TATIANA RODRIGUES FRAGA

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEASES DE *LEPTOSPIRA* ENVOLVIDAS COM
MECANISMOS DE ESCAPE DO SISTEMA COMPLEMENTO HUMANO**

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

São Paulo
2014

TATIANA RODRIGUES FRAGA

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEASES DE *LEPTOSPIRA* ENVOLVIDAS COM
MECANISMOS DE ESCAPE DO SISTEMA COMPLEMENTO HUMANO**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Lourdes Isaac

Co-orientadora: Profa. Dra. Angela Silva
Barbosa

Versão original

São Paulo
2014

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

reprodução não autorizada pelo autor

Fraga, Tatiana Rodrigues.

Identificação de proteases de *Leptospira* envolvidas com mecanismos de escape do sistema complemento humano. / Tatiana Rodrigues Fraga. – São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Lourdes Isaac.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Mecanismo de evasão imune empregados por leptospirosas patogênicas para escapar do sistema complemento humano.

Versão do título para o inglês: Identification of leptospiral proteases involved with evasion mechanisms from human complement system.

1. Imunoquímica 2. Complemento imunológico 3. Imunoproteínas 4. Leptospirose 5. Proteínas recombinantes 6. Infecções bacterianas
I. Isaac, Profa. Dra. Lourdes II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB066/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Tatiana Rodrigues Fraga.

Título da Tese: Identificação de proteases de *Leptospira* envolvidas com mecanismos de escape do sistema complemento humano.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

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

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Linen Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **108** nas fls. **75** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Lourdes Isaac, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Identificação de proteases de leptospira envolvidas com mecanismos de escape do sistema complemento humano** do qual participou(aram) o(s) alunos **Tatiana Rodrigues Fraga e os pesquisadores Ângela Silva Barbosa, Patrícia Antonio Estima Abreu**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **25.08.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 26 de agosto de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

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

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 25 de setembro de 2009.

PARECER 916 /CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, na sessão de 24.09.2009 **APROVOU** o projeto intitulado: *"Identificação de proteases de leptospira envolvidas com mecanismos de escape do sistema complemento humano"*. sob responsabilidade de execução dos autores Profa. Dra. Lourdes Isaac e a aluna Tatiana Rodrigues Fraga.

Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em
24.09.2010

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO MARINHO ANDRADE ZANOTTO
Vice-Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP
No Exercício

*Aos meus pais e minha querida avó,
pelo amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Às minhas queridas orientadoras Dra. Lourdes Isaac e Dra. Angela Silva Barbosa pela grande amizade de todos esses anos, pela confiança em meu trabalho e neste projeto. Muitíssimo obrigada por tudo, sem palavras para agradecer tudo o que fizeram por mim!

Às colombianas Mónica Castiblanco e Adriana Granados, amigas mais que especiais que me acompanharam em todos os momentos do doutorado. Ufa! Conseguimos meninas!

À estagiária de iniciação científica Daniella Courrol que contribuiu em diversos experimentos desta tese. Sua alegria e motivação foram simplesmente fundamentais, Dani!

Aos membros mais recentes do Laboratório de Complemento: Iris, Karina e Leandro, que são amigos queridíssimos e excelentes pessoas para se ter ao lado no dia a dia. Adoro vocês!

À Marlene P. C. Florido e à Paula e pelos trabalhos técnicos, pela amizade e grande apoio, sempre.

Aos pesquisadores e funcionários do Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária da USP: Dr. Sílvio Arruda Vasconcellos, Zenáide M. de Moraes e Gisele O. Souza, que forneceram as culturas de leptospiros para a realização desse trabalho. Obrigada por sempre nos ajudarem com tudo o que precisamos e pela grande amizade de tantos anos.

Aos pesquisadores e funcionários do Laboratório de Proteases da Unifesp: Dr. Luiz Juliano, Izaurinha, Márcia, Lilian, Aline, Juliana e Débora, pela ajuda com os experimentos de atividade, purificação e sequenciamento das proteínas. Obrigada por me receberem tão bem no laboratório de vocês!

Às meninas do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan: Ludmila, Lígia, Vanessa, Demétria, Lídia, Matilde e Tatiana. Obrigada pela amizade e pela doçura de todas vocês!

À Denize Monaris, Amane, Dani Yamamoto e Danielly, grandes amigas e excelentes pessoas.

À Dra. Fernanda Portaro do Instituto Butantan, pelos ótimos conselhos de experimentos e pela grande prestatividade.

Ao Dr. Shaker Chuck Farah do Instituto de Química da Universidade de São Paulo pela grande ajuda com os manuscritos e pelas ótimas sugestões.

À Dra. Lígia Morganti e Dra. Rosa do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares pela amizade de longa data e por sempre estarem dispostas a nos ajudar.

Aos queridíssimos vizinhos do Laboratório de Imunodeficiências: Cris, Otávio, Paulo, Lena, Marília, Zé, Marina, Stefanie, Mateo, Núria, Edgar, Walmir, Patrícia, Angela e Marco, pela ótima amizade e convivência. Adoro muito todos vocês!

Aos amigos do Departamento de Imunologia: Susana, Tiago, Camila, Fernanda, Michele e Cristiane Nafah que são pessoas muito especiais na minha vida!

À Sílvia Bazan, Kátia Françoso, Carol Almeida, Erica Ata, Cris Makiyama e Cris Takahashi, queridas amigas de longa data que sempre estiveram ao meu lado!

Aos meus amigos e professores da Aliança Francesa: Gisele, Tati Andrade, Rodrigo, Paulo, Maria Augusta, Fernando, Ana, Lucas, Larissa e Ataiena. Obrigada por tornarem minhas manhãs de sábado maravilhosas!

Aos funcionários do Departamento de Imunologia Milton, Otacílio, Moisés, Márcio, Celso, João, Aurea e todos aqueles que sempre estão dispostos a nos ajudar no dia a dia do ICB.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

“Uma gota de amor é mais que um oceano de intelecto.”

Blaise Pascal

RESUMO

Fraga TR. Identificação de proteases de leptospira envolvidas com mecanismos de escape do sistema complemento humano. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

A leptospirose é uma zoonose mundialmente disseminada que representa um grave problema de saúde pública. Microrganismos patogênicos, notadamente os que atingem a circulação sanguínea como a leptospira, desenvolveram múltiplas estratégias de evasão ao sistema imune do hospedeiro, em especial ao sistema complemento. Neste contexto, o principal objetivo deste trabalho foi analisar a secreção de proteases capazes de clivar moléculas do sistema complemento por leptospirosas patogênicas, o que constituiria um novo mecanismo de evasão imune para este patógeno. Nove estirpes de leptospira foram selecionadas para este trabalho: sete patogênicas e duas saprófitas. Para a obtenção dos sobrenadantes de cultura, bactérias cultivadas em meio EMJH modificado foram transferidas para PBS pH 7,4 e incubadas a 37 °C por diferentes tempos. Após incubação, os sobrenadantes foram coletados e analisados quanto à atividade inibitória e proteolítica sobre componentes do sistema complemento. O efeito sobre a ativação do complemento foi quantificado por ELISA, onde a atividade das três vias foi medida separadamente. Verificamos que o sobrenadante de leptospirosas patogênicas foi capaz de inibir a ativação de todas as vias do complemento, enquanto o da espécie saprófita não inibiu nenhuma delas. Em seguida, com objetivo de analisar se essa atividade inibitória poderia estar relacionada com a secreção de proteases, ensaios de clivagem enzimática foram efetuados. Os sobrenadantes das nove estirpes de leptospira foram incubados com diferentes proteínas do complemento a 37 °C e as clivagens analisadas por *Western blot*. As proteases presentes nos sobrenadantes das leptospirosas patogênicas apresentaram atividade proteolítica sobre as moléculas: C3, C3b e iC3b, proteínas da via alternativa (Fator B), clássica e das lectinas (C2 e C4b). Os componentes C3, C4, C2 e Fator B também foram clivados quando soro humano normal foi utilizado como fonte de complemento. Contudo, algumas proteínas tais como IgG humana, C1q, Fator D e Properdina não foram alvos das proteases de leptospira. De forma interessante, as proteases conseguiram atuar em sinergia com os reguladores do hospedeiro Fator I e Fator H na clivagem de C3b, promovendo uma inativação eficiente da molécula. Para melhor caracterizar a proteólise de C3, fragmentos de clivagem tiveram sua porção N-terminal sequenciada por degradação de Edman. Esta análise revelou que ambas as cadeias α e β de C3 são alvos das proteases. Além disso, ensaios de inibição enzimática foram efetuados para determinar as classes de proteases envolvidas nas clivagens. Verificamos que a atividade proteolítica foi inibida pela 1,10-fenantrolina, sugerindo a participação de metalo proteases. Selecionamos uma metalo protease da família das termolisinas, presente apenas nas espécies patogênicas de leptospira, para ser produzida como proteína recombinante em *E. coli*. A termolisina (fragmento PepSY-M4) apresentou atividade proteolítica sobre a molécula de C3 purificada e também no soro humano normal, o que indica que esta proteína pode ser uma das proteases responsáveis pelas clivagens observadas com o sobrenadante total das leptospirosas. Deste modo, podemos concluir que proteases produzidas pelas estirpes patogênicas de leptospira são capazes de degradar moléculas efetoras do sistema complemento, representando potenciais alvos para o desenvolvimento de novas terapias e estratégias profiláticas em leptospirose.

Palavras-chave: Sistema complemento. Leptospirose. Evasão Imune. Proteases.

ABSTRACT

Fraga TR. Identification of leptospiral proteases involved in immune evasion mechanisms from the human complement system. [Ph. D. thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Leptospirosis is a worldwide zoonosis of public health importance. Pathogenic microorganisms, notably those who reach the blood circulation as leptospira, have evolved multiple strategies to escape the host immune defenses, in particular, the complement system. In this context, the aim of this work was to study the secretion of proteases that cleave complement proteins by pathogenic leptospires, what could constitute a new immune evasion mechanism for this pathogen. Nine leptospira strains were selected to be studied in this work: seven pathogenic and two saprophytic. To obtain the leptospiral culture supernatants, bacteria were cultivated in modified EMJH medium, transferred to PBS pH 7.4 and incubated at 37 °C for different times. The supernatants were then collected and submitted to inhibitory and proteolytic assays. The effect of the leptospiral supernatants on complement activation was quantified by ELISA, an assay where the activity of the three pathways was assessed separately. We observed that the culture supernatant of pathogenic leptospires was able to inhibit all complement pathways. In contrast, the saprophytic strain did not cause any inhibition. To analyze whether this inhibitory effect could be related to the activity of proteases, enzymatic assays were performed. The supernatants of the nine leptospira strains were incubated with different complement proteins at 37°C, and the cleavages were analyzed by Western blot. The proteases present in the supernatants of pathogenic leptospires were able to cleave diverse complement proteins such as C3, C3b and iC3b, proteins from the alternative (Factor B), classical and lectin pathways (C4b and C2). The components C3, C4, C2 and Factor B were also cleaved when normal human serum was used as a complement source. However, some complement proteins were not targeted by the proteases such as C1q, Factor D, Properdin and also human IgG. Interestingly, the proteases worked in synergy with the host regulators Factor I and Factor H in C3b cleavage, promoting an efficient inactivation of this molecule. To further characterize the proteolysis of C3, cleavage fragments had their N-terminal portion sequenced by Edman degradation. This analysis revealed that both α - and β - chains of C3 were targeted by the proteases. In addition, inhibition assays were performed and revealed that the proteolytic activity was abolished by 1,10-phenanthroline, suggesting the participation of metalloproteases. A leptospiral metalloprotease from the thermolysin family, present only in pathogenic species, was produced as a recombinant protein in *E. coli*. The thermolysin (fragment PepSY-M4) was able to cleave C3 in the purified form and also in normal human serum, suggesting that this protein could be one of the proteases responsible for the cleavages observed with the leptospiral supernatants. Therefore, we can conclude that proteases secreted by pathogenic leptospires are able to degrade complement effector molecules, and represent potential targets for the development of new therapies and prophylactic approaches in leptospirosis.

Keywords: Complement system. Leptospirosis. Immune evasion. Proteases.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Amp - Ampicilina

Amp^R - Sítio de resistência à ampicilina

AP - *Alternative pathway*

BLAST - *Basic local alignment search tool*

C1-INH - Proteína inibidora de C1

C4BP - *C4b Binding Protein*

C5aR - Receptor da anafilotoxina C5a

CD - *Cluster of differentiation*

CLUSTALW - *Multiple alignment of nucleic acid and protein sequences*

Col E1 - Origem de replicação bacteriana

CR - *Complement Receptor*

DAF - *Decay Accelerating Factor*

DO - Densidade óptica

E. coli - *Escherichia coli*

E-64 - [1-[N-[(L-3-trans-carboxioxirano-2-carbonil)-L-leucil]amino]-4-guanidinobutano]

EcoRI - Endonuclease de restrição I de *Escherichia coli*

EDTA - Ácido etileno-diamino-tetra-acético

EGTA - Ácido tetra-acético-etileno-glicol

ELISA - *Enzyme linked immunosorbent assay*

EMJH - Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris

F - Ficolina

FB - Fator B

FD - Fator D

FH - Fator H

FI - Fator I

FTP - *Fungalysin/thermolysin propeptide motif*

GVB⁺⁺ - *Gelatin Veronal Buffer* com cálcio e magnésio

HindIII - Endonuclease de restrição III de *Haemophilus influenzae*

HIV - *Human immunodeficiency virus*

IgM - Imunoglobulina M

IgG - Imunoglobulina G

IPTG - Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

kDa - kilo Dalton

L. - *Leptospira*

lacZ - Promotor da beta-galactosidase

LB - Meio Luria-Bertani

LBon - Meio Luria-Bertani sem cloreto de sódio

LcpA - *Leptospiral complement regulator-acquiring protein A*

LIC - *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni

Lig - *Leptospiral Immunoglobulin-like protein*

LPS - Lipopolissacarídeo

M4 - Domínio catalítico pertencente à família peptidase M4

M4_C - Domínio catalítico carboxi-terminal pertencente à família peptidase M4

MAC - *Membrane Attack Complex*

MASP - *Mannose associated serine-protease*

MBL - *Mannose Binding Lectin*

MCP - *Membrane Co-factor Protein*

MOPS - Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico

MS - Ministério da Saúde

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

OPD - o-dihidrocloreto de felilenodiamina

ORF - *Open Reading Frame*

P - Properdina

pb - Pares de bases

PBS - *Phosphate buffer saline*

PCR - *Polimerase chain reaction*

PDB - *Protein Data Bank*

PFAM - *Protein family database*

PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonilo

PVDF - Difluoreto de polivinilideno

RCA - *Regulators of complement activation*

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

SMC - Sítio de múltiplas clonagens

SHN - Soro humano normal

TAE - Tampão tris-Acetato-EDTA

Tris - (hidroxidometil) amino-metano

U - Unidade de atividade enzimática

VA - Via alternativa

VC - Via clássica

VL - Via das lectinas

WHO - *World Health Organization*

XGal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

XhoI - Endonuclease de restrição I de *Xhantomonas holcicola*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. O ciclo de transmissão da leptospirose.....	25
Figura 2. Imagens de leptospiras e representação esquemática da membrana da espiroqueta.....	28
Figura 3. Ativação do sistema complemento.....	33
Figura 4. Representação esquemática da clivagem de C3 e seus fragmentos.....	35
Figura 5. Representação esquemática da clivagem de C4 e seus fragmentos.....	37
Figura 6. Representação esquemática da clivagem de C5 e formação do complexo de ataque à membrana.....	39
Figura 7. Representação esquemática do Fator B e C2 e formação das C3 convertases.....	41
Figura 8. Mecanismos de evasão ao sistema complemento.....	48
Figura 9. As leptospiras patogênicas evadem o sistema complemento pela aquisição de reguladores do hospedeiro	51
Figura 10. As leptospiras patogênicas evadem o sistema complemento pelo recrutamento do plasminogênio	52
Figura 11. Leptospiras patogênicas e saprófitas selecionadas para estudo	58
Figura 12. Fragmentos da termolisina codificada pelo gene LIC13322 selecionados para serem produzidos como proteínas recombinantes.....	64
Figura 13. Representação esquemática dos vetores pGEMT-Easy e pAE.....	66
Figura 14. Perfil eletroforético das proteínas secretadas pelas diferentes estirpes de leptospira	75
Figura 15. Sobrenadante da leptospira patogênica inibe as três vias de ativação do sistema complemento.....	77
Figura 16. Proteases secretadas por leptospiras patogênicas clivam o fragmento C3b do complemento	79
Figura 17. Clivagem do fragmento C3b pelas proteases de leptospira em sinergia com os reguladores do hospedeiro FI e FH.....	81
Figura 18. Proteases secretadas pelas leptospiras patogênicas clivam proteínas das três vias do sistema complemento.....	84

Figura 19. Proteases secretadas pelas leptospiiras patogênicas não apresentam atividade proteolítica sobre C1q, C4, Fator D, Properdina e IgG humana.....	85
Figura 20. As proteases secretadas pelas leptospiiras patogênicas apresentam atividade proteolítica mesmo em quantidades reduzidas.....	86
Figura 21. Sítios de clivagem das proteases de leptospira na molécula C3 do complemento	88
Figura 22. Localização dos sítios de clivagem das proteases de leptospira na molécula C3 do sistema complemento	89
Figura 23. Proteases secretadas pelas leptospiiras patogênicas clivam proteínas do complemento no soro humano normal	91
Figura 24. Proteases secretadas pelas leptospiiras patogênicas clivam a proteína C5 apenas quando purificada.....	92
Figura 25. Proteases secretadas pelas leptospiiras patogênicas são inibidas pela 1,10-fenantrolina	94
Figura 26. Localização cromossômica dos genes que codificam termolisinas em <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni	96
Figura 27. Representação esquemática da termolisina codificada pelo gene LIC13322 de <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni	97
Figura 28. Amplificação e clonagem dos insertos gênicos da termolisina no vetor pGEMT-Easy	98
Figura 29. Clonagem dos insertos gênicos da termolisina no vetor de expressão pAE....	99
Figura 30. Expressão dos fragmentos da termolisina em <i>E. coli</i>	100
Figura 31. Purificação dos fragmentos da termolisina por cromatografia de afinidade a metal.....	101
Figura 32. Proteínas dos sobrenadantes das leptospiiras patogênicas são reconhecidas por anticorpo contra o fragmento M4 da termolisina.....	103
Figura 33. O fragmento PepSY-M4 da termolisina é reconhecido pelo soro de hamsters infectados com leptospiiras patogênicas	104
Figura 34. O fragmento PepSY-M4 da termolisina cliva a proteína C3 e é inibido pela 1,10-fenantrolina.....	106
Figura 35. O fragmento PepSY-M4 da termolisina atua em sinergia com reguladores do hospedeiro na clivagem das proteínas C3 e C3b do complemento	108

Figura 36. O fragmento PepSY-M4 da termolisina cliva a proteína C3 presente no soro humano normal.....	109
Figura 37. Representação esquemática do possível mecanismo de ação da termolisina sobre as moléculas C3 e C3b do sistema complemento.....	110
Figura 38. Purificação de proteínas do sobrenadante de <i>L. interrogans</i> sorovar Kennewicki estirpe Fromm por exclusão molecular.....	112
Figura 39. A secreção de proteases pelas leptospiras patogênicas constitui um possível mecanismo de evasão imune ao sistema complemento	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de leptospira determinadas segundo a classificação genotípica	26
Tabela 2. Proteases de patógenos que clivam moléculas do sistema complemento.....	47
Tabela 3. Proteínas de leptospira que interagem com moléculas do hospedeiro como mecanismo de evasão imune	50
Tabela 4. Anticorpos utilizados nos ensaios de <i>Western blot</i> e <i>ELISA</i>	59
Tabela 5. Inibidores de protease utilizados nos ensaios de inibição.....	63
Tabela 6. Fragmentos amplificados do gene LIC13322 que codifica para a termolisina de leptospira selecionada para estudo	64
Tabela 7. <i>Primers</i> utilizados nos sequenciamentos dos insertos gênicos clonados em pGEM-T Easy e pAE.....	68
Tabela 8. Etapas da purificação por cromatografia de afinidade a metal	69
Tabela 9. Identidade e similaridade entre os domínios catalíticos M4 da termolisina de leptospira codificada pelo gene LIC13322 e metalo proteases de patógenos capazes de clivar proteínas do complemento.....	96

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 A leptospirose.....	23
1.2 As leptospiras	26
1.3 A resposta imune na leptospirose.....	29
1.4 O sistema complemento.....	31
<i>1.4.1 A proteína C3</i>	<i>34</i>
<i>1.4.2 A proteína C4.....</i>	<i>36</i>
<i>1.4.3 A proteína C5</i>	<i>38</i>
<i>1.4.4 As proteínas C2 e Fator B</i>	<i>40</i>
1.5 Mecanismos de evasão ao sistema complemento	42
1.6 Mecanismos de evasão ao sistema complemento apresentados por leptospiras patogênicas	49
2 OBJETIVOS	53
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
3.1 Soluções e reagentes	56
3.2 Estirpes de leptospira, condições de cultivo e secreção	58
3.3 Proteínas do sistema complemento e anticorpos	59
3.4 Métodos de separação e análise de amostras	60
<i>3.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e Western blot.....</i>	<i>60</i>
<i>3.4.2 Dosagem de proteína e de lipopolissacarídeo</i>	<i>60</i>
3.5 Análise da inibição das três vias do sistema complemento	61
3.6 Análise da atividade proteolítica sobre componentes do sistema complemento.....	62
3.7 Sequenciamento amino-terminal dos produtos de clivagem de C3	62

3.8 Identificação das classes de proteases envolvidas nas clivagens das proteínas do sistema complemento.....	62
3.9 Expressão da termolisina recombinante em <i>Escherichia coli</i>	63
3.9.1 Amplificação do gene LIC13322 por reação em cadeia da polimerase (PCR)	63
3.9.2 Bactérias e vetores utilizados na produção das proteínas recombinantes.....	65
3.9.3 Preparação e transformação de <i>Escherichia coli</i> competentes	66
3.9.4 Clonagem dos insertos gênicos no vetor pGEM-T Easy e subclonagem no vetor de expressão pAE.....	67
3.9.5 Expressão e purificação das proteínas recombinantes	68
3.10 Análise da presença de proteínas com domínio peptidase M4 nos sobrenadantes de cultura das leptospiros	69
3.11 Infecção de hamsters com leptospiros patogênicos	70
3.12 Análise da antigenicidade da termolisina recombinante	71
3.13 Análise da atividade proteolítica da termolisina recombinante.....	71
3.14 Purificação de proteínas do sobrenadante de cultura das leptospiros patogênicos .	72
4 RESULTADOS	73
4.1 Obtenção e caracterização eletroforética das proteínas secretadas pelas leptospiros ...	74
4.2 O sobrenadante de leptospiros patogênicos inibe as três vias de ativação do sistema complemento	76
4.3 Proteases secretadas pelas leptospiros patogênicas são capazes de clivar o fragmento C3b do sistema complemento	78
4.4 Proteases secretadas pelas leptospiros patogênicas atuam em sinergia com reguladores do hospedeiro para inativar o fragmento C3b.....	80
4.5 Proteases secretadas por diferentes estirpes de leptospiros patogênicas clivam proteínas das três vias do sistema complemento.....	82
4.6 As proteases secretadas pelas leptospiros patogênicas clivam as cadeias α e β da molécula C3	87
4.7 As proteases secretadas pelas leptospiros patogênicas clivam proteínas do complemento no soro humano normal	90

4.8 As proteases secretadas pelas leptospiros patogênicas são inibidas pela 1,10-fenatrolina	93
4.9 Termolisinas: metalo proteases de leptospira	95
<i>4.9.1 Produção da termolisina recombinante em sistema heterólogo</i>	<i>97</i>
<i>4.9.2 Análise da presença de proteínas com domínio peptidase M4 nos sobrenadantes de cultura das leptospiros</i>	<i>102</i>
<i>4.9.3 Análise da antigenicidade da termolisina recombinante</i>	<i>104</i>
<i>4.9.4 Análise da atividade proteolítica da termolisina recombinante</i>	<i>105</i>
4.10 Purificação de proteínas do sobrenadante de cultura das leptospiros patogênicas	111
5 DISCUSSÃO	113
6 CONCLUSÕES.....	124
REFERÊNCIAS	126
APÊNDICE A - Apresentações orais em congressos.....	141
APÊNDICE B - Trabalhos apresentados em congressos na forma de pôster	142
APÊNDICE C - Capítulo de livro	145
APÊNDICE D - Artigos publicados.....	146

1 INTRODUÇÃO

1.1 A leptospirose

A leptospirose é uma zoonose causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* (Faine et al., 1999). A doença constitui um importante problema de saúde pública, com aproximadamente 500.000 casos de leptospirose grave reportados a cada ano mundialmente. As principais regiões endêmicas incluem o Caribe, Sudeste Asiático, Oceania, América do Sul e Central (Hartskeerl et al., 2011). A elevada incidência da doença está principalmente relacionada a comunidades onde não há condições de saneamento apropriadas e a regiões propícias a enchentes. Nestes locais ocorre a contaminação da água por leptospirosas patogênicas, as quais são eliminadas na urina de roedores, os principais reservatórios urbanos da bactéria (Sakata et al., 1992). Além disso, também há relatos de infecção por leptospirosas decorrentes da prática de esportes aquáticos e pela exposição ocupacional, como por exemplo, em arrozais, fazendas e abatedouros (Adler, de la Peña Moctezuma, 2010; Picardeau, 2013).

Desde 1985, a leptospirose humana é uma doença de notificação compulsória no Brasil. Segundo o Sistema de Vigilância Epidemiológica, no período de 1997 a 2013 foram confirmados 57.968 casos de leptospirose. Considerando que parte das infecções não é notificada e que a apresentação subclínica da doença é com frequência erroneamente diagnosticada como “síndrome viral”, pode-se inferir que o número de casos confirmados reflita apenas uma pequena parcela do número real de casos no Brasil (Brasil, 2014).

As leptospirosas causam infecções assintomáticas em seus hospedeiros de manutenção, nos quais colonizam os túbulos renais proximais, sendo eliminadas na urina (Figura 1). A infecção ocorre pela penetração das bactérias em mucosas intactas e na pele lesada. As leptospirosas se disseminam pela circulação sanguínea por todo o organismo, concentrando-se principalmente no fígado, nos rins e nos pulmões (Ko et al., 2009; Levett, 2001).

A leptospirose pode se apresentar como uma infecção subclínica, com sintomas semelhantes aos da gripe, como febre e dor de cabeça, ou evoluir para doença sistêmica grave, a síndrome de *Weil*, que é caracterizada por insuficiência renal, hepática e hemorragia pulmonar. As diferentes manifestações da doença podem ser explicadas pela carga bacteriana, virulência da estirpe de leptospirosas infectante e pelo estado de saúde do paciente (Bharti et al., 2003; Picardeau, 2013).

A forma subclínica da leptospirose pode ser tratada com antibióticos orais como a doxaciclina e a eritromicina. Nos casos mais graves, o medicamento de escolha é a penicilina intravenosa. A terapia de suporte, que consiste principalmente na diálise e ventilação mecânica, é importante quando há insuficiência renal, desequilíbrio hidroeletrolítico e hemorragia pulmonar (World Health Organization, 2003).

A realização de exames laboratoriais para a leptospirose é de grande importância, pois os sintomas clínicos são polimórficos e dificultam o diagnóstico. A confirmação laboratorial da doença é baseada na demonstração da presença de leptospiros, fragmentos de DNA ou detecção de anticorpos específicos (Musso, La Scola, 2013).

O cultivo de leptospiros a partir do sangue ou líquido e a reação de polimerase em cadeia (PCR) podem ser positivos em amostras coletadas na primeira semana da doença (fase de bacteremia). As leptospiros são isoladas com relativa facilidade em meio *Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris* (EMJH). Contudo, como o crescimento das bactérias é lento, o resultado das culturas é frequentemente retrospectivo em relação à evolução da doença. Já as técnicas de PCR são mais sensíveis e rápidas que o cultivo da espiroqueta, representando uma alternativa para o diagnóstico da doença (Ahmed et al., 2009).

A partir da segunda semana da doença as bactérias e os fragmentos de DNA são encontrados na urina e os testes sorológicos podem ser positivos. O teste de referência recomendado pela Organização Mundial da Saúde é o MAT (teste de aglutinação microscópica), no qual o soro do paciente reage com uma suspensão de leptospiros vivos ou inativados (WHO, 2003). Após incubação, observa-se aglutinação em microscópio de campo escuro se houver reação antígeno-anticorpo. A interpretação dos resultados é baseada na comparação de amostras sequenciais, colhidas com intervalo mínimo de 10 dias. O diagnóstico é considerado positivo somente se houver uma elevação de pelo menos 4 vezes no título de anticorpos aglutinantes. O MAT é um ensaio quantitativo e de alta complexidade, pois envolve a manutenção de diversas estirpes de referência. Alternativamente, o teste sorológico ELISA-IgM também pode ser utilizado para o diagnóstico da leptospirose. Observa-se reação positiva em amostras coletadas de seis a oito dias após o aparecimento dos primeiros sinais clínicos da doença. Como antígenos para este teste são utilizados extratos totais de leptospiros ou proteínas recombinantes tais como LipL32, LigA e OmpL1 (Flannery et al., 2001; Signorini et al., 2013).

Figura 1. O ciclo de transmissão da leptospirose. Os principais reservatórios das leptospirosas patogênicas são os roedores, os mamíferos domésticos e selvagens. As bactérias são eliminadas na urina destes animais e contaminam a água e o solo. Em roedores, a leptospirose apresenta-se como uma infecção crônica e assintomática. Já em mamíferos, podem ocorrer diferentes manifestações tais como abortos em bovinos e uveíte em cavalos. A manutenção da leptospirose nestes animais ocorre pela transmissão interna dentro dos rebanhos ou pelo contato contínuo com roedores. Os humanos são hospedeiros acidentais e podem ser infectados pelo contato direto com animais ou com a água e solo contaminados. Após a penetração pela pele ou mucosas, as leptospirosas se disseminam pela circulação sanguínea e colonizam órgãos vitais como fígado, rins e pulmões. As principais manifestações clínicas da forma grave da doença incluem hepatite, nefrite e hemorragia pulmonar. Os humanos não são considerados reservatórios de leptospirosas, uma vez que não eliminam uma quantidade de bactérias suficiente para a transmissão.

1.2 As leptospiros

O gênero *Leptospira* pertence à família *Leptospiraceae* e à ordem *Spirochaetales* (Faine et al., 1999). Dois tipos de classificação taxonômica coexistem, um baseado em determinantes antigênicos e o outro em determinantes genéticos. No primeiro, o gênero *Leptospira* foi inicialmente dividido em duas espécies: *L. biflexa*, que engloba as bactérias saprófitas, e *L. interrogans*, que reúne as patogênicas (Levett, 2001). A base dessa classificação é sorológica, resultando na determinação dos diferentes sorovares, os quais são distinguidos pela heterogeneidade estrutural dos carboidratos do lipopolissacarídeo (LPS) da bactéria. Os sorovares antigenicamente relacionados são agrupados em sorogrupos. O segundo tipo de classificação, o genotípico, foi efetuado com base em hibridação por homologia de DNA. Deste modo foram determinadas 20 espécies genômicas diferentes de leptospira (Tabela 1) (Brenner et al., 1999; Smythe et al., 2013).

Tabela 1. Espécies de leptospira determinadas segundo a classificação genotípica.

Patogenicidade	Espécie genômica	Patogenicidade	Espécie genômica
Patogênicas	<i>Leptospira alexanderi</i>	Saprófitas	<i>Leptospira biflexa</i>
	<i>Leptospira borgpetersenii</i>		<i>Leptospira meyeri</i>
	<i>Leptospira weilii</i>		<i>Leptospira wolbachii</i>
	<i>Leptospira santarosai</i>		<i>Leptospira vanthiellii</i> (espécie genômica 3)
	<i>Leptospira noguchii</i>		<i>Leptospira terpstrae</i> (espécie genômica 4)
	<i>Leptospira interrogans</i>		<i>Leptospira yanagawae</i> (espécie genômica 5)
	<i>Leptospira kirschneri</i>		
	<i>Leptospira kmetyi</i>		
	<i>Leptospira alstonii</i> (espécie genômica 1)		
Intermediárias	<i>Leptospira inadai</i>		
	<i>Leptospira licerasiae</i>		
	<i>Leptospira wolffii</i>		
	<i>Leptospira broomii</i>		
	<i>Leptospira fainei</i>		

Fonte: Modificado de Brenner et al. (1999); Smythe et al. (2013).

As leptospiiras são bactérias espiroquetas aeróbias, com estrutura helicoidal, que apresentam aproximadamente 0,1 μm de largura e 6 a 20 μm de comprimento (Figura 2 A e B). Estas espiroquetas possuem membrana citoplasmática e parede celular, a qual é envolta por uma membrana externa contendo lipoproteínas e porinas, que permitem troca de solutos entre o espaço periplasmático e o meio ambiente (Figura 2 C). A movimentação do microrganismo está associada a dois flagelos periplasmáticos localizados em extremidades opostas da bactéria. Álcoois e ácidos graxos são utilizados como fonte de carbono e energia (Faine et al., 1999; Ko et al., 2009).

O lipopolissacarídeo (LPS) das leptospiiras possui uma composição semelhante ao das bactérias Gram-negativas, contudo com baixa atividade endotóxica. Anticorpos anti-LPS conferem proteção à infecção por leptospiiras. De fato, as vacinas veterinárias disponíveis, as chamadas bacterinas, são compostas por leptospiiras inativadas ou preparações de membrana externa, as quais são ricas em LPS. Entretanto, a principal desvantagem das bacterinas é o fato de não induzirem memória imunológica de longa duração, exigindo revacinações anuais ou semestrais. Além disso, devido à elevada heterogeneidade da porção de carboidrato do LPS, as bacterinas protegem apenas contra os sorogrupos presentes na preparação, não conferindo, portanto, proteção cruzada. Atualmente tem sido priorizado o desenvolvimento de vacinas com componente(s) bem definido(s), com o objetivo de alcançar máxima proteção por longo tempo e com o mínimo de efeitos adversos (Faine et al., 1999; McBride et al., 2005).

O sequenciamento dos genomas de diversos microrganismos aliado aos avanços na bioinformática revolucionaram o campo da vacinologia, possibilitando a identificação de candidatos vacinais sem a necessidade de cultivo do patógeno. Essa abordagem, chamada de vacinologia reversa, tem possibilitado a identificação de potenciais antígenos vacinais em leptospira. Nos últimos anos, leptospiiras patogênicas e saprófitas tiveram seus genomas sequenciados (Bulach et al., 2006; Chou et al., 2012; Nascimento et al., 2004; Picardeau et al., 2008; Ren et al., 2003; Ricaldi et al., 2012). Dentre os potenciais candidatos vacinais identificados nos genomas, as proteínas Lig (*leptospiral immunoglobulin-like proteins*) são as mais promissoras. Estas proteínas são expressas apenas durante a infecção e estão envolvidas em processos de evasão imune e adesão de leptospiiras (Castiblanco-Valencia et al., 2012; Choy et al., 2007; Lin et al., 2009, 2011). Diferentes fragmentos da proteína LigA foram capazes de conferir 80 a 100% de proteção em modelo animal. Contudo, embora tal proteína confira proteção, reduzindo a mortalidade dos animais, estes ainda continuam portadores da bactéria. Assim, estudos adicionais têm sido realizados no sentido de também prevenir a

colonização renal nos animais infectados (Coutinho et al., 2011; Hartwig et al., 2014; Silva et al., 2007).

Figura 2. Imagens de leptospiros e representação esquemática da membrana da espiroqueta. (A) Imagem captada por microscopia eletrônica de *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae. As leptospiros possuem estrutura helicoidal e apresentam aproximadamente 0,1 μm de largura e 6 a 20 μm de comprimento. (B) Fotomicrografia de uma secção de tecido renal de *Rattus norvegicus*. As leptospiros encontram-se no lúmen dos túbulos renais proximais como estruturas filamentosas impregnadas por prata segundo coloração de Warthin-Starry (aumento de 400X). (C) Nesta representação esquemática da membrana das leptospiros patogênicas pode-se notar que a membrana interna (MI) está intimamente associada à parede celular de peptídeoglicanos (PG), a qual é separada da membrana externa (ME) pelo espaço periplasmático, no qual se localiza o endoflagelo (não representado na figura). Dentre os componentes da ME da bactéria destacam-se o lipopolissacarídeo (LPS), proteínas transmembrana, como a porina OmpL1, e diversas proteínas expostas na superfície como LigA, LigB, LenA, LenB, LcpA e Loa22. A lipoproteína LipL32 é representada como uma proteína de subsuperfície. Fonte: Modificado de (A) Levett (2001), (B) Ko et al. (2009) e (C) Fraga et al. (2011).

1.3 A resposta imune na leptospirose

A infecção por leptospiros ocorre após a penetração da bactéria na pele lesada ou mucosas, seguida pela disseminação do patógeno via hematogênica para todo o organismo. Os principais órgãos-alvo são o fígado, os rins e os pulmões (Faine et al., 1999).

O sistema imune inato constitui a primeira linha de defesa do hospedeiro. Durante as primeiras horas de infecção, a ativação da via alternativa do sistema complemento desempenha um papel fundamental. De fato, quando leptospiros saprófitas são incubadas com soro humano normal, estas são rapidamente eliminadas. Contudo, o mesmo não ocorre com as leptospiros patogênicas, as quais são capazes de sobreviver à ação do complemento, possibilitando a disseminação pelo organismo e o estabelecimento da infecção (Barbosa et al., 2009; Meri et al., 2005).

As leptospiros são primeiramente detectadas pelas células do sistema imune pelos *pathogen activated receptors* (PRRs), que reconhecem motivos moleculares conhecidos como *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). Os PRRs são divididos em receptores endocíticos, de sinalização e secretados. Duas principais famílias de PRRs de sinalização desempenham um papel fundamental no reconhecimento de patógenos: os *toll-like receptors* (TLRs) e os *nod-like receptors* (NLRs) (Mogensen, 2009).

Dentre os TLRs, TLR2 e TLR4 têm sido os mais estudados na leptospirose. LPS de bactérias Gram-negativas é capaz de ativar o TLR4 (Miller et al., 2005). Contudo, o LPS das leptospiros, que é menos endotóxico que o LPS das bactérias Gram-negativas, ativa macrófagos humanos pelo TLR2 (Werts et al., 2001). Já em camundongos, que são resistentes à leptospirose, foi observada ativação de ambos receptores TLR2 e TLR4 (Chassin et al., 2009; Nahori et al., 2005). Acredita-se que esta diferença de reconhecimento entre macrófagos humanos e murinos possa estar relacionada com a susceptibilidade ou resistência à infecção. De fato, além da diferença no reconhecimento, observou-se também que ao infectar macrófagos humanos (linhagem celular THP-1) com leptospiros patogênicas, estas se localizam principalmente no citosol, sendo capazes de se multiplicar e induzir apoptose destas células fagocitárias. Contudo, em linhagens de macrófagos murinos (J774A.1), as leptospiros são encontradas majoritariamente no fagolisossomo, sendo eliminadas pelas células (Li et al., 2010). Deste modo, pode-se inferir que a ativação do TLR4 juntamente com a eliminação das bactérias localizadas no fagolisossomo dos macrófagos murinos possam estar relacionadas à

maior resistência dos camundongos, em contraste à susceptibilidade observada em humanos (Fraga et al., 2011).

Os leucócitos polimorfonucleares (PMNs) constituem a maior população de fagócitos circulantes. A atuação de mecanismos dependentes e independentes de oxigênio utilizados pelos PMNs na eliminação dos patógenos tem sido estudada na leptospirose. Verificou-se que leptospirosas patogênicas apresentam uma maior resistência ao peróxido de hidrogênio e aos grânulos primários dos PMNs que estirpes saprófitas (Murgia et al., 2002). Esta maior resistência pode ser atribuída, em parte, à enzima catalase (KatE), que é expressa somente em estirpes patogênicas de leptospirosas (Eshghi et al., 2012).

Os principais componentes da imunidade adquirida que atuam na infecção por leptospirosas são a via clássica do sistema complemento e os anticorpos. O principal antígeno que estimula a produção de anticorpos é o LPS. A imunização passiva com anticorpos anti-LPS é capaz de conferir proteção contra a infecção por leptospirosas pertencentes a um mesmo sorogrupo em modelo animal (Jost et al., 1986). Além disso, a eficiência da fagocitose de leptospirosas aumenta quando estas são opsonizadas por imunoglobulinas G específicas (Banfi et al., 1982; Wang et al., 1984), as quais podem promover também a aglutinação das bactérias e a ativação da via clássica do sistema complemento (Malkin et al., 1984).

Apesar da existência de diferentes mecanismos imunes efetores, as leptospirosas patogênicas conseguem sobreviver e se multiplicar no organismo. Nos animais reservatórios, elas colonizam os túbulos renais proximais, estabelecendo uma infecção persistente, na qual as bactérias se multiplicam e são constantemente eliminadas na urina. Análises proteômicas revelaram que leptospirosas extraídas dos rins possuem uma expressão reduzida de proteínas antigênicas quando comparada a bactérias mantidas em cultura (Monahan et al., 2009). Esta redução antigênica pode representar um possível mecanismo de evasão imune. Além disso, outro mecanismo que pode estar envolvido na colonização renal é a formação de biofilmes. Leptospirosas saprófitas e patogênicas são capazes de formar biofilmes, os quais ajudam as bactérias a sobreviver no meio ambiente e a colonizar o hospedeiro, respectivamente (Ristow et al., 2008). A formação de biofilmes representa uma importante barreira entre o patógeno e o sistema imune, impedindo a atuação de células e moléculas efetoras (Brihuega et al., 2012).

Dentre os mecanismos de evasão imune apresentados por leptospirosas patogênicas, iremos explorar mais detalhadamente aqueles utilizados para escapar do sistema complemento humano, os quais constituem o tema deste trabalho.

1.4 O sistema complemento

O sistema complemento é composto por aproximadamente 35 proteínas presentes no plasma ou associadas a membranas celulares. A ativação deste sistema desempenha um papel essencial na eliminação de microrganismos, remoção de imunocomplexos e células apoptóticas, bem como no processo inflamatório (Köhl, 2006).

O sistema complemento pode ser ativado por três vias diferentes: a via alternativa, a via clássica e a via das lectinas (Figura 3). A ativação do complemento envolve uma série de reações que ocorrem em cascata, culminando na formação do complexo de ataque à membrana (MAC), que promove a lise celular.

A ativação da via clássica ocorre principalmente pela ligação da molécula C1q a imunocomplexos formados por IgM ou IgG depositados na superfície de patógenos (Duncan, Winter, 1988; Lachmann, Hughes-Jones, 1984). Alternativamente, C1q pode ligar-se diretamente a estruturas bacterianas, como o lipídeo A e os ácidos lipoteicóicos, ou ainda por intermédio de pentraxinas (Gewurz, 1995). Após a ligação do C1q ocorre a ativação das serino proteases a ele associadas, C1r e C1s, o que resulta na clivagem das moléculas de C4 e C2, gerando a C3 convertase da via clássica: C4bC2a (Walport, 2001).

A ativação da via das lectinas ocorre pela interação da molécula *mannose binding lectin* (MBL) com carboidratos presentes na superfície dos patógenos (Fujita et al., 2004). Além deste mecanismo, a via das lectinas também pode ser ativada pela ligação das ficolinas 1, 2 e 3 presentes no soro a componentes acetilados (Thiel et al., 2007). Após a ligação da MBL ou ficolinas ao microrganismo ocorre a ativação das serino proteases a elas associadas MASP-1 e MASP-2, resultando na clivagem de C4 e C2, e gerando a C3 convertase da via das lectinas: C4bC2a (Harmat et al., 2004). A função da MASP-3, que também está associada à MBL e às ficolinas, ainda não está totalmente esclarecida, embora alguns estudos tenham demonstrado sua capacidade em inibir a atividade de MASP-2 (Dahl et al., 2001).

A via alternativa pode ser ativada diretamente na superfície dos patógenos, sem a presença de anticorpos específicos. A ligação tiol-éster da molécula de C3 sofre hidrólise espontânea, gerando C3(H₂O), o qual adota conformação estrutural semelhante à do fragmento C3b (Isenman et al., 1981). As moléculas de C3(H₂O) podem se ligar covalentemente às superfícies de patógenos, permitindo em seguida a ligação do Fator B, o qual é clivado pelo Fator D, gerando o fragmento Ba, que é liberado, e o fragmento Bb que permanece associado ao C3(H₂O), resultando na formação da primeira C3 convertase da via

alternativa: C3(H₂O)Bb. A properdina, que atua como um regulador positivo, estabiliza e prolonga a meia-vida desta C3 convertase (Fearon et al., 1975). Na superfície de patógenos, a via alternativa continua a ser amplificada, aumentando a produção de C3b gerado pelas outras vias (Thurman, 2006).

As três vias de ativação do sistema complemento levam à formação de C3 convertases, as quais são responsáveis pela clivagem da proteína C3, gerando a anafilotoxina C3a e o fragmento C3b, que se associa às C3 convertases para formar as C5 convertases: C4bC2aC3b e C3bBbC3b. Com a proteólise da molécula de C5, é gerada a anafilotoxina C5a e o fragmento C5b, ao qual se associam sequencialmente os componentes C6, C7, C8 e nC9 para formar o complexo de ataque à membrana (MAC) (Dankert et al., 1985). Esta estrutura multiprotéica (C5b6789n) é inserida na bicamada lipídica como um canal transmembrana, promovendo um desequilíbrio iônico que resulta na lise celular (Mollnes, 2002).

Como resultado da ativação do sistema complemento, além da lise celular, são geradas diversas moléculas com importantes funções biológicas. Os fragmentos C3b, iC3b, C3d e C4d atuam como opsoninas, facilitando o processo de fagocitose. As anafilotoxinas C3a e C5a são capazes de recrutar células inflamatórias e promover a desgranulação de mastócitos e basófilos, com consequente liberação de mediadores inflamatórios (Gasque, 2004).

Para evitar o consumo exagerado das proteínas do complemento e prevenir a ocorrência de danos às células do hospedeiro, é fundamental que haja uma regulação precisa deste sistema. Dentre os principais reguladores plasmáticos do complemento encontram-se o Fator H (FH), que atua na via alternativa, e o C4b *Binding Protein* (C4BP), que atua na via clássica e das lectinas. Estes reguladores aceleram o decaimento das C3 convertases (C3bBb e C4bC2a, respectivamente) e atuam como co-fatores do Fator I (FI) na clivagem dos fragmentos C3b e C4b, impedindo assim a continuidade da ativação das três vias do complemento (Blom et al., 2002; Morgan, 1999; Rodríguez de Córdoba et al., 2004).

Além de proteínas de fase fluida, o sistema complemento possui reguladores presentes na membrana das células, dentre os quais destacam-se: o *membrane co-factor protein* (MCP), o *complement receptor 1* (CR1), o *decay accelerating factor* (DAF) e a protectina (CD59). As proteínas reguladoras MCP e CR1 também atuam como co-fatores do FI na clivagem dos fragmentos C3b e C4b. Já os reguladores DAF e CD59 não possuem atividade de co-fator. DAF acelera o decaimento das C3 e C5 convertases por meio de sua associação ao fragmento C3b, e CD59 bloqueia a formação do MAC ao inibir a incorporação de C9 ao complexo C5b-8 (Kim et al., 2006).

Figura 3. Ativação do sistema complemento. A via clássica pode ser ativada pela ligação de C1q a complexos antígeno-anticorpo. Já a interação da MBL com carboidratos como a manose inicia a ativação da via das lectinas. A via alternativa é espontaneamente ativada e gera fragmentos C3b que se ligam covalentemente à superfície de patógenos. As três vias de ativação do complemento convergem para a via terminal, a qual resulta na formação do complexo de ataque a membrana (MAC, C5b6789n), promovendo a lise celular. Abreviaturas: MBL - mannose binding lectin, MASP - serino protease associada à MBL. Fonte: Modificado de Walport (2001).

1.4.1 A proteína C3

A proteína C3 é a molécula do complemento mais abundante no soro, com concentrações que variam entre 0,8 a 1,9 mg/mL em adultos saudáveis (Ritchie et al., 2004). As principais células produtoras de C3 são os hepatócitos, contudo monócitos, macrófagos, leucócitos polimorfonucleares, fibroblastos e células epiteliais também secretam esta proteína (Morley, Walport, 2000).

O gene C3 humano está localizado no cromossomo 19 e possui 41 éxons. Os primeiros 16 exons codificam a cadeia β e os 25 éxons seguintes a cadeia α (Fong et al., 1990). A proteína C3 é sintetizada como uma pró-molécula de cadeia simples e sofre modificações pós-traducionais que incluem a clivagem de um peptídeo sinal (22 aa), a remoção de uma sequência de 4 argininas, a glicosilação e a formação de uma ligação tiol-éster intracadeia (Law et al., 1979). A proteína C3 madura é formada pelas cadeias α (115 kDa) e β (75 kDa), as quais são unidas por pontes de dissulfeto (Morley, Walport, 2000).

A molécula C3 é um componente essencial para as três vias de ativação do sistema complemento. A clivagem desta proteína pelas C3 convertases ocorre na cadeia α , liberando a anafilotoxina C3a, e gerando a cadeia α' (110 kDa) que, juntamente com a cadeia β (75 kDa), compõe o fragmento C3b do complemento (Figura 4). Este fragmento se deposita na superfície dos patógenos e possibilita a formação da C3 convertase da via alternativa (C3bBb) e também das C5 convertases das três vias do complemento (C3bBbC3b, da via alternativa e C4bC2aC3b, das vias clássica e das lectinas).

Contudo, em paralelo à ativação, ocorre também o processo de regulação do complemento. Neste contexto, o fragmento C3b é clivado pelo Fator I na presença de co-fatores como Fator H, MCP ou CR1 (Figura 4). Nesta clivagem há liberação de C3f e formação de iC3b, que é composto por três cadeias (45 kDa, 62 kDa e 75 kDa). O fragmento iC3b não é capaz de formar as C3 e C5 convertases, contudo é uma importante opsonina, sendo também alvo de regulação. Assim, o fragmento iC3b pode sofrer uma degradação adicional pelo Fator I na presença de CR1 como co-fator, gerando C3c e C3dg. A clivagem posterior de C3dg, gerando C3d e C3g é efetuada por serino proteases plasmáticas de ampla especificidade tais como plasmina, trispina e elastase (Morley, Walport, 2000).

Figura 4. Representação esquemática da clivagem de C3 e seus fragmentos. A clivagem do C3 pelas C3 convertases resulta na formação do fragmento C3b e na liberação da anafilotoxina C3a. Em paralelo à ativação do complemento, ocorre o processo de regulação, no qual o fragmento C3b é clivado pelo Fator I na presença de co-fatores como Fator H, MCP ou CR1. Nesta clivagem há liberação de C3f e formação de iC3b, que é uma importante opsonina. O fragmento iC3b pode sofrer ainda uma degradação adicional pelo Fator I, gerando C3c e C3dg, o qual pode ser posteriormente clivado em C3d e C3g por serino proteases plasmáticas de ampla especificidade tais como plasmina, tripsina e elastase. Fonte: Modificado de Morley e Walport (2000).

1.4.2 A proteína C4

A proteína C4 encontra-se no soro em concentrações que variam entre 0,05 e 0,8 mg/mL em adultos saudáveis (Ritchie et al., 2004). As principais células produtoras de C4 são os hepatócitos, contudo monócitos, macrófagos e células epiteliais intestinais também secretam esta proteína (Morley, Walport, 2000).

O gene *C4* humano está localizado no cromossomo 6 e possui 41 éxons. A proteína C4 é sintetizada como uma pró-molécula de cadeia simples e sofre modificações pós-traducionais que incluem a clivagem de um peptídeo sinal (22 aa), a sulfatação de resíduos de tirosina, a glicosilação e a formação de uma ligação tiol-éster intracadeia. A proteína C4 madura possui três cadeias: α (97 kDa), β (75 kDa) e γ (33 kDa), as quais são unidas por pontes de dissulfeto (Arlaud, 2005).

A molécula C4 é um componente do sistema complemento que participa das vias clássica e das lectinas. Após ativação destas vias, as serino proteases C1s (via clássica) e MASP2 (via das lectinas) clivam a proteína C4 na cadeia α , liberando a anafilotoxina C4a, e gerando a cadeia α' (85 kDa) que juntamente com as cadeias β (75 kDa) e γ (33 kDa) formam o fragmento C4b do complemento (Figura 5). Este fragmento se deposita na superfície dos patógenos e possibilita a formação da C3 convertase das vias clássica e das lectinas (C4bC2a) (Walport, 2001).

No processo de regulação do complemento o fragmento C4b é clivado pelo Fator I na presença de C4BP, MCP ou CR1 como co-fatores (Figura 5). Nesta clivagem há formação de C4c e liberação do fragmento C4d (Morley, Walport, 2000).

Figura 5. Representação esquemática da clivagem de C4 e seus fragmentos. A clivagem do C4 pelas serino proteases C1s ou MASP2 resulta na formação do fragmento C4b e na liberação da anafilotoxina C4a. Em paralelo à ativação do complemento, ocorre o processo de regulação, no qual o fragmento C4b é clivado pelo Fator I na presença de co-fatores como C4BP, MCP ou CR1. Nesta clivagem há formação de C4c e liberação do fragmento C4d. Fonte: Modificado de Morley e Walport (2000).

1.4.3 A proteína C5

A proteína C5 encontra-se no soro em concentrações que variam entre 0,07 e 0,16 mg/mL em adultos saudáveis (Pfarr et al., 2005). As principais células produtoras de C5 são os hepatócitos, contudo monócitos, macrófagos e células alveolares tipo II também secretam esta proteína (Morley, Walport, 2000).

O gene C5 humano está localizado no cromossomo 9 e possui 41 éxons. A proteína C5 é sintetizada como uma pró-molécula de cadeia simples e sofre modificações pós-traducionais que incluem a clivagem de um peptídeo sinal (18 aa), a remoção de uma região rica em argininas e glicosilação. A proteína C5 madura possui duas cadeias: α (115 kDa) e β (75 kDa), as quais são unidas por pontes de dissulfeto (Figura 6 A) (Tack et al., 1979).

A molécula C5 é um componente que participa das três vias de ativação do sistema complemento. Com a clivagem da proteína pelas C5 convertases da via alternativa (C3bBbC3b) ou das vias clássica e das lectinas (C4bC2aC3b) são gerados os fragmentos C5a e C5b. A anafilotoxina C5a é um potente agente inflamatório, que atua no receptor C5aR de células como neutrófilos, monócitos, macrófagos e células do parênquima hepático (Haviland et al., 1995). A ação da anafilotoxina é regulada no organismo pela enzima plasmática carboxipeptidase-N, que remove o aminoácido arginina da porção C-terminal da molécula, formando C5a des-Arg, que possui reduzida atividade inflamatória (Manthey et al., 2009). Já o fragmento C5b se associa sequencialmente aos componentes C6, C7, C8 e nC9, formando assim o complexo de ataque à membrana (MAC), que promove a lise celular (Figura 6 B).

A

B

Figura 6. Representação esquemática da clivagem de C5 e formação do complexo de ataque à membrana. (A) A clivagem do C5 pelas C5 convertases da via alternativa (C3bBbC3b) ou das vias clássica e das lectinas (C4bC2aC3b) gera a anafilotoxina C5a, que é um potente agente inflamatório, e o fragmento C5b. (B) O fragmento C5b se associa sequencialmente aos componentes C6, C7, C8 e nC9, formando o complexo de ataque à membrana (MAC), que promove a lise celular. Fonte: Modificado de Morley e Walport (2000); Aleshin et al. (2012).

1.4.4 As proteínas C2 e Fator B

As proteínas C2 e Fator B encontram-se no soro em concentrações que variam entre 11-35 µg/mL e 74-286 µg/mL, respectivamente. As principais células produtoras de C2 e Fator B são os hepatócitos, contudo monócitos e fibroblastos também secretam estas proteínas (Morley, Walport, 2000).

Os genes *C2* e *FB* humanos estão localizados no cromossomo 6 e ambos possuem 18 éxons. As proteínas C2 e Fator B são formadas por uma única cadeia polipeptídica, a qual é sintetizada como uma pró-molécula que sofre modificações pós-traducionais que incluem a clivagem de um peptídeo sinal e glicosilação (Smith et al., 1984). As proteínas C2 (100 kDa) e Fator B (90 kDa) são estruturalmente semelhantes e possuem uma identidade de 39% em aminoácidos (Figura 7 A).

As proteínas C2 e Fator B participam de diferentes vias do sistema complemento. C2 é um componente das vias clássica e das lectinas, e o Fator B é uma molécula exclusiva da via alternativa. Contudo, C2 e Fator B desempenham funções semelhantes entre si, pois ao serem clivados no processo de ativação do complemento, conferem atividade de serino proteases às C3 e C5 convertases (Forneris et al., 2012).

O processo de formação das C3 convertases se inicia pela associação do Fator B ou C2 ao C3b (via alternativa) ou C4b (via clássica e das lectinas). Fator B e C2 associados a estas moléculas sofrem clivagens pelas serino proteases específicas de cada via, sendo: Fator D da via alternativa, C1s da via clássica, e MASP2 da via das lectinas. Com as clivagens do Fator B e C2 há liberação das porções Ba e C2b, e formação dos fragmentos Bb e C2a, os quais possuem atividade de serino proteases e permanecem associados ao C3b e C4b, respectivamente, formando assim as C3 convertases da via alternativa (C3bBb) e das vias clássica e das lectinas (C4bC2a) (Figura 7 B). Em seguida, com a clivagem de C3 por estas convertases há geração de fragmentos C3b adicionais, os quais se associam às C3 convertases para formar as C5 convertases da via alternativa (C3bBbC3b) e das vias clássica e das lectinas (C4bC2aC3b) (Forneris et al., 2012).

A

B

Via Alternativa

Via Clássica e das Lectinas

Figura 7. Representação esquemática do Fator B e C2 e formação das C3 convertases. (A) Fator B e C2 possuem 39% de identidade em aminoácidos. Ambas as proteínas possuem peptídeo sinal para secreção (S), regiões CCP (*complement control protein repeat*), VWA (*Von Willebrand tipo A*) e domínio catalítico com atividade de serino protease (SP). As setas indicam os locais onde Fator B e C2 são clivados para formação dos fragmentos C2a, C2b, Ba e Bb. (B) Após ativação do complemento, Fator B e C2 associam-se às moléculas C3b (via alternativa) ou C4b (via clássica e das lectinas). Após essa associação, Fator B e C2 sofrem clivagens pelas serino proteases específicas de cada via (Fator D da via alternativa, C1s da via clássica, e MASP2 da via das lectinas). Com as clivagens do Fator B e C2 há liberação das porções Ba e C2b, e formação dos fragmentos Bb e C2a, que permanecem associados ao C3b e C4b, respectivamente, formando assim as C3 convertases da via alternativa (C3bBb) e da via clássica e das lectinas (C4bC2a). Fonte: (A) Modificado de Forneris et al. (2012).

1.5 Mecanismos de evasão ao sistema complemento

Considerando que o sistema complemento é um importante componente da imunidade inata e adquirida, certos patógenos desenvolveram diferentes estratégias de evasão a este sistema, possibilitando o estabelecimento da infecção (Blom et al., 2009; Lambris et al., 2008; Rooijackers, van Strijp, 2007; Zipfel et al., 2013).

Os mecanismos de escape ao sistema complemento podem ser agrupados em cinco estratégias principais (Figura 8):

✓ *Estratégias passivas de evasão ao complemento*

Alguns patógenos evadem ao ataque mediado pelo sistema complemento devido à presença de componentes estruturais característicos, tais como a parede celular (Lambris et al., 2008). De fato, bactérias Gram-positivas e fungos possuem paredes celulares espessas, as quais impedem a inserção do complexo de ataque à membrana (MAC). Como exemplo deste mecanismo de evasão podemos citar a bactéria Gram-positiva *Streptococcus pneumoniae*, cuja parede celular de peptídeoglicano previne a inserção do MAC na superfície da bactéria (Joiner et al., 1983).

✓ *Aquisição de reguladores do hospedeiro pelos patógenos*

A aquisição de reguladores do hospedeiro é um mecanismo de evasão ao complemento amplamente utilizado pelos patógenos. Bactérias (*Escherichia coli*, *Borrelia burgdorferi* e várias outras), vírus (HIV-1), fungos (*Candida albicans*) e parasitas (*Echinococcus* spp.) são capazes de recrutar reguladores do complemento e impedir a ativação deste sistema em sua superfície (Bernet et al., 2003; Inal, 2004; Meri et al., 2004). As principais vantagens deste mecanismo incluem as elevadas concentrações plasmáticas dos reguladores e a sua pronta disponibilidade, possibilitando o rápido revestimento dos patógenos ao entrarem na circulação sanguínea. Além disso, muitos dos reguladores do complemento possuem características estruturais comuns contendo domínios SCRs (*short consensus repeats*), que permitem a ligação de diferentes reguladores a uma mesma proteína do patógeno (Lambris et al., 2008).

Os principais reguladores plasmáticos do complemento recrutados pelos patógenos são o Fator H e o C4BP. Estas proteínas reguladoras aceleram o decaimento das C3 convertases e atuam como co-fatores do Fator I na clivagem de C3b e C4b, respectivamente (Kraiczy, Würzner, 2006). Além disso, a aquisição da proteína inibidora de C1 (C1-INH) também foi observada em *Bordetella pertussis*, impedindo assim a ativação da via clássica do sistema complemento (Marr et al., 2007). De forma interessante, reguladores de membrana da célula hospedeira, tais como DAF, MCP e CD59, podem ser incorporados por alguns vírus durante o processo de brotamento viral (Tortorella et al., 2000). A incorporação de reguladores de membrana do complemento promove um aumento da resistência ao soro em vírus como o citomegalovírus humano (HCMV), o vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV), o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o vírus da vaccinia (VACV) (Marschang et al., 1995; Saifuddin et al., 1995; Schmitz et al., 1995; Spear et al., 1995; Vanderplasschen et al., 1998).

✓ *Inibição por interação direta de proteínas microbianas com componentes do complemento*

A ativação do sistema complemento envolve uma série de interações proteína-proteína altamente específicas. Deste modo, interrupções destas ligações podem culminar na desestabilização e perda na eficiência de ativação deste sistema. Com esse objetivo, certos patógenos expressam proteínas inibidoras, as quais têm a capacidade de se ligar a moléculas do complemento, interrompendo assim sua ativação (Lambris et al., 2008).

Staphylococcus aureus expressa diversas moléculas inibidoras do complemento. As proteínas SCINs (*staphylococcal complement inhibitors*) têm a capacidade de se ligar às C3 convertases e promover a estabilização destas em um estado não funcional, bloqueando a ativação das três vias do complemento (Rooijakkers et al., 2005). Já os inibidores SSL-7 (*staphylococcal superantigen-like protein-7*) e CHIPS (*chemotaxis inhibitory protein*) interferem com o componente C5 e o receptor C5aR, respectivamente (de Haas et al., 2004; Langley et al., 2005). CHIPS é secretado por *S. aureus* e atua como antagonista dos receptores C5aR de neutrófilos e monócitos, reduzindo a atuação da anafilotoxina C5a sobre estas células (Postma et al., 2004; Wright et al., 2007). Além disso, patógenos como *Borrelia burgdorferi* e *Schistosoma* spp expressam proteínas CD59-like, que são inibidores da via terminal do complemento. A ligação destas proteínas aos componentes C8 e C9 impede a formação do MAC na superfície destes patógenos (Deng et al., 2003; Pausa et al., 2003).

✓ *Inativação por clivagem enzimática dos componentes do complemento: aquisição de proteases do hospedeiro*

A degradação de componentes do complemento em fragmentos menores e não funcionais constitui um importante mecanismo de evasão imune. A clivagem pode ocorrer de forma indireta, pela aquisição de proteases do hospedeiro, ou direta, pela expressão de proteases microbianas (Zipfel et al., 2013).

Diversos microrganismos patogênicos são capazes de recrutar proteases do hospedeiro, ou seus precursores, em sua superfície. Um dos mecanismos mais estudados é a ligação do plasminogênio que, na presença de ativadores como o *urokinase-type plasminogen activator* (uPA), é convertido em plasmina na superfície do patógeno. A plasmina gerada pode clivar proteínas do complemento como C3, C3b e C5, além da imunoglobulina G e a fibronectina (Barthel et al., 2012). *Borrelia burgdorferi*, *Streptococcus pyogenes* e *Candida albicans* expressam pelo menos cinco proteínas de membrana que se ligam ao plasminogênio (Brissette et al., 2009; Hallström et al., 2010; Lagal et al., 2006; Luo et al., 2013; Poltermann et al., 2007; Ringdahl, Sjöbring, 2000; Sanderson-Smith et al., 2007).

✓ *Inativação por clivagem enzimática dos componentes do complemento: expressão de proteases microbianas*

A degradação e a inativação funcional de componentes do complemento por proteases microbianas é uma estratégia chave para atenuar os mecanismos de defesa dependentes da ativação do sistema complemento. Além disso, a secreção de proteases pode proporcionar o controle do micro-ambiente no hospedeiro infectado, aumentando consideravelmente a sobrevivência dos patógenos (Potempa et al., 2012).

Diversos microrganismos patogênicos incluindo bactérias, fungos, parasitas e vírus, expressam proteases capazes de clivar diferentes componentes do complemento, tais como moléculas envolvidas na sua ativação (C3, MBL, ficolinas e C1q), amplificação e formação das convertases (C3, C4, C2, Fator B e seus fragmentos), e também proteínas da via terminal (C5, C6, C7, C8 e C9) (Tabela 2).

Proteases das quatro principais classes: cisteíno-, aspártico-, serino- e metalo proteases estão envolvidas nas clivagens de moléculas do complemento. Dentre as cisteíno proteases podemos destacar a *streptococcal pyrogenic exotoxin B* (SpeB), que é um importante fator de virulência secretado por *Streptococcus pyogenes*. A SpeB é uma protease de ampla especificidade que degrada diversas moléculas do complemento, resultando em uma inibição eficaz das três vias de ativação (Tabela 2). Além disso, a degradação de C3 e C3b pela SpeB contribui para a resistência do patógeno à opsonofagocitose por neutrófilos (Honda-Ogawa et al., 2013; Kuo et al., 2004; Lukomski et al., 1998; Terao et al., 2008).

A importância das cisteíno proteases também tem sido relatada na periodontite, que é uma doença caracterizada pela inflamação nas estruturas subgengivais dos dentes causada por um conjunto de bactérias tais como *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*. A evasão ao sistema complemento é crucial para a sobrevivência destes patógenos, uma vez que os componentes deste sistema estão presentes no fluido crevicular gengival em até 70% de sua concentração sérica (Schenkein, Genco, 1977). *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* secretam as cisteíno proteases gingipaína e interpaína A, respectivamente. De forma interessante, foi comprovado que estas duas proteases presentes simultaneamente no local da infecção, atuam de forma sinérgica na degradação das moléculas do complemento. A ação conjunta destas proteases resulta em uma redução efetiva na ativação do complemento, favorecendo diretamente a sobrevivência das bactérias e o estabelecimento da infecção (Popadiak et al., 2007; Potempa et al., 2009).

Dentre as proteases aspárticas que degradam proteínas do complemento, há proteases de membrana, como a *outer membrane protein E* (PgtE) de *Salmonella enterica*, e também secretadas como as *secreted aspartic proteinases* (Saps) de *Candida albicans*. A protease PgtE degrada os componentes C3b, C4b e C5 contribuindo para a disseminação da *Salmonella enterica* durante a infecção sistêmica (Ramu et al., 2007). As Saps de *Candida albicans* representam uma família de 10 proteínas com múltiplas funções na patogenicidade do microrganismo tais como adesão, invasão e danos às células do hospedeiro (Naglik et al., 2004). As clivagens das proteínas do complemento C3b, C4b e C5 pelas Saps 1, 2 e 3 resultam em redução na fagocitose da levedura, sendo observada também uma diminuição na inflamação, a qual pode estar relacionada aos baixos níveis da anafilotoxina C5a detectados na presença das proteases (Gropp et al., 2009).

Enzimas proteolíticas da classe das serino proteases são produzidas por fungos (*Aspergillus fumigatus*), parasitas (*Schistosoma mansoni*) e bactérias (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Neisseria meningitidis*) (Tabela 2). A proteína central do complemento C3 é um substrato comum às serino proteases produzidas por estes patógenos. Além da proteína C3, o sobrenadante de cultura de *Aspergillus fumigatus* também possui atividade proteolítica sobre os componentes C4 e C5. Esta atividade foi atribuída majoritariamente à *alkaline serine protease 1* (Alp1), principal protease secretada pelo patógeno. Estirpes mutantes no gene que codifica para Alp1 apresentaram reduzida atividade proteolítica sobre as moléculas do complemento, comprovando a importância da protease para a ocorrência das clivagens (Behnsen et al., 2010).

A evasão ao sistema complemento é um fator crucial para o estabelecimento de infecções sistêmicas por *Neisseria meningitidis*. De fato, pacientes deficientes em moléculas do complemento possuem uma elevada susceptibilidade a infecções invasivas por esta bactéria (Figuerola, Densen, 1991; Ram et al., 2010). Recentemente foi descrita a atividade proteolítica da serino protease NalP (*neisserial autotransporter P*) sobre a molécula C3 do complemento (Del Tordello et al., 2014). NalP é uma protease autotransportadora que sofre auto-clivagem durante o processo de secreção. Além da forma secretada, NalP também pode apresentar-se na forma lipídica, a qual se encontra ancorada na membrana externa da bactéria (Roussel-Jazédé et al., 2013; Turner et al., 2002).

As metalo proteases que degradam proteínas do complemento estão presentes majoritariamente em bactérias tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Tannerella forsythia* (Tabela 2). A bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* secreta duas metalo proteases, a *alkaline protease A* (AprA) e a elastase, as quais clivam C3b e impedem sua deposição na superfície da bactéria (Hong, Ghebrehwet, 1992; Schmidtchen et al., 2003). Já a *gelatinase E* (GelE) de *Enterococcus faecalis* exerce atividade proteolítica sobre o componente C3 e os fragmentos C3b, C3a e iC3b, resultando em uma redução substancial na fagocitose do patógeno por leucócitos polimorfonucleares humanos (Park et al., 2007, 2008). Além de clivar a molécula C3, a toxina lambda de *Clostridium perfringens* também atua em outros importantes substratos biológicos como o colágeno e a fibronectina, favorecendo o processo de invasão e disseminação da bactéria pelo organismo (Jin et al., 1996).

Tabela 2. Proteases de patógenos que clivam moléculas do sistema complemento.

Patógeno	Protease	Classe	Moléculas do complemento	Referências
<i>Streptococcus pyogenes</i>	SpeB	Cisteíno protease	C3, C3b, C4 C6, C7, C8, C9 properdina	Honda-Ogawa et al., 2013 Kuo et al., 2004 Terao et al., 2008 Tsao et al., 2006
<i>Entamoeba histolytica</i>	EhCP1	Cisteíno protease	C3, C5, C3a, C5a	Meléndez-López et al., 2007 Reed et al., 1989; 1995
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Gingipaína	Cisteíno protease	C3, C4, C5	Popadiak et al., 2007
<i>Prevotella intermedia</i>	ImpA	Cisteíno protease	C3, C4	Potempa et al., 2009
<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphopain A	Cisteíno protease	C3, C5	Jusko et al., 2014
	Staphopain B	Cisteíno protease	C3b, C5	Jusko et al., 2014
HIV (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)	HIV-1 proteinase	Aspártico protease	C3, C3b	Kisselev, 1997
<i>Salmonella enterica</i>	PgtE	Aspártico protease	C3b, C4b e C5	Ramu et al., 2007
<i>Candida albicans</i>	Sap1, 2 e 3	Aspártico proteases	C3b, C4b, C5	Gropp et al., 2009
<i>Schistosoma mansoni</i>	28 kDa protease	Serino protease	C3, C3b, C9	Marikovsky et al., 1990
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Alp1	Serino protease	C3, C3b, C4, C4b, C5	Behnsen et al., 2010
<i>Escherichia coli</i>	EspP	Serino protease	C3, C3b e C5	Orth et al., 2010
<i>Staphylococcus aureus</i>	Protease V8	Serino protease	C3, C5	Jusko et al., 2014
<i>Neisseria meningitidis</i>	NalP	Serino protease	C3	Del Tordello et al., 2014
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Elastase	Metalo protease	C1q e C3	Hong et al., 1992
	AprA	Metalo protease	C1q, C3 e C2	Hong et al., 1992 Laarman et al., 2012
<i>Clostridium perfringens</i>	Toxina lambda	Metalo protease	C3	Jin et al., 1996
<i>Enterococcus faecalis</i>	GelE	Metalo protease	C3, C3b, iC3b, C3a	Park et al., 2007; 2008
<i>Staphylococcus aureus</i>	Aureolisina	Metalo protease	C3	Laarman et al., 2011
<i>Tannerella forsythia</i>	Karilisina	Metalo protease	C4, C5, MBL, ficolinas 2 e 3	Jusko et al., 2012

Ativação do sistema complemento

Evasão ao sistema complemento

Figura 8. Mecanismos de evasão ao sistema complemento. (1) **Aquisição de reguladores do complemento:** a inibição da via clássica pode ocorrer pela captura do inibidor de C1 (C1-INH) por moléculas de superfície dos patógenos. (2) **Inibição por interação direta:** os patógenos podem expressar também moléculas que interagem com as proteínas presentes nas C3- e C5-conversases, inibindo-as. Outro exemplo são as proteínas que atuam como antagonistas do receptor C5aR na célula do hospedeiro, impedindo a ligação da anafilotoxina C5a. (3) **Inativação por clivagem enzimática:** proteases do hospedeiro ou produzidas pelos patógenos podem clivar componentes do sistema complemento, tais como C3, C3b e properdina (P). **Abreviaturas:** VA (via alternativa), VL (via das lectinas), VC (via clássica), MBL (*mannose binding lectin*), F (ficolina), MASP (serino protease associada à MBL), FB (Fator B), FD (Fator D), RCA (reguladores da ativação do complemento), FI (Fator I), CR (receptor de moléculas do complemento) e MAC (complexo de ataque à membrana). Fonte: Modificado de Lambris et al. (2008).

1.6 Mecanismos de evasão ao sistema complemento apresentados por leptospiiras patogênicas

Os estudos sobre evasão ao sistema complemento por leptospiiras patogênicas foram iniciados em nosso laboratório durante o desenvolvimento da tese da aluna Aldacilene Silva (Silva, 2009). Primeiramente observamos que leptospiiras patogênicas são resistentes ao tratamento com soro humano normal, ao passo que as saprófitas são rapidamente eliminadas. Verificamos que este mecanismo é claramente dependente do sistema complemento, uma vez que a inativação do soro a 56 °C por 30 min promove a sobrevivência destas bactérias (Barbosa et al., 2009).

Dados da literatura mostram que apenas estirpes patogênicas de leptospiiras são capazes de se ligar ao Fator H, um regulador negativo da via alternativa do sistema complemento (Alitalo et al., 2001; Kühn et al., 1995; Meri et al., 2005; Stevenson et al., 2007; Verma et al., 2006). Posteriormente nosso grupo descreveu, pela primeira vez, a ligação de leptospiiras patogênicas ao C4BP, um regulador negativo das vias clássica e das lectinas (Barbosa et al., 2009). Em seguida, proteínas de membrana de leptospiiras foram identificadas como ligantes destes reguladores tais como o fator de alongação Tu (EF-Tu), que se liga ao Fator H, a proteína LcpA, que se liga ao C4BP, e as proteínas LigA e LigB, que se ligam a ambos os reguladores (Tabela 3). Além disso, verificamos que o Fator H e o C4BP ligados a estas proteínas, retêm atividade de co-fator do Fator I, na clivagem de C3b e C4b, respectivamente (Figura 9) (Barbosa et al., 2010; Castiblanco-Valencia et al., 2012; Wolf et al., 2013).

Outro mecanismo de evasão utilizado pelas leptospiiras patogênicas é a aquisição de moléculas precursoras de proteases do hospedeiro, como o plasminogênio. Uma vez ligado à superfície da leptospira, o plasminogênio é convertido em plasmina na presença do *urokinase-type plasminogen activator* (uPA) (Vieira et al., 2009, 2011, 2012). A plasmina é uma protease que possui ampla especificidade, clivando moléculas de matriz extracelular, como fibrinogênio, e proteínas do complemento, como o fragmento C3b e os componentes C3 e C5 (Figura 10). Diversas proteínas de membrana de leptospiiras patogênicas foram descritas como ligantes de plasminogênio tais como o fator de alongação Tu (EF-Tu), as proteínas LigA e LigB e várias outras descritas na Tabela 3 (Castiblanco-Valencia et al., *in press*; Wolf et al., 2013).

De forma interessante, nos ensaios realizados pelo nosso grupo observamos ainda que a clivagem dos fragmentos C3b e C4b também ocorre na ausência de proteínas do hospedeiro, sugerindo uma possível participação de proteases bacterianas na degradação destas moléculas. Neste contexto, o principal objetivo deste trabalho foi investigar mecanismos de evasão de leptospiras, com particular enfoque na clivagem de componentes do sistema complemento por proteases secretadas. Acreditamos que a caracterização destas proteínas poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e/ou preventivas que interfiram no processo de evasão imune de leptospiras patogênicas.

Tabela 3. Proteínas de leptospira que interagem com moléculas do hospedeiro como mecanismo de evasão imune.

Molécula do hospedeiro	Proteína da leptospira patogênica	Referências
Fator H (FH)	EF-Tu (<i>elongation factor Tu</i>)	Wolf et al., 2013
	LenA e LenB (<i>leptospiral endostatin-like proteins A e B</i>)	Stevenson et al., 2007
	LigA e LigB (<i>leptospiral immunoglobulin-like proteins A e B</i>)	Castiblanco-Valencia et al., 2012
	Lsa23 (adesina de 23 kDa)	Siqueira et al., 2013
C4BP (C4b binding protein)	LcpA (<i>leptospiral complement regulator-acquiring protein A</i>)	Barbosa et al., 2010
	Lsa33 (adesina de 33 kDa)	Domingos et al., 2012
	LigA e LigB (<i>leptospiral immunoglobulin-like proteins A e B</i>)	Castiblanco-Valencia et al., 2012
	Lsa23 (adesina de 23 kDa)	Siqueira et al., 2013
Plasminogênio	Enolase	Nogueira et al., 2013
	EF-Tu (<i>elongation factor Tu</i>)	Wolf et al., 2013
	LenA (<i>leptospiral endostatin-like protein A</i>)	Verma et al., 2010
	LigA e LigB (<i>leptospiral immunoglobulin-like proteins A e B</i>)	Castiblanco-Valencia et al., <i>in press</i>
	OmpL1 (<i>outer membrane protein L1</i>)	Fernandes et al., 2012
	LipL32 (lipoproteína de 32 kDa)	Hauk et al., 2012
	Lsa20 (adesina de 20 kDa)	Mendes et al., 2011
	Lsa23, Lsa26, Lsa36 (adesinas de 23, 26 e 36 kDa)	Siqueira et al., 2013
	Lsa30 (adesina de 30 kDa)	Souza et al., 2012
	Lsa33 (adesina de 33 kDa)	Domingos et al., 2012
	Lsa44, Lsa45 (adesinas de 44 e 45 kDa)	Fernandes et al., 2014
	LipL40 (lipoproteína de 40 kDa) e Lp29, Lp49, MPL36, rLIC12730, rLIC10494 (proteínas de membrana externa)	Vieira et al., 2010
	rLIC12238 (proteína de membrana externa) e Lsa66 (adesina de 66 kDa)	Oliveira et al., 2011

Via Alternativa do Sistema Complemento

Via Clássica e das Lectinas

Figura 9. As leptospiros patogênicas evadem ao sistema complemento pela aquisição de reguladores do hospedeiro. As leptospiros saprófitas são susceptíveis à ação do complemento, pois não se ligam aos reguladores negativos FH e C4BP. Em contraste, as leptospiros patogênicas recrutam estes reguladores em sua superfície, escapando do ataque mediado pelo complemento. As proteínas de membrana externa da leptospira LenA e LenB ligam-se ao FH, e a LcpA ao C4BP, já as proteínas LigA e LigB ligam-se a ambos os reguladores. O FH inibe a via alternativa e o C4BP as vias clássica e das lectinas. Ambos são co-fatores do FI na clivagem dos fragmentos C3b e C4b, respectivamente, acelerando o decaimento das C3 convertases na superfície das leptospiros patogênicas. Fonte: Modificado de Fraga et al. (2011).

Figura 10. As leptospiros patogênicas evadem ao sistema complemento pelo recrutamento do plasminogênio. Leptospiros patogênicas se ligam ao plasminogênio que, na presença do ativador uPA, é convertido em plasmina. Esta protease possui ampla especificidade, clivando moléculas de matriz extracelular, como fibrinogênio, e proteínas do complemento, como o fragmento C3b e o componente C5. Diversas proteínas de membrana foram descritas como ligantes de plasminogênio tais como as proteínas LigA e LigB, representadas na figura.

2 OBJETIVOS

Os objetivos desta tese foram a identificação e a caracterização de proteases secretadas por leptospiros com a capacidade de clivar proteínas do sistema complemento humano.

As etapas envolvidas foram:

1. Obtenção de sobrenadantes de cultura de diferentes estirpes patogênicas e não patogênicas de leptospira;
2. Obtenção dos perfis eletroforéticos das proteínas secretadas pelas diferentes estirpes de leptospira;
3. Análise da capacidade dos sobrenadantes de leptospira em inibir as três vias de ativação do sistema complemento;
4. Avaliação da atividade proteolítica dos sobrenadantes de leptospira sobre as proteínas do complemento purificadas e no soro humano normal;
5. Determinação dos sítios de clivagem das proteases de leptospira sobre a molécula C3 do sistema complemento;
6. Análise da sinergia entre as proteases de leptospira e os reguladores do hospedeiro Fator I e Fator H e na clivagem de C3b;
7. Determinação da natureza química das proteases envolvidas nas clivagens das proteínas do complemento utilizando inibidores de proteases;
8. Expressão e purificação de uma metalo protease recombinante da família das termolisinas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni em sistema heterólogo;
9. Análise da presença da termolisina nos sobrenadantes de cultura das diferentes estirpes de leptospira e também de sua antigenicidade;
10. Análise da atividade proteolítica da termolisina recombinante sobre diferentes moléculas do sistema complemento;
11. Purificação de proteínas do sobrenadante de cultura das leptospiros patogênicas para obtenção de proteases nativas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Soluções e reagentes

- **Meio de cultura para *Leptospira* spp:**
- **EMJH modificado:** meio EMJH (Difco, Maryland, MD., Estados Unidos) suplementado com soro de coelho 10%, enriquecido com L-asparagina 0,015%, piruvato de sódio 0,001%, cloreto de cálcio 0,001%, cloreto de magnésio 0,001%, peptona 0,03% e extrato de carne 0,02%. O meio foi esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm.
- **Meios de cultura para *Escherichia coli*:** todos os meios de cultura foram esterilizados por autoclavagem. Soluções estéreis dos antibióticos foram adicionadas segundo a concentração final desejada. Para os meios sólidos, foram acrescentados 1,5% de ágar aos meios líquidos.
- **LB:** triptona 1,0%, extrato de levedura 0,5% e cloreto de sódio 1,0%
- **LBon:** triptona 1,0% e extrato de levedura 0,5%
- **LB-amp e LBon-amp:** meio LB ou LBon contendo ampicilina 100 µg/mL
- **LB-XGal-amp:** meio sólido LB-amp contendo XGal 50 µg/mL
- **SOB:** triptona 1,6%, extrato de levedura 0,5%, cloreto de sódio 0,5% e cloreto de potássio 0,02%
- **Preparação de *Escherichia coli* competentes:**
- **solução RF:** cloreto de magnésio 1 M
- **solução RF I:** acetato de potássio 30 mM, cloreto de cálcio 10 mM, cloreto de manganês 50 mM, cloreto de potássio 100 mM e glicerol 15%, pH 5,8
- **solução RF II:** cloreto de cálcio 75 mM, cloreto de magnésio 20 mM, cloreto de potássio 10 mM, Na-MOPS 10 mM e glicerol 15%, pH 6,8
- **Eletroforese em gel de agarose:**
- **tampão TAE:** Tris-Acetato 40 mM pH 8,5, EDTA 1 mM, pH 8,5
- **gel de agarose:** 0,8 a 1% de agarose em tampão TAE
- **tampão de amostra 10X:** azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25% e glicerol 50%

- **Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE):**
- **acrilamida 30%:** acrilamida 29% e N,N'-metilenobisacrilamida 1%
- **tampão Tris-HCl pH 8,8:** Tris-HCl 1,5 M e SDS 0,1%, pH 8,8
- **tampão Tris-HCl pH 6,8:** Tris-HCl 0,5 M e SDS 0,1%, pH 6,8
- **solução de persulfato de amônio:** persulfato de amônio 10%
- **TEMED:** N,N,N',N'-tetrametilenodiamina
- **tampão de amostra 5X:** Tris-HCl 50 mM pH 6,8, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 100 mM e SDS 2%
- **tampão de corrida:** Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%, pH 8,3
- **solução corante:** ácido acético glacial 10%, etanol 45% e azul Coomassie R250 0,25%
- **solução descorante:** ácido acético glacial 10% e etanol 30%

- **Western blot:**
- **tampão de transferência:** Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, SDS 0,02% e etanol 20%
- **PBS:** cloreto de potássio 2,7 mM, cloreto de sódio 137 mM, fosfato dibásico de sódio 10 mM e fosfato monobásico de potássio 1,7 mM, pH 7,4
- **PBS-T:** PBS contendo *Tween* 20 0,05%
- **tampão de bloqueio:** leite desnatado 10% em PBS-T
- **solução de revelação:** *kit Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce, Illinois, IL., Estados Unidos)
- **filme fotográfico:** *Hyperfilm* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido)

- **Análise da inibição das três vias do sistema complemento:**
- **tampão carbonato:** bicarbonato de sódio 100 mM; carbonato de sódio 100 mM, pH 9,6
- **PBS-T:** PBS contendo *Tween* 20 0,05%
- **solução AP:** cloreto de sódio 144 mM, barbital sódico 0,96 mM, ácido barbitúrico 2,48 mM, cloreto de magnésio 1,4 mM e EGTA 10 mM
- **GVB⁺⁺:** cloreto de sódio 144 mM, barbital sódico 0,96 mM, ácido barbitúrico 2,48 mM, cloreto de magnésio 0,83 mM e cloreto de cálcio 0,25 mM
- **solução de revelação:** OPD 0,05% e H₂O₂ 0,015%, em tampão citrato pH 5,0
- **solução stop:** ácido sulfúrico 4 M

3.2 Estirpes de leptospira, condições de cultivo e secreção

As estirpes de leptospira selecionadas para estudo encontram-se na Figura 11. As leptospiros foram cultivadas em meio EMJH modificado por 7 dias a 29 °C sob condições aeróbias. Para obtenção dos sobrenadantes, as culturas foram centrifugadas (5.400 x g por 15 min a 4 °C), lavadas duas vezes e ressuspensas em PBS 1X pH 7,4. A concentração de leptospiros foi determinada por contagem em microscópio de campo escuro, utilizando-se câmara de Petroff-Hausser. Para a secreção de proteases, as suspensões bacterianas ($1,0 \times 10^9$ leptospiros) foram incubadas a 37 °C por 4 h. Ao final deste período, os sobrenadantes foram coletados por centrifugação (5.400 x g por 15 min a 4 °C), filtrados em membrana de 0,22 µm e utilizados nos ensaios funcionais.

Com a finalidade de melhor caracterizar a secreção de proteases, ensaios adicionais foram efetuados com quantidades crescentes de leptospira ($8,0 \times 10^7$ a $1,0 \times 10^9$) e também com diferentes tempos de secreção (30 min a 4 h).

Estirpes de leptospira:

1. <i>L. interrogans</i> sorovar Pomona estirpe Pomona	}	Leptospiros patogênicas
2. <i>L. interrogans</i> sorovar Kennewicki estirpe Fromm		
3. <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni estirpe 10A		
4. <i>L. interrogans</i> sorovar Icterohaemorrhagiae estirpe RGA		
5. <i>L. interrogans</i> sorovar Pyrogenes estirpe Salinen		
6. <i>L. kirshneri</i> sorovar Cynopteri estirpe 3522 C	}	Leptospiros não patogênicas
(Saprófitas)
7. <i>L. noguchi</i> sorovar Panama estirpe n CZ 214		
8. <i>L. biflexa</i> sorovar Andamana estirpe CH11		
9. <i>L. biflexa</i> sorovar Patoc estirpe Patoc I		

Figura 11. Leptospiros patogênicas e saprófitas selecionadas para estudo.

3.3 Proteínas do sistema complemento e anticorpos

As moléculas do sistema complemento C3, C3b, iC3b, C4, C4b, C5, C2, Fator B, Fator D, C1q, Properdina, Fator I e Fator H, purificadas a partir de soro humano normal, assim como os anticorpos policlonais específicos contra estas proteínas foram adquiridos comercialmente da empresa *Complement Technology* (Texas, TX., Estados Unidos). Os anticorpos secundários conjugados com peroxidase foram adquiridos da empresa *Kirkegaard & Perry Laboratories* e foram utilizados nas diluições mencionadas na Tabela 4 (Maryland, MD., Estados Unidos).

Além das proteínas do sistema complemento também analisamos a clivagem da Imunoglobulina G humana (IgG), que foi adquirida comercialmente da empresa *Sigma-Aldrich* (Missouri, MO., Estados Unidos), juntamente com o anti-IgG conjugado com peroxidase.

Tabela 4. Anticorpos utilizados nos ensaios de *Western blot* e *ELISA*.

Anticorpo primário	Diluição	Anticorpo secundário conjugado com peroxidase	Diluição
Anticorpo anti-C3 humano feito em cabra	1:5.000	Anticorpo anti-IgG humano feito em coelho	1:10.000
Anticorpo anti-C4 humano feito em cabra	1:5.000	Anticorpo anti-IgG de cabra feito em coelho	1:5.000
Anticorpo anti-C5 humano feito em cabra	1:2.000	Anticorpo anti-IgG de camundongo feito em coelho	1:10.000
Anticorpo anti-C2 humano feito em cabra	1:2.000	Anticorpo anti-IgG de hamster feito em coelho	1:2.500
Anticorpo anti-FB humano feito em cabra	1:2.000		
Anticorpo anti-FP humano feito em cabra	1:5.000		
Anticorpo anti-FD humano feito em cabra	1:2.000		
Anticorpo anti-C1q humano feito em cabra	1:2.000		

3.4 Métodos de separação e análise de amostras

3.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e Western blot

As proteínas foram separadas por eletroforese em géis com 1,0 mm de espessura, 4,5% de acrilamida no gel de empilhamento e 10 a 15% no gel de separação. Após adição do tampão de amostra 5X, as amostras foram aquecidas a 96 °C por 3 min. As eletroforeses foram efetuadas a 120 V, em tampão de corrida, à temperatura ambiente (Laemmli, 1970). Os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Sigma-Aldrich) ou com *Pierce Silver Stain Kit* (Pierce).

Para análise por *Western blot*, as proteínas foram transferidas do gel de poliacrilamida para membrana de nitrocelulose, em sistema *Mini-Trans-Blot Cell* (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, CA., Estados Unidos), por 1 h a 350 mA. Após transferência, a membrana foi incubada com tampão de bloqueio por 16 h a 4 °C. Os anticorpos primários e secundários foram incubados, em sequência, por 1 h à temperatura ambiente com agitação (Towbin et al., 1979). A membrana foi lavada três vezes com PBS-T por 5 min entre cada uma das etapas anteriores. Por fim, adicionamos solução de revelação à membrana, a qual foi então exposta a um filme fotográfico que foi sensibilizado pela quimioluminescência emitida.

3.4.2 Dosagem de proteína e de lipopolissacarídeo

A concentração total de proteína dos sobrenadantes das leptospiros e das proteínas recombinantes foi determinada pelo *Kit BCA Protein Assay* (Pierce). As preparações de proteína foram analisadas quanto a possíveis contaminações por LPS pelo teste *Limulus Amebocyte Lysate*, o qual foi efetuado no Laboratório de Controle de Qualidade do Instituto Butantan. O conteúdo de LPS das amostras foi inferior a 0,125 EU/mL, sendo estas consideradas livres de LPS.

3.5 Análise da inibição das três vias do sistema complemento

O objetivo destes ensaios foi verificar a capacidade do secretado das leptospiros em inibir as três vias de ativação do sistema complemento. A ativação das vias alternativa, clássica e das lectinas foi analisada separadamente, segundo descrito por Roos et al. (2003), com modificações. Placas de 96 poços (Corning, Massachusetts, MA., Estados Unidos) foram sensibilizadas com LPS de *Escherichia coli* (1,0 µg/poço; Sigma-Aldrich), IgG humana (0,4 µg/poço; Sigma-Aldrich), ou manana de *Saccharomyces cerevisiae* (1,0 µg/poço; Sigma-Aldrich) dissolvidos em tampão carbonato por 16 h. Entre cada uma das etapas seguintes, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T. As placas foram bloqueadas com BSA 3% em PBS por 2 h a 37 °C. O soro humano normal foi diluído em tampão AP (diluições 1:7 a 1:16) para a via alternativa, e GVB⁺⁺ (diluições 1:50 a 1:120) para as vias clássica e das lectinas. Para avaliar o efeito inibitório, os soros diluídos foram pré-incubados com o sobrenadante da patogênica *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm, ou da não patogênica *L. biflexa* sorovar Andamana (3 µg de proteína total cada), ou com PBS 1X, por 1 h a 37 °C. Em seguida, os soros foram adicionados às placas e incubados por 1 h a 37 °C. A ativação do complemento foi medida pela deposição de C3b (via alternativa) ou C4b (via clássica e das lectinas), detectados com anticorpos policlonais anti-C3 e anti-C4, respectivamente. Estes anticorpos foram utilizados na diluição de 1:5.000 e incubados por 1 h a 37 °C. Após lavagem, o anticorpo secundário anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase foi adicionado na diluição de 1:5.000 e incubado por 1 h a 37 °C. A reação foi revelada por 15 min após adição da solução de revelação, e interrompida com solução de ácido sulfúrico 4 M. A intensidade da coloração foi determinada pela leitura da absorbância a 492 nm.

3.6 Análise da atividade proteolítica sobre componentes do sistema complemento

Nestes ensaios analisamos a atividade proteolítica dos sobrenadantes de cultura das leptospiros patogênicas e não patogênicas sobre proteínas do sistema complemento. Os sobrenadantes (3 µg em proteína total) foram incubados com as proteínas purificadas do complemento (0,25 µg) ou com soro humano normal (volume correspondente a 0,25 µg da proteína do complemento estudada), por diferentes tempos a 37 °C. As clivagens foram analisadas por *Western blot* com anticorpos policlonais específicos.

Para comprovar a presença de atividade proteolítica nos sobrenadantes, reações adicionais foram realizadas utilizando cinco, dez e cinquenta vezes menos proteína total que nas reações anteriores (0,6 µg, 0,3 µg e 0,06 µg, respectivamente) e maior quantidade de substrato (3 µg das proteínas do complemento). As clivagens foram analisadas por SDS-PAGE.

3.7 Sequenciamento amino-terminal dos produtos de clivagem de C3

Com o objetivo de determinar os sítios de clivagem das proteases de leptospira sobre a proteína C3 do complemento, o sobrenadante de *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm (2 µg em proteína total) foi incubado com C3 (150 µg) por 4 h a 37 °C. Após esse período, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE 15% e transferidas para membranas de PVDF. Os produtos de clivagem foram visualizados na membrana após coloração com *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,1% (Sigma Aldrich) contendo 40% de metanol. Os fragmentos de clivagem foram excisados e analisados por degradação de Edman (Edman et al., 1950; Niall, 1973) em sequenciador Shimadzu PPSQ-23 (Quioto, Japão).

3.8 Identificação das classes de proteases envolvidas nas clivagens das proteínas do sistema complemento

Nestes ensaios, o sobrenadante de *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm (3 µg em proteína total) foi incubado com diferentes classes de inibidores de protease nas concentrações mencionadas na Tabela 5, por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionadas as proteínas do complemento (0,25 µg) e a reação foi incubada por 2 h a 37 °C. Como controles foram efetuadas reações com os veículos dos inibidores de protease,

etanol e etanol-água (1:1). A inibição das clivagens foi analisada por *Western blot* com anticorpos específicos.

Tabela 5. Inibidores de protease utilizados nos ensaios de inibição.

Inibidor	Classe de protease	Concentração utilizada
PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo)	Serino proteases	5 mM
1,10-fenantrolina	Metalo proteases	5 mM
E-64	Cisteíno proteases	28 µM
Pepstatina	Aspártico proteases	5 µM

3.9 Expressão da termolisina recombinante em *Escherichia coli*

A termolisina codificada pelo gene LIC13322 (*Gene ID*: 2770759, Cromossomo I, *ORF*: nucleotídeos 4076605 a 4078989) de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni foi selecionada para ser produzida como proteína recombinante em *E. coli*. Esta proteína foi selecionada por possuir elevada identidade e similaridade com proteases de outros patógenos que clivam componentes do sistema complemento (ver item 4.9). A proteína LipL32, codificada pelo gene LIC11352 (*Gene ID*: 2772192, Cromossomo: I, *ORF*: nucleotídeos 1666299 a 1667117) foi utilizada como controle. O plasmídeo contendo o gene LIC11352 inserido no vetor de expressão pDEST-17 (Invitrogen, Califórnia, CA., Estados Unidos) foi cedido pelo Dr. Shaker Chuck Farah do Departamento de Bioquímica, IQ - USP. A proteína LipL32 foi expressa e purificada como previamente descrito por Hauk et al. (2005).

3.9.1 Amplificação do gene LIC13322 por reação em cadeia da polimerase (PCR)

Considerando os domínios presentes na termolisina codificada pelo gene LIC13322 desenhamos três estratégias de clonagem diferentes (Figura 12). Os insertos gênicos correspondentes aos fragmentos da termolisina foram amplificados por PCR utilizando o DNA genômico de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni como molde e oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos (Tabela 6). O DNA genômico foi previamente extraído da bactéria pela Dra. Angela Silva Barbosa do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, que nos cedeu este material.

Figura 12. Fragmentos da termolisina codificada pelo gene LIC13322 selecionados para serem produzidos como proteínas recombinantes. A análise da sequência primária da termolisina pelos programas *SMART* e *PSORTb* (Letunic et al., 2012; Yu et al., 2010) revelou que esta proteína possui peptídeo sinal para secreção (SP), pró-domínios FTP e PepSY, e domínios catalíticos Peptidase_M4 e M4_C. No esquema estão delimitados os fragmentos da termolisina selecionados para serem produzidos como proteínas recombinantes, sendo estes: FTP-PepSY-M4, PepSY-M4 e M4.

Tabela 6. Fragmentos amplificados do gene LIC13322 que codifica para a termolisina de leptospira selecionada para estudo.

Fragmento da Termolisina	Características	Primers* (5' → 3')	Inserto (pb)	Proteína (kDa)
FTP-PepSY-M4	Pró-domínios FTP, PepSY e domínios catalíticos M4	<i>Full F:</i> 5' <u>CTCGAGA</u> AAGGATAAGCAG 3' <i>Full R:</i> 5' CGCA <u>AAGCTT</u> CTAAATACTG 3'	2.307	88
PepSY-M4	Pró-domínio PepSY e domínios catalíticos M4	<i>Pep F:</i> 5' <u>CTCGAGCA</u> AGTTCAGAGAA 3' <i>Full R:</i> 5' CGCA <u>AAGCTT</u> CTAAATACTG 3'	1.959	74
M4	Domínios catalíticos M4	<i>M4 F:</i> 5' <u>CTCGAGG</u> ATGCTAGAAGATAC 3' <i>Full R:</i> 5' CGCA <u>AAGCTT</u> CTAAATACTG 3'	1.641	62

* Sítios para as enzimas de restrição *Xho*I e *Hind*III sublinhados nos primers forward (F) e reverse (R), respectivamente.

As reações em cadeia da polimerase foram efetuadas em volume final de 20 μL , sendo: 2,0 μL de tampão de reação 10X, 0,8 μL de cloreto de magnésio 50 mM, 0,4 μL de *primer forward* 10 μM , 0,4 μL de *primer reverse* 10 μM , 0,4 μL de dNTP mix 10 mM, 1,0 μL de DNA molde (114 ng/ μL), 0,5 μL (2,5 U) da enzima *High Fidelity Polymerase* (Invitrogen) e 14,5 μL de água MilliQ estéril.

Para amplificação, as reações foram submetidas a ciclos de temperatura no termociclador PTC-100 (MJ Research, Minnesota, MN, Estados Unidos). Após desnaturação inicial por 2 min a 95 °C, seguiram-se 40 ciclos com as seguintes etapas: desnaturação a 95 °C por 45 s, hibridação a 50 °C por 45 s e extensão a 68 °C por 2 min. Por fim, efetuou-se extensão adicional por 7 min a 68 °C.

3.9.2 Bactérias e vetores utilizados na produção das proteínas recombinantes

Nas etapas de clonagem dos insertos gênicos utilizamos o vetor pGEMT-Easy (Promega, Wisconsin, WI., Estados Unidos) e a bactéria *E. coli* DH5 α . Para expressão das proteínas recombinantes utilizamos o vetor pAE (Ramos et al., 2004) e as bactérias *E. coli* BL21-SI e *E. coli* BL21 C43(DE3). As duas bactérias possuem o gene que codifica a enzima T7 RNA polimerase integrado no genoma. Na *E. coli* BL21-SI este gene está sob controle do promotor *proU*, indutível por elevada osmolaridade, e na *E. coli* BL21 C43(DE3) sob controle do promotor *lacUV5*, indutível por IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo). Além disso, na *E. coli* BL21 C43(DE3) há expressão da subunidade b da proteína F₁F₀ATP sintase, a qual é acompanhada pela proliferação de membranas intracelulares que permitem a expressão de proteínas tóxicas. Na Figura 13 há uma representação esquemática dos vetores utilizados e a descrição de suas características principais.

Figura 13. Representação esquemática dos vetores pGEMT-Easy e pAE. O vetor pGEMT-Easy é utilizado para clonagem de produtos de PCR por ligação A-T (adenosina-timina). O seu uso permite a distinção entre colônias azuis (negativas) e brancas (positivas), quando o substrato XGal é adicionado ao meio de cultura (Promega Corporation). No vetor de expressão pAE, o gene de interesse é clonado sob controle do promotor T7. O vetor possui códon de iniciação seguido de região codificadora para seis histidinas na posição N-terminal, permitindo a purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade a metal. Fonte: Promega e Ramos et al. (2004).

3.9.3 Preparação e transformação de *Escherichia coli* competentes

Estirpes de *E. coli* competentes foram preparadas pelo tratamento com cloreto de cálcio (Sambrook et al., 1989). Uma colônia isolada da bactéria crescida em LB-ágar (37 °C por 16 h) foi inoculada em 2 mL de meio LB e incubada a 37 °C por 16 h com agitação. O pré-inóculo foi diluído para 100 mL com meio LB e incubado até atingir a D.O._(600 nm) de 0,6, quando 4 mL de solução RF foram adicionados. A cultura foi mantida a 4 °C por 15 min e centrifugada a 2.700 x g por 15 min a 4 °C. As células foram lavadas duas vezes com 5 mL de solução RF I e ressuspensas em 1 mL de solução RF II. As bactérias foram divididas em alíquotas de 50 µL e armazenadas a -80 °C.

As estirpes de *E. coli* competentes foram transformadas pelo método do choque térmico (Sambrook et al., 1989). Alíquotas de 5 µL das reações de ligação ou de 2 µL das minipreparações foram adicionadas às bactérias competentes. A mistura foi mantida a 4 °C por 30 min, submetida ao choque térmico a 42 °C por 2 min e incubada a 4 °C por 5 min. Para a recuperação das bactérias foram adicionados 450 µL de meio LB seguido por incubação a 37 °C por 90 min sob agitação. Por fim, as culturas foram plaqueadas em meio sólido LB contendo XGal e/ou antibióticos, e incubadas a 37 °C por 16 h.

3.9.4 Clonagem dos insertos gênicos no vetor pGEM-T Easy e subclonagem no vetor de expressão pAE

Os insertos gênicos amplificados por PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose e purificados utilizando-se o *kit QIAquick Gel Extraction* (Qiagen, Maryland, MD., Estados Unidos). Em seguida, foram efetuadas reações de ligação dos insertos ao vetor pGEMT-Easy (Promega). As reações, com volume final de 20 µL, continham: 1 µL (3 U) da enzima T4 DNA ligase, 10 µL do tampão de reação 2X, 8 µL do inserto gênico purificado e 1 µL do vetor pGEM-T Easy (50 ng). Alíquotas de 5 µL das reações de ligação foram utilizadas na transformação de bactérias *E. coli* DH5α. As colônias recombinantes foram selecionadas em placas LB-XGal-amp. Para confirmação da presença dos insertos, as construções foram digeridas com a enzima de restrição *EcoRI* e também submetidas a reações de sequenciamento de nucleotídeos, as quais foram realizadas pelo método da terminação da cadeia empregando 2,3-dideoxiribonucleotídeos (ddNTPs) (Sanger et al., 1977), adaptado para sequenciador automático *Genetic Analyser ABI3100* (Applied Biosystems, Califórnia, CA., Estados Unidos).

Para possibilitar a expressão das proteínas recombinantes em *E. coli*, os insertos foram transferidos do vetor pGEM-T Easy para o vetor de expressão pAE. Assim, as construções foram digeridas com as enzimas de restrição *XhoI* e *HindIII*, e os insertos purificados do gel de agarose foram subclonados no vetor pAE, previamente digerido com as mesmas enzimas. As reações de ligação foram efetuadas em volume final de 10 µL, sendo: 1 µL (5U) da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen), 1 µL de tampão T4 DNA ligase 10X e quantidades otimizadas de inserto e vetor. Uma alíquota de 5 µL das reações foi utilizada na transformação de *E. coli* DH5α. As colônias recombinantes foram selecionadas em placas 2YT-amp. Para confirmação da presença dos insertos no vetor pAE, as construções foram submetidas à digestão com as enzimas *XhoI* e *HindIII* e a reações de sequenciamento. Os *primers* utilizados nos sequenciamentos encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7. *Primers* utilizados nos sequenciamentos dos insertos gênicos clonados em pGEM-T Easy e pAE.

<i>Primers para pGEMT-Easy</i>	<i>Sequência</i>	<i>Primers para pAE</i>	<i>Sequência</i>
M13 <i>forward</i>	5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3'	T7 <i>forward</i>	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
M13 <i>reverse</i>	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'	pRSET <i>upstream</i>	5' CTTTGAGTGAGCTGATACCG 3'
Pep <i>forward</i>	5' CTCGAGCAAGTTCCAGAGAA 3'	pRSET <i>reverse</i>	5' ATGCTAGTTATTGCTCAGCGGTGG 3'
M4 <i>forward</i>	5' CTCGAGGATGCTAGAAGATAC 3'	Interno 1 <i>forward</i>	5' GGAAATGATAGCAAAGTAGTG 3'
Full <i>reverse</i>	5' CGCAAGCTTCTAAATACTG 3'	Interno 2 <i>forward</i>	5' GACCCTACATATGAAGAT 3'

3.9.5 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

As construções em pAE foram extraídas das bactérias *E. coli* DH5 α por *kits* de mini-preparações (Promega) e utilizadas para transformar *E. coli* BL21-SI ou *E. coli* BL21 C43(DE3). As colônias recombinantes foram selecionadas em placas LBon-amp e LB-amp, respectivamente.

Para expressão das proteínas recombinantes em *E. coli* BL21-SI, os clones contendo as construções plasmidiais foram inoculados em 30 mL de meio LBon-amp e cultivados a 37 °C por 16 h sob agitação. O pré-inóculo foi diluído em 400 mL de meio LBon-amp e incubado a 37 °C até a D.O._(600nm) de 0,6, quando foi adicionado NaCl para concentração final de 300 mM (indutor para expressão da proteína recombinante). Após incubação por 3 h, as culturas foram centrifugadas a 2.500 x g por 15 min a 4 °C, e as células ressuspensas em 30 mL de PBS 1X pH 7,4. Após lise mecânica utilizando prensa francesa (*French Press*; Thermo Fisher Scientific, Florida, FL, Estados Unidos), as frações solúveis e insolúveis foram separadas por centrifugação a 12.000 x g por 5 min a 4 °C.

Para expressão das proteínas recombinantes em *E. coli* BL21 C43(DE3), os clones foram submetidos ao mesmo ensaio de indução descrito anteriormente. Contudo, as bactérias foram cultivadas em meio LB-amp e a expressão das proteínas foi induzida com IPTG 1 mM.

Os fragmentos recombinantes PepSY-M4 e M4 da termolisina foram expressos na fração insolúvel dos lisados bacterianos, na forma de corpúsculos de inclusão, sendo, portanto necessária a realização de uma etapa adicional de renaturação. Para tanto, os corpúsculos foram solubilizados em 25 mL de uréia 8 M, e gotejados em uma solução de 2 L de PBS 1X pH 7,4 contendo 5 mM imidazol, sob agitação lenta (renaturação por diluição pulsada). Em seguida, as soluções contendo as proteínas renaturadas foram purificadas por cromatografia de afinidade a metal (Ni^{2+}), utilizando colunas HisTrap HP de 5 mL (GE Healthcare). As etapas da cromatografia encontram-se na Tabela 8. As frações contendo as proteínas purificadas foram reunidas e dialisadas contra 2 L de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 a 4 °C.

Tabela 8. Etapas da purificação por cromatografia de afinidade a metal.

Etapas	Soluções
Equilíbrio e reequilíbrio	50 mL Tris-HCl 50 mM pH 7,4 e imidazol 5 mM
Lavagens	50 mL Tris-HCl 50 mM pH 7,4 e imidazol 5 mM, 20 mM e 40 mM
Eluição	50 mL Tris-HCl 50 mM pH 7,4 e imidazol 1 M

3.10 Análise da presença de proteínas com domínio peptidase M4 nos sobrenadantes de cultura das leptospiros

A presença de proteínas com domínio peptidase M4 nos sobrenadantes das leptospiros foi analisada por *Western blot* com anticorpo policlonal produzido contra este domínio. Para a obtenção deste anticorpo, dois grupos de cinco camundongos BALB/c com 4 a 6 semanas de idade foram imunizados, via intraperitoneal, com o fragmento recombinante M4 (10 µg por animal) ou com PBS (controle), utilizando o hidróxido de alumínio como adjuvante. No total, foram efetuadas três imunizações a cada dez dias, sendo os animais sangrados pelo plexo retro-orbital dez dias após a última imunização. O sangue coletado foi incubado por 1 h à temperatura ambiente e centrifugado a 2.300 x g por 10 min a 4 °C para coleta dos soros.

No ensaio de *Western blot* foram utilizados os sobrenadantes de cultura das nove estirpes diferentes de leptospiros (Figura 11) (650 ng de proteína total cada) e o soro produzido contra o domínio peptidase M4 na diluição 1:5.000. Como controle utilizamos o

soro dos animais imunizados com PBS, na mesma diluição. O anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Kirkegaard & Perry Laboratories) foi utilizado como anticorpo secundário na diluição 1:10.000.

3.11 Infecção de hamsters com leptospiplas patogênicas

Neste ensaio foram utilizados três grupos de dez hamsters (*Mesocricetus auratus*), com aproximadamente 80 g cada. Com a finalidade de comprovar a virulência das leptospiplas utilizadas nos experimentos de secreção das proteases, o primeiro grupo de animais foi infectado com $1,0 \times 10^9$ leptospiplas em PBS, mesma dose utilizada nos ensaios *in vitro*. O segundo grupo de hamsters foi infectado com $1,0 \times 10^6$ leptospiplas em PBS, e o terceiro grupo foi o controle de animais não infectados.

Todos os hamsters do primeiro grupo morreram após três a sete dias de infecção, comprovando a virulência das bactérias utilizadas nos ensaios de secreção. Já os animais do segundo grupo não morreram, mas apresentaram sinais de leptospirose, sendo sacrificados no 15º dia de infecção, juntamente com os hamsters do grupo controle. Antes do sacrifício, os animais foram submetidos à punção cardíaca para coleta de sangue, o qual foi incubado por 1 h à temperatura ambiente e centrifugado a $2.300 \times g$ por 10 min a 4 °C para coleta dos soros.

O teste de aglutinação microscópica (MAT) foi utilizado para quantificação dos níveis de aglutininas nos soros dos hamsters. Como antígeno, foi utilizada a estirpe *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm, cultivada por sete dias em meio EMJH modificado. As reações foram efetuadas em placas de poliestireno com 96 poços, nas quais as suspensões de leptospiplas foram incubadas com os soros na diluição inicial de 1:100. Em seguida, para determinação do título de aglutininas anti-leptospiplas, foram efetuadas diluições seriadas em escala geométrica com razão dois. As microplacas foram incubadas em estufa a 29 °C por três horas. A leitura foi realizada em microscópio de campo escuro, no aumento de 100 vezes, observando-se a formação de aglutinações. O título de soro foi considerado como a recíproca da maior diluição que apresentou 50% de leptospiplas aglutinadas por campo (Corrêa et al., 1965/67; Myers, 1985). Os soros dos hamsters infectados apresentaram título de MAT entre 1.600 a 3.200, comprovando a existência de anticorpos aglutinantes e a infecção pelas leptospiplas. Os soros dos animais controle não aglutinaram estas bactérias.

3.12 Análise da antigenicidade da termolisina recombinante

O objetivo deste ensaio foi analisar a antigenicidade do fragmento PepSY-M4 da termolisina de leptospira. Para tanto, efetuamos um *Western blot* com as proteínas recombinantes PepSY-M4 e LipL32 (200 ng cada), sendo esta última utilizada como controle positivo de infecção. Para verificar o reconhecimento das proteínas, os soros dos hamsters infectados (item 3.11) foram reunidos e adicionados na diluição 1:1.000. Como controle negativo foram utilizados os soros dos animais não infectados, e como anticorpo secundário, o anti-IgG de hamster conjugado com peroxidase (Kirkegaard & Perry Laboratories) na diluição 1:2.500.

3.13 Análise da atividade proteolítica da termolisina recombinante

A atividade proteolítica dos fragmentos recombinantes PepSY-M4 e M4 da termolisina foi analisada pela incubação das proteínas (0,25 a 1 µg) com os componentes purificados C3 ou C3b (0,25 µg) a 37 °C por diferentes tempos. Alternativamente, soro humano normal (volume correspondente a 0,25 µg de C3) foi utilizado como fonte de complemento. Reações na presença dos reguladores do complemento Fator I (0,2 µg) e/ou Fator H (0,5 µg) também foram efetuadas. As clivagens foram analisadas por *Western blot* com anticorpo policlonal anti-C3.

Com a finalidade de confirmar a natureza química da termolisina, os fragmentos recombinantes PepSY-M4 e M4 foram incubados com o inibidor de metalo proteases 1,10-fenantrolina (5 mM) por 30 min à temperatura ambiente, antes da adição das proteínas do complemento. O veículo do inibidor de protease (etanol) foi utilizado como controle de reação.

3.14 Purificação de proteínas do sobrenadante de cultura das leptospiros patogênicas

A purificação do sobrenadante de cultura de *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm foi efetuada por exclusão molecular utilizando a coluna Superdex 75 10/300 GL acoplada ao cromatógrafo Akta Purifier e ao coletor de frações Frac-920 (GE Healthcare). A coluna foi previamente calibrada com azul dextran (2.000 kDa), albumina (66 kDa), quimiotripsinogênio (25 kDa) e aprotinina (6 kDa).

O sobrenadante de cultura das leptospiros (60 µg de proteína total) foi aplicado à coluna Superdex 75 10/300 GL e a eluição das proteínas foi monitorada pela absorbância a 280 nm, sendo coletadas 200 frações de 500 µL cada.

A atividade proteolítica total das frações foi analisada utilizando o substrato fluorescente Abz-GKLFSIKQ-EDDnp (10 µM) (Oliveira et al., 2012). Este peptídeo foi selecionado dentre outros testados, pois foi sobre o qual as proteases secretadas apresentaram maior atividade. A hidrólise do substrato foi quantificada em espectrofluorímetro Hitachi F-2500 (Tóquio, Japão), a 37 °C. A fluorescência do grupo Abz foi medida em $\lambda_{\text{emissão}}$ de 420 nm e $\lambda_{\text{excitação}}$ de 320 nm. O efeito interno do filtro foi corrigido como descrito por Lui et al., (1999) e a concentração de DMSO (dimetilsulfóxido) foi mantida abaixo de 1% (Hirata et al., 1994).

As frações que apresentaram atividade proteolítica sobre o substrato fluorescente foram posteriormente analisadas quanto à capacidade de clivarem a molécula C3 do sistema complemento.

Os experimentos de purificação foram efetuados no laboratório do Dr. Luiz Juliano do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção e caracterização eletroforética das proteínas secretadas pelas leptospiiras

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de leptospiiras patogênicas secretarem proteases envolvidas com mecanismos de escape do sistema complemento. Com esta finalidade, nove estirpes de leptospira foram selecionadas: sete patogênicas e duas saprófitas (Figura 14). As leptospiiras foram cultivadas em meio EMJH modificado por sete dias a 29 °C para obtermos quantidade de bactéria suficiente para os ensaios de secreção. Nestes ensaios, o meio de cultura EMJH foi substituído por PBS 1X pH 7,4 e as leptospiiras foram incubadas a 37 °C para a secreção de proteínas e demais produtos. Estas condições foram selecionadas com o objetivo de adequar as bactérias a condições similares àquelas encontradas no hospedeiro, em relação à osmolaridade (300 mOsm), pH (7,4) e temperatura (37 °C). De fato, a osmolaridade tem se mostrado ser um fator crucial para a secreção de proteínas em leptospira. Importantes fatores de virulência, como as proteínas Ligs, são secretadas apenas em osmolaridade fisiológica (300 mOsm), não havendo secreção quando as leptospiiras são cultivadas em baixas osmolaridades (70 mOsm) (Matsunaga et al., 2005).

Após o período de secreção, os sobrenadantes das leptospiiras foram coletados e analisados por eletroforese. O perfil proteico dos sobrenadantes das nove estirpes de leptospira diferem quanto à composição, número e intensidade das bandas correspondentes às proteínas secretadas (Figura 14). Pode-se observar que a maioria dos componentes dos sobrenadantes apresenta massa molecular inferior a 95 kDa. De forma interessante, as duas estirpes saprófitas possuem um perfil proteico relativamente similar, o qual difere do perfil apresentado pelas estirpes patogênicas.

Figura 14. Perfil eletroforético das proteínas secretadas pelas diferentes estirpes de leptospira. As proteínas secretadas (650 ng) foram solubilizadas em tampão redutor, desnaturadas e analisadas por SDS-PAGE 15%. O gel obtido foi corado com *Pierce Silver Stain Kit*. (M) Marcador de massa molecular *Page Ruller* (Fermentas, Vilnius, Lituânia). O perfil proteico dos sobrenadantes difere quanto à composição, número e intensidade das proteínas secretadas. As duas estirpes saprófitas possuem um perfil proteico relativamente similar, o qual difere das estirpes patogênicas.

4.2 O sobrenadante de leptospiros patogênicas inibe as três vias de ativação do sistema complemento

Com a finalidade de avaliar o efeito dos sobrenadantes das leptospiros patogênicas e saprófitas sobre o sistema complemento, efetuamos um ensaio no qual a atividade das três vias é analisada separadamente (Roos et al., 2003). Assim, para ativar especificamente as vias alternativa, clássica ou das lectinas, microplacas foram incubadas com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, imunoglobulina G humana ou manana de *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente. Os sobrenadantes das leptospiros patogênicas ou saprófitas foram pré-incubados com soro humano normal (SHN), sendo em seguida adicionados às microplacas para ativação do complemento. A ativação das vias foi medida segundo a deposição de C3b (via alternativa) ou C4b (via clássica e das lectinas) gerados.

De forma interessante, observamos que apenas o secretado da patogênica *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm foi capaz de inibir a atividade das três vias do sistema complemento. Em contrapartida, o secretado da saprófita *L. biflexa* sorovar Andamana estirpe CH11 não apresentou efeito inibitório em relação ao controle PBS (Figura 15). Esta diferença observada indica que a espécie patogênica possui mecanismos específicos de inativação do complemento em fase fluida, ou seja, no sobrenadante de cultura, e que estes mecanismos não estão presentes na espécie saprófita.

Figura 15. Sobrenadante da leptospira patogênica inibe as três vias de ativação do sistema complemento. As vias alternativa, clássica e das lectinas foram ativadas em microplacas incubadas com LPS, IgG ou manana, respectivamente. O efeito inibitório foi analisado pela pré-incubação do SHN com o sobrenadante da patogênica *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm, ou da saprófita *L. biflexa* sorovar Andamana estirpe CH11, ou PBS por 1 h a 37 °C. A ativação do complemento foi medida pela deposição de C3b (via alternativa) ou C4b (via clássica e das lectinas), com anticorpos policlonais anti-C3 e anti-C4, respectivamente. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão, de três experimentos independentes, cada um deles efetuado em duplicata (* $p < 0,05$). Apenas o sobrenadante da leptospira patogênica foi capaz de inibir a atividade das três vias do sistema complemento.

4.3 Proteases secretadas pelas leptospiros patogênicas são capazes de clivar o fragmento C3b do sistema complemento

Nos ensaios anteriores verificamos que o sobrenadante de leptospiros patogênicas foi capaz de inibir as três vias de ativação do sistema complemento. Decidimos então investigar se proteases possivelmente secretadas por estas bactérias poderiam estar relacionadas com este efeito inibitório. Para analisar essa hipótese, efetuamos ensaios proteolíticos nos quais os sobrenadantes das leptospiros foram utilizados como fonte de proteases, e o fragmento C3b do complemento como substrato. Estes experimentos revelaram que proteases presentes no sobrenadante das leptospiros patogênicas são capazes de clivar rapidamente o fragmento C3b. De fato, com apenas 5 min de incubação já é observada uma banda de clivagem de ~46 kDa, comprovando a rápida ação das proteases sobre a proteína do complemento (Figura 16 A). Além disso, pode-se notar também que com o aumento do tempo de incubação ocorre uma clivagem mais pronunciada da molécula, com a geração de fragmentos de 47 kDa a 28 kDa.

Para melhor caracterizar a produção de proteases, quantidades crescentes de leptospiros e também diferentes tempos de secreção foram analisados (Figuras 16 B e C). Nestes experimentos, verificamos que a clivagem do C3b pelas proteases foi dependente do número de bactérias utilizado, intensificando-se progressivamente com o aumento da quantidade de leptospiros (Figura 16 B). Em seguida, determinamos a cinética de secreção, incubando C3b com sobrenadantes obtidos em diferentes tempos de cultivo (30 min a 4 h). Observamos, então, que a clivagem do C3b ocorre de forma tempo-dependente, ou seja, com o aumento do tempo de cultivo observamos também maior atividade proteolítica (Figura 16 C). Em relação a este último ensaio, gostaríamos de ressaltar que as leptospiros têm um crescimento relativamente lento, quando comparadas a outras bactérias, atingindo fase exponencial em sete dias. Assim, no período estudado (30 min a 4 h), não se espera multiplicação bacteriana intensa. Portanto, o tempo de cultivo nesta faixa reflete aproximadamente o tempo de secreção de moléculas para o sobrenadante da cultura.

De forma geral, os testes aqui descritos revelaram que a atividade proteolítica do sobrenadante das leptospiros patogênicas aumenta com a quantidade de bactérias e também com o tempo de secreção, o que corrobora a produção e secreção de proteases por estes microrganismos.

Figura 16. Proteases secretadas por leptospiros patogênicas clivam o fragmento C3b do complemento. (A) O sobrenadante da patogênica *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm ($1,0 \times 10^9$ bactérias) foi incubado com C3b por 5 a 120 min a 37 °C. As clivagens foram analisadas por *Western blot* com anticorpo policlonal anti-C3. A clivagem de C3b pelo FI com FH como co-fator foi utilizada como controle. Com apenas 5 min de reação já pode ser observada clivagem de C3b, comprovando a rápida ação das proteases sobre a proteína do complemento. (B) Quantidades crescentes de leptospiros foram incubadas por 4 h a 37 °C, e os sobrenadantes coletados incubados com C3b por 1 h a 37 °C. (C) As leptospiros ($1,0 \times 10^9$ bactérias) foram incubadas a 37 °C por 30 min a 4 h, e os sobrenadantes coletados incubados com C3b por 1 h a 37 °C. A atividade proteolítica do sobrenadante das leptospiros sobre C3b foi dependente do número de bactérias e também do tempo de secreção.

4.4 Proteases secretadas pelas leptospiros patogênicas atuam em sinergia com reguladores do hospedeiro para inativar o fragmento C3b

Meri e colaboradores (2005) demonstraram que leptospiros patogênicas são capazes de se ligar ao Fator H, um regulador plasmático do sistema complemento. Nosso grupo comprovou esta ligação e ampliou os estudos, identificando proteínas de membrana das leptospiros que se ligam ao Fator H e mapeando os domínios pelos quais este regulador interage com as proteínas da bactéria (Silva et al., 2011; Castiblanco-Valencia et al., 2012). Além disso, verificamos que o Fator H ligado às leptospiros patogênicas retém a atividade de co-fator do Fator I na clivagem de C3b. Contudo, nos ensaios realizados com os sobrenadantes das leptospiros, observamos que a proteólise de C3b também ocorre na ausência de Fator H e Fator I, o que sugere a existência de proteases bacterianas capazes de clivar diretamente esta molécula. Considerando este fato, perguntamo-nos se as proteases de leptospira poderiam atuar em conjunto com o Fator I e o Fator H, ou seja, se haveria uma clivagem mais pronunciada do C3b na presença destas proteínas reguladoras. Para investigar esta hipótese, o sobrenadante das leptospiros patogênicas foi incubado com C3b, Fator I e Fator H e as clivagens obtidas foram analisadas por *Western blot* com anticorpo anti-C3 (Figura 17). Neste ensaio observamos que, de fato, há uma clivagem mais intensa de C3b quando adicionamos Fator I e Fator H à reação, ocorrendo completa degradação da cadeia α' , a qual não ocorre quando o C3b é incubado apenas com os reguladores (Fator I e Fator H) ou com as proteases de leptospira. Deste modo, podemos inferir que os reguladores do sistema complemento Fator I e Fator H atuam em sinergia com as proteases secretadas pelas leptospiros patogênicas para a eficiente inativação do fragmento C3b do sistema complemento.

Figura 17. Clivagem do fragmento C3b pelas proteases de leptospira em sinergia com os reguladores do hospedeiro FI e FH. O sobrenadante de *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm foi incubado com C3b na presença ou ausência de FI e/ou FH a 37 °C por 2 h. As proteínas do complemento foram incubadas com PBS como controle. As clivagens foram analisadas por *Western blot* com anticorpo policlonal anti-C3. (*) A cadeia α' do C3b foi totalmente degradada pela ação conjunta entre as proteases de leptospira e o FI na presença do FH como co-fator.

4.5 Proteases secretadas por diferentes estirpes de leptospiros patogênicas clivam proteínas das três vias do sistema complemento

Nos ensaios anteriores verificamos que a patogênica *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm é capaz de secretar proteases que clivam o fragmento C3b do sistema complemento. Com a finalidade de aprofundar este estudo, analisamos a atividade proteolítica dos sobrenadantes de nove estirpes diferentes de leptospiros: sete patogênicas e duas saprófitas (Figura 18). Expandimos também a variedade de substratos, utilizando proteínas das três vias do sistema complemento e a imunoglobulina G humana.

Avaliamos a clivagem das seguintes moléculas do sistema complemento:

- **C3, C3b e C5:** moléculas comuns às três vias de ativação do complemento
- **iC3b:** fragmento gerado pela clivagem do C3b pelo Fator I (Figura 4)
- **Fator B, Fator D e Properdina:** proteínas da via alternativa
- **C4, C4b e C2:** proteínas das vias clássica e das lectinas
- **C1q:** molécula da via clássica

Para analisar a atividade proteolítica, os sobrenadantes das diferentes estirpes de leptospiros foram incubados separadamente com cada molécula do complemento purificada. As clivagens foram analisadas por *Western blot* utilizando anticorpos específicos contra as proteínas do complemento.

Nestes ensaios, verificamos que apenas os sobrenadantes das estirpes patogênicas de leptospira apresentaram atividade proteolítica sobre as moléculas do sistema complemento. As sete estirpes patogênicas selecionadas apresentaram padrão de clivagem semelhante sobre os substratos testados, ao passo que as estirpes saprófitas mostraram apenas reduzida atividade proteolítica sobre estas moléculas (Figura 18).

As proteases secretadas pelas estirpes patogênicas de leptospira foram capazes de clivar a proteína C3, que é a molécula central do sistema complemento, bem como os fragmentos imunologicamente ativos C3b e iC3b, e também proteínas da via alternativa (Fator B), clássica e das lectinas (C4b e C2) (Figura 18).

Dentre as moléculas do complemento analisadas, verificamos que C1q, C4, Fator D e Properdina não foram clivadas pelas proteases de leptospira (Figura 19). Este resultado mostra que, apesar de atuar em diferentes substratos, as proteases apresentam certo grau de especificidade. Além disso, uma vez não observada clivagem da proteína C1q, decidimos analisar se as proteases seriam capazes de clivar moléculas de IgG, nas quais o C1q pode se ligar para iniciar a via clássica (Figura 19). Verificamos, porém, que as moléculas de IgG também não foram clivadas pelas proteases de leptospira. Contudo, mesmo na ausência de clivagem destas moléculas, não podemos excluir totalmente a atuação das proteases nesta etapa de ativação da via clássica, pois, além da IgG, outras moléculas podem servir como plataformas para a ligação do C1q, tais como a IgM e as pentraxinas, que talvez possam ser alvos de degradação das proteases de leptospira.

De forma interessante, as proteases das leptospiros patogênicas não foram capazes de clivar o componente C4, mas a proteína C4b, que é derivada do C4, teve a cadeia α' completamente degradada (Figuras 18 e 19). Uma possível explicação para este fato, seria a existência de sítios proteolíticos na cadeia α do C4 que são expostos somente quando esta é clivada, gerando a cadeia α' do C4b, a qual tornar-se-ia susceptível à ação das proteases de leptospira.

A atividade proteolítica sobre as moléculas do complemento foi confirmada com a realização de ensaios adicionais, nos quais foram utilizadas quantidades reduzidas dos sobrenadantes das leptospiros (Figura 20). Nestas condições, observamos que as proteínas do complemento continuam a ser clivadas mesmo quando utilizamos cinco a cinquenta vezes menos sobrenadante (0,6 μ g a 0,06 μ g) que nas reações iniciais (3 μ g), o que resulta em uma proporção de proteína total em relação ao substrato de 1:50 (0,06 μ g de proteína total presente no sobrenadante em relação à 3 μ g de proteína do complemento purificada). Considerando que para efetuar o cálculo desta proporção utilizamos a quantidade de proteína total presente no secretado, podemos inferir que estamos em uma razão bem menor das proteases de leptospira em relação às proteínas do complemento, visto que nos sobrenadantes de cultura há diversas proteínas além das proteases. Assim, com o conjunto de resultados aqui apresentados, conseguimos comprovar de forma consistente que as proteases secretadas pelas leptospiros patogênicas são realmente capazes de clivar moléculas do sistema complemento.

Figura 18. Proteases secretadas pelas leptospiros patogênicas clivam proteínas das três vias do sistema complemento. Os sobrenadantes de leptospiros patogênicos (1 a 7) e saprófitas (8 e 9) foram incubados com as proteínas do complemento purificadas por 1 h a 37 °C. As clivagens foram analisadas por *Western blot* com anticorpos específicos contra as moléculas do complemento. As estirpes de leptospira 1 a 9 encontram-se listadas na Figura 14. As proteases secretadas pelas estirpes patogênicas de leptospira clivaram a molécula central do complemento C3, os fragmentos C3b e iC3b, além de proteínas das vias alternativa (FB), clássica e das lectinas (C2 e C4b). (*) Completa degradação da cadeia α' do C4b.

Figura 19. Proteases secretadas pelas leptospiros patogênicas não apresentam atividade proteolítica sobre C1q, C4, Fator D, Properdina e IgG humana. Os sobrenadantes de leptospiros patogênicas (1 a 7) e saprófitas (8 e 9) foram incubados com as proteínas purificadas por 1 h a 37 °C. As clivagens foram analisadas por *Western blot* com anticorpos específicos contra os substratos testados. As estirpes de leptospiros 1 a 9 encontram-se listadas na Figura 14. Legenda: P - Properdina e FD - Fator D.

Figura 20. As proteases secretadas pelas leptospiros patogênicas apresentam atividade proteolítica mesmo em quantidades reduzidas. Os sobrenadantes da patogênica *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm e da saprófita *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc foram incubados com proteínas do complemento por 1 e 4 h a 37 °C, em quantidades que representam (1) cinquenta, (2) dez e (3 e 4) cinco vezes menos proteína total que nas reações iniciais. As clivagens foram analisadas por SDS-PAGE.

4.6 As proteases secretadas pelas leptospiros patogênicas clivam as cadeias α e β da molécula C3

Com a finalidade de determinar os pontos de clivagem das proteases de leptospira sobre a molécula de C3, submetemos os oito fragmentos resultantes da proteólise de C3 ao sequenciamento amino-terminal por degradação de Edman (Figura 21). Dentre os produtos de clivagem analisados, foi possível obter a sequência N-terminal de apenas três destes. Limitações da técnica como a elevada massa de proteína necessária, bem como a semelhante migração eletroforética apresentada por algumas bandas, podem ter contribuído para este resultado.

Pela análise dos sequenciamentos amino-terminais obtidos, conseguimos comprovar que ambas as cadeias α e β da molécula de C3 são clivadas pelas proteases de leptospira. A localização dos sítios de clivagem nos possibilitou elaborar um modelo da degradação de C3 pelas proteases de leptospira (Figura 21). Este modelo nos permitiu inferir que os fragmentos de 68 kDa, 47 kDa (YGGGYG-) e 43 kDa (RSSKI-) são possivelmente provenientes da degradação da cadeia α , e a banda de 28 kDa (HPSQ-) da clivagem da cadeia β da molécula de C3.

Com a utilização do programa de bioinformática *Protean* (*DNAStar*, Wisconsin, WI., Estados Unidos), verificamos que os sítios de clivagem das proteases localizam-se em regiões hidrofílicas, antigênicas e potencialmente expostas da molécula de C3. Além disso, conseguimos mapear os pontos de hidrólise na estrutura cristalográfica da proteína (PDB 2A73, Janssen et al., 2005), o que confirmou a localização destes sítios na superfície da molécula, constituindo, portanto, potenciais alvos para as proteases de leptospira (Figura 22).

Figura 21. Sítios de clivagem das proteases de leptospira na molécula C3 do complemento. (A) O sobrenadante da patogênica *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm foi incubado com a proteína C3 por 4 h a 37 °C. As proteínas foram submetidas a SDS-PAGE e transferidas para membrana de PVDF. Após coloração com *Coomassie blue* (Sigma), os produtos de clivagem foram excisados da membrana e analisados por degradação de Edman. (M) Marcador *Page Ruller* (Fermentas). (B) Representação esquemática da clivagem de C3 pelas proteases de leptospira. As sequências N-terminais dos fragmentos estão indicadas próximas às setas, as quais representam os possíveis sítios de clivagem. Ambas as cadeias α e β da molécula de C3 foram clivadas pelas proteases de leptospira.

Figura 22. Localização dos sítios de clivagem das proteases de leptospira na molécula C3 do sistema complemento. Os sítios de clivagem das proteases de leptospira foram localizados na estrutura cristalográfica da molécula C3 (PDB 2A73, Janssen et al., 2005) com a utilização do programa de bioinformática *PyMOL Molecular Graphics System* (Schrödinger, Massachusetts, MA. Estados Unidos). Os aminoácidos que correspondem aos pontos de clivagem (indicados pelas setas pretas) encontram-se em azul escuro e preto. Os aminoácidos sequenciados por degradação de Edman estão destacados em vermelho próximos ao aminoácido em azul escuro, o qual também foi sequenciado. Pode-se observar que os sítios de clivagem das proteases de leptospira localizam-se em regiões potencialmente expostas das cadeias α e β da proteína C3.

4.7 As proteases secretadas pelas leptospiros patogênicas clivam proteínas do complemento no soro humano normal

Verificamos que proteases secretadas pelas leptospiros patogênicas são capazes de clivar diversas proteínas do complemento purificadas. Contudo, para o estabelecimento do processo infeccioso, é importante que tais proteases clivem também moléculas do complemento presentes no soro. Assim, para verificar a ocorrência destas clivagens, novos ensaios proteolíticos foram efetuados utilizando soro humano normal (SHN) como fonte de complemento (Figura 23).

Os componentes C3, C2 e Fator B presentes no soro foram clivados pelas proteases das leptospiros patogênicas (Figura 23). Contudo, as clivagens foram menos pronunciadas que as obtidas quando utilizamos as proteínas do complemento purificadas (Figura 18). Esta atenuação das clivagens pode ser uma consequência da existência de inibidores de protease no soro tais como a α_2 -macroglobulina, a qual não está presente quando utilizamos as proteínas purificadas. Outra hipótese seria o fato da clivagem individual das proteínas ter sido afetada por uma competição entre os diferentes substratos (proteínas do complemento e outros), que estão presentes ao mesmo tempo no soro.

Nestes ensaios observamos também que a clivagem de C5 ocorre apenas quando utilizamos a proteína purificada como substrato, não havendo degradação no soro humano normal (Figura 24). Contudo, verificamos o contrário para a proteína C4, ou seja, as proteases de leptospira foram capazes de clivar a molécula presente no soro (Figura 23), mas não a proteína purificada (Figura 19). Acreditamos que uma possível explicação para este fato seja a presença de moléculas no soro que possam atuar como co-fatores das proteases de leptospira na clivagem do C4, ou ainda, que proteínas do sobrenadante das leptospiros possam atuar como co-fatores das proteases presentes no soro, possibilitando a clivagem nesta condição.

Figura 23. Proteases secretadas pelas leptospiros patogênicas clivam proteínas do complemento no soro humano normal. O sobrenadante de *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm foi incubado com SHN por 1 h a 37 °C. SHN diluído em PBS foi utilizado como controle. Os produtos de clivagem foram analisados por *Western blot* com anticorpos policlonais específicos contra as proteínas do complemento. As moléculas de C3, C4, C2 e FB foram clivadas pelas proteases presentes no sobrenadante da leptospira patogênica.

Figura 24. Proteases secretadas pelas leptospiros patogênicas clivam a proteína C5 apenas quando purificada. (A) Quantidades crescentes dos sobrenadantes da patogênica *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm (1 a 3) e da saprófita *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc (4), foram incubadas com as moléculas do complemento por 1 h e 4 h a 37 °C. As clivagens foram analisadas por SDS-PAGE. (B) O sobrenadante de *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm foi incubado com SHN por 1 h a 37 °C. SHN diluído em PBS foi utilizado como controle. Os produtos de clivagem foram analisados por Western blot com anticorpo policlonal anti-C5.

4.8 As proteases secretadas pelas leptospiros patogênicas são inibidas pela 1,10-fenantrolina

Verificamos que diferentes estirpes patogênicas de leptospira são capazes de secretar proteases que clivam moléculas do complemento tanto purificadas quanto presentes no soro humano normal. Decidimos, então, determinar quais as classes de proteases presentes nos sobrenadantes de cultura que são responsáveis por estas clivagens. Com este objetivo, utilizamos inibidores das quatro principais classes de proteases, sendo estes: PMSF (serino proteases), E-64 (cisteíno proteases), 1,10-fenantrolina (metalo proteases) e pepstatina (aspártico proteases). Nestes ensaios, os inibidores de protease foram incubados com o sobrenadante de *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm, sendo em seguida adicionadas as proteínas do complemento.

Observamos que apenas o inibidor de metalo proteases 1,10-fenantrolina foi capaz de inibir as clivagens das moléculas do complemento pelas proteases secretadas pelas leptospiros patogênicas (Figura 25). As clivagens da molécula C3 e dos fragmentos C3b, iC3b e C4b foram completamente inibidas pela 1,10-fenantrolina. Contudo, a proteólise de C2 e Fator B foi parcialmente inibida, podendo ser ainda observadas algumas bandas de degradação na presença do inibidor.

Com os resultados aqui apresentados, podemos inferir que metalo proteases presentes no secretado das leptospiros patogênicas constituem uma das classes responsáveis pelas clivagens das moléculas do complemento. Contudo, devido à inibição parcial das clivagens de Fator B e C2, não podemos excluir a participação de outras classes de proteases, as quais talvez possam atuar em conjunto com as metalo proteases.

Figura 25. Proteases secretadas pelas leptospiros patogênicas são inibidas pela 1,10-fenantrolina. Para determinar as classes de proteases responsáveis pelas clivagens, antes da adição das proteínas do complemento, o sobrenadante de *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm foi incubado com os seguintes inibidores: (4) PMSF 5 mM (serino proteases), (5) E-64 28 μM (cisteíno proteases), (6) 1,10-fenantrolina 5 mM (metalo proteases) ou (7) pepstatina 5 μM (aspártico proteases). Os veículos dos inibidores foram utilizados como controles, sendo: (1) PBS, (2) Etanol : Água (1:1) e (3) Etanol. As clivagens das proteínas do complemento foram analisadas por *Western blot* com anticorpos específicos.

4.9 Termolisinas: metalo proteases de leptospira

Os ensaios de inibição proteolítica mostraram que as metalo proteases podem ser uma das classes de enzimas responsáveis pelas clivagens das proteínas do complemento obtidas com os sobrenadantes das leptospiros patogênicas. Considerando este dado, efetuamos uma busca nos genomas de leptospira sequenciados para encontrar possíveis candidatos para esta função. Analisando comparativamente os genomas das espécies patogênicas e saprófitas, observamos que grande parte dos genes que codificam proteases nas leptospiros patogênicas possui algum grau de identidade e/ou similaridade com genes presentes nas espécies saprófitas. De forma interessante, verificamos que uma das poucas exceções são as termolisinas, metalo proteases da família peptidase M4 (*MEROPS database*, Rawlings et al., 2012), cujos genes estão presentes apenas em estirpes patogênicas de leptospira.

L. interrogans sorovar Copenhageni possui quatro genes que codificam para metalo proteases da família das termolisinas, sendo estes: LIC10715, LIC13320, LIC13321 e LIC13322 (Figura 26). A análise das proteínas codificadas por estes genes utilizando a ferramenta de bioinformática *SMART* (Letunic et al., 2012) revelou que todas possuem o domínio catalítico M4, mesmo com certas variações na composição de aminoácidos. Considerando estes dados, efetuamos uma busca na literatura por proteases secretadas por outros patógenos que possuíssem o domínio M4 e que apresentassem atividade proteolítica sobre proteínas do sistema complemento. Encontramos quatro proteases com estas características: a aureolisina de *Staphylococcus aureus*, a toxina lambda de *Clostridium perfringens*, a elastase de *Pseudomonas aeruginosa* e a gelatinase de *Enterococcus faecalis*. Utilizando a ferramenta de bioinformática *CLUSTALW* (Thompson et al., 1994) efetuamos um alinhamento entre os domínios catalíticos das termolisinas e os das proteases que também possuem o domínio M4. Dentre as quatro termolisinas de leptospira, a protease codificada pelo gene LIC13322 possui domínio catalítico com maior grau de identidade e similaridade com as proteases já descritas como enzimas que clivam proteínas do complemento (Tabela 9). Considerando esta análise, selecionamos a proteína codificada pelo gene LIC13322 de *L. interrogans* sorovar Copenhageni para ser produzida na forma recombinante para estudos de atividade proteolítica sobre as proteínas do sistema complemento.

Figura 26. Localização cromossômica dos genes que codificam para termolisinas em *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Os genes que codificam para proteínas da família das termolisinas localizam-se no cromossomo I de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Três destes genes apresentam-se em sequência (LIC13320, LIC13321 e LIC13322) e o quarto localiza-se em outro local do genoma (LIC10715). O gene LIC13322 foi selecionado para estudo neste trabalho. Fonte: *NCBI database* (The NCBI handbook).

Tabela 9. Identidade e similaridade entre os domínios catalíticos M4 da termolisina de leptospira codificada pelo gene LIC13322 e metalo proteases de patógenos capazes de clivar proteínas do complemento.

Microrganismo	Metallo protease	Proteína do complemento clivada	Identidade*	Similaridade*
<i>Staphylococcus aureus</i>	Aureolisina (Laarman et al., 2011)	C3	25%	35%
<i>Clostridium perfringens</i>	Toxina lambda (Jin et al., 1996)	C3	24%	35%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Elastase (Hong et al., 1992)	C3, C1q	20%	35%
<i>Enterococcus faecalis</i>	Gelatinase (Park et al., 2007; 2008)	C3, C3b, iC3b, C3a	20%	32%

* Identidade e similaridade obtidas por alinhamento dos domínios catalíticos utilizando o programa *CLUSTALW* (Thompson et al., 1994).

4.9.1 Produção da termolisina recombinante em sistema heterólogo

A análise da sequência de aminoácidos da termolisina codificada pelo gene LIC13322 utilizando os programas de bioinformática *SMART* e *PSORTb* (Letunic et al., 2012; Yu et al., 2010) revelou que esta proteína possui um peptídeo sinal para secreção (SP), pró-domínios FTP e PepSY, e domínios catalíticos Peptidase_M4 e M4_C (Figura 27). A região anterior ao domínio catalítico é denominada de pró-peptídeo, a qual é constituída pelos domínios FTP e PepSY na termolisina. Estes domínios podem atuar como inibidores, prevenindo a ativação prematura da enzima, ou como chaperonas intramoleculares, promovendo o correto dobramento dos domínios catalíticos e favorecendo a atividade. Os domínios catalíticos da termolisina pertencem à família peptidase M4 das metalo proteases (MEROPS database, Rawlings et al., 2012), as quais requerem um cátion divalente, geralmente o zinco, para a catálise (Finn et al., 2014).

Considerando a localização dos domínios existentes na termolisina de leptospira, selecionamos três fragmentos para serem produzidos como proteínas recombinantes em *Escherichia coli*: (1) FTP-PepSY-M4, (2) PepSY-M4 e (3) M4 (Figura 26). A região que codifica para o peptídeo sinal foi excluída de todas as construções, uma vez que sua função é direcionar as proteínas para secreção, sendo removido para a obtenção de enzimas funcionais.

Figura 27. Representação esquemática da termolisina codificada pelo gene LIC13322 de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. A análise da sequência primária da termolisina pelos programas *SMART* e *PSORTb* (Letunic et al., 2012; Yu et al., 2010) revelou que esta proteína possui peptídeo sinal para secreção (SP), pró-domínios FTP e PepSY, e domínios catalíticos Peptidase_M4 e M4_C. As posições dos aminoácidos que delimitam os diferentes domínios estão indicadas nas setas. No esquema estão representados também os fragmentos da termolisina selecionados para serem produzidos como proteínas recombinantes: FTP-PepSY-M4, PepSY-M4 e M4.

A produção dos diferentes fragmentos recombinantes da termolisina foi efetuada utilizando o sistema de expressão heterólogo em *Escherichia coli*. Para tanto, os nucleotídeos correspondentes aos insertos gênicos foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando como molde o DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe M20 e nucleotídeos iniciadores específicos (*primers*) (Tabela 6).

As tentativas de amplificar o inserto gênico correspondente ao fragmento FTP-PepSY-M4 não foram bem sucedidas. Prosseguimos então com a amplificação dos insertos correspondentes aos fragmentos PepSY-M4 e M4 que, após obtidos e purificados, foram clonados no vetor pGEMT-Easy (Figura 28). As construções obtidas foram analisadas após digestão com a enzima de restrição *EcoRI* e por sequenciamento.

Figura 28. Amplificação e clonagem dos insertos gênicos da termolisina no vetor pGEMT-Easy. (A) Os insertos gênicos correspondentes aos fragmentos PepSY-M4 e M4 foram amplificados por PCR a partir do DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe M20 e analisados em gel de agarose 1%. (B) Os insertos gênicos purificados foram clonados no vetor pGEMT-Easy e as construções obtidas analisadas por digestão com a enzima *EcoRI*, que permite a liberação dos insertos. Foram analisadas duas amostras de cada construção: 1 e 2. Para o inserto PepSY-M4 foram positivas as amostras 1 e 2, e para o inserto M4 somente a amostra 2. (M) Marcador de massa molecular (1 kb *plus DNA ladder*, Fermentas).

Para clonagem dos insertos gênicos no vetor de expressão pAE, as construções em pGEM-T Easy foram digeridas com as enzimas de restrição *Xho*I e *Hind*III (Figura 29 A) e os insertos purificados ligados no vetor pAE, previamente digerido com as mesmas enzimas.

As construções em pAE foram analisadas após digestão com as enzimas de restrição *Xho*I e *Hind*III (Figura 29 B). A análise de restrição confirmou a presença dos insertos no vetor pAE pela obtenção de bandas com massa molecular esperada. Além disso, o sequenciamento das construções com *primers* específicos (Tabela 7) revelou que os insertos gênicos foram inseridos corretamente no vetor de expressão, proporcionando um correto quadro de leitura para a tradução das proteínas recombinantes.

Figura 29. Clonagem dos insertos gênicos da termolisina no vetor de expressão pAE. (A) Os insertos obtidos após digestão das construções em pGEMT-Easy com as enzimas *Xho*I e *Hind*III foram purificados e analisados em gel de agarose 1%. (B) Os insertos purificados foram clonados em vetor pAE e as construções obtidas analisadas após digestão com as enzimas *Xho*I e *Hind*III, que permite a liberação dos insertos. Foram analisadas duas amostras de cada construção: 1 e 2. Todas as amostras analisadas foram positivas, ou seja continham os insertos PepSY-M4 ou M4. (M) Marcador de massa molecular (1 kb *plus* DNA ladder e GeneRuler, Fermentas).

Para expressão das proteínas recombinantes, as construções em pAE foram utilizadas na transformação de bactérias *E. coli* BL21(SI). Como controle, bactérias foram transformadas com o vetor pAE sem inserto. A indução das proteínas recombinantes foi efetuada pela adição de cloreto de sódio ao meio de cultura (concentração final de 300 mM), seguida de incubação das bactérias por 3 h a 30 °C. Após este período, as células foram recuperadas por centrifugação e lisadas. As frações solúveis e insolúveis foram separadas por centrifugação e analisadas por SDS-PAGE (Figura 30).

Observamos que o fragmento PepSY-M4 foi expresso com sucesso na estirpe *E. coli* BL21(SI). Contudo, não foi possível expressar o fragmento M4 nesta bactéria que, provavelmente devido à toxicidade da proteína, teve seu crescimento impedido. Assim, para obtenção do fragmento M4 foi necessária a utilização da *E. coli* BL21(DE3)C43, que é uma estirpe mais adequada à expressão de proteínas tóxicas. A expressão do fragmento M4 nesta bactéria foi induzida pela adição de IPTG (concentração final de 1 mM) e os lisados bacterianos resultantes foram analisados por SDS-PAGE (Figura 30).

Figura 30. Expressão dos fragmentos da termolisina em *E. coli*. Estirpes de *E. coli* contendo as construções em pAE foram induzidas para expressar as proteínas recombinantes. Como controle, bactérias transformadas com o vetor pAE sem inserto também foram induzidas. Após indução, as bactérias foram lisadas e as frações solúveis e insolúveis analisadas por SDS-PAGE 10%. As induções foram efetuadas em duplicata e estão representadas no gel pelos números 1 e 2. Os fragmentos PepSY-M4 e M4 da termolisina foram expressos na fração insolúvel dos lisados bacterianos. As setas indicam as proteínas recombinantes com as massas moleculares esperadas. (M) Marcador *Page Ruller* (Fermentas).

Os fragmentos recombinantes PepSY-M4 e M4 da termolisina foram expressos na fração insolúvel dos lisados bacterianos, ou seja, na forma de corpúsculos de inclusão (Figura 30). Assim, para obtenção das proteínas na forma solúvel, foi necessária a realização de uma etapa de renaturação antes do processo de purificação. Para tanto, os corpúsculos de inclusão foram solubilizados em uréia 8 M e gotejados lentamente em uma solução de PBS 1X pH 7,4, em um processo denominado renaturação por diluição pulsada.

Após a renaturação, as soluções contendo as proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade a metal e as frações obtidas analisadas por SDS-PAGE 12% (Figura 31). Os fragmentos PepSY-M4 e M4 foram eluídos com imidazol 1 M, e as frações contendo as proteínas purificadas foram dialisadas contra tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

Figura 31. Purificação dos fragmentos da termolisina por cromatografia de afinidade a metal. Os fragmentos PepSY-M4 e M4 foram expressos na fração insolúvel dos lisados bacterianos, renaturados por diluição pulsada e purificados por cromatografia de afinidade a metal. (1) Fração insolúvel solubilizada em uréia 8 M; (2 a 5) Frações da eluição com imidazol 1 M. As setas indicam as proteínas com massas moleculares esperadas de 74 kDa (PepSY-M4) e 62 kDa (M4). (M) Marcador *Page Ruller* (Fermentas).

4.9.2 Análise da presença de proteínas com domínio peptidase M4 nos sobrenadantes de cultura das leptospiros

A presença de proteínas com domínio peptidase M4 nos sobrenadantes das leptospiros foi analisada por *Western blot* com anticorpo policlonal produzido em camundongos contra o fragmento recombinante M4 da termolisina. Os sobrenadantes de cultura das nove estirpes de leptospira selecionadas foram separados por SDS-PAGE e transferidos para membrana de nitrocelulose. Após bloqueio dos sítios inespecíficos, a membrana foi incubada com anticorpo policlonal contra o fragmento M4, seguida de anticorpo secundário e revelação com substrato quimioluminescente. Como controle, efetuamos o mesmo ensaio utilizando soro dos animais imunizados com PBS, o qual não reconheceu proteínas nos sobrenadantes das leptospiros.

Verificamos que o anticorpo policlonal contra o fragmento M4 da termolisina foi capaz de reconhecer proteínas apenas no sobrenadante das leptospiros patogênicas, não havendo reconhecimento de bandas nas espécies saprófitas (Figura 32). Além disso, observamos que as proteínas reconhecidas possuem massa molecular entre 75 e 55 kDa (Figura 32). Estas bandas podem corresponder ao fragmento PepSY-M4 (71 kDa) e M4 (57 kDa) da termolisina codificada pelo gene LIC13322, bem como a fragmentos semelhantes das termolisinas codificadas pelos genes LIC13321, LIC13320 e LIC10715, as quais também possuem o domínio catalítico peptidase M4.

Este resultado obtido corrobora a análise por bioinformática efetuada com os genomas das leptospiros, na qual observamos que os genes codificadores de proteases com domínio M4 estão presentes apenas em espécies patogênicas como *L. interrogans*, não havendo genes semelhantes em leptospiros saprófitas como *L. biflexa*.

Figura 32. Proteínas dos sobrenadantes das leptospiros patogênicas são reconhecidas por anticorpo contra o fragmento M4 da termolisina. Os sobrenadantes de estirpes patogênicas (1 a 7) e saprófitas (8 e 9) de leptospira foram separados por SDS-PAGE e transferidos para membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com anticorpo contra o fragmento M4 da termolisina. Proteínas com massa molecular de 75 a 55 kDa foram reconhecidas apenas nos sobrenadantes das estirpes patogênicas de leptospira.

4.9.3 Análise da antigenicidade da termolisina recombinante

O objetivo deste ensaio foi verificar se o fragmento PepSY-M4 da termolisina pode ser reconhecido por anticorpos produzidos durante a infecção por leptospiros, ou seja, analisar se esta proteína é antigênica. Para tanto, hamsters foram infectados com *L. interrogans* sorovar Kennewiki estirpe Fromm ($1,0 \times 10^6$ bactérias) e o soro coletado foi incubado com as proteínas recombinantes imobilizadas em membrana de nitrocelulose. A proteína de leptospira LipL32, que é expressa durante a infecção (Guerreiro et al., 2001; Haake et al., 2000), foi utilizada como controle positivo. Soro de animais não infectados também foram incubados com as proteínas imobilizadas como controle negativo.

Verificamos que o fragmento PepSY-M4 da termolisina e a proteína controle LipL32 foram reconhecidos pelo soro dos hamster infectados com as leptospiros (Figura 33). Não houve reconhecimento destas proteínas pelo soro controle dos animais não infectados. Este resultado demonstra que a termolisina é antigênica, ou seja, que são produzidos anticorpos contra epítomos presentes nesta proteína durante a infecção por leptospiros patogênicas.

Figura 33. O fragmento PepSY-M4 da termolisina é reconhecido pelo soro de hamsters infectados com leptospiros patogênicas. Para analisar a antigenicidade da termolisina, o fragmento PepSY-M4 e a proteína controle LipL32 foram incubados com soro de hamsters infectados com *L. interrogans* sorovar Kennewiki estirpe Fromm. (1) Proteínas analisadas por SDS-PAGE. (2) *Western blot* mostrando o reconhecimento das proteínas pelo soro dos animais infectados. As duas proteínas não foram reconhecidas pelo soro dos animais controle não infectados. (M) Marcador *Page Ruller* (Fermentas).

4.9.4 Análise da atividade proteolítica da termolisina recombinante

Os fragmentos recombinantes PepSY-M4 e M4 da termolisina foram submetidos a testes de atividade proteolítica utilizando como substratos moléculas do complemento purificadas. Observamos que o fragmento M4, correspondente à região dos domínios catalíticos Peptidase M4 e M4_C, não apresentou atividade proteolítica sobre a proteína C3 purificada (Figura 34 B). Já o fragmento PepSY-M4 que engloba, além dos domínios catalíticos também o domínio PepSY, foi capaz de clivar a molécula C3 do complemento (Figura 34 B). A função do domínio PepSY nas proteases pode variar entre inibição da atividade proteolítica, prevenindo ativação prematura da enzima, ou chaperona intramolecular (Finn et al., 2014). No caso da termolisina de leptospira, é possível que este domínio atue como uma chaperona, proporcionando correto dobramento dos domínios catalíticos e favorecendo a atividade enzimática.

Analisando comparativamente a clivagem da cadeia α do C3 pelo sobrenadante das leptospiros patogênicas (Figura 34 A) e pelo fragmento PepSY-M4 da termolisina (Figura 34 B), podemos observar que em ambos os casos uma banda de clivagem de aproximadamente 100 kDa, que denominamos de cadeia α'' é gerada. Quando efetuamos a pré-incubação do fragmento PepSY-M4 com a 1,10-fenantrolina, verificamos que não há formação deste produto de clivagem (Figura 34 C), o que corrobora a atuação da termolisina recombinante como uma metalo protease capaz de clivar a cadeia α da molécula de C3.

A clivagem da cadeia α pelo fragmento PepSY-M4 da termolisina foi tempo e dose dependentes (Figura 34 D). Pela análise por densitometria da cadeia α'' de 100 kDa, podemos observar que com o aumento do tempo de reação há uma maior formação de produto de clivagem (Figura 34 E).

Figura 34. O fragmento PepSY-M4 da termolisina cliva a proteína C3 e é inibido pela 1,10-fenantrolina. (A) Clivagem da proteína C3 (0,25 μ g) pelo sobrenadante de *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe M20 (3 μ g em proteína total) por 2 h a 37 °C. (B) Análise da clivagem da proteína C3 (0,25 μ g) pelos fragmentos M4 e PepSY-M4 (0,5 μ g cada) por 4 h a 37 °C. (C) O fragmento PepSY-M4 (0,5 μ g) foi incubado com 1,10-fenantrolina (5 mM) por 30 min antes da adição do componente C3 (0,25 μ g). Os veículos da termolisina e do inibidor de metalo proteases foram utilizados como controles (Tris-HCl 50 mM pH 7,4 e etanol, respectivamente). (D) A clivagem do C3 (0,25 μ g) pelo fragmento PepSY-M4 foi analisada na presença de diferentes quantidades da protease (0,25 e 0,5 μ g, por 4 h) e em tempos de reação crescentes (2 a 6 h, com 0,25 μ g de proteína).

A clivagem da cadeia α da proteína C3 pela termolisina (fragmento PepSY-M4) gerou uma cadeia α'' com aproximadamente 100 kDa. Esta cadeia possui massa molecular semelhante à cadeia α' do fragmento C3b, o qual é formado quando C3 é clivado pelas C3 convertases na ativação do sistema complemento. Neste contexto, uma hipótese a ser avaliada seria a possibilidade de geração de uma molécula semelhante ao C3b nativo (*C3b-like*) por ação da termolisina de leptospira sobre a proteína C3.

Como já descrito anteriormente, no processo de regulação do complemento o fragmento C3b é clivado pelo Fator I na presença do Fator H como co-fator. Considerando este dado, acreditamos que a geração de uma molécula *C3b-like* poderia ser comprovada pela clivagem desta proteína pelos reguladores do hospedeiro. Deste modo, efetuamos um ensaio em que o fragmento PepSY-M4 foi incubado com C3, sendo então posteriormente adicionados Fator I e/ou Fator H à reação (Figura 35 A). De forma interessante, verificamos que na presença do Fator I e Fator H houve completa degradação da cadeia α'' de 100 kDa, gerando um produto de clivagem adicional de 46 kDa, semelhante ao obtido, quando C3b é clivado pelos reguladores. A atividade proteolítica do Fator I e Fator H sobre a cadeia α'' corrobora a possível geração de uma molécula *C3b-like* pela ação da termolisina de leptospira sobre C3.

Nos ensaios anteriores observamos também que ao adicionar somente Fator H à reação houve uma clivagem parcial da cadeia α'' (Figura 35 A). Uma possível explicação para este fato seria a atuação do Fator H como co-fator da termolisina de leptospira, o qual possibilitaria a clivagem de moléculas *C3b-like* pela protease bacteriana. Considerando esta observação, decidimos investigar se o fragmento PepSY-M4 poderia clivar também moléculas de C3b nativas, e se esta clivagem seria ou não dependente do Fator H. Efetuamos então um ensaio nas mesmas condições que o anterior, substituindo apenas a molécula de C3 pelo fragmento C3b purificado (Figura 35 B). Verificamos que o fragmento PepSY-M4 não foi capaz de clivar a proteína C3b na ausência do Fator H, mas quando este é adicionado, a clivagem ocorre, confirmando a dependência do Fator H como um possível co-fator da termolisina na clivagem do C3b e de moléculas *C3b-like*. Além disso, assim como na clivagem do C3 pela termolisina, a proteólise do C3b na presença do FH também foi inibida pela 1,10-fenantrolina, confirmando a atuação da metalo protease (Figura 35 B). Deste modo, podemos inferir que a termolisina secretada pelas leptospiros patogênicas poderia atuar em sinergia com o Fator I na inativação de moléculas C3b e *C3b-like*, quando na presença do Fator H (Figura 37).

Figura 35. O fragmento PepSY-M4 da termolisina atua em sinergia com reguladores do hospedeiro na clivagem das proteínas C3 e C3b do complemento. O fragmento PepSY-M4 (0,5 µg) foi incubado com (A) C3 ou (B) C3b (0,25 µg) por 4 h a 37 °C, sendo em seguida adicionados FH (0,5 µg) e/ou FI (0,2 µg) e a reação incubada por 2 h adicionais. Em ensaio de inibição, a termolisina foi pré-incubada com 1,10-fenantroline (5 mM), antes da adição de C3b. As clivagens foram analisadas por *Western blot* utilizando anticorpo policlonal anti-C3. Na clivagem de C3 pelo fragmento PepSY-M4 é gerada uma cadeia α'' de 100 kDa, a qual na presença do FH é degradada tanto pelo FI quanto pela própria termolisina, gerando um fragmento de 46 kDa. Já a molécula de C3b, que possui cadeia α', é somente degradada pela termolisina na presença do FH, havendo um efeito sinérgico quando são adicionados FI e FH à reação.

A atividade proteolítica dos fragmentos M4 e PepSY-M4 da termolisina também foi avaliada utilizando soro humano normal (SHN) como fonte de complemento (Figura 36). Apenas o fragmento PepSY-M4 foi capaz de clivar a proteína C3. Além disso, como Fator H e Fator I estão presentes no soro, a banda de clivagem observada tem a mesma massa molecular (~46 kDa) que as bandas obtidas pela proteólise das cadeias α' e α'' das moléculas de C3b e C3b-like, respectivamente.

Considerando a existência de diversos inibidores de proteases no SHN, tais como a α_2 -macroglobulina, a atividade da termolisina de leptospira mesmo na presença destes inibidores, sugere uma possível atuação desta protease *in vivo*, onde esta seria secretada pelas leptospiros patogênicas, constituindo um mecanismo de evasão ao sistema complemento humano.

Figura 36. O fragmento PepSY-M4 da termolisina cliva a proteína C3 presente no soro humano normal.

Os fragmentos M4 ou PepSY-M4 (0,5 μ g) foram incubados com SHN (volume correspondente à 0,25 μ g de C3) por 1 h a 37 °C. As clivagens foram analisadas por *Western blot* utilizando anticorpo policlonal anti-C3. O fragmento PepSY-M4 apresentou atividade proteolítica sobre C3 gerando uma banda de massa molecular semelhante (~46 kDa) à observada nas clivagens das proteínas C3b e C3b-like pela protease bacteriana.

Na figura abaixo encontra-se a representação esquemática do possível mecanismo de ação da termolisina de leptospira na clivagem das proteínas C3 e C3b do sistema complemento.

Figura 37. Representação esquemática do possível mecanismo de ação da termolisina sobre as moléculas C3 e C3b do sistema complemento. As termolisinas secretadas pelas leptospiros patogênicas clivam a proteína C3, gerando uma molécula C3b-like, a qual na presença do FH, pode ser degradada pelo FI ou pela própria termolisina. Os fragmentos C3b gerados pela ação da C3 convertase também podem ser clivados pela termolisina quando FH está presente.

4.10 Purificação de proteínas do sobrenadante de cultura das leptospiros patogênicas

Com o objetivo de isolar as proteases nativas responsáveis pelas clivagens das proteínas do complemento, efetuamos ensaios de purificação do sobrenadante de cultura das leptospiros patogênicas.

A purificação do sobrenadante de *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm foi efetuada por exclusão molecular em coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare). A eluição das proteínas foi monitorada pela absorbância a 280 nm. O substrato fluorescente Abz-GKLFSIKQ-EDDnp foi utilizado para analisar a atividade proteolítica total das frações eluídas. Este substrato foi selecionado dentre outros testados, pois foi sobre o qual as proteases de leptospira apresentaram melhor atividade. Além disso, as frações que apresentaram atividade proteolítica total sobre o substrato fluorescente foram selecionadas para ensaios de clivagem da molécula C3 do sistema complemento.

Na Figura 38 A podemos observar dois picos de atividade proteolítica, os quais correspondem a proteínas de massa molecular de aproximadamente 30 kDa e 72 kDa. Além disso, verificamos que nas frações relativas aos picos de atividade proteolítica total houve também degradação da proteína C3 do complemento (Figura 38 B). Neste contexto, é importante notar que a atividade específica destas frações é bastante elevada, ou seja, há uma baixa concentração de proteína total e uma elevada atividade proteolítica. Este fato corrobora a existência de enzimas proteolíticas no sobrenadante das leptospiros, uma vez que estas mesmo estando em baixas concentrações conseguem atuar em seus substratos. Contudo, embora desejadas em termos de elevada pureza das amostras, as baixas concentrações de proteína total representam uma grande dificuldade para a identificação das proteases secretadas. Esta dificuldade ocorre pois os métodos de identificação proteica atualmente disponíveis exigem uma quantidade de proteína relativamente elevada, ou seja, não apresentam uma sensibilidade suficiente para a detecção de amostras pouco concentradas.

Acreditamos que seja necessária a otimização do processo de purificação das proteases nativas visando à obtenção de amostras mais concentradas e de maior estabilidade, uma vez que a atividade das proteases nativas é rapidamente perdida na ausência das demais proteínas presentes no sobrenadante total.

A

B

Figura 38. Purificação de proteínas do sobrenadante de *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm por exclusão molecular. (A) O sobrenadante de *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm foi purificado em coluna Superdex 75 10/300 GL previamente calibrada com albumina (66 kDa) e aprotinina (6 kDa). A eluição das proteínas foi monitorada pela absorbância a 280 nm. A atividade proteolítica total das frações foi analisada utilizando o substrato fluorescente Abz-GKLFSIKQ-EDDnp. (B) As frações correspondentes aos picos de atividade proteolítica total foram submetidas a ensaio de clivagem da proteína C3 do complemento por 1 h a 37 °C. As clivagens foram analisadas por Western blot com anticorpo policlonal anti-C3. Pode-se observar que ocorreu clivagem da proteína C3 nas frações relativas aos picos de atividade proteolítica total.

5 DISCUSSÃO

O estudo de mecanismos de evasão ao sistema complemento por leptospiros patogênicos representa uma importante linha de pesquisa do Laboratório de Complemento do Instituto de Ciências Biomédicas em conjunto com o Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan. Esta linha de pesquisa emergiu da observação de que leptospiros patogênicos são resistentes ao tratamento com soro humano normal, ao passo que as saprófitas são rapidamente eliminadas, sendo este mecanismo claramente dependente do sistema complemento, uma vez que a inativação do soro a 56 °C por 30 min promove a sobrevivência das bactérias (Barbosa et al., 2009).

Com base nesta observação inicial, decidimos investigar quais mecanismos de evasão poderiam conferir resistência às leptospiros patogênicos. O primeiro mecanismo estudado foi a aquisição de reguladores negativos do hospedeiro. Verificamos que leptospiros patogênicos são capazes de recrutar Fator H (via alternativa) e C4BP (via clássica e das lectinas), os quais retêm a atividade de co-fator do Fator I na clivagem de C3b e C4b, respectivamente (Figura 9) (Barbosa et al., 2009; Barbosa et al., 2010; Castiblanco-Valencia et al., 2012). De forma interessante, observamos nestes ensaios que a clivagem dos fragmentos C3b e C4b também ocorria na ausência de proteínas do hospedeiro, sugerindo uma possível participação de proteases bacterianas na degradação destas moléculas. Neste contexto, o principal objetivo deste trabalho foi investigar mecanismos de evasão de leptospiros, com particular enfoque na clivagem de componentes do sistema complemento por proteases secretadas.

Proteases são fundamentais em diversas funções biológicas, desde a regulação da expressão proteica até a sinalização celular. Em humanos, a expressão descontrolada de proteases culmina no desenvolvimento de uma grande variedade de condições patológicas tais como câncer e doenças cardiovasculares (Lopez-Otin, Bond, 2008; Turk, 2006). As proteases catalisam a clivagem de ligações peptídicas e podem ser divididas em seis diferentes classes segundo o resíduo de aminoácido envolvido na catálise, sendo estas: metalo-, aspártico-, serino-, cisteíno-, treonino- e glutâmico proteases. O mecanismo catalítico das aspártico-, glutâmico- e metalo proteases envolve a ativação de uma molécula de água, a qual promove o ataque nucleofílico de ligações peptídicas no substrato proteico. Já as serino-, cisteíno- e treonino proteases utilizam seus respectivos aminoácidos (serina, cisteína e treonina) como nucleófilos para a clivagem da ligação peptídica. Dentre as seis classes de proteases, as mais abundantes são as metalo-, aspártico-, serino- e cisteíno proteases (Deu et al., 2012; Drag, Salvesen, 2010).

Em resposta aos mecanismos de defesa do hospedeiro, microrganismos patogênicos expressam diversos fatores de virulência. Dentre estes, destacam-se as proteases, as quais podem contribuir para a virulência dos patógenos de diversas formas tais como nos processos de invasão, evasão imune e nutrição. De fato, a clivagem de proteínas do hospedeiro representa uma importante fonte nutritiva para os microrganismos. Em alguns casos, como a bactéria periodontal *Porphyromonas gingivalis*, a degradação de proteínas constitui a principal fonte de energia do patógeno (Kuramitsu, 1998).

A degradação de proteínas da lâmina basal, matriz extracelular e do interior de vasos sanguíneos possibilita o processo de invasão dos patógenos (Armstrong, 2006). *Staphylococcus aureus* secreta duas cisteíno proteases papaína-like chamadas ScpA (*staphopain A*) e ScpB (*staphopain B*). Estas proteases são capazes de degradar componentes do tecido conectivo da derme como o colágeno e a elastina, favorecendo o processo de disseminação da bactéria pelo organismo do hospedeiro (Ohbayashi et al., 2011; Potempa et al., 1988).

A clivagem de moléculas efetoras do sistema imune por proteases microbianas constitui um importante mecanismo de evasão imunológico. Anticorpos, citocinas, quimiocinas, peptídeos antimicrobianos e moléculas do sistema complemento são alguns dos alvos destas proteases. *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* secretam as metalo proteases elastase A e aureolisina, as quais são capazes de degradar os peptídeos antimicrobianos dermicina e a catelicidina LL-37, respectivamente (Lai et al., 2007; Sieprawska-Lupa et al., 2004). *Streptococcus pyogenes* secreta as proteases IdeS (*immunoglobulin G-endopeptidase S*) e ScpC (*serine endopeptidase protein C*) que degradam a imunoglobulina G e a interleucina-8, respectivamente. Estirpes de *Streptococcus pyogenes* que secretam a protease IdeS são resistentes a fagocitose por macrófagos (von Pawel-Rammingen et al., 2002). Além disso, a degradação da interleucina-8 pela protease ScpC confere à bactéria resistência à morte mediada por neutrófilos, impedindo a transmigração e ativação destas células no local da infecção (Sjölander et al., 2008).

A clivagem e a inativação funcional de componentes do complemento é uma estratégia chave para atenuar os mecanismos de defesa dependentes da ativação deste sistema. As proteases microbianas têm como alvo diferentes moléculas do complemento, tais como proteínas envolvidas na sua ativação (C3, MBL, ficolinas e C1q), amplificação e formação das convertases (C3, C4, C2, Fator B e seus fragmentos), e também componentes da via terminal (C5, C6, C7, C8 e C9) (Lambris et al., 2008).

Proteases das quatro principais classes: cisteíno-, aspártico-, serino- e metalo proteases estão envolvidas na clivagem de moléculas do complemento. A cisteíno protease SpeB (*streptococcal pyrogenic exotoxin B*) de *Streptococcus pyogenes* destaca-se pela sua capacidade de degradação de diversas proteínas do complemento, resultando em uma inibição eficaz das três vias de ativação (Kuo et al., 2004; Lukomski et al., 1998; Honda-Ogawa et al., 2013; Terao et al., 2008). Já a aspártico protease PgtE (*outer membrane protein E*) de *Salmonella enterica* cliva os componentes C3b, C4b e C5 contribuindo para a disseminação da bactéria durante a infecção sistêmica (Ramu et al., 2007). Dentre as serino proteases, foi descrita recentemente a atividade proteolítica da autotransportadora NalP (*neisserial autotransporter P*) de *Neisseria meningitidis* sobre a molécula de C3 do complemento (Del Tordello et al., 2014).

As metalo proteases que degradam componentes do complemento estão presentes principalmente em bactérias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Tannerella forsythia*. As metalo proteases secretadas por estes patógenos têm em comum a capacidade de degradação da proteína C3, com exceção da karilisina que é secretada pelo patógeno periodontal *Tannerella forsythia*, e cliva os componentes C4, C5, MBL, ficolinas 2 e 3 (Hong et al., 1992; Jin et al., 1996; Jusko et al., 2012; Laarman et al., 2011, 2012; Park et al., 2007, 2008).

Com a finalidade de estudar a clivagem de moléculas do complemento por leptospiros, selecionamos nove estirpes diferentes, sendo sete patogênicas e duas saprófitas (Figura 14). A secreção de proteases pelas leptospiros foi efetuada em condições semelhantes às fisiológicas em relação ao pH (PBS 7,4), osmolaridade (300 mOsm) e temperatura (37 °C). De fato, importantes fatores de virulência, como as proteínas Ligs, são secretadas apenas em osmolaridade fisiológica (300 mOsm), não havendo secreção quando as leptospiros são cultivadas em outras condições (Matsunaga et al., 2005). Após o período de secreção, os sobrenadantes das leptospiros foram coletados e analisados por eletroforese (Figura 14). Observamos que as duas estirpes saprófitas possuem um perfil proteico similar, o qual difere do perfil apresentado pelas estirpes patogênicas.

Em seguida, uma vez obtidos os sobrenadantes das leptospiros, avaliamos o seu efeito sobre as três vias de ativação do sistema complemento. Para tanto, os sobrenadantes foram pré-incubados com soro humano normal e adicionados a microplacas contendo moléculas que ativam separadamente as vias alternativa, clássica e das lectinas (Roos et al., 2003). Verificamos que apenas o sobrenadante de estirpe patogênica de leptospira foi capaz de inibir

as três vias de ativação do sistema complemento (Figura 15). Neste contexto, decidimos avaliar se o efeito inibitório observado poderia estar relacionado à degradação e à inativação de proteínas do complemento.

A atividade proteolítica dos sobrenadantes das nove estirpes de leptospira foi analisada utilizando como substrato as proteínas do complemento purificadas ou soro humano normal como fonte de complemento. Verificamos que apenas os sobrenadantes das leptospiros patogênicas apresentaram atividade proteolítica sobre as moléculas do complemento, sendo observada reduzida atividade nas espécies saprófitas. As proteases secretadas foram capazes de clivar o componente central do complemento C3, e também moléculas específicas das três vias de ativação: Fator B (via alternativa), C2 e C4 (via clássica e das lectinas) (Figuras 18 e 23).

A proteína C3 é clivada pelas proteases de leptospira nas cadeias α e β , gerando diversos fragmentos de degradação (Figura 21). A análise dos sítios de clivagem por programas de bioinformática nos permitiu visualizar que estes se localizam em regiões hidrofílicas e potencialmente expostas da molécula de C3 (Figura 22). Além disso, utilizando os componentes purificados do complemento, observamos que os fragmentos C3b e iC3b também são clivados pelas proteases de leptospira (Figura 18). Estes dois fragmentos são importantes opsoninas, possibilitando a fagocitose pela ligação aos receptores CR1 e CR3, respectivamente. Deste modo, podemos inferir que a clivagem destes fragmentos poderia resultar em uma redução da fagocitose mediada pelo complemento, favorecendo a sobrevivência das leptospiros. De fato, este efeito já foi observado em *Enterococcus faecalis*, cuja clivagem de C3b e iC3b pela metalo protease GelE resulta em uma redução substancial da fagocitose por leucócitos polimorfonucleares humanos (Park et al., 2007, 2008).

De forma interessante, verificamos também que as proteases de leptospira atuam em sinergia com reguladores do hospedeiro na clivagem do fragmento C3b (Figura 17). No processo de regulação do complemento, o fragmento C3b é clivado pelo Fator I, na presença do Fator H como co-fator, gerando iC3b e C3f (Figura 4). Já as proteases de leptospira promovem uma extensiva degradação de C3b, gerando fragmentos adicionais aos obtidos na clivagem pelo Fator I (Figura 16). Contudo, ao adicionarmos o regulador do hospedeiro (Fator I) e seu co-fator (Fator H) juntamente com as proteases de leptospira, observamos uma clivagem ainda mais pronunciada do fragmento C3b. A sinergia entre os reguladores do hospedeiro e as proteases de leptospira resulta em uma efetiva inativação do fragmento C3b, cuja cadeia α' é completamente degradada pela ação conjunta das proteases (Figura 17).

As proteases de leptospira foram capazes de clivar C4 e C4b, quando utilizamos soro como fonte de complemento e a proteína purificada, respectivamente (Figuras 18 e 23). A degradação destas proteínas afeta diretamente a ativação das vias clássica e das lectinas, pois o fragmento C4b participa da formação das C3 e C5 convertases de ambas as vias (Figura 3). Além disso, o componente C5 do complemento também possui sítios proteolíticos para a atuação das proteases de leptospira, como podemos observar pela clivagem obtida com a proteína purificada (Figura 24 A). Contudo, apesar de atuarem sobre C3 e C4, as proteases não foram capazes de clivar C5 no soro humano normal (Figura 24 B). Uma possível explicação seria o fato da clivagem de C5 ter sido afetada por uma competição entre os diferentes substratos (proteínas do complemento e outros), que estão presentes ao mesmo tempo no soro. Outra hipótese seria a existência de diferentes proteases atuando na clivagem destas moléculas, sendo aquela que atua sobre C5 mais susceptível à ação dos inibidores de protease presentes no soro humano, tais como a α_2 -macroglobulina.

Os componentes C2 e Fator B, que possuem 39% de identidade em aminoácidos, foram clivados pelas proteases de leptospira (Figuras 18 e 23). A degradação destas proteínas afeta as três vias de ativação do complemento (Fator B: via alternativa e C2: via clássica e das lectinas) (Figura 7). Até o momento, além das proteases de leptospira, apenas a protease alcalina A (Apra) de *Staphylococcus aureus* foi descrita como capaz de clivar o componente C2 do complemento (Laarman et al., 2012). Além disso, apesar da elevada identidade entre C2 e Fator B, a protease Apra degrada apenas C2, o que não ocorre com as proteases de leptospira, as quais clivam ambas as moléculas. Este fato poderia ser justificado pela presença de diferentes proteases no sobrenadante das leptospiros, as quais poderiam atuar separadamente sobre as duas proteínas do complemento, ou ainda pela presença de uma protease de menor especificidade, que degradaria ambos substratos.

Dentre as proteases que clivam componentes do complemento encontram-se proteases de elevada especificidade, como a autotransportadora NalP de *Neisseria meningitidis*, e também proteases de ampla especificidade, como a cisteína protease SpeB de *Streptococcus pyogenes*. NalP cliva a proteína C3 em um único sítio na cadeia α (Del Tordello et al., 2014). Já a protease SpeB degrada diferentes moléculas do complemento incluindo C3, C3b, C4 e componentes da via terminal (C6, C7, C8, C9) (Honda-Ogawa et al., 2013; Kuo et al., 2004; Terao et al., 2008; Tsao et al., 2006). De forma geral, as proteases de leptospira clivaram C3 e C4, bem como seus fragmentos, e também as proteínas C2 e Fator B, as quais possuem uma elevada identidade em aminoácidos. Contudo, algumas das moléculas testadas não foram

degradadas tais como a imunoglobulina G e as moléculas do complemento C1q, Fator D e Properdina (Figura 19). Este fato demonstra que as proteases secretadas pelas leptospiiras patogênicas possuem alguma especificidade por seus substratos, preferindo algumas proteínas em detrimento de outras.

As clivagens das proteínas do complemento foram inibidas pela 1,10-fenantrolina, o que sugere a participação de metalo proteases de leptospira nestas degradações (Figura 25). Contudo, acreditamos que outras classes de proteases também possam estar envolvidas, pois obtivemos inibição parcial da clivagem de C2 e Fator B. Além disso, como trabalhamos com o sobrenadante total das leptospiiras, é possível que a degradação observada seja resultado de uma ação conjunta de diferentes proteases, as quais podem pertencer ou não à mesma classe. Considerando esta hipótese, é possível que uma protease expressa apenas em espécies patogênicas efetue uma primeira clivagem nas moléculas do complemento e que os fragmentos resultantes possam ser substratos para outras proteases, as quais trabalhariam em sinergia com a primeira. Estas proteases que atuariam em um segundo momento poderiam ser expressas também em espécies saprófitas, uma vez que não conseguiriam atuar sem que ocorresse a primeira degradação das moléculas do complemento, a qual ocorre apenas nas leptospiiras patogênicas.

A análise do genoma da patogênica *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni estirpe Fiocruz L1-130 por programas de bioinformática (*NCBI database* e *SMART program*) revelou a presença de dezesseis genes que codificam potenciais proteases secretadas. Quando agrupados segundo a classe das proteases, verificamos que há genes codificadores de uma cisteíno protease, duas serino proteases e treze metalo proteases. A presença majoritária de genes que codificam metalo proteases corrobora os dados de inibição proteolítica obtidos com a 1,10-fenantrolina.

Dentre os genes que codificam metalo proteases, verificamos que aqueles que codificam proteases da família das termolisinas estão presentes exclusivamente em estirpes patogênicas de leptospiiras. Além disso, observamos que as proteases codificadas por estes genes possuem o domínio catalítico Peptidase_M4, o qual está presente em proteases de outros patógenos capazes de clivar moléculas do complemento tais como a elastase de *Pseudomonas aeruginosa*, a toxina lambda de *Clostridium perfringens*, a gelatinase E de *Enterococcus faecalis* e a aureolisina de *Staphylococcus aureus*. Verificamos que *L. interrogans* sorovar Copenhageni possui quatro proteínas da família das termolisinas. Dentre estas, selecionamos a termolisina codificada pelo gene LIC13322 para ser produzida como

proteína recombinante, uma vez que esta enzima possui domínio catalítico com maior identidade com as metalo proteases cuja atividade proteolítica sobre o complemento já foi demonstrada (Tabela 9).

Foram produzidos dois fragmentos recombinantes da protease codificada pelo gene LIC13322: o fragmento M4, que corresponde aos domínios catalíticos Peptidase_M4 e Peptidase_M4_C, e o fragmento PepSY-M4, que possui além dos domínios catalíticos o pró-domínio PepSY (Figuras 27 e 31). O fragmento M4 foi utilizado na imunização de camundongos para obtenção de anticorpos policlonais contra esta proteína. Estes anticorpos foram capazes de reconhecer proteínas nos sobrenadantes de cultura das estirpes patogênicas de leptospira, não havendo reconhecimento nas estirpes saprófitas (Figura 32). Além disso, o fragmento PepSY-M4 apresentou características antigênicas, pois foi reconhecido pelo soro de hamsters infectados com leptospiros patogênicos (Figura 33).

A atividade proteolítica dos fragmentos M4 e PepSY-M4 da termolisina foi avaliada utilizando como substrato as proteínas purificadas do complemento e também soro humano normal (Figuras 34 B e 36). O fragmento M4 não apresentou atividade sobre as proteínas testadas. Já o fragmento PepSY-M4, que contém além dos domínios catalíticos o domínio PepSY, foi capaz de clivar a proteína C3 purificada e também presente no soro humano normal. A função do domínio PepSY nas proteases pode variar entre inibição da atividade proteolítica, prevenindo ativação prematura da enzima, ou chaperona intramolecular (Finn et al., 2014). No caso da termolisina de leptospira, é possível que este domínio atue como uma chaperona, proporcionando correto dobramento dos domínios catalíticos e favorecendo a atividade enzimática.

A clivagem da proteína C3 pelo fragmento PepSY-M4 gerou uma molécula C3b-like, a qual foi posteriormente degradada pelo regulador do hospedeiro Fator I, na presença do Fator H como co-fator (Figura 35 A). Esta sinergia entre proteases microbianas e reguladores do hospedeiro também foi observada em outros patógenos, como *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e, mais recentemente, em *Neisseria meningitidis*. Observamos que as proteases secretadas por estes patógenos atuam de forma semelhante à termolisina de leptospira, clivando a proteína C3 na cadeia α , e gerando um fragmento que passa a ser alvo de degradação pelo Fator I na presença do Fator H como co-fator (Del Tordello et al., 2014; Laarman et al., 2011; Park et al., 2007, 2008).

De forma interessante, verificamos também que o fragmento PepSY-M4 da termolisina, quando na presença do regulador do hospedeiro Fator H, é capaz de clivar o fragmento C3b e moléculas C3b-like (Figura 35). No processo de regulação do complemento, o Fator H atua como co-fator do Fator I na clivagem de fragmentos C3b gerados pela ativação do sistema complemento. Até o momento, não há relatos na literatura de proteases microbianas que utilizam o Fator H como co-fator para exercerem sua atividade proteolítica. Contudo, essa é uma hipótese possível para a termolisina de leptospira, a qual adquire a capacidade de clivagem do fragmento C3b e moléculas C3b-like somente na presença do Fator H (Figura 37). Para comprovar essa hipótese, até então inédita na literatura, experimentos de interação proteica entre a termolisina de leptospira e o Fator H estão atualmente em andamento.

Acreditamos que a termolisina seja uma das proteases de leptospira responsáveis pelas clivagens das moléculas do complemento. Contudo, o fragmento PepSY-M4 não apresentou atividade proteolítica sobre C4, Fator B e C2. Deste modo, outras proteases presentes nos sobrenadantes das leptospiros patogênicas devem ser responsáveis por estas clivagens.

Com o objetivo de tentar isolar as proteases nativas de leptospira, o sobrenadante da *L. interrogans* sorovar Kennewiki estirpe Fromm foi submetido à cromatografia por exclusão molecular. Conseguimos obter duas frações de aproximadamente 30 kDa e 72 kDa, as quais apresentaram uma elevada atividade específica, ou seja, possuíam uma baixa concentração de proteína total e uma elevada atividade proteolítica (Figura 38). De fato, a obtenção de amostras com elevada atividade específica é altamente desejada em um processo de purificação. Contudo, a concentração obtida das proteínas purificadas não foi suficiente para a identificação das proteases nativas. Acreditamos que seja necessária a otimização do processo de purificação na tentativa de obtermos amostras mais concentradas e também de conseguirmos uma maior estabilidade das proteases nativas purificadas, as quais perdem rapidamente a atividade proteolítica na ausência das demais proteínas presentes no sobrenadante total.

De fato, um grande desafio na área de enzimologia é a obtenção de proteases nativas purificadas. As proteases e enzimas em geral são geralmente pouco expressas pelos microrganismos, uma vez que atuam em seus substratos mesmo estando em baixas concentrações. Contudo, o que é uma vantagem para o microrganismo em termos de redução de gasto energético com a síntese de proteínas, representa um enorme desafio àqueles que desejam obter as proteases purificadas.

Acreditamos que os resultados apresentados neste trabalho tenham contribuído para a caracterização de um novo possível mecanismo de evasão imune em leptospira: a secreção de proteases que clivam componentes do sistema complemento humano (Figura 39). Esta exploração inicial de proteases secretadas pelas leptospirosas possibilitou a geração de uma vasta gama de perguntas que envolvem desde o isolamento e a caracterização bioquímica destas enzimas até a ampliação de substratos e a realização de estudos imunológicos funcionais. De fato, é possível que as proteases secretadas pelas leptospirosas patogênicas participem de diferentes etapas da infecção, como por exemplo, no processo de invasão da bactéria. Resultados preliminares do nosso grupo mostraram que proteínas de matriz extracelular, como colágeno e fibronectina, também são degradadas pelas proteases secretadas pelas espécies patogênicas de leptospira. Deste modo, fica evidente que a expansão e o aprofundamento da caracterização de proteases de leptospirosas é fundamental para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos com a patogênese da bactéria. Além disso, diversas proteases microbianas são potenciais alvos terapêuticos e antígenos vacinais (McKerrow, 1999a,b; Selzer et al., 1999; Serruto et al., 2010). Assim, podemos concluir que o estudo de proteases em leptospira representa uma importante área para geração de dados extremamente relevantes tanto para o conhecimento da patogênese do microrganismo, bem como de potencial importância terapêutica e preventiva em leptospirose.

Figura 39. A secreção de proteases por leptospiros patogênicas constitui um possível mecanismo de evasão imune ao sistema complemento. As proteases secretadas são capazes de clivar proteínas das três vias do sistema complemento tais como: C3 e C4, bem como seus fragmentos C3b, iC3b e C4b, e também as proteínas Fator B e C2, que possuem uma elevada identidade em aminoácidos entre si. Dentre as proteases secretadas, encontram-se as metalo proteases da família das termolisinas, as quais são capazes de clivar C3. A degradação de componentes do sistema complemento pode favorecer a sobrevivência da bactéria, possibilitando sua disseminação pelo organismo e o estabelecimento da infecção.

6 CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivos principais a identificação e a caracterização de proteases de leptospira com a capacidade de clivar proteínas do sistema complemento humano. Com base nos resultados obtidos podemos concluir que o sobrenadante de cultura de leptospiras patogênicas é capaz de inibir as três vias de ativação do sistema complemento. Verificamos que esta inibição pode estar diretamente relacionada à existência de proteases secretadas pelas estirpes patogênicas, as quais exercem atividade proteolítica sobre diversos componentes do sistema complemento tais como a molécula central C3, os fragmentos C3b e iC3b, bem como proteínas da via alternativa (Fator B), clássica e das lectinas (C4, C4b e C2).

Além disso, ensaios com inibidores de protease revelaram que enzimas da classe das metalo proteases estão possivelmente envolvidas nas clivagens observadas. Dentre estas, as metalo proteases da família das termolisinas são fortes candidatas a participarem das degradações, uma vez que a forma recombinante da protease foi capaz de clivar a molécula C3 do complemento no soro humano normal.

Deste modo, podemos concluir que proteases produzidas pelas estirpes patogênicas de leptospira são capazes de degradar moléculas efetoras do sistema imune do hospedeiro, representando potenciais alvos para o desenvolvimento de novas terapias e estratégias profiláticas em leptospirose.

REFERÊNCIAS*

- Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 2010;140(3-4):287-96.
- Ahmed A, Engelberts MF, Boer KR, Ahmed N, Hartskeerl RA. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. *PLoS One.* 2009;4(9):e7093.
- 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.
- Alitalo A, et al. Complement evasion by *Borrelia burgdorferi*: serum-resistant strains promote C3b inactivation. *Infect Immun.* 2001;69(6):3685-91.
- Arlaud GJ, Colomb MG. Complement: Classical pathway. In: *Encyclopedia of Life Sciences.* Chichester, United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd. 2005:1-10.
- Armstrong PB. Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction. *Immunobiology.* 2006;211(4):263-81.
- 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(4):813-6.
- Barbosa AS, 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.
- Barbosa AS, et al. Immune evasion of leptospira species by acquisition of human complement regulator C4BP. *Infect Immun.* 2009;77(3):1137-43.
- Barthel D, Schindler S, Zipfel PF. Plasminogen is a complement inhibitor. *J Biol Chem.* 2012;287(22):18831-42.
- Behnsen J, et al. Secreted *Aspergillus fumigatus* protease Alp1 degrades human complement proteins C3, C4, and C5. *Infect Immun.* 2010;78(8):3585-94.
- Bernet J, Mullick J, Singh AK, Sahu A. Viral mimicry of the complement system. *J Biosci.* 2003;28(3):249-64.
- Bharti AR, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* 2003;3(12):757-71.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Blom AM, Hallström T, Riesbeck K. Complement evasion strategies of pathogens-acquisition of inhibitors and beyond. *Mol Immunol*. 2009;46(14):2808-17.

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

Brasil. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. [citado em: 2014 fev. 10]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados>.

Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Int J Syst Bacteriol*. 1999;49(2):839-58.

Brihuega B, Samartino L, Auteri C, Venzano A, Caimi K. *In vivo* cell aggregations of a recent swine biofilm-forming isolate of *Leptospira interrogans* strain from Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2012;44(3):138-43.

Brissette CA, et al. *Borrelia burgdorferi* infection-associated surface proteins ErpP, ErpA, and ErpC bind human plasminogen. *Infect Immun*. 2009;77(1):300-6.

Bulach DM, et al. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(39):14560-5.

Castiblanco-Valencia MM, et al. Leptospiral immunoglobulin-like proteins mediate cleavage of fibronectin and complement components by interaction with plasminogen and generation of active plasmin. 2014; *in press*.

Castiblanco-Valencia MM, 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.

Chassin C, 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.

Chou LF, et al. Sequence of *Leptospira santarosai* serovar Shermani genome and prediction of virulence-associated genes. *Gene*. 2012;511(2):364-70.

Choy HA, Kelley MM, Chen TL, Møller AK, Matsunaga J, Haake DA. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect Immun*. 2007;75(5):2441-50.

Corrêa MOA, Hyakutake S, Natale V, Galvão PA, Aguiar HA. Estudos sobre a *Leptospira wolffi* em São Paulo. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1965/67;25/27:11-25.

Coutinho ML, et al. A LigA three-domain region protects hamsters from lethal infection by *Leptospira interrogans*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(12):e1422.

Dahl MR, et al. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity*. 2001;15(1):127-35.

Dankert JR, Shiver JW, Esser AF. Ninth component of complement: self-aggregation and interaction with lipids. *Biochemistry*. 1985;24(11):2754-62.

de Haas CJ, et al. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. *J Exp Med*. 2004;199(5):687-95.

Del Tordello E, Vacca I, Ram S, Rappuoli R, Serruto D. *Neisseria meningitidis* NalP cleaves human complement C3, facilitating degradation of C3b and survival in human serum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(1):427-32.

Deng J, Gold D, LoVerde PT, Fishelson Z. Inhibition of the complement membrane attack complex by *Schistosoma mansoni* paramyosin. *Infect Immun*. 2003;71(11):6402-10.

Deu E, Verdoes M, Bogyo M. New approaches for dissecting protease functions to improve probe development and drug discovery. *Nat Struct Mol Biol*. 2012;19(1):9-16.

Domingos RF, et al. Features of two proteins of *Leptospira interrogans* with potential role in host-pathogen interactions. *BMC Microbiol*. 2012;12:50.

Drag M, Salvesen GS. Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(9):690-701.

Duncan AR, Winter G. The binding site for C1q on IgG. *Nature*. 1988;332(6166):738-40.

Edman P, Högfeldt E, Sillén LG, Kinell P. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chem Scand*. 1950;4:283-93.

Eshghi A, et al. *Leptospira interrogans* catalase is required for resistance to H₂O₂ and for virulence. *Infect Immun*. 2012;80(11):3892-9.

Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and Leptospirosis. Melbourne: MedScience, 1999.

Fearon DT, Austen KF. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J Exp Med*. 1975;142(4):856-63.

Fernandes LG, et al. Functional and immunological evaluation of two novel proteins of *Leptospira* spp. *Microbiology*. 2014;160(1):149-64.

Fernandes LG, et al. OmpL1 is an extracellular matrix- and plasminogen-interacting protein of *Leptospira* spp. *Infect Immun*. 2012;80(10):3679-92.

Figueroa JE, Densen P. Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clin Microbiol Rev*. 1991;4(3):359-95.

Finn RD, et al. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D222-30.

Flannery B, et al. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 2001;39(9):3303-10.

Fong KY, Botto M, Walport MJ, So AK. Genomic organization of human complement component C3. *Genomics.* 1990;7(4):579-86.

Forneris F, Wu J, Gros P. The modular serine proteases of the complement cascade. *Curr Opin Struct Biol.* 2012;22(3):333-41.

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.

Fujita T, Matsushita M, Endo Y. The lectin-complement pathway--its role in innate immunity and evolution. *Immunol Rev.* 2004;198:185-202.

Gasque P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol.* 2004;41(11):1089-98.

Gewurz H, Zhang XH, Lint TF. Structure and function of the pentraxins. *Curr Opin Immunol.* 1995;7(1):54-64.

Gropp K, Schild L, Schindler S, Hube B, Zipfel PF, Skerka C. The yeast *Candida albicans* evades human complement attack by secretion of aspartic proteases. *Mol Immunol.* 2009;47(2-3):465-75.

Guerreiro H, et al. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect Immun.* 2001;69(8):4958-68.

Haake DA, et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun.* 2000;68(4):2276-85.

Hallström T, et al. Complement regulator-acquiring surface protein 1 of *Borrelia burgdorferi* binds to human bone morphogenic protein 2, several extracellular matrix proteins, and plasminogen. *J Infect Dis.* 2010;202(3):490-8.

Harmat V, et al. The structure of MBL-associated serine protease-2 reveals that identical substrate specificities of C1s and MASP-2 are realized through different sets of enzyme-substrate interactions. *J Mol Biol.* 2004;342(5):1533-46.

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(4):494-501.

Hartwig DD, et al., Mannosylated LigANI produced in *Pichia pastoris* protects hamsters against leptospirosis. *Curr Microbiol.* 2014;68(4):524-30.

Hauk P, Barbosa AS, Ho PL, Farah CS. Calcium binding to leptospira outer membrane antigen LipL32 is not necessary for its interaction with plasma fibronectin, collagen type IV, and plasminogen. *J Biol Chem.* 2012;287(7):4826-34.

Hauk P, et al. Expression and characterization of HlyX hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni: potentiation of hemolytic activity by LipL32. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;333(4):1341-7.

Haviland DL, et al. Cellular expression of the C5a anaphylatoxin receptor (C5aR): demonstration of C5aR on nonmyeloid cells of the liver and lung. *J Immunol.* 1995;154(4):1861-9.

Hirata IY, et al. Internally quenched fluorogenic protease substrates: solid phase synthesis and fluorescence spectroscopy of peptides containing orthoaminobenzoyl/dinitrophenyl groups as donor-acceptor pairs. *Lett Pept Sci.* 1994;(1):299–308.

Honda-Ogawa M, et al. Cysteine proteinase from *Streptococcus pyogenes* enables evasion of innate immunity via degradation of complement factors. *J Biol Chem.* 2013;288(22):15854-64.

Hong YQ, Ghebrehiwet B. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3. *Clin Immunol Immunopathol.* 1992;62(2):133-8.

Inal JM. Parasite interaction with host complement: beyond attack regulation. *Trends Parasitol.* 2004;20(9):407-12.

Isenman DE, Kells DI, Cooper NR, Müller-Eberhard HJ, Pangburn MK. Nucleophilic modification of human complement protein C3: correlation of conformational changes with acquisition of C3b-like functional properties. *Biochemistry.* 1981;20(15):4458-67.

Janssen BJ, et al. Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity. *Nature.* 2005;437(7058):505-11.

Jin F, et al. Purification, characterization, and primary structure of *Clostridium perfringens* lambda-toxin, a thermolysin-like metalloprotease. *Infect Immun.* 1996;64(1):230-7.

Joiner K, Brown E, Hammer C, Warren K, Frank M. Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing. III. C5b-9 deposits stably on rough and type 7 *S. pneumoniae* without causing bacterial killing. *J Immunol.* 1983;130(2):845-9.

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

- Jusko M, et al. A metalloproteinase karilysin present in the majority of *Tannerella forsythia* isolates inhibits all pathways of the complement system. *J Immunol*. 2012;188(5):2338-49.
- Jusko M, et al. Staphylococcal proteases aid in evasion of the human complement system. *J Innate Immun*. 2014;6(1):31-46.
- Kim DD, Song WC. Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol*. 2006;118(2-3):127-36.
- Kisselev AF, Mentele R, von der Helm K. Cleavage of the complement system C3 component by HIV-1 proteinase. *Biol Chem*. 1997;378(5):439-42.
- 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.
- Köhl J. Self, non-self, and danger: a complementary view. *Adv Exp Med Biol*. 2006;586:71-94.
- Kraiczy P, Würzner R. Complement escape of human pathogenic bacteria by acquisition of complement regulators. *Mol Immunol*. 2006;43(1-2):31-44.
- Kühn S, Skerka C, Zipfel PF. Mapping of the complement regulatory domains in the human factor H-like protein 1 and in factor H1. *J Immunol*. 1995;155(12):5663-70.
- Kuo CF, et al. Histopathologic changes in kidney and liver correlate with streptococcal pyrogenic exotoxin B production in the mouse model of group A streptococcal infection. *Microb Pathog*. 2004;36(5):273-85.
- Kuramitsu HK. Proteases of *Porphyromonas gingivalis*: what don't they do? *Oral Microbiol Immunol*. 1998;13(5):263-70.
- Laarman AJ, et al. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways. *J Immunol*. 2012;188(1):386-93.
- Laarman AJ, Ruyken M, Malone CL, van Strijp JA, Horswill AR, Rooijackers SH. *Staphylococcus aureus* metalloprotease aureolysin cleaves complement C3 to mediate immune evasion. *J Immunol*. 2011;186(11):6445-53.
- Lachmann PJ, Hughes-Jones NC. Initiation of complement activation. *Springer Semin Immunopathol*; 1984;7:143-62.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
- Lagal V, Portnoï D, Faure G, Postic D, Baranton G. *Borrelia burgdorferi* sensu stricto invasiveness is correlated with OspC-plasminogen affinity. *Microbes Infect*. 2006;8(3):645-52.

- Lai Y, Villaruz AE, Li M, Cha DJ, Sturdevant DE, Otto M. The human anionic antimicrobial peptide dermcidin induces proteolytic defence mechanisms in staphylococci. *Mol Microbiol.* 2007;63(2):497-506.
- Lambris JD, Ricklin D, Geisbrecht BV. Complement evasion by human pathogens. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(2):132-42.
- Langley R, Wines B, Willoughby N, Basu I, Proft T, Fraser JD. The staphylococcal superantigen-like protein 7 binds IgA and complement C5 and inhibits IgA-Fc alpha RI binding and serum killing of bacteria. *J Immunol.* 2005;174(5):2926-33.
- Law SK, Lichtenberg NA, Levine RP. Evidence for an ester linkage between the labile binding site of C3b and receptive surfaces. *J Immunol.* 1979;123(3):1388-94.
- Letunic I, Doerks T, Bork P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(Database issue):D302-5.
- Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(2):296-326.
- Li S, et al. Replication or death: distinct fates of pathogenic *Leptospira* strain Lai within macrophages of human or mouse origin. *Innate Immun.* 2010;16(2):80-92.
- Lin YP, Lee DW, McDonough SP, Nicholson LK, Sharma Y, Chang YF. Repeated domains of leptospira immunoglobulin-like proteins interact with elastin and tropoelastin. *J Biol Chem.* 2009;284(29):19380-91.
- Lin YP, McDonough SP, Sharma Y, Chang YF. Leptospira immunoglobulin-like protein B (LigB) binding to the C-terminal fibrinogen α C domain inhibits fibrin clot formation, platelet adhesion and aggregation. *Mol Microbiol.* 2011;79(4):1063-76.
- López-Otín C, Bond JS. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem.* 2008;283(45):30433-7.
- Lukomski S, et al. Genetic inactivation of an extracellular cysteine protease (SpeB) expressed by *Streptococcus pyogenes* decreases resistance to phagocytosis and dissemination to organs. *Infect Immun.* 1998;66(2):771-6.
- Luo S, Hoffmann R, Skerka C, Zipfel PF. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 is a novel factor H-, factor H-like protein 1-, and plasminogen-binding surface protein of *Candida albicans*. *J Infect Dis.* 2013;207(4):594-603.
- Malkin K. Enhancement of *Leptospira hardjo* agglutination titers in sheep and goat serum by heat inactivation. *Can J Comp Med.* 1984;48(2):208-10.
- Manthey HD, Woodruff TM, Taylor SM, Monk PN. Complement component 5a (C5a). *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(11):2114-7.
- Marikovsky M, Arnon R, Fishelson Z. *Schistosoma mansoni*: localization of the 28 kDa secreted protease in cercaria. *Parasite Immunol.* 1990;12(4):389-401.

Marr N, Luu RA, Fernandez RC. *Bordetella pertussis* binds human C1 esterase inhibitor during the virulent phase, to evade complement-mediated killing. *J Infect Dis.* 2007;195(4):585-8.

Marschang P, Sodroski J, Würzner R, Dierich MP. Decay-accelerating factor (CD55) protects human immunodeficiency virus type 1 from inactivation by human complement. *Eur J Immunol.* 1995;25(1):285-90.

Matsunaga J, Sanchez Y, Xu X, Haake DA. Osmolarity, a key environmental signal controlling expression of leptospiral proteins LigA and LigB and the extracellular release of LigA. *Infect Immun.* 2005;73(1):70-8.

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

McKerrow^a JH, Engel JC, Caffrey CR. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. *Bioorg Med Chem.* 1999;7(4):639-44.

McKerrow^b JH. Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action. *Int J Parasitol.* 1999;29(6):833-7.

Meléndez-López SG, et al. Use of recombinant *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase 1 to identify a potent inhibitor of amebic invasion in a human colonic model. *Eukaryot Cell.* 2007;6(7):1130-6.

Mendes RS, et al. The novel leptospiral surface adhesin Lsa20 binds laminin and human plasminogen and is probably expressed during infection. *Infect Immun.* 2011;79(11):4657-67.

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

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

Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(1):36-46.

Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(2):240-73.

Mollnes TE, Song WC, Lambris JD. Complement in inflammatory tissue damage and disease. *Trends Immunol.* 2002;23(2):61-4.

Monahan AM, Callanan JJ, Nally JE. Review paper: Host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis. *Vet Pathol.* 2009;46(5):792-9.

- Morgan BP, Harris CL. Complement regulatory proteins. Academic Press. London. 1999; 382p.
- Morley BJ, Walport MJ. The complement facts book. Academic Press. London. 2000;228p.
- 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.
- Musso D, La Scola B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. J Microbiol Immunol Infect. 2013;46(4):245-52.
- Myers DM. Manual de métodos para el diagnostico de la leptospirosis. Martinez: Centro Panamericano de Zoonoses, 1985. Nota técnica n.30.
- Naglik J, Albrecht A, Bader O, Hube B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. Cell Microbiol. 2004;6(10):915-26.
- Nahori MA, et al. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. J Immunol. 2005;175(9):6022-31.
- Nascimento AL, et al. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. Braz J Med Biol Res. 2004;37(4):459-77.
- Niall HD. Automated Edman degradation: the protein sequenator. Methods Enzymol. 1973;27:942-1010.
- Nogueira SV, et al. *Leptospira interrogans* enolase is secreted extracellularly and interacts with plasminogen. PLoS One. 2013;8(10):e78150.
- Ohbayashi T, et al. Degradation of fibrinogen and collagen by staphopains, cysteine proteases released from *Staphylococcus aureus*. Microbiology. 2011;157(3):786-92.
- Oliveira LC, et al. Internally quenched fluorescent peptide libraries with randomized sequences designed to detect endopeptidases. Anal Biochem. 2012;421(1):299-307.
- Oliveira R, de Moraes ZM, Gonçalves AP, Romero EC, Vasconcellos SA, Nascimento AL. Characterization of novel OmpA-like protein of *Leptospira interrogans* that binds extracellular matrix molecules and plasminogen. PLoS One. 2011;6(7):e21962.
- Orth D, et al. EspP, a serine protease of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, impairs complement activation by cleaving complement factors C3/C3b and C5. Infect Immun. 2010;78(10):4294-301.
- Park SY, et al. Immune evasion of *Enterococcus faecalis* by an extracellular gelatinase that cleaves C3 and iC3b. J Immunol. 2008;181(9):6328-36.
- Park SY, Kim KM, Lee JH, Seo SJ, Lee IH. Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. Infect Immun. 2007;75(4):1861-9.

- Pausa M, et al. Serum-resistant strains of *Borrelia burgdorferi* evade complement-mediated killing by expressing a CD59-like complement inhibitory molecule. *J Immunol.* 2003;170(6):3214-22.
- Pfarr N, et al. Linking C5 deficiency to an exonic splicing enhancer mutation. *J Immunol.* 2005;174(7):4172-7.
- Picardeau M, et al. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS One.* 2008;3(2):e1607.
- Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect.* 2013;43(1):1-9.
- Poltermann S, Kunert A, von der Heide M, Eck R, Hartmann A, Zipfel PF. Gpm1p is a factor H-, FHL-1-, and plasminogen-binding surface protein of *Candida albicans*. *J Biol Chem.* 2007;282(52):37537-44.
- Popadiak K, Potempa J, Riesbeck K, Blom AM. Biphasic effect of gingipains from *Porphyromonas gingivalis* on the human complement system. *J Immunol.* 2007;178(11):7242-50.
- Postma B, et al. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* binds specifically to the C5a and formylated peptide receptor. *J Immunol.* 2004;172(11):6994-7001.
- Potempa J, Dubin A, Korzus G, Travis J. Degradation of elastin by a cysteine proteinase from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem.* 1988;263(6):2664-7.
- Potempa M, et al. Interpain A, a cysteine proteinase from *Prevotella intermedia*, inhibits complement by degrading complement factor C3. *PLoS Pathog.* 2009;5(2):e1000316.
- Potempa M, Potempa J. Protease-dependent mechanisms of complement evasion by bacterial pathogens. *Biol Chem.* 2012;393(9):873-88.
- Ram S, Lewis LA, Rice PA. Infections of people with complement deficiencies and patients who have undergone splenectomy. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(4):740-80.
- Ramos CR, Abreu PA, Nascimento AL, Ho PL. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37(8):1103-9.
- Ramu P, Tanskanen R, Holmberg M, Lähteenmäki K, Korhonen TK, Meri S. The surface protease PgtE of *Salmonella enterica* affects complement activity by proteolytically cleaving C3b, C4b and C5. *FEBS Lett.* 2007;581(9):1716-20.
- Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(Database issue):D343-50.

Reed SL, Ember JA, Herdman DS, DiScipio RG, Hugli TE, Gigli I. The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylatoxins C3a and C5a. *J Immunol.* 1995;155(1):266-74.

Reed SL, Keene WE, McKerrow JH, Gigli I. Cleavage of C3 by a neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J Immunol.* 1989;143(1):189-95.

Ren SX, et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature.* 2003;422(6934):888-93.

Ricaldi JN, et al. Whole genome analysis of *Leptospira licerasiae* provides insight into leptospiral evolution and pathogenicity. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(10):e1853.

Ringdahl U, Sjöbring U. Analysis of plasminogen-binding M proteins of *Streptococcus pyogenes*. *Methods.* 2000;21(2):143-50.

Ristow P, et al. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. *Microbiology.* 2008;154(5):1309-17.

Ritchie RF, Palomaki GE, Neveux LM, Navolotskaia O. Reference distributions for complement proteins C3 and C4: a comparison of a large cohort to the world's literature. *J Clin Lab Anal.* 2004;18(1):9-13.

Rodríguez de Córdoba S, Esparza-Gordillo J, Goicoechea de Jorge E, Lopez-Trascasa M, Sánchez-Corral P. The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. *Mol Immunol.* 2004;41(4):355-67.

Rooijakkers SH, et al. Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat Immunol.* 2005;6(9):920-7.

Rooijakkers SH, van Strijp JA. Bacterial complement evasion. *Mol Immunol.* 2007;44(1-3):23-32.

Roos A, et al. Functional characterization of the lectin pathway of complement in human serum. *Mol Immunol.* 2003;39(11):655-68.

Roussel-Jazédé V, Grijpstra J, van Dam V, Tommassen J, van Ulsen P. Lipidation of the autotransporter NalP of *Neisseria meningitidis* is required for its function in the release of cell-surface-exposed proteins. *Microbiology.* 2013;159(2):286-95.

Saifuddin M, et al. Role of virion-associated glycosylphosphatidylinositol-linked proteins CD55 and CD59 in complement resistance of cell line-derived and primary isolates of HIV-1. *J Exp Med.* 1995;182(2):501-9.

Sakata EE, Yasuda PH, Romero EC, Silva MV, Lomar AV. The serovars of *Leptospira interrogans* isolated from cases of human leptospirosis in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1992;34(3):217-21.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3 v.

Sanderson-Smith ML, Dowton M, Ranson M, Walker MJ. The plasminogen-binding group A streptococcal M protein-related protein Prp binds plasminogen via arginine and histidine residues. J Bacteriol. 2007;189(4):1435-40.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977;74(12):5463-7.

Schenkein HA, Genco RJ. Gingival fluid and serum in periodontal diseases. I. Quantitative study of immunoglobulins, complement components, and other plasma proteins. J Periodontol. 1977;48(12):772-7

Schmidtchen A, Holst E, Tapper H, Björck L. Elastase-producing *Pseudomonas aeruginosa* degrade plasma proteins and extracellular products of human skin and fibroblasts, and inhibit fibroblast growth. Microb Pathog. 2003;34(1):47-55.

Schmitz J, Zimmer JP, Kluxen B, Aries S, Bögel M, Gigli I, Schmitz H. Antibody-dependent complement-mediated cytotoxicity in sera from patients with HIV-1 infection is controlled by CD55 and CD59. J Clin Invest. 1995;96(3):1520-6.

Selzer PM, et al. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: lessons from a parasite target. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(20):11015-22.

Serruto D, Rappuoli R, Scarselli M, Gros P, van Strijp JA. Molecular mechanisms of complement evasion: learning from staphylococci and meningococci. Nat Rev Microbiol. 2010;8(6):393-9.

Sieprawska-Lupa M, et al. Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(12):4673-9.

Signorini ML, Lottersberger J, Tarabla HD, Vanasco NB. Enzyme-linked immunosorbent assay to diagnose human leptospirosis: a meta-analysis of the published literature. Epidemiol Infect. 2013;141(1):22-32.

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;2:44.

Silva EF, et al. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. Vaccine. 2007;25(33):6277-86.

Silva, AS. Implicações do polimorfismo Y402H de fator H para a concentração plasmática de proteínas do sistema complemento e do perfil lipídico em pacientes com degeneração da mácula relacionada a idade. [tese (Doutorado em Ciências)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009.

Siqueira GH, Atzingen MV, Alves IJ, de Moraes ZM, Vasconcellos SA, Nascimento AL. Characterization of three novel adhesins of *Leptospira interrogans*. Am J Trop Med Hyg. 2013;89(6):1103-16

Sjölander H, et al. The ScpC protease of *Streptococcus pyogenes* affects the outcome of sepsis in a murine model. Infect Immun. 2008;76(9):3959-66

Smith CA, Vogel CW, Müller-Eberhard HJ. MHC Class III products: an electron microscopic study of the C3 convertases of human complement. J Exp Med. 1984;159(1):324-9.

Smythe L, Adler B, Hartskeerl RA, Galloway RL, Turenne CY, Levett PN; International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the Taxonomy of *Leptospiraceae*. 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. Int J Syst Evol Microbiol. 2013;63(5):1859-62.

Souza NM, Vieira ML, Alves IJ, de Moraes ZM, Vasconcellos SA, Nascimento AL. Lsa30, a novel adhesin of *Leptospira interrogans* binds human plasminogen and the complement regulator C4bp. Microb Pathog. 2012;53(3-4):125-34.

Spear GT, Lurain NS, Parker CJ, Ghassemi M, Payne GH, Saifuddin M. Host cell-derived complement control proteins CD55 and CD59 are incorporated into the virions of two unrelated enveloped viruses. Human T cell leukemia/lymphoma virus type I (HTLV-I) and human cytomegalovirus (HCMV). J Immunol. 1995;155(9):4376-81

Stevenson B, et al. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. PLoS One. 2007;2(11):e1188.

Tack BF, Morris SC, Prahl JW. Fifth component of human complement: purification from plasma and polypeptide chain structure. Biochemistry. 1979;18(8):1490-7.

Terao Y, et al. Group A streptococcal cysteine protease degrades C3 (C3b) and contributes to evasion of innate immunity. J Biol Chem. 2008;283(10):6253-60.

The NCBI handbook [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2002 Oct. Chapter 18, The Reference Sequence (RefSeq) Project. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091>.

Thiel S. Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins. Mol Immunol. 2007;44(16):3875-88.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 1994;22(22):4673-80.

Thurman JM, Holers VM. The central role of the alternative complement pathway in human disease. J Immunol. 2006;176(3):1305-10.

Tortorella D, Gewurz BE, Furman MH, Schust DJ, Ploegh HL. Viral subversion of the immune system. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:861-926.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(9):4350-4.

Tsao N, Tsai WH, Lin YS, Chuang WJ, Wang CH, Kuo CF. Streptococcal pyrogenic exotoxin B cleaves properdin and inhibits complement-mediated opsonophagocytosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;339(3):779-84.

Turk B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(9):785-99.

Turner DP, Wooldridge KG, Ala'Aldeen DA. Autotransported serine protease A of *Neisseria meningitidis*: an immunogenic, surface-exposed outer membrane, and secreted protein. *Infect Immun*. 2002;70(8):4447-61.

Vanderplasschen A, Mathew E, Hollinshead M, Sim RB, Smith GL. Extracellular enveloped vaccinia virus is resistant to complement because of incorporation of host complement control proteins into its envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(13):7544-9.

Verma A, Brissette CA, Bowman AA, Shah ST, Zipfel PF, Stevenson B. Leptospiral endostatin-like protein A is a bacterial cell surface receptor for human plasminogen. *Infect Immun*. 2010;78(5):2053-9.

Verma A, et al. LfhA, a novel factor H-binding protein of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun*. 2006;74(5):2659-66.

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

Vieira ML, et al. *In vitro* identification of novel plasminogen-binding receptors of the pathogen *Leptospira interrogans*. *PLoS One*. 2010;5(6):e11259.

Vieira ML, et al. Plasminogen binding proteins and plasmin generation on the surface of *Leptospira* spp.: the contribution to the bacteria-host interactions. *J Biomed Biotechnol*. 2012;758513.

Vieira ML, Vasconcellos SA, Gonçalves AP, de Moraes ZM, Nascimento AL. Plasminogen acquisition and activation at the surface of leptospira species lead to fibronectin degradation. *Infect Immun*. 2009;77(9):4092-101.

von Pawel-Rammingen U, Johansson BP, Björck L. IdeS, a novel streptococcal cysteine proteinase with unique specificity for immunoglobulin G. *EMBO J*. 2002;21(7):1607-15

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

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

Werts C, et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol*. 2001;2(4):346-52.

Wolff DG, et al. Interaction of leptospira elongation factor tu with plasminogen and complement factor h: a metabolic leptospiral protein with moonlighting activities. *PLoS One*. 2013;8(11):e81818.

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

Wright AJ, et al. Characterisation of receptor binding by the chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* and the effects of the host immune response. *Mol Immunol*. 2007;44(10):2507-17.

Yu NY, et al. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics*. 2010;26(13):1608-15.

Zipfel PF, Hallström T, Riesbeck K. Human complement control and complement evasion by pathogenic microbes--tipping the balance. *Mol Immunol*. 2013;56(3):152-60.

APÊNDICE A - Apresentações orais em congressos

1. **Fraga TR**, Courrol D, Castiblanco-Valência MM, Izaura IY, Vaconcelos SA, Juliano L, Barbosa AS, Isaac L. Immune evasion in *Leptospira*: the secretion of proteases that cleave complement proteins. In: *15th International Congress of Immunology*. Milão, Itália, 2013.
2. **Fraga TR**, Courrol D, Castiblanco-Valência MM, Vaconcelos SA, Barbosa AS, Isaac L. *Leptospira* evades the human complement attack by the secretion of proteases that directly cleave complement proteins. In: *XXXVII Congress of the Brazilian Immunology Society*. Campos do Jordão, São Paulo, 2012.
3. **Fraga TR**, Courrol DS, Vasconcellos SA, Barbosa AS, Isaac L. Cleavage of complement proteins by leptospiral secreted proteases: an evasion strategy against host immunity? In: *VII International Leptospirosis Meeting*. Mérida, México, 2011.
4. **Fraga TR**. Palestra intitulada "Immune evasion mechanisms acquired by pathogenic leptospires to avoid the complement system". In: *XXXVI Congress of the Brazilian Society of Immunology*. Foz do Iguaçu, Brasil, 2011.
5. Castiblanco MM, **Fraga TR**, Silva LB, Monaris D, Abreu PAE, Strobel S, Jozsi M, Isaac L, Barbosa AS. Leptospiral immunoglobulin-like proteins contribute to immune evasion by interacting with human complement regulators FH, FHR-1 and C4BP. In: *VII International Leptospirosis Meeting*. Mérida, México, 2011.
6. Castiblanco MM, **Fraga TR**, Silva LB, Monaris D, Abreu PAE, Strobel S, Jozsi M, Isaac L, Barbosa AS. Immune evasion of pathogenic leptospira by acquisition of complement regulators FH, FHR-1 and C4BP. In: *XXXVI Congress of the Brazilian Society of Immunology*. Foz do Iguaçu, Brasil, 2011.

APÊNDICE B – Trabalhos apresentados em congressos na forma de pôster

1. Fraga TR, Courrol D, Castiblanco-Valência MM, Izaura IY, Vaconcelos SA, Juliano L, Barbosa AS, Isaac L. Pathogenic leptospire evade complement attack by secretion of metalloproteases. In: *14th European Meeting on Complement in Human Disease*. Jena, Alemanha, 2013.

2. Fraga TR, Courrol D, Castiblanco-Valência MM, Vaconcelos SA, Barbosa AS, Isaac L. A novel mechanism of immune evasion in *Leptospira*: The expression of proteases that cleave complement proteins. In: *XXIV International Complement Workshop*. Creta, Grécia, 2012.

- Trabalho premiado com Conference Trainee Awards.

3. Fraga TR, Courrol D, Castiblanco-Valência MM, Vaconcelos SA, Barbosa AS, Isaac L. *Leptospira* evades the human complement attack by the secretion of proteases that directly cleave complement proteins. In: *XXXVII Congress of the Brazilian Immunology Society*. Campos do Jordão, São Paulo, 2012.

4. Fraga TR, Vasconcellos SA, Barbosa AS, Isaac L. A novel mechanism of immune evasion in *Leptospira*: The expression of proteases that cleave complement proteins. In: *13th European Meeting on Complement in Human Disease*. Leiden, Holanda, 2011.

- Trabalho premiado pela Marie Curie Action funded by European Comission.

5. Fraga TR, Courrol DS, Vasconcellos SA, Barbosa AS, Isaac L. Complement proteins are cleaved by pathogenic leptospiral proteases. In: *XXXVI Congress of the Brazilian Society of Immunology*. Foz do Iguaçu, Brasil, 2011.

6. Fraga TR, Vasconcellos SA, Barbosa AS, Isaac L. Novel mechanism of immune evasion in *Leptospira*: the secretion of proteases that cleave the central complement protein C3b. In: *XXXV Congress of the Brazilian Society for Immunology*. Porto Alegre, Brasil, 2010.

7. Castiblanco-Valencia MM, **Fraga TR**, Silva LB, Monaris D, Abreu PAE, Barbosa AS, Isaac L. Plasmin cleaves human complement C3b and C5 proteins in the presence of *Leptospira interrogans* proteins: a new role of LigA and LigB for complement immune evasion. In: *15th International Congress of Immunology*. Milão, Itália, 2013.

8. Castiblanco-Valencia MM, **Fraga TR**, Silva LB, Monaris D, Abreu PAE, Barbosa AS, Isaac L. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with plasminogen to escape complement mediated-killing. In: *XXIV International Complement Workshop*. Creta, Grécia, 2012.

9. Castiblanco-Valencia MM, **Fraga TR**, Silva LB, Monaris D, Abreu PAE, Barbosa AS, Isaac L. Plasminogen binds to leptospiral immunoglobulin-like proteins and inhibits complement activation. In: *XXXVII Congress of the Brazilian Immunology Society*. Campos do Jordão, São Paulo, 2012.

10. Courrol DS, **Fraga TR**, Vasconcellos AS, Barbosa AS, Isaac L. Termolisinas: proteases secretadas por leptospiros patogênicas para evasão do sistema complemento humano. In: *20º Simpósio de Iniciação Científica*. Ribeirão Preto, 2012.

11. Martinez AGP, Ferreira VP, **Fraga TR**, Vasconcellos AS, Daha MR, Barbosa AS, Isaac L. Properdin binding to the surface of leptospira promotes complement activation and controls proliferation of non-pathogenic bacteria *in vivo*. In: *XXIV International Complement Workshop*. Creta, Grécia, 2012.

12. Martinez AGP, Ferreira VP, **Fraga TR**, Vasconcellos AS, Daha MR, Barbosa AS, Isaac L. Human properdin binds to leptospira species and promotes alternative pathway activation. In: *XXXVII Congress of the Brazilian Immunology Society*. Campos do Jordão, São Paulo, 2012.

13. Castiblanco MM, **Fraga TR**, Silva LB, Monaris D, Abreu PAE, Strobel S, Jozsi M, Isaac L, Barbosa AS. Immune evasion of pathogenic leptospira by acquisition of complement regulators FH, FHR-1 and C4BP. In: *XXXVI Congress of the Brazilian Society of Immunology*. Foz do Iguaçu, Brasil, 2011.

- 14.** Castiblanco MM, **Fraga TR**, Silva LB, Monaris D, Abreu PAE, Strobel S, Jozsi M, Isaac L, Barbosa AS. Human complement regulators interact with leptospiral immunoglobulin-like proteins contributing to immune evasion. *In: 13th European Meeting on Complement in Human Disease*. Leiden, Holanda, 2011.
- 15.** Castiblanco MM, **Fraga TR**, Silva LB, Monaris D, Abreu PAE, Strobel S, Jozsi M, Isaac L, Barbosa AS. Immune evasion of pathogenic *Leptospira*: human complement regulators Factor H and C4b-Binding Protein interact with LigA and LigB proteins. *In: Current Opinion in Cellular Host-Pathogen Interactions*. Amsterdam, Holanda, 2010.
- 16.** Castiblanco MM, **Fraga TR**, Silva LB, Monaris D, Abreu PAE, Strobel S, Jozsi M, Isaac L, Barbosa AS. Interaction of host complement regulators factor H and C4BP with Lig proteins constituted a leptospiral immune evasion mechanism. *In: XXXV Congress of the Brazilian Society for Immunology*. Porto Alegre, Brasil, 2010.
- 17.** Castiblanco MM, **Fraga TR**, Silva LB, Monaris D, Abreu PAE, Strobel S, Jozsi M, Isaac L, Barbosa AS. Immune evasion of pathogenic *Leptospira*: human complement regulators Factor H and C4b-Binding Protein interact with LigA and LigB proteins. *In: Reunião Científica Anual do Instituto Butantan*. São Paulo, Brasil, 2010.
- 18.** Castiblanco MM, **Fraga TR**, Silva LB, Monaris D, Abreu PAE, Strobel S, Jozsi M, Isaac L, Barbosa AS. *Leptospira* Immunoglobulin-like proteins bind human complement regulator Factor H. *In: XXIII International Complement Workshop*. Nova Iorque, EUA, 2010.

APÊNDICE C - Capítulo de livro

Capítulo do livro Molecular Medical Microbiology. Elsevier. Munique. 2014. In press.

LEPTOSPIRA AND LEPTOSPIROSIS

Tatiana Rodrigues Fraga¹, Eneas de Carvalho², Lourdes Isaac¹, Angela Silva Barbosa³

¹ Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ² Biotechnology Center, Butantan Institute, São Paulo, Brazil; ³ Laboratory of Bacteriology, Butantan Institute, São Paulo, Brazil

Leptospirosis is a neglected infectious disease caused by spirochetes from the genus *Leptospira*. It constitutes a major public health problem in developing countries, with outcomes ranging from subclinical infections to fatal pulmonary hemorrhage and Weil's syndrome. The clinical diagnosis of leptospirosis is challenging due to the protein-based nature of the disease. To successfully establish an infection, leptospires bind to extracellular matrix compounds and host cells. The interaction of leptospires with pathogen recognition receptors is a fundamental issue in leptospiral immunity. The knowledge of evasion strategies employed by pathogenic leptospires to subvert the immune system is of extreme importance as they may represent targets for the development of new treatments and prophylactic approaches in leptospirosis. Besides, the recent availability of complete genome sequences for *Leptospira* spp. has led to important insights into their pathogenesis. This chapter presents an overview of the above aspects, highlighting the molecular microbiology of the pathogen.

APÊNDICE D - Artigos publicados

1. **Fraga TR**, Courrol D, Castiblanco MM, Hirata IY, Vasconcellos AS, Juliano L, Barbosa AS, Isaac L. Immune evasion by pathogenic *Leptospira* strains: the secretion of proteases that directly cleave complement proteins. *The Journal of Infectious Diseases*. v. 209, p. 876-886, 2014.
2. **Fraga TR**, Barbosa AS, Isaac L. Leptospirosis: Aspects of Innate Immunity, Immunopathogenesis and Immune Evasion from the Complement System. *Scandinavian Journal of Immunology*. v.73, p.408-419, 2011.
3. Castiblanco-Valencia MM, **Fraga TR**, Silva LB, Monaris D, Abreu PAE, Strobel S, Jozsi M, Isaac L, Barbosa AS. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators Factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. *The Journal of Infectious Diseases*. v. 205, p. 995-1004, 2012.
4. Farias LP, Krautz-Peterson G, Tararam CA, Araujo-Montoya BO, **Fraga TR**, Rofatto HK, Silva-Jr FP, Isaac L, Da'dara AA, Wilson RA, Shoemaker CB, Leite LCC. On the three-finger protein domain fold and CD59-like proteins in *Schistosoma mansoni*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. v.7, p. e2482, 2013.

Immune Evasion by Pathogenic *Leptospira* Strains: The Secretion of Proteases that Directly Cleave Complement Proteins

Tatiana Rodrigues Fraga,¹ Daniella dos Santos Courrol,¹ Mónica Marcela Castiblanco-Valencia,¹ Izaura Yoshico Hirata,² Sílvia Arruda Vasconcellos,² Luiz Juliano,³ Angela Silva Barbosa,⁴ and Lourdes Isaac¹

¹Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, and ²Faculty of Veterinary Medicine, University of São Paulo, ³Department of Biophysics, Federal University of São Paulo, and ⁴Laboratory of Bacteriology, Butantan Institute, São Paulo, Brazil

Leptospirosis is an infectious disease of public health importance. To successfully colonize the host, pathogens have evolved multiple strategies to escape the complement system. Here we demonstrate that the culture supernatant of pathogenic but not saprophytic *Leptospira* inhibit the three complement pathways. We showed that the proteolytic activity in the supernatants of pathogenic strains targets the central complement molecule C3 and specific proteins from each pathway, such as factor B, C2, and C4b. The proteases cleaved α and β chains of C3 and work in synergy with host regulators to inactivate C3b. Proteolytic activity was inhibited by 1,10-phenanthroline, suggesting the participation of metalloproteases. A recombinant leptospiral metalloprotease from the thermolysin family cleaved C3 in serum and could be one of the proteases responsible for the supernatant activity. We conclude that pathogenic leptospiral proteases can deactivate immune effector molecules and represent potential targets to the development of new therapies in leptospirosis.

Keywords. *Leptospira*; Leptospirosis; Immune Evasion; Innate Immunity; Complement System; Proteases.

Leptospirosis is a neglected infectious disease of public health importance [1, 2]. The disease is caused by spirochetes from the genus *Leptospira*, which includes pathogenic and saprophytic species [3]. To successfully establish an infection, leptospires must evade host immune defenses, including the complement system. Complement is a major arm of innate immunity, and one of its main functions is to recognize and destroy microorganisms (for a comprehensive review, see [4]). The three activation pathways of the complement system ensure that virtually any nonhost surface is recognized as hostile. However, pathogenic microorganisms have evolved multiple strategies to escape complement attack,

which include: (1) the production of a capsule to prevent complement recognition, (2) the acquisition of host fluid phase complement regulatory proteins, such as factor H (FH) and C4b-binding protein, and (3) the secretion of proteases that inactivate complement molecules [5–7].

The ability of pathogenic leptospires to multiply and spread in the host reflects a low efficacy of complement against them [8]. Indeed, these bacteria are able to efficiently acquire the host regulators FH and C4b-binding protein, promoting complement inactivation on their surfaces. Diverse membrane proteins have been described as ligands for these regulators, including the leptospiral immunoglobulin-like (Lig) proteins A and B, which bind both regulators [9].

The secretion of proteases that cleave and inactivate complement proteins has been described as an effective immune evasion strategy for several human pathogens [10, 11]. Interestingly, pathogen-derived proteases target a wide range of substrates, including the central complement molecule C3, proteins involved in cascade initiation, such as C1q and immunoglobulins, as well as terminal components, such as C5 [12]. Illustrative examples of these proteases are elastase (PaE) and alkaline protease (AprA) from *Pseudomonas aeruginosa*,

Received 13 May 2013; accepted 6 September 2013; electronically published 26 October 2013.

Presented in part: XIII European Meeting on Complement in Human Disease, Leiden, The Netherlands, 21–24 August 2011 (abstract 116) and XXIV International Complement Workshop, Chania, Crete, Greece, 10–15 October 2012 (abstract 153).

Correspondence: Dr. Lourdes Isaac, Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1730, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil (louisaac@icb.usp.br).

The Journal of Infectious Diseases 2014;209:876–86

© The Author 2013. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

DOI: 10.1093/infdis/jit569

gelatinase (GelE) from *Enterococcus faecalis*, and aureolysin (Aur) from *Staphylococcus aureus*. All these proteins are secreted enzymes that belong to the metalloprotease class. PaE and AprA proteases target C1q and C3, promoting a functional impairment of all complement pathways [13]. The protease GelE cleaves C3 and the fragments C3b, C3a and iC3b, promoting a substantial reduction of the pathogen's phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes [14, 15]. Furthermore, secreted Aur acts in synergy with host regulators to inactivate C3, effectively hampering the host innate immune response [16].

To our knowledge the secretion of proteases as an immune evasion strategy has not yet been investigated in *Leptospira*. Given the ability of these pathogenic microorganisms to disseminate fully in the host, we believe it would be quite relevant to examine complement inhibition in the fluid phase, which could create a favorable environment for leptospiral multiplication and spread. Therefore, the purpose of this work was to analyze the ability of pathogenic leptospires to secrete proteases that target complement molecules. The cleavage of these proteins could markedly impair complement activation and may constitute a new immune evasion mechanism in *Leptospira*.

MATERIALS AND METHODS

Proteins, Antibodies and Sera

The complement proteins purified from human plasma and the polyclonal antibodies against them were purchased from Complement Technology. The anti-goat immunoglobulin G (IgG) conjugated with peroxidase was purchased from KPL. Normal human serum was obtained from healthy volunteers, after informed consent.

Leptospira Strains and Culture Supernatants

The *Leptospira* strains used are listed in Figure 1. All strains were cultivated for 7 days in modified Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) medium at 29°C under aerobic conditions [17]. The supernatants containing the secreted proteins were obtained as follows: freshly harvested leptospires were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4), counted by dark-field microscopy using a Petroff-Hausser chamber, and suspended in a final volume of PBS to obtain 1×10^9 leptospires. To allow the secretion of proteases, bacterial suspensions were incubated at 37°C for 4 hours. The supernatants were collected after centrifugation, passed through a 0.22-mm filter, and used in functional assays.

Cloning, Expression and Purification of *Leptospira interrogans* Thermolysin

Escherichia coli DH5 α was the cloning host strain, and *E. coli* BL21 (SI) was chosen for expression of the recombinant proteins, using a T7 promoter-based expression plasmid pAE [18]. The leptospiral thermolysin (gene ID, 2 770 759; chromosome,

I; open reading frame, nucleotides 4 076 605–4 078 989) fragments PepSY-M4 and M4 were amplified by polymerase chain reaction from genomic DNA of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni strain M10 using the following primers: CTCGAGGATGCTAGAAGATAC (fragment M4, F), CGCAA GCTTCTAAATACTG (fragment M4, R), CTCGAGCAAGTT CCAGAGAA (fragment PepSY-M4, F), and CGCAAGCTTC TAAATACTG (fragment PepSY-M4, R). Cloning, expression, and purification were performed as described elsewhere [17].

Electrophoresis and Protein Dosage

Leptospiral culture supernatants or recombinant thermolysins were solubilized in reducing loading buffer, heated for 3 minutes at 96°C, and separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) [19]. Protein concentration was determined using Pierce BCA Kit. All protein preparations were free of lipopolysaccharide according to the limulus amebocyte lysate test (<0.125 endotoxin units/mL).

Proteolytic Activity and Inhibition Assays

Leptospiral culture supernatants (3 μ g of total secreted proteins) or recombinant thermolysins (1 μ g of the fragments PepSY-M4 or M4) were incubated with purified complement proteins (0.25 μ g) or serum (amount corresponding to 0.25 μ g of the complement protein studied), for different times at 37°C. Proteolytic specificity was further confirmed with reactions using 5, 10, and 50 times less leptospiral supernatant (corresponding to 0.6, 0.3, and 0.06 μ g of total protein, respectively). To analyze C3b cleavage, reactions were performed with the regulatory proteins factor I (FI) (0.2 μ g) and/or FH (0.5 μ g), in the presence or absence of the leptospiral supernatants. The chemical nature of the proteases was accessed by preincubation of leptospiral supernatants with inhibitors of serine, metallo-, cysteine, or aspartyl proteases (5 mmol/L Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mmol/L 1,10-phenanthroline, 28 μ mol/L E-64, or 5 μ mol/L pepstatin, respectively) for 30 minutes.

The cleavage products were analyzed by means of Western blot [20]. The reactions were subjected to SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes [21]. After blocking with 10% skimmed milk in PBS-T (PBS containing 0.05% Tween 20), complement proteins were detected by goat anti-human polyclonal antibodies, followed by peroxidase-conjugated anti-goat antibodies. Positive signals were detected by enhanced chemiluminescence (West Pico, Pierce).

Complement Activation Assays

Complement assays were performed as described elsewhere [22] with modifications. Microtiter plates were coated overnight with *E. coli* lipopolysaccharide (1 μ g per well), human IgG (400 ng per well), or mannan (1 μ g per well) in 0.1 mol/L sodium carbonate buffer (pH 9.6). Plates were washed with PBS-T between each of the following steps. Plates were blocked with PBS–3% bovine

Figure 1. Electrophoretic profile of whole secreted proteins from *Leptospira* strains. Leptospirae (1.0×10^9 bacteria) were allowed to secrete proteins for 4 hours at 37°C. The supernatants were collected and submitted to total protein dosage. Samples (650 ng) of secreted proteins were solubilized in reducing loading buffer, boiled, and separated by 15% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were detected by silver staining. Abbreviation: M, Molecular weight marker.

serum albumin for 2 hours at 37°C. For the alternative pathway (AP), serum was diluted in AP buffer (144 mmol/L sodium chloride, 0.96 mmol/L sodium barbital, 2.48 mmol/L barbituric acid, 1.4 mmol/L magnesium chloride, and 10 mmol/L ethylene glycol tetraacetic acid), and for the classic and lectin pathways, it was diluted in gelatin veronal buffer with Ca^{++} and Mg^{++} (GVB $^{++}$) buffer (144 mmol/L sodium chloride, 0.96 mmol/L sodium barbital, 2.48 mmol/L barbituric acid, 0.83 mmol/L magnesium chloride, and 0.25 mmol/L calcium chloride). To analyze the inhibitory effect, diluted serum was preincubated with leptospiral supernatants (3 μg of total secreted proteins) or PBS for 1 hour at 37°C, and added to the plates for 1 hour at 37°C. Complement activation was measured by deposition of C3b (alternative pathway) or C4b (classical and lectin pathways) with anti-C3 and anti-C4 polyclonal antibodies, respectively, followed by peroxidase-conjugated anti-goat IgG. Substrate reaction was performed with *o*-phenylenediamine dihydrochloride, and absorbance was measured at 492 nm.

N-terminal Sequencing

The supernatant of *L. interrogans* serovar Kennewicki strain Fromm (2 μg of total secreted proteins) was incubated with C3 (150 μg) for 4 hours at 37°C. Proteins were subjected to SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. Cleavage products were visualized with 0.1% Coomassie blue in 40% methanol, excised, and analyzed in a Shimadzu PPSQ-23 protein sequencer.

RESULTS

Production and Electrophoretic Characterization of Leptospiral Secreted Proteins

The first step of this work was to obtain an electrophoretic profile of the proteins secreted by the nine *Leptospira* strains

studied, of which seven are pathogenic and two saprophytic (Figure 1). The strains were cultivated for 7 days at 29°C in Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) medium. The leptospirae were then washed, resuspended in PBS (pH 7.4), and allowed to secrete proteins for 4 hours at 37°C. These conditions were selected to mimic the host environment regarding osmolarity (300 mOsm), pH (7.4) and temperature (37°C) [23]. The leptospiral supernatants were collected and analyzed by electrophoresis. The secreted proteins from the 9 *Leptospira* strains differ in composition, number, and intensity of bands. The majority of the components have molecular weights lower than 95 kDa (Figure 1). The two saprophytic strains share a similar protein profile, which differs from those presented by the pathogenic species.

Inhibition of three Complement Pathways by Supernatant of Pathogenic *Leptospira*

To analyze if the supernatant of pathogenic *Leptospira* was able to inhibit the complement cascade, we tested its activity in a well-described assay where the three pathways can be assessed separately [22]. The alternative, classical and lectin pathways were specifically activated in microtiter plates coated with lipopolysaccharide, IgG, or mannan, respectively. To test for inhibitory activity, human serum was preincubated with the supernatant of pathogenic *L. interrogans* serovar Kennewicki strain Fromm or saprophytic *Leptospira biflexa* serovar Andamana strain CH11 before complement activation. Interestingly, we observed that only the supernatant of pathogenic *Leptospira* inhibited the deposition of C3b (alternative pathway) and C4b (classical and lectin pathways) (Figure 2). In contrast, proteins secreted by the saprophytic strain did not cause any inhibition of complement activity.

Figure 2. Supernatant of pathogenic *Leptospira* inhibits the activity of the three complement pathways. Lipopolysaccharide, immunoglobulin G or mannan were immobilized on microtiter plates to activate the alternative, classical and lectin pathways, respectively. To assess the inhibitory effect, normal human serum (NHS) was preincubated with the supernatant of pathogenic *Leptospira interrogans* serovar Kennewicki strain Fromm, or saprophytic *Leptospira biflexa* serovar Andamana strain CH11, or phosphate-buffered saline (PBS) for 1 hour at 37°C. Complement activation was measured by deposition of C3b (alternative pathway) or C4b (classical and lectin pathways) with anti-C3 and anti-C4 polyclonal antibodies, respectively, followed by peroxidase-conjugated secondary antibodies. Optical densities were determined at 492 nm. Data represent mean $\pm$ standard deviation of 3 independent experiments, each performed in duplicate. $A_{492\text{ nm}}$, absorbance at 492 nm; * $P < .05$.

Direct Cleavage of C3b by Pathogenic Leptospiral Secreted Proteases

The complement inhibition produced by the supernatant of pathogenic *Leptospira* prompted us to investigate whether secreted proteases could target key complement molecules, thereby promoting a downregulation of complement activation. To investigate this hypothesis, different amounts of bacteria and culture incubation times were analyzed (Supplementary Figure 1). The tests revealed that the proteolytic activity of the leptospiral supernatant increases with both the total amount of bacteria present and incubation time. We also observed that the C3b molecule is rapidly cleaved by the secreted proteases. Indeed, after only 5 minutes of reaction a cleavage band of approximately 46 kDa is observed (Figure 3A). A more pronounced cleavage occurred after 40 minutes of incubation, with the production of additional fragments ranging from 47 to 28 kDa.

Synergistic Inactivation of C3b by Pathogenic Leptospiral Proteases and Host Factors

Previous studies have shown that pathogenic leptospires are able to bind the host complement regulatory protein FH. At the bacteria surface, bound FH acts as a cofactor of FI in C3b cleavage [9, 24]. Considering this well-established evasion mechanism in *Leptospira*, we asked whether the secreted proteases could act together with host complement regulators in C3b cleavage. To answer this question, proteolytic assays were performed with C3b and the supernatant of pathogenic *L. interrogans* serovar Kennewicki strain Fromm, in the presence or absence of FI and/or FH (Figure 3B). We observed that a complete degradation of the α' chain occurred when FI and FH were added to the reactions, suggesting that the leptospiral proteases work in synergy with these regulators to effectively inactivate C3b.

Figure 3. Pathogenic leptospiral proteases directly cleave C3b and work in synergy with host factors to inactivate this molecule. *A*, The supernatant of pathogenic *Leptospira interrogans* serovar Kennewicki strain Fromm was incubated with C3b for 5–120 minutes at 37°C. The cleavage of C3b by factor I (FI) using factor H (FH) as a cofactor was used as a control. *B*, The leptospiral supernatant was incubated with C3b, in the presence of FI and/or FH, for 2 hours at 37°C. All cleavages were analyzed by Western blot with anti-C3 polyclonal antibodies. Asterisk indicates complete degradation of C3b α' chain. Abbreviation: PBS, phosphate-buffered saline.

Cleavage of Complement Proteins From three Pathways by Proteases Secreted by Pathogenic *Leptospira* Strains

In the assays described above, we showed that pathogenic *L. interrogans* serovar Kennewicki strain Fromm secretes proteases that cleave C3b. To investigate whether this activity is restricted to pathogenic strains, and also to analyze if these proteases target other complement molecules, we repeated the experiments using a panel of nine *Leptospira* strains (Figure 4). Interestingly, we observed that all pathogenic strains were able to secrete proteases that cleave complement proteins from the three pathways. In contrast, the saprophytic strains did not present a significant proteolytic activity. The leptospiral proteases target central complement molecules, such as C3 and its fragments C3b and iC3b, and also proteins from the alternative (factor B [FB]), classical, and lectin pathways (C4b and C2) (Figure 4). To further confirm this activity, reactions with reduced amounts of leptospiral supernatants were performed (Supplementary Figure 2). In these assays, we demonstrated that the complement molecules are still cleaved, even when 5 to 50 times less supernatant was used, which reinforces the presence of enzymatic activity in the samples.

The leptospiral proteases were not able to cleave all proteins tested. C1q, C4, FD, properdin, and human IgG were not degraded by the leptospiral culture supernatant (data not shown). This indicates that these secreted enzymes have some degree of specificity for their substrates. Interestingly, the leptospiral proteases were not able to degrade purified C4 (data not shown). However, the C4b molecule, which is derived from C4, has its

α' chain extensively degraded (Figure 4 and Supplementary Figure 2). A possible explanation would be the presence of proteolytic sites in the C4 α chain that are exposed only when this molecule is cleaved, generating the C4b α' chain.

Proteases Secreted by Pathogenic *Leptospira* and Degradation of α and β Chains of C3

To determine the cleavage sites of the leptospiral proteases, we performed an analysis of the C3 fragmentation by these enzymes. C3 was incubated with the leptospiral supernatant and the cleavage products were submitted to N-terminal sequencing by Edman degradation (Figure 5). Despite being unsuccessful in sequencing all of the cleavage products, the fragments that were sequenced revealed that both α and β chains of C3 are degraded. A schematic representation of the cleavages shows that the 43-kDa (SLQLPS↓RSSKI), 47-kDa (LNEQRY↓YGGGYG), and 68-kDa fragments may originate from α -chain degradation and that the 28-kDa (KLSINT↓HPSQKPL) and 46-kDa fragments are produced by β -chain cleavage. An analysis of the C3 structure (PDB number 2A73) showed that the proteolytic sites are located in hydrophilic, antigenic, and surface-exposed regions, which can be accessed by the leptospiral proteases (data not shown).

Inhibition of Complement-Directed Proteases Secreted by Pathogenic *Leptospira* by 1,10-Phenanthroline

To identify the classes of proteases involved in the cleavage of the complement proteins, inhibition assays were performed.

Figure 4. Proteases secreted by pathogenic *Leptospira* cleave complement proteins from the three pathways. The supernatants of pathogenic (lanes 1–7) and saprophytic (lanes 8–9) *Leptospira* strains were incubated with the purified complement proteins C3, C3b, iC3b, factor B (FB), C2, or C4b for 1 hour at 37°C. The cleavages were analyzed by means of Western blot assays with polyclonal antibodies against the complement proteins. *Leptospira* strains 1–9 are listed in Figure 1.

In these experiments, before the addition of the substrates, the leptospiral supernatant was treated with inhibitors of serine, metallo-, cysteine, or aspartyl proteases (Figure 6). We observed that only 1,10-phenanthroline was able to inhibit the proteolytic activity, which points toward the participation of metalloproteases. However, it does not completely exclude the contribution of other classes of enzymes, in particular serine proteases,

some of which have been shown to be inhibited by 1,10-phenanthroline [25].

Cleavage of Complement Proteins in Human Serum by Pathogenic Leptospiral Proteases

Our data clearly demonstrate that leptospiral proteases are able to cleave various purified complement molecules. However, we

Figure 5. Cleavage sites of the leptospiral proteases in C3 molecule. *A*, supernatant of pathogenic *Leptospira interrogans* serovar Kennewicki strain Fromm (2 µg of total secreted proteins) was incubated with C3 (150 µg) for 4 hours at 37°C. Proteins were subjected to sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride membrane. Cleavage products were stained with Coomassie blue, excised and analyzed by Edman degradation. *M*, molecular weight marker. *B*, Schematic representation of C3 cleavage by leptospiral proteases. N-terminal sequences of the fragments are indicated next to arrows, which represent cleavage sites.

should consider that to constitute an immune evasion strategy, the secreted proteases must also have activity in serum. To address this issue, we performed further proteolytic assays, which revealed that the leptospiral proteases are able to cleave C3, C4, C2, and FB in NHS (Figure 7A).

These cleavages were less pronounced than those observed with the purified proteins, which could be partially explained by the presence of protease inhibitors in serum, such as α₂-macroglobulin. Alternatively, it is also possible that the cleavages were affected by a competition among the different substrates, which are present all together in serum.

Another interesting observation was the cleavage of C4, which occurred only when NHS was used as a complement source (Figure 7A) but is not observed when the purified protein is used. We speculate that proteins present in human serum could act as cofactors of the leptospiral proteases, helping them cleave C4 in this context.

Cleavage of C3 in Human Serum by Recombinant *Leptospira* Thermolysin

The proteases inhibition assays indicate that metalloproteases could be among the enzymes responsible for the cleavages of the complement proteins. This observation prompted us to perform a detailed search in the *Leptospira* genomes to find possible candidates to this function. To our surprise, most of the proteases genes present in pathogenic *Leptospira* share some degree of identity and/or similarity with genes of the saprophytic strains. One of the few exceptions are those related to thermolysins, which are metalloproteases from the peptidase M4 family whose genes are present only in pathogenic strains.

Among these proteins, the thermolysin encoded by the gene LIC13322 of *L. interrogans* serovar Copenhageni was selected to be produced as a recombinant protein in *E. coli*. This leptospiral thermolysin has a predicted signal peptide for secretion (Figure 7B) and catalytic domains that are 20%–25% identical and 32%–35% similar to metalloproteases from other pathogens that have already been described to cleave complement proteins (Supplementary Table 1).

Our attempts to express the full-length thermolysin LIC13322 were unsuccessful (data not shown). As an alternative, two different portions of the protein were produced: the M4 fragment, which contains the catalytic M4 domains, and the PepSY-M4 fragment, which includes the propeptide PepSY plus the catalytic domains (Figure 7C). To confirm the presence of thermolysin-like proteins in the *Leptospira* supernatants, we produced polyclonal antibodies against the M4 fragment in mice and used them in Western blot assays. The anti-M4 antibodies recognized proteins with molecular weights between 75 and 55 kDa (Figure 7D), which is in accordance with the predicted size of the native thermolysin fragments PepSY-M4 (71 kDa) and M4 (57 kDa).

The proteolytic activity of the thermolysin fragments PepSY-M4 and M4 was analyzed. Only the PepSY-M4 construction was able to cleave C3 in serum (Figure 7E). Indeed, it has been reported that the PepSY domain may act either as an inhibitor, preventing premature activation of the enzyme, or as a chaperone, promoting proper folding of the catalytic domain [27]. It seems that in the case of the recombinant leptospiral thermolysin, the PepSY domain may act as a chaperone, facilitating proper folding necessary for the proteolytic activity of the M4 domain.

Figure 6. The proteases secreted by pathogenic *Leptospira* are inhibited by 1,10-phenanthroline. Before the addition of complement proteins, the leptospiral supernatant was incubated with inhibitors of serine proteases (5 mmol/L PMSF; lane 4), cysteine proteases (28 μmol/L E-64; lane 5), metalloproteases (5 mmol/L 1,10-phenanthroline; lane 6), or aspartyl proteases (5 μmol/L pepstatin; lane 7). The vehicles of the protease inhibitors were used as controls, including phosphate-buffered saline (lane 1), ethanol-water solution (1:1; lane 2), and ethanol (lane 3). The cleavages of C3, C3b, iC3b, factor B (FB), C2, and C4b were analyzed by means of Western blot assays with polyclonal antibodies.

DISCUSSION

In this work, we demonstrated that the supernatant of pathogenic *Leptospira* is able to inhibit the activation of the complement system (Figure 2). This inhibition can be directly correlated with the secretion of proteases that cleave and inactivate key

complement proteins. The three pathways were inhibited, which reinforces the participation of proteases, since these enzymes target both α and β chains of C3, a central complement molecule, and also specific proteins from the alternative (FB), classical, and lectin pathways (C4 and C2) (Figures 4 and 5; Supplementary Figure 2).

Figure 7. Pathogenic leptospiral proteases and recombinant *Leptospira interrogans* thermolysin cleave complement proteins in human serum. **A**, The supernatant of pathogenic *L. interrogans* serovar Kennewicki strain Fromm was incubated with NHS for 1 hour at 37°C. Cleavages were analyzed by means of Western blot assays with polyclonal antibodies. **B**, Schematic representation of the leptospiral thermolysin encoded by LIC13322. The metalloprotease has a signal peptide for secretion (SP), prodomains FTP and PepSY, and catalytic domains Peptidase_M4 and Peptidase_M4_C (Pfam database [26]). Arrows indicate amino acid positions. **C**, Thermolysin fragments M4 and PepSY-M4 were produced as recombinant proteins in *Escherichia coli*. Lane 1, sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis of total *E. coli* extracts expressing fragments; lane 2, purified recombinant proteins; M, molecular weight marker. **D**, Recognition of thermolysin present in the supernatants of pathogenic *Leptospira* strains by anti-thermolysin polyclonal antibodies. Lanes 1–7, pathogenic strains; lanes 8–9, saprophytic strains. *Leptospira* strains 1–9 are listed in Figure 1. **E**, Thermolysin LIC13322 fragments had their proteolytic activity tested. Recombinant fragments were incubated with NHS for 1 hour at 37°C, and the cleavages were analyzed using Western blot assays with anti-C3 polyclonal antibodies.

Interestingly, apart from the leptospiral proteases, only AprA from *S. aureus* was demonstrated to cleave C2 [28]. This protein was able to effectively inhibit the classical and lectin pathways of

complement. Despite the high degree of homology between C2 and FB, AprA targets only C2. In contrast, the leptospiral proteases are able to cleave both of these proteins (Figure 4). This

could be a result of the action of different enzymes present in the supernatant or the activity of a single protease less specific than AprA.

One of the negative regulators of the alternative pathway is the serine protease FI. This enzyme, in the presence of the cofactors FH or membrane cofactor protein (MCP), cleaves C3b in fragments that are unable to continue the complement cascade. However, some of these fragments, such as iC3b, are still immunologically active. Both C3b and iC3b are important opsonins and facilitate phagocytosis through CR1 and CR3 receptors, respectively [29]. The leptospiral proteases cleave C3b into products that are distinct from those produced by FI (Figure 3A). The C3b fragment is extensively degraded by the bacterial enzymes, generating additional bands that are not obtained with the host serine protease. The secreted leptospiral proteases are also able to cleave purified iC3b, promoting an efficient inactivation of this molecule (Figure 4). The cleavage of both C3b and iC3b by the leptospiral proteases could result in a functional impairment of complement-mediated phagocytosis. Indeed, a similar effect was observed with the metalloprotease GelE from *E. faecalis*, which cleaves C3b and iC3b and promotes a substantial reduction in the pathogen's phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes [14, 15].

We also showed in this study that the leptospiral proteases were able to work synergistically with the host regulators FI and FH in C3b inactivation (Figure 3B). This synergy between pathogenic proteases and host factors has also been described for other pathogens, such as *E. faecalis* [14, 15] and *S. aureus* [16]. The metalloproteases GelE and Aur from *E. faecalis* and *S. aureus*, respectively, cleave C3 in a specific α -chain site, generating a C3b-like molecule, which is further degraded by host FI and FH.

Another interesting finding in this study was that these proteases involved in complement inactivation are probably metalloproteases (Figure 6). A detailed search in the National Center for Biotechnology Information GenBank database [30] allowed us to find potential candidates that are metalloproteases from the thermolysin family. This family of enzymes comprises proteases that are considered virulence factors for diverse pathogens. Thermolysins are able to degrade various biologically important substrates, such as extracellular matrix components, interleukins, and proteins from the complement system [31]. To study the activity of these proteins, we expressed and purified two recombinant fragments of the thermolysin encoded by the gene LIC13322. The PepSY-M4 fragment was able to cleave C3 in human serum, suggesting that thermolysin could be one of the proteases responsible for the effects previously observed with the whole leptospiral supernatant. However, this protein was not able to cleave C2, C4, and FB (data not shown), which indicates that other leptospiral proteases are also involved in complement degradation. The purification and characterization of the native proteases secreted by pathogenic leptospires are currently underway.

From this work, we can conclude that the proteases secreted by pathogenic *Leptospira* are able to deactivate immune effector

molecules. These proteases represent potential targets for the development of new treatments and prophylactic approaches in leptospirosis.

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *The Journal of Infectious Diseases* online (<http://jid.oxfordjournals.org/>). Supplementary materials consist of data provided by the author that are published to benefit the reader. The posted materials are not copyedited. The contents of all supplementary data are the sole responsibility of the authors. Questions or messages regarding errors should be addressed to the author.

Notes

Acknowledgment. We thank Shaker Chuck Farah for a critical reading of the manuscript.

Financial support. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (grant 2010/50043-0).

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts.

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

1. World Health Organization. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Malta: International Leptospirosis Society, 2003.
2. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7:736–47.
3. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and *Leptospirosis*. Melbourne, Australia: MedScience, 1999.
4. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 2010; 11:785–97.
5. Rooijakkers SH, van Strijp JA. Bacterial complement evasion. *Mol Immunol* 2007; 44:23–32.
6. Lambris JD, Ricklin D, Geisbrecht BV. Complement evasion by human pathogens. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6:132–42.
7. Blom AM, Hallström T, Riesbeck K. Complement evasion strategies of pathogens acquisition of inhibitors and beyond. *Mol Immunol* 2009; 46:2808–17.
8. Fraga TR, Barbosa AS, Isaac L. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. *Scand J Immunol* 2011; 73:408–19.
9. Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, Silva LB, 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.
10. Potempa J, Pike RN. Corruption of innate immunity by bacterial proteases. *J Innate Immun* 2009; 1:70–87.
11. Potempa M, Potempa J. Protease-dependent mechanisms of complement evasion by bacterial pathogens. *Biol Chem* 2012; 393:873–88.
12. Ward PA, Chapitis J, Conroy MC, Lepow IH. Generation by bacterial proteinases of leukotactic factors from human serum, and human C3 and C5. *J Immunol* 1973; 110:1003–9.
13. Hong YQ, Ghebrehiet B. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; 62:133–8.
14. Park SY, Kim KM, Lee JH, Seo SJ, Lee IH. Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. *Infect Immun* 2007; 75:1861–9.
15. Park SY, Shin YP, Kim CH, et al. Immune evasion of *Enterococcus faecalis* by an extracellular gelatinase that cleaves C3 and iC3b. *J Immunol* 2008; 181:6328–36.

16. Laarman AJ, Ruyken M, Malone CL, van Strijp JA, Horswill AR, Rooijakkers SH. *Staphylococcus aureus* metalloprotease aureolysin cleaves complement C3 to mediate immune evasion. *J Immunol* **2011**; 186: 6445–53.
17. Barbosa AS, Abreu PA, Neves FO, et al. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. *Infect Immun* **2006**; 74:6356–64.
18. Ramos CR, Abreu PA, Nascimento AL, Ho PL. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med Biol Res* **2004**; 37:1103–9.
19. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**; 227:680–5.
20. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1979**; 76:4350–4.
21. Barbosa AS, Abreu PA, Vasconcellos SA, et al. Immune evasion of leptospira species by acquisition of human complement regulator C4BP. *Infect Immun* **2009**; 77:1137–43.
22. Roos A, Bouwman LH, Munoz J, et al. Functional characterization of the lectin pathway of complement in human serum. *Mol Immunol* **2003**; 39:655–68.
23. Matsunaga J, Sanchez Y, Xu X, Haake DA. Osmolarity, a key environmental signal controlling expression of leptospiral proteins LigA and LigB and the extracellular release of LigA. *Infect Immun* **2005**; 73:70–8.
24. 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.
25. Andrade D, Assis DM, Lima AR, et al. Substrate specificity and inhibition of human kallikrein-related peptidase 3 (KLK3 or PSA) activated with sodium citrate and glycosaminoglycans. *Arch Biochem Biophys* **2010**; 498:74–82.
26. Finn RD, Mistry J, Tate J, et al. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **2010**; 38(Database issue):D211–22.
27. Marie-Claire C, Ruffet E, Beaumont A, Roques BP. The prosequence of thermolysin acts as an intramolecular chaperone when expressed in trans with the mature sequence in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **1999**; 285:1911–5.
28. Laarman AJ, Bardoel BW, Ruyken M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways. *J Immunol* **2012**; 188:386–93.
29. Newman SL, Becker S, Halme J. Phagocytosis by receptors for C3b (CR1), iC3b (CR3), and IgG (Fc) on human peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* **1985**; 38:267–78.
30. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, et al. GenBank. *Nucleic Acids Res* **2013**; 41(Database issue):D36–42.
31. Chung MC, Popova TG, Millis BA, et al. Secreted neutral metalloproteases of *Bacillus anthracis* as candidate pathogenic factors. *J Biol Chem* **2006**; 281:31408–18.

Supplementary Figure 1. Characterization of the proteolytic activity of pathogenic leptospiral supernatant. (A) Increasing amounts of pathogenic *L. interrogans* serovar Kennewicki strain Fromm were allowed to secrete proteases for 4 h at 37°C. The supernatants were collected and incubated with C3b for 1 h at 37°C. (B) 1.0×10^9 leptospire were allowed to secrete proteases for 30 min to 4 h at 37°C. The supernatants were incubated with C3b for 1 h at 37°C. The cleavages were analyzed by Western blot with anti-C3 polyclonal antibodies. The cleavage of C3b by FI with FH as co-factor was used as a control.

Supplementary Figure 2. Reduced amounts of leptospiral proteases are still able to cleave the complement proteins. Pathogenic *L. interrogans* serovar Kennewicki strain Fromm and saprophytic *L. biflexa* serovar Patoc strain Patoc I (1×10^9 bacteria) were allowed to secrete proteases for 4 h at 37°C. Different quantities of the supernatants, (1) 0.06 µg, (2) 0.3 µg, (3 and 4) 0.6 µg (corresponding to 50, 10 and 5 times less supernatant than the initial reactions shown in Figure 4), were incubated with 5 µg of the complement proteins C3, C3b, iC3b, FB, C2 or C4b, for 1 h and 4 h at 37°C. The cleavages were analyzed by SDS-PAGE stained with Coomassie blue.

Additional References

32. Jin F, Matsushita O, Katayama S, et al. Purification, characterization, and primary structure of *Clostridium perfringens* lambda-toxin, a thermolysin-like metalloprotease. Infect Immun **1996**; 64:230–7.
33. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res **1994**; 22:4673–80.

Supplementary Figure 1

Supplementary Figure 2

Supplementary Table 1

Supplementary Table 1. Identity and similarity between the catalytic domain of the leptospiral thermolysin and metalloproteases from other pathogens that cleave complement proteins.

Microorganism	Metalloprotease	Complement proteins cleaved	Identity *	Similarity *	References
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Elastase	C3, C1q	20%	35%	[13]
<i>Clostridium perfringens</i>	λ toxin	C3	24%	35%	[32]
<i>Enterococcus faecalis</i>	Gelatinase	C3, C3b, iC3b, C3a	20%	32%	[14, 15]
<i>Staphylococcus aureus</i>	Aureolysin	C3	25%	35%	[16]

* Identity and similarity were calculated based on sequence alignments using the program CLUSTALW [33].

Leptospirosis: Aspects of Innate Immunity, Immunopathogenesis and Immune Evasion From the Complement System

T. R. Fraga*, A. S. Barbosa† & L. Isaac*

*Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil; and †Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

Received 4 October 2010; Accepted in revised form 20 December 2010

Correspondence to: L. Isaac, Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1730, São Paulo, SP 05508-900, Brazil. E-mail: louisaac@icb.usp.br

Abstract

Leptospirosis is a neglected infectious disease caused by spirochetes from the genus *Leptospira*. It constitutes a major public health problem in developing countries, with outcomes ranging from subclinical infections to fatal pulmonary haemorrhage and Weil's syndrome. To successfully establish an infection, leptospires bind to extracellular matrix compounds and host cells. The interaction of leptospires with pathogen recognition receptors is a fundamental issue in leptospiral immunity as well as in immunopathology. Pathogenic but not saprophytic leptospires are able to evade the host complement system, circulate in the blood and spread into tissues. The target organs in human leptospirosis include the kidneys and the lungs. The association of an autoimmune process with these pathologies has been explored and diverse mechanisms that permit leptospires to survive in the kidneys of reservoir animals have been proposed. However, despite the intense research aimed at the development of a leptospirosis vaccine supported by the genome sequencing of *Leptospira* strains, there have been relatively few studies focused on leptospiral immunity. The knowledge of evasion strategies employed by pathogenic leptospires to subvert the immune system is of extreme importance as they may represent targets for the development of new treatments and prophylactic approaches in leptospirosis.

Introduction

Leptospirosis is a zoonosis caused by pathogenic bacteria from the genus *Leptospira* [1]. The disease is an important human and veterinary problem around the world. More than 500,000 cases of severe leptospirosis are reported each year, with mortality rates exceeding 10% [2]. A high incidence of the disease is primarily associated with poor communities lacking proper sanitation facilities and flood-prone regions [3]. Leptospirosis is transmitted by the contact of abraded skin or mucous membranes with water or soil contaminated with urine from reservoir animals, such as rodents [4].

In several affected countries, a major effort has been initiated to find a potent and effective immunotherapy. However, the available vaccines neither induce immunological memory nor confer cross-protection against the leptospiral serovars not included in the preparation. Most of the current research is aimed towards the identification and characterization of *Leptospira* virulence factors. How-

ever, we still lack a complete understanding of how this infection progresses, the main characteristics of innate and acquired immunity and how pathogenic *Leptospira* species are able to escape from the immune system. The knowledge of immune evasion strategies employed by leptospires is of special interest, as they can be targets for the development of new treatments and prophylactic approaches in leptospirosis. Therefore, to encourage future studies, the aim of this review was to summarize and to discuss some aspects of the leptospiral immunity, immunopathogenesis and immune evasion.

Leptospira and leptospirosis

Leptospira microbiology

The genus *Leptospira* belongs to the order *Spirochaetales* that includes the genus *Borrelia* and *Treponema*, which are also human pathogens causing Lyme disease and syphilis, respectively. Morphologically unique in their coiled

shape, spirochetes emerged early in eubacterial evolution. The *Leptospira* genus includes pathogenic and saprophytic species, being classified into more than 200 serovars considering the structural heterogeneity of the carbohydrate moiety of lipopolysaccharide (LPS) [4]. Besides this antigenic classification, taxonomy based on genetic similarities is currently being employed [5].

Leptospire are thin and highly motile spirochetes with hooked ends (Fig. 1). They have two periplasmic flagella subterminally attached that confer both translational and non-translational forms of movement [4]. Like

other spirochetes, leptospire have a distinctive double-membrane architecture, sharing characteristics of both Gram-positive and Gram-negative bacteria. The leptospiral cytoplasmic membrane is closely associated with a peptidoglycan cell wall, which is overlaid by an outer membrane [6] (Fig. 2). Phospholipids, outer membrane proteins (OMPs) and LPS are the main components of the outer membrane [7]. Leptospiral LPS has a lower endotoxic potential compared with Gram-negative LPS, possibly related to the unusual features of its Lipid A component [4, 8]. To date, according to mutagenesis

Figure 1 Transmission electron micrographs of *Leptospira interrogans* serovar Pomona. (A) Leptospire are thin, helically coiled bacteria, classed in the order *Spirochaetales* [4]. These highly motile spirochetes are normally about 0.1–0.2 μm wide and 6–20 μm long. They have two periplasmic flagella and characteristic hooked ends. Original magnification, $\times 12,000$. (B) Immunoelectron microscopic localization of LipL32, an abundant, surface-exposed, outer membrane protein of pathogenic *Leptospira*. Original magnification, $\times 20,000$. Courtesy of Dr Aurora Cianciarullo and Dr Enéas de Carvalho, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil.

Figure 2 Schematic depiction of leptospiral membrane architecture. The inner membrane (IM) is closely associated with the peptidoglycan (PG) cell wall, which is overlaid by the outer membrane (OM) [6]. Surface-exposed lipoproteins (LipL32, LigA, LigB and Loa22), the transmembrane outer membrane protein porin L1 (OmpL1), and lipopolysaccharide are among the main components of the outer membrane. For simplicity, TonB-dependent receptor systems, leptospiral lipoprotein export apparatus and endoflagella were omitted.

data, only four virulence factors were described in leptospires: the proteins Loa22 [9], haem oxygenase [10], FliY (flagellar motor switch protein) [11] and LPS [12].

Clinical presentation of leptospirosis

Pathogenic leptospires persistently colonize the kidneys from reservoir animals, which do not present clinical symptoms, eliminating the bacteria in the urine. Humans are incidental hosts, being susceptible to the disease [4]. Protean clinical presentation is well documented with patients exhibiting either very mild symptoms or subclinical disease (80–90% of infections) or a more severe illness characterized by jaundice, acute renal failure and bleeding (Weil's disease) or pulmonary haemorrhage syndrome. Typically, leptospirosis follows a biphasic course. Of sudden onset, the septicemic phase lasts 4–7 days during which leptospires can be found in patient's blood and cerebrospinal fluid. Non-specific symptoms including fever, headache, chills, muscle aches, abdominal pain and conjunctival suffusion are common during the acute phase. These are followed by a 1- to 3-day period of defervescence. In the second stage of the disease, called the immune phase, fever and earlier symptoms recur, and aseptic meningitis may develop. Anti-*Leptospira* antibodies begin to be produced and the bacteria are excreted in the urine. A subset (10–15%) of patients develops the severe forms of the disease, which may progress very rapidly, leading to death. In these patients, jaundice is primarily attributed to hepatocellular dysfunction rather than fulminant hepatic necrosis. Acute renal failure occurs in 16–40% of cases (for more comprehensive reviews describing the clinical features of leptospirosis see [1, 4, 13]). Leptospirosis-associated severe pulmonary haemorrhagic syndrome has increasingly become recognized as an important manifestation of leptospiral infection [13–16] and may be considered a relevant prognostic factor associated with fatal outcomes in severe leptospirosis [17]. Interestingly, symptomless infection with *Leptospira* has been reported in endemic areas [13, 18]. This raises the possibility that protective acquired immunity against severe leptospirosis after recurrent infections may be established in those areas [18].

Leptospiral invasion

To establish and maintain the infection, pathogenic leptospires bind to a wide range of extracellular matrix components and other host ligands, including laminin, collagen types I and IV, cellular and plasma fibronectin, fibrinogen, elastin and proteoglycans [19–22]. In addition, *L. interrogans* are able to bind endothelial cells, monocytes/macrophages, kidney epithelial cells and fibroblast cell line cultures *in vitro* [23, 24].

It is important to highlight that virulent leptospires, despite being extracellular pathogens, are highly invasive microorganisms and they are able to adhere to and invade host cells more efficiently than the non-virulent and saprophytic strains [24]. Indeed, pathogenic strains have been shown to translocate through polarized MDCK cell monolayers at a rate significantly greater than that of non-pathogenic *Leptospira* [25]. Moreover, some authors speculate that *Leptospira* could have a short intracellular phase [26], probably enabling them to escape from complement and antibodies.

Leptospira immunity

The innate immune system constitutes the first line of host defence, playing a crucial role in early recognition and elimination of leptospires. The activation of the alternative pathway of the complement system is one of the most important effector mechanisms during the first hours of infection [27, 28]. A clear illustration of this fact is the observation that saprophytic *L. biflexa* is killed within a few minutes in the presence of normal human serum *in vitro*. By contrast, pathogenic *Leptospira* species are able to survive, and are more resistant to the action of the complement system, especially if they are virulent [27, 28]. The term pathogenic refers to genotypic properties of leptospires that may be expressed or not whereas the term virulent refers to phenotypic characteristics by which means pathological changes may be affected in the host. For example, *L. interrogans* serovar Copenhageni causes severe disease in humans when expressing its virulence mechanisms, which can be lost to a variable extent, in culture, thus becoming relatively avirulent, but not non-pathogenic. By contrast, *L. biflexa* serovar Patoc does not cause disease in any known host, thus receiving the classification of non-pathogenic. The property of virulence may be re-established by passage through a suitable host system [4].

As leptospires are extracellular pathogens, the acquired immune response depends on the production of antibodies and the activation of the classical pathway of the complement system. In leptospirosis, most of the specific antibodies produced are against the LPS. As a consequence, passive immunization with polyclonal or monoclonal anti-LPS antibodies is able to confer protection against the disease [29]. In many experimental models, it became evident that phagocytosis of *Leptospira* by neutrophils and macrophages is only effective if this pathogen is opsonized by specific IgG [30–32]. Besides opsonization, these antibodies may agglutinate leptospires [34] and activate the classical pathway of the complement system. Opsonins such as iC3b generated after complement activation may also be important to enhance phagocytosis as anti-complement receptor type 3 antibodies block the adhesion of different strains of *Leptospira* to polymorphonuclear leucocytes [33].

Humoral-mediated immunity is of utmost importance to confer protection against leptospirosis in humans, dogs, pigs, guinea pigs and hamsters [4]. However, the role of cell-mediated immunity remains poorly understood. In cattle, the development of cellular immune responses has been associated with protection against leptospirosis. Indeed, vaccination of cattle with a killed *L. borgpetersenii* preparation results in INF- γ production and proliferation of both CD4⁺ $\alpha\beta$ and WC1⁺ $\gamma\delta$ T cells following peripheral blood mononuclear cell (PBMC) stimulation with *Leptospira* [35, 36]. In humans, when PBMC from healthy donors or patients recovered from leptospirosis are stimulated with *Leptospira*, an expansion of both $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T lymphocytes occurs [37]. However, in patients with acute leptospirosis, an increased number of peripheral blood $\gamma\delta$ T cells have been observed [38]. Therefore, it seems that not only $\alpha\beta$ but also $\gamma\delta$ T lymphocytes are important in the leptospiral immune response.

Interestingly, although pathogenic *Leptospira* is not considered a typical intracellular pathogen, it was reported that *L. interrogans* may be able to escape from the phagolysosome to the cytosol of a human macrophage cell line (THP-1) [39]. Therefore, leptospiral peptides could be complexed with MHC class I molecules, and be later presented to CD8⁺ T lymphocytes. Indeed, CD8⁺ T lymphocytes specific to peptides derived from leptospiral immunoglobulin-like (Lig) A protein were identified in human patients [40].

Additional studies are required to explore the phenotypic and functional characteristics of T cell populations in leptospirosis. Such studies may point towards the improvement of leptospirosis therapies and vaccine formulations.

Leptospires and pathogen recognition receptors

Following invasion, leptospires can be detected by the immune system through the pathogen recognition receptors (PRRs), which recognize molecular motifs known as pathogen-associated molecular patterns. PRRs can be divided into endocytic, signalling and secreted receptors. Two main families of signalling PRRs play a decisive role in pathogens' recognition, the Toll-like receptors (TLRs) and the Nod-like receptors (NLRs) [41].

Among TLRs, TLR2 and TLR4 are the most studied in leptospirosis until now. LPS from Gram-negative bacteria is able to activate TLR4, resulting in a pro-inflammatory cytokine and chemokine dependent response [42]. However, leptospiral LPS, which is less endotoxic than Gram-negative LPS, activates human macrophages through TLR2 instead of TLR4 [43]. This different recognition is attributed to the unusual composition of the leptospiral Lipid A moiety [8], and could be a strategy that pathogenic *Leptospira* may use to avoid adequate acti-

vation of immune cells, contributing to the establishment of the disease in humans.

In mice, which are resistant to leptospirosis, the LPS is recognized by TLR2 and TLR4 [44]. Indeed, both TLR4 and TLR2 stimulation are crucial to control leptospirosis in mice. Double TLR2/TLR4 knockout mice infected with *L. interrogans* rapidly died from hepatic and renal failure. The severe inflammation observed in the liver and the kidneys of these animals appears to be independent of MyD88, the main adaptor of TLRs [45]. Another spirochete, *Borrelia burgdorferi*, which causes Lyme disease, also promotes inflammation independent of MyD88 [46]. Therefore, innate immune receptors from the Nod-like family could be responsible for triggering inflammation in response to invasive leptospires in absence of TLR stimulation [45].

At this point, regarding the differences in recognition of leptospires by TLRs in human and murine macrophages, it is relevant to raise some considerations about the mechanisms possibly involved in mice resistance and human susceptibility to leptospirosis. In a human macrophage cell line (THP-1), *L. interrogans* were visualized in the cytosol. The leptospiral replication inside the human macrophage was followed by induction of apoptosis and bacterial release. By contrast, in a murine macrophage cell line (J774A.1), *L. interrogans* were localized in the phagolysosome, being efficiently killed by the cell machinery [39]. Moreover, LPS from *L. interrogans* activates the TLR4-MD2 pathway in murine macrophages but not in humans [44]. The lack of TLR4 activation together with the cytosolic localization of virulent leptospires and macrophage apoptosis induction may contribute to human susceptibility to leptospirosis in contrast to mouse resistance.

Other receptors may mediate the binding of pathogens to host cells before their ingestion by phagocytic cells. Dendritic cells (DCs) express diverse PRRs, including C-type lectins as DC-specific intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin (DC-SIGN), an endocytic receptor that recognizes high-mannose glycans and fucose-containing antigens on pathogens' surfaces [47]. *L. interrogans* serovar Autumnalis isolated from leptospirosis patients and both virulent and avirulent strains of *L. interrogans* serovar Pyrogenes isolated from rat, contained high mannose components on their surfaces. These *L. interrogans* serovars were able to bind DC-SIGN in DCs, inducing their maturation and production of IL-12p70 and TNF- α , but reduced secretion of IL-10. Secreted antigens from leptospires also interacted with DC-SIGN, being possibly involved in modulation of bystander DCs. Furthermore, the avirulent serovar Pyrogenes presented a higher DC binding and DC-SIGN affinity than the virulent strain [48]. The lower interaction of virulent strains with DCs could result in a reduced bacterial uptake and antigen presentation to T cells, favouring

disease development. Besides endocytosis, DC-SIGN recognition can activate intercellular pathways that cross-talk with TLRs signalling, influencing DCs activation [49]. Considering that immature DCs express TLR2 and that leptospires are able to interact with this receptor in human macrophages [47], it is particularly relevant to investigate the cross-talk between DC-SIGN and TLR pathways in DCs [48]. Therefore, further investigations on DCs activation and antigen presentation to T cells are required to elucidate the establishment of adaptive immune responses in leptospirosis.

Leptospiral phagocytosis and microbicidal activity of phagocytic cells

As polymorphonuclear neutrophils (PMNs) constitute the largest population of intravascular phagocytes, they are expected to play an important role in leptospiral clearance. Relatively few studies have deeply explored the contribution of these leucocytes to eliminate non-pathogenic or pathogenic leptospires during the early phase of infection. The slow growth rate of leptospires *in vitro* and requirement of opsonic antibodies for an adequate killing of pathogenic strains by neutrophils [30] hampered the scientific community's perception of the real importance of PMNs in the early control of leptospirosis. Besides these limitations, it was reported that PMNs are able to kill both non-pathogenic and pathogenic strains of *Leptospira* by oxygen dependent and independent mechanisms. *L. biflexa* and *L. interrogans* are both killed by hydrogen peroxide (H₂O₂) and by primary granules of PMNs *in vitro*, although pathogenic leptospires are more resistant than non-pathogenic [50]. This could be associated with the expression of catalase (KatE), an enzyme involved in resistance to oxidative killing that is produced only by pathogenic strains [51, 52].

Antimicrobial peptides (AMPs) are small cationic peptides active against bacteria, viruses, fungi and certain parasites. In humans, the most studied AMPs are cathelicidins and defensins, which are produced mainly by neutrophils and epithelial cells. To exert their microbicidal potential, the cationic peptides bind negatively charged molecules on the pathogens' surface, such as LPS, promoting membrane permeabilization and endotoxin neutralization [53]. *L. interrogans* are efficiently killed by cathelicidins from sheep and cattle, but the human peptide LL-37 presents a reduced activity [54]. However, human defensins (HNP1, HNP2 and HNP3) were able to successfully kill *L. interrogans* [55]. In addition, the spirochetes *Borrelia* and *Treponema*, which lack LPS, were more resistant to cathelicidins than *Leptospira* [54]. Future investigations should aim to better characterize the role of AMPs in leptospirosis. It would be interesting to evaluate their interaction with leptospiral outer membrane components, as well as their action on different lepto-

spiral strains (saprophytic, pathogenic virulent and culture attenuated). Physiological concentrations of these peptides in epithelial cells and neutrophils should also be considered in those experiments.

Cytokines and pentraxins in leptospirosis

As there is a diverse array of clinical manifestations in leptospirosis, it would be helpful to determine parameters that could predict the disease outcome. The clinical hallmarks of severe leptospirosis can resemble septic shock, with multi-organ failure, hypotension and death [4]. Therefore, the expression of molecules usually evaluated in the context of sepsis, such as cytokines and pentraxins, has been investigated in leptospirosis.

The pro-inflammatory cytokine TNF- α , which has a prognostic value in sepsis, has been associated with disease severity and poor outcome in leptospirosis patients [56]. However, as TNF- α is an early phase cytokine, its levels are reduced or undetectable with disease progression. At this point, elevated plasma levels of IL-6 and IL-8 have been correlated with patients' mortality [57].

Pentraxins are a family of proteins usually characterized by a pentameric structure. C-reactive protein (CRP) and serum amyloid P component (SAP) are short pentraxins, and Pentraxin 3 (PTX-3) is a long pentraxin. Both CRP and PTX-3 are acute phase proteins and have been studied as serological markers in sepsis [58]. However, in leptospirosis patients, increasing serum levels of PTX-3 but not CRP were associated with mortality and disease severity [59].

The usefulness of the cytokines and PTX-3 in monitoring severe leptospirosis should be evaluated in large prospective studies to better characterize the prognostic value of these markers. In addition, regarding the high PTX-3 levels in leptospirosis patients [59], it is relevant to raise some considerations about this long pentraxin. Apart from being an acute phase protein, PTX3 can also act as an opsonin and participate in the activation and regulation of the complement system, via binding to C1q, Factor H and L-ficolin [58]. Therefore, the roles of PTX3 in leptospirosis should be explored to better characterize the mechanisms involved in leptospiral immunity.

Genetic polymorphisms and susceptibility to leptospirosis

The severity of leptospirosis depends on the combination of diverse factors including the virulence of the infecting serovar as well as the bacterial load. The role of genetic polymorphisms in the susceptibility to leptospirosis has also been explored. The highly polymorphic human leucocyte-like antigen DQ-6 (HLA-DQ6) was associated with an increased risk of leptospirosis among triathletes who ingested contaminated water. Considering that this

association was not allele specific, a possible role of leptospiral superantigens was suggested, as these molecules could bind HLA outside the peptide-binding groove, resulting in a widespread polyclonal T cell activation [60]. Additionally, alleles from HLA-A and HLA-B, as well as single nucleotide polymorphisms in the interleukin (IL)-4 and IL-4R α genes had significantly higher frequencies in patients with a history of leptospirosis from Terceira Island in the Azores archipelago [61]. The associations encountered between genetic factors and leptospirosis represent an important initial step towards larger cohort studies with application of more stringent statistical tests. Indeed, the identification of genetic susceptibility factors to infectious diseases is quite relevant as they can be used as markers to identify risk populations that could benefit from preventive measures, such as a future vaccine.

Immunopathology in leptospirosis

Immunological aspects of renal disease

The kidneys are target organs in human leptospirosis pathology. The acute phase of the renal disease is characterized by tubule-interstitial nephritis that may progress to fibrosis in chronic stages [62]. Renal epithelial cells express TLRs, including TLR2 and TLR4 [63]. Therefore, the involvement of TLR in leptospirosis renal disease has been explored. It was suggested that pathogenic leptospires induce tubule-interstitial nephritis through the recognition of outer membrane proteins by TLR2 in renal tubule cells [64]. This recognition is followed by activation of nuclear transcription factor κ B (NF- κ B) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathways, leading to early inflammation and leucocyte recruitment, respectively [65]. In the chronic stages of the disease, leptospires are able to induce renal fibrosis. Indeed, leptospiral outer membrane proteins induce the accumulation of extracellular matrix components in tubular cells through the activation of transforming growth factor- β /Smad-dependent pathways, contributing to the development of fibrosis in the kidneys [66].

Pulmonary haemorrhage and autoimmune process in leptospirosis

Pulmonary haemorrhage is a serious life threatening disorder and is the major cause of death due to leptospirosis in Brazil [17]. The mechanisms proposed to explain pulmonary pathology are the direct action of toxins and an autoimmune process. The relatively low number of leptospires recovered from lung tissue suggests a possible role of circulating bacterial toxins produced at distant sites, such as the liver [67]. Although specific toxins remain unidentified, a wide range of predicted proteases and

haemolysins that could be involved in lung damage are encoded in the genomes of pathogenic *Leptospira* [52, 68, 69]. Apart from the toxins, the deposition of IgM, IgA, IgG and C3 in the alveolus of patients with pulmonary haemorrhage syndrome and in guinea pigs experimentally infected with clinical isolates has been reported [70, 71]. This deposition of immunoglobulins and complement observed in the alveolus fits with the pattern of Goodpasture's syndrome. However, it is still not clear whether an autoimmune process occurs in the kidneys, as sera from leptospirosis patients did not recognize the human glomerular basement membrane [72]. Therefore, the development of renal autoimmunity associated with leptospirosis requires more detailed analysis.

Uveitis is an inflammatory process in the eye that can be triggered by autoimmune reactions. Uveitis is frequently observed in *Leptospira* infected horses and represents a late complication in 40% of human patients [73, 74]. A significant concentration of serovar-specific LPS was observed in the aqueous humour of patients, suggesting an endotoxin-mediated process [74]. However, antibodies against the leptospiral lipoproteins LruA and LruB were detected in sera from patients who had leptospiral uveitis [73]. Indeed, antibodies against LruA and LruB presented cross-reactivity with eye proteins of horses, reinforcing the hypothesis of autoimmune uveitis in leptospirosis [75].

Guillain-Barré syndrome, an autoimmune disease that affects the nervous system, was described in a child infected with *L. interrogans*, probably as a result of re-infection [76]. In addition, anticardiolipin IgG antibodies were raised in patients with severe leptospirosis, which could be related to vascular endothelial injury observed in the disease [77].

It is clear that the development of autoimmune processes as a result of leptospiral infection is a relevant topic of research. Additional studies are needed to evaluate other autoimmune reactions in leptospirosis, such as IgA nephropathy and systemic lupus erythematosus.

Immune evasion in leptospirosis

Leptospiral complement evasion

An antileptospiral activity in normal serum mediated by the complement system was first reported by Johnson and Muschel in the mid-1960s [78]. The authors observed that serum from a variety of mammals exerted a bactericidal effect against different *Leptospira* serotypes. According to their studies, non-pathogenic forms could be distinguished from pathogenic ones by a greater susceptibility to normal serum. It became clear that virulence correlates with the ability to survive in mammalian hosts, which can be greatly attributed to the capacity of resisting complement-mediated killing [79]. Further

studies on the bactericidal effect of lower-vertebrate sera towards *Leptospira* revealed a different pattern of killing compared with that of mammalian sera [80]. Curiously, normal serum from turtles (*Chrysemys picta* and *Chelydra serpentina*) and from the frog *Rana pipiens* displayed bactericidal activity against both pathogenic and saprophytic *Leptospira* strains. One plausible interpretation for these findings would be the presence of either specific or cross-reacting antibodies in the serum of these lower-vertebrates, enabling antibody-dependent complement-mediated lysis [80].

Although leptospiral serum resistance against host complement was described many decades ago, the mechanisms underlying this resistance started to be unraveled only recently. Pathogens have evolved sophisticated strategies to circumvent the immune defence systems of a variety of hosts, notably mechanisms to escape complement activation and/or lytic complement attack. Among these mechanisms are the acquisition of host fluid-phase complement regulators, notably Factor H and C4b-binding protein (C4BP), the secretion of proteases that inactivate key complement components, and the expression of proteins in the pathogens' surface that may inhibit or modulate complement activation (reviewed in [81]). The first study reporting a complement evasion strategy in pathogenic *Leptospira* was carried out by Meri *et al.* [27]. The authors demonstrated that serum-resistant and serum-intermediate strains of *Leptospira* were able to bind Factor H and Factor H-related protein 1 (FHR-1 α and FHR-1 β) from human serum. Bound Factor H remained functionally active, acting as a cofactor in the cleavage of C3b by Factor I [27] (Fig. 3). To date, only two leptospiral ligands for human Factor H have been described, LenA and LenB. LenA (leptospiral endostatin-like protein A), formerly called LfhA (for leptospiral Factor H-binding protein A) [82] and Lsa24 (for leptospiral surface adhesin, 24 kDa) [19], was first identified through the screening of a lambda phage expression library of *L. interrogans* serovar Pomona [82]. Sequence analyses of genes from *L. interrogans* allowed identification of five additional *lenA* paralogs, designated *lenB*, *lenC*, *lenD*, *lenE* and *lenF*, which encode domains with putative structural and functional similarities with mammalian endostatins [83]. All Len proteins have been shown to interact with the extracellular matrix components laminin and fibronectin (LenA is able to interact only with laminin), but binding specificities for human Factor H are displayed solely by LenA and LenB [83]. Besides interacting with Factor H and laminin, LenA is a receptor for human plasminogen [84]. A number of surface proteins of pathogenic microorganisms involved in complement escape may also bind other host molecules, such as plasminogen, fibrinogen, thrombin, IgA, IgG and extracellular matrix components (reviewed by [81]), thus contributing to tissue degradation and adhesion to host cells as well.

Besides recruiting Factor H to its surface, *Leptospira* also have the ability to bind human C4BP, a key fluid-phase inhibitor of the classical and lectin pathways [28]. Pathogenic leptospiral strains efficiently acquire C4BP from human serum, whereas the non-pathogenic strain Patoc I binds negligible amounts of this complement regulator to its surface. Surface-bound C4BP retains cofactor activity, indicating that acquisition of this complement regulator may contribute to leptospiral serum resistance [28] (Fig. 3). We recently identified a 20-kDa *Leptospira* outer membrane protein named LcpA which interacts with this complement regulator [85]. LcpA is surface-exposed, binds both purified and soluble C4BP from human serum, and is expressed by leptospiral strains that are at least partially able to resist complement-mediated killing. Moreover, C4BP remains functionally active when bound to LcpA, acting as a cofactor for Factor I in the cleavage of C4b [85]. Considering that pathogenic leptospires are able to widely spread in the host organism, it is reasonable to suppose that these pathogens may express many different surface receptors for complement and other host molecules. The identification and characterization of these proteins is of great relevance, as they may represent interesting targets for immune intervention.

One interesting observation is that, while pathogenic leptospires evade the complement system, purified peptidoglycan (PG) is able to activate complement [86]. At this point, it is important to consider that PG is not exposed in leptospires, being overlaid by the outer membrane. As a result of mechanical shear stress or bacterial killing, the PG could be exposed and activate the complement system. However, in pathogenic leptospires this activation would be counter-balanced by the inhibitory effects of bound Factor H and C4BP.

Recently, mutations affecting *L. interrogans* LPS demonstrated that it plays a crucial role in leptospiral virulence. Although previous studies have demonstrated that an intact LPS is essential for complement resistance, the above-mentioned LPS mutants did not present a higher susceptibility to complement-mediated killing [12].

Immune evasion strategies involved in renal colonization

Leptospires colonize the proximal renal tubules of reservoir animals, where they are able to replicate and persist, being constantly eliminated in the urine. A wide range of mechanisms possibly involved in the ability of leptospires to survive in the kidneys has been suggested [87].

Despite the recent finding that the absence of LPS did not reduce the complement resistance of leptospires in sera [12], it is possible that the mechanisms underlying persistence in the renal tubules are different. Leptospiral LPS recovered from rat kidneys presents a higher content

Figure 3 Complement evasion strategies in *Leptospira*. Saprophytic *Leptospira* are susceptible to complement-mediated killing because they do not bind the host complement regulatory proteins Factor H (FH) [27] and C4b Binding Protein (C4BP) [28]. By contrast, pathogenic *Leptospira* evade complement attack by acquiring these soluble proteins of the alternative and classical pathways on their surfaces. Factor H, a 150-kDa plasma protein, inhibits the alternative pathway of complement by preventing binding of Factor B to C3b, accelerating decay of the C3-convertase C3bBb and acting as a cofactor for the cleavage of C3b by Factor I. LenA and LenB are leptospiral ligands for human FH [82, 83]. C4BP is a 570-kDa plasma glycoprotein that inhibits the classical pathway of complement by interfering with the assembly and decay of the C3-convertase C4bC2a and acts as a cofactor for Factor I in the proteolytic inactivation of C4b. LcpA is a leptospiral outer membrane protein which interacts with human C4BP [85]. As a consequence of the acquisition of those fluid-phase regulators on the surface of a given pathogen, complement activation is down-regulated preventing opsonization and the formation of the lytic membrane attack complex on its surface. In the schematic representation of FH and C4BP, each circle represents one SCR domain. Open circles indicate the three SCR domains of the C4BP β -chain.

of the O antigen compared with the LPS of leptospires isolated from guinea pig liver with acute infection [88]. This increased content of LPS O antigen in chronically infected kidneys could constitute an immune evasion strategy. Indeed, the O antigen expression was associated with complement resistance in *Francisella tularensis*, a facultative intracellular Gram-negative pathogen [89]. Therefore, the role of the LPS O antigen in the leptospiral immune evasion should be evaluated.

Besides increased LPS O antigen content, proteomic analysis revealed a reduced expression of antigenic proteins in leptospires from rat kidneys in contrast to *in vitro* cultured bacteria [90]. This antigenic reduction

could also reflect a means of escaping from host immune responses.

Saprophytic and pathogenic leptospires are able to form biofilms, helping them to survive in environmental habitats and to colonize the hosts [91]. Indeed, biofilms can constitute a barrier against the immune effector cells and molecules, including antibodies and complement, and represent one of the major mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* persistence in chronic infections [92]. Investigations on biofilm formation by leptospires in renal tubule cells from resistant and susceptible hosts could certainly contribute to our understanding of immune evasion strategies and disease pathology.

Experimental animal models in leptospirosis

Experimental animal models have been used to test vaccine candidates as well as to elucidate host immune responses and leptospirosis pathology. Hamsters, guinea pigs and gerbils are suitable for reproducing acute lethal infection [4, 29, 93]. Mice and rats, which are resistant to leptospirosis, are experimental models to study persistent chronic infection [4]. Moreover, mice with specific mutations, such as in *tlr4* gene, have been used to reproduce acute infection [94]. The pathogenesis of severe leptospirosis with a particular focus on pulmonary haemorrhage has also been studied in animal models. For this purpose, not only guinea pigs and rodents, but also non-human primates, such as marmoset monkeys, are used [67, 70, 95].

The Golden Syrian hamster is a well characterized model of leptospirosis. The hamster's infection has the same pattern of that observed in accidental hosts, and so represents an appropriate model of the severe form of human leptospirosis [4, 93]. Indeed, the hamster model has been used to determine leptospiral infectivity, to restore the virulence of culture-attenuated strains and in challenge assays, where the protective capacity of vaccine candidates is evaluated [93, 96, 97]. The advantages of this model include the reproducibility of the results and susceptibility to a broad range of pathogenic strains [96]. However, there are relatively few hamster-specific reagents commercially available, which constitute a major difficulty to study the immunologic and cytokine response to infection. This problem has been partially overcome by the use of real time PCR for cytokines [98, 99].

Considering that mice are not susceptible to leptospirosis, transgenic and mutant murine models have been employed to study the disease. Severe combined immunodeficiency SCID/C3H, TLR4 deficient C3H/HeJ [94] and double-knockout (TLR2 and TLR4) C57BL/6 mice [45] are highly susceptible to lethal leptospirosis, and represent additional models. Indeed, young C3H/HeJ mice, which have a mutation in the *tlr4* gene, were used to evaluate recombinant protein vaccine candidates [100].

Some differences regarding resistant mouse strains have been reported in protocols using sub-lethal infection

with *L. interrogans*. The mouse strains CBA and C57BL/6, which frequently develop inflammatory lesions, are suitable for studying interstitial nephritis [101]. The mouse strain A may be the choice for studies aiming to recover large amounts of leptospires from the kidneys. Among the mouse strains tested, BALB/c proved to be the most resistant to leptospirosis [101], and was used as a resistance model [102]. The genus *Rattus*, which is the most important transmission source in human leptospirosis in urban settings, also represents a model of persistent infection and renal colonization [103].

Overall, diverse animal models have been employed to study leptospirosis. The choice of the experimental model depends on the aim of the study, as well as the availability of suitable reagents to address specific pathological and immunological issues.

Vaccine development in leptospirosis

In the veterinary field, leptospirosis causes significant economic impact. Abortion and stillbirths are frequent in infected cattle, requiring broad vaccination measures. The available vaccines are inactivated leptospires or outer membrane fractions. These vaccines do not confer a T cell dependent response, requiring annual revaccinations [4]. Furthermore, there is no cross-protection against the leptospiral serovars not included in the preparation, demanding the production of a new vaccine when different serovars emerge. The side effects associated with whole-cell leptospiral vaccines limits their feasibility for human use [4]. Nevertheless, licensed human vaccines are currently administered in a few countries such as Cuba and China [104, 105]. Indeed, the search for a conserved immunogenic protein that could subvert all these limitations is an actual challenge for the scientific community.

Recently, the genomes of two saprophytic and four pathogenic *Leptospira* strains were sequenced (Table 1) [51, 52, 68, 69]. The genome sequencing contributed in a decisive manner to the vaccine and therapeutic field, allowing the identification of potential targets for immune interference. Indeed, several vaccine candidates identified by genome bioinformatics analyses have been

Table 1 Saprophytic and pathogenic *Leptospira* species whose genomes have been sequenced.

<i>Leptospira</i> species	Serovar	Strain	Typical reservoir [13]	Reference
Saprophytic				
<i>L. biflexa</i>	Patoc	Patoc1 (strains Paris and Ames)	Do not survive in hosts	[51]
Pathogenic				
<i>L. interrogans</i>	Lai	56601	Rat	[68]
<i>L. interrogans</i>	Copenhageni	Fiocruz L1-130	Rat	[52]
<i>L. borgpetersenii</i>	Hardjo	L550	Cattle and sheep	[69]
		JB197		

tested. The majority of these studies focus on subunit vaccines composed of recombinant outer membrane proteins.

Leptospiral immunoglobulin-like (Lig) proteins belong to a family of surface-exposed determinants that have Ig-like repeat domains found in virulence factors such as intimin and invasins. The Lig proteins are expressed during host infection and culture attenuation of the pathogenic strains results in loss of its expression [106]. Lig proteins can bind to a variety of extracellular matrix components, thereby mediating adhesion to host cells [20]. Considering the relevant role of Lig proteins in leptospirosis, they have been tested as vaccine and diagnosis candidates. In fact, to date the most promising candidate is the C-terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein A (LigA), which although not being able to completely eliminate leptospires from kidneys, confers protection in a hamster model of leptospirosis [97].

Concluding remarks

This worldwide zoonosis is an important human and veterinary health problem mainly in impoverished populations lacking proper sanitation facilities and flood-prone regions. Besides the need for more economical investment in sanitary improvements and better education, it is essential to investigate vaccine candidates that induce long lasting immune protection. To improve the success of this immunotherapy, we have to fully understand:

- (1) the biological requirements for *Leptospira* survival;
- (2) the main molecular differences between non-pathogenic and pathogenic species that define leptospiral persistence and its evasion from the host immune system;
- (3) virulence factors and bacterial ligands implicated in immune evasion;
- (4) gene polymorphisms that could favour the severity of leptospiral infection.

Acknowledgment

We thank Dr Aurora Cianciarullo and Dr Enéas de Carvalho from Instituto Butantan, São Paulo, for the electronic micrographs of *Leptospira*. We also thank Dr Shaker Chuck Farah from Instituto de Química and Dr Marilis do Valle Marques from Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, for critical reading of the manuscript.

References

- 1 Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:296–326.
- 2 World Health Organization. Leptospirosis worldwide. *Wkly Epidemiol Rec* 1999;74:237–42.
- 3 Reis RB, Ribeiro GS, Felzemburgh RD *et al.* Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. *PLoS Negl Trop Dis* 2008;2:e228.
- 4 Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira and Leptospirosis*. Melbourne: MedScience, 1999.
- 5 Nalam K, Ahmed A, Devi SM *et al.* Genetic affinities within a large global collection of pathogenic *Leptospira*: implications for strain identification and molecular epidemiology. *PLoS One* 2010;5:e12637.
- 6 Haake DA. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology* 2000;146:1491–504.
- 7 Cullen PA, Haake DA, Adler B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiol Rev* 2004;28:291–318.
- 8 Que-Gewirth NL, Ribeiro AA, Kalb SR *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;279:25420–9.
- 9 Ristow P, Bourhy P, da Cruz McBride FW *et al.* The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLoS Pathog* 2007;3:e97.
- 10 Murray GL, Ellis KM, Lo M, Adler B. *Leptospira interrogans* requires a functional heme oxygenase to scavenge iron from hemoglobin. *Microbes Infect* 2008;10:791–7.
- 11 Liao S, Sun A, Ojcius DM, Wu S, Zhao J, Yan J. Inactivation of the *flhY* gene encoding a flagellar motor switch protein attenuates mobility and virulence of *Leptospira interrogans* strain Lai. *BMC Microbiol* 2009;9:253.
- 12 Murray GL, Srikram A, Henry R, Hartskeerl RA, Sermswan RW, Adler B. Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. *Mol Microbiol* 2010;78:701–9.
- 13 Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN *et al.* Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 2003;3:757–71.
- 14 Gouveia EL, Metcalfe J, de Carvalho AL *et al.* Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2008;14:505–8.
- 15 Marotto PC, Nascimento CM, Eluf-Neto J *et al.* Acute lung injury in leptospirosis: clinical and laboratory features, outcome, and factors associated with mortality. *Clin Infect Dis* 1999;29:1561–3.
- 16 Panaphut T, Domrongkitchaiporn S, Thinkamrop B. Prognostic factors of death in leptospirosis: a prospective cohort study in Khon Kaen, Thailand. *Int J Infect Dis* 2002;6:52–9.
- 17 Spichler AS, Vilaça PJ, Athanazio DA *et al.* Predictors of lethality in severe leptospirosis in urban Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2008;79:911–4.
- 18 Ganoza CA, Matthias MA, Saito M, Cespedes M, Gotuzzo E, Vinetz JM. Asymptomatic renal colonization of humans in the peruvian Amazon by *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4:e612.
- 19 Barbosa AS, Abreu PA, Neves FO *et al.* A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. *Infect Immun* 2006;74:6356–64.
- 20 Choy HA, Kelley MM, Chen TL, Möller AK, Matsunaga J, Haake DA. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect Immun* 2007;75:2441–50.
- 21 Lin YP, Lee DW, McDonough SP, Nicholson LK, Sharma Y, Chang YF. Repeated domains of leptospira immunoglobulin-like proteins interact with elastin and tropoelastin. *J Biol Chem* 2009;284:19380–91.
- 22 Breiner DD, Fahey M, Salvador R, Novakova J, Coburn J. *Leptospira interrogans* binds to human cell surface receptors including proteoglycans. *Infect Immun* 2009;77:5528–36.
- 23 Thomas DD, Higbie LM. *In vitro* association of leptospires with host cells. *Infect Immun* 1990;58:581–5.

- 24 Liu Y, Zheng W, Li L, Mao Y, Yan J. Pathogenesis of leptospirosis: interaction of *Leptospira interrogans* with *in vitro* cultured mammalian cells. *Med Microbiol Immunol* 2007;196:233–9.
- 25 Barocchi MA, Ko AI, Reis MG, McDonald KL, Riley LW. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. *Infect Immun* 2002;70:6926–32.
- 26 Faisal SM, Yan W, McDonough SP, Chang YF. Leptospira immunoglobulin-like protein A variable region (LigAvar) incorporated in liposomes and PLGA microspheres produces a robust immune response correlating to protective immunity. *Vaccine* 2009;27:378–87.
- 27 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.
- 28 Barbosa AS, Abreu PA, Vasconcellos SA *et al.* Immune evasion of *Leptospira* species by acquisition of human complement regulator C4BP. *Infect Immun* 2009;77:1137–43.
- 29 Jost BH, Adler B, Vinh 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.
- 30 Wang B, Sullivan JA, Sullivan GW, Mandell GL. Role of specific antibody in interaction of leptospires with human monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infect Immun* 1984;46:809–13.
- 31 Wang B, Sullivan J, Sullivan GW, Mandell GL. Interaction of leptospires with human polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun* 1984;44:459–64.
- 32 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.
- 33 Cinco M, Cini B, Perticarari S, Presani G. *Leptospira interrogans* binds to the CR3 receptor on mammalian cells. *Microb Pathog* 2002;33:299–305.
- 34 Malkin K. Enhancement of *Leptospira hardjo* agglutination titers in sheep and goat serum by heat inactivation. *Can J Comp Med* 1984;48:208–10.
- 35 Naiman BM, Alt D, Bolin CA, Zuerner R, Baldwin CL. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gammadelta T lymphocytes. *Infect Immun* 2001;69:7550–8.
- 36 Naiman BM, Blumberman S, Alt D *et al.* Evaluation of type 1 immune response in naïve and vaccinated animals following challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo: involvement of WC1(+) gammadelta and CD4 T cells. *Infect Immun* 2002;70:6147–57.
- 37 Tuero I, Vinetz JM, Klimpel GR. Lack of demonstrable memory T cell responses in humans who have spontaneously recovered from leptospirosis in the Peruvian Amazon. *J Infect Dis* 2010;201:420–7.
- 38 Klimpel GR, Matthias MA, Vinetz JM. *Leptospira interrogans* activation of human peripheral blood mononuclear cells: preferential expansion of TCR gamma delta+ T cells vs TCR alpha beta+ T cells. *J Immunol* 2003;171:1447–55.
- 39 Li S, Ojcius DM, Liao S *et al.* Replication or death: distinct fates of pathogenic *Leptospira* strain Lai within macrophages of human or mouse origin. *Innate Immun* 2010;16:80–92.
- 40 Guo YJ, Wang KY, Sun SH. Identification of an HLA-A*0201-restricted CD8(+) T-cell epitope encoded within Leptospiral immunoglobulin-like protein A. *Microbes Infect* 2010;12:364–73.
- 41 Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev* 2009;22:240–73.
- 42 Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol* 2005;3:36–46.
- 43 Werts C, Tapping RI, Mathison JC *et al.* Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* 2001;2:346–52.
- 44 Nahori MA, Fournié-Amazouz E, Que-Gewirth NS *et al.* Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. *J Immunol* 2005;175:6022–31.
- 45 Chassin C, Picardeau M, Goujon JM *et al.* TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, *Leptospira interrogans*. *J Immunol* 2009;183:2669–77.
- 46 Behera AK, Hildebrand E, Uematsu S, Akira S, Coburn J, Hu LT. Identification of a TLR-independent pathway for *Borrelia burgdorferi*-induced expression of matrix metalloproteinases and inflammatory mediators through binding to integrin alpha 3 beta 1. *J Immunol* 2006;177:657–64.
- 47 Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Pathogens target DC-SIGN to influence their fate DC-SIGN functions as a pathogen receptor with broad specificity. *APMIS* 2003;111:698–714.
- 48 Gaudart N, Ekpo P, Pattanapanyasat K, van Kooyk Y, Engering A. *Leptospira interrogans* is recognized through DC-SIGN and induces maturation and cytokine production by human dendritic cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;53:359–67.
- 49 van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol* 2003;3:697–709.
- 50 Murgia R, Garcia R, Cinco M. Leptospires are killed *in vitro* by both oxygen-dependent and -independent reactions. *Infect Immun* 2002;70:7172–5.
- 51 Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C *et al.* Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS One* 2008;3:e1607.
- 52 Nascimento AL, Verjovski-Almeida S, Van Sluys MA *et al.* Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Braz J Med Biol Res* 2004;37:459–77.
- 53 Guaní-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Terán LM. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol* 2010;135:1–11.
- 54 Sambri V, Marangoni A, Giacani L *et al.* Comparative *in vitro* activity of five cathelicidin-derived synthetic peptides against *Leptospira*, *Borrelia* and *Treponema pallidum*. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:895–902.
- 55 Wu Q, Xu L, Wang X, Li S, Wang B. Investigation of microbicidal activity of neutrophil defensins against leptospires. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* 1992;23:126–9.
- 56 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;23:1177–8.
- 57 Wagenaar JF, Gasem MH, Goris MG *et al.* Soluble ST2 levels are associated with bleeding in patients with severe Leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis* 2009;3:e453.
- 58 Bottazzi B, Doni A, Garlanda C, Mantovani A. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. *Annu Rev Immunol* 2010;28:157–83.
- 59 Wagenaar JF, Goris MG, Gasem MH, *et al.* Long pentraxin PTX3 is associated with mortality and disease severity in severe Leptospirosis. *J Infect* 2009;58:425–32.
- 60 Lingappa J, Kuffner T, Tappero J *et al.* HLA-DQ6 and ingestion of contaminated water: possible gene-environment interaction in an outbreak of Leptospirosis. *Genes Immun* 2004;5:197–202.
- 61 Fialho RN, Martins L, Pinheiro JP *et al.* Role of human leukocyte antigen, killer-cell immunoglobulin-like receptors, and cytokine gene polymorphisms in leptospirosis. *Hum Immunol* 2009;70:915–20.
- 62 Yang CW. Leptospirosis renal disease: understanding the initiation by Toll-like receptors. *Kidney Int* 2007;72:918–25.
- 63 Anders HJ, Banas B, Schlöndorff D. Signaling danger: toll-like receptors and their potential roles in kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:854–67.

- 64 Yang CW, Hung CC, Wu MS *et al.* Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. *Kidney Int* 2006;69:815–22.
- 65 Hung CC, Chang CT, Tian YC *et al.* Leptospiral membrane proteins stimulate pro-inflammatory chemokines secretion by renal tubule epithelial cells through toll-like receptor 2 and p38 mitogen activated protein kinase. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:898–910.
- 66 Tian YC, Chen YC, Hung CC *et al.* Leptospiral outer membrane protein induces extracellular matrix accumulation through a TGF- β 1/Smad-dependent pathway. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2792–8.
- 67 Miller NG, Allen JE, Wilson RB. The pathogenesis of hemorrhage in the lung of the hamster during acute leptospirosis. *Med Microbiol Immunol* 1974;160:269–78.
- 68 Ren SX, Fu G, Jiang XG *et al.* Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 2003;422:888–93.
- 69 Bulach DM, Zuercher RL, Wilson P *et al.* Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:14560–5.
- 70 Nally JE, Chantranuwat C, Wu XY *et al.* Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. *Am J Pathol* 2004;164:1115–27.
- 71 Croda J, Neto AN, Brasil RA, Pagliari C, Nicodemo AC, Duarte MI. Leptospirosis pulmonary haemorrhage syndrome is associated with linear deposition of immunoglobulin and complement on the alveolar surface. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:593–9.
- 72 Craig SB, Graham GC, Burns MA *et al.* Leptospirosis and Goodpasture's syndrome: testing the aetiological hypothesis. *Ann Trop Med Parasitol* 2009;103:647–51.
- 73 Verma A, Rathinam SR, Priya CG, Muthukkaruppan VR, Stevenson B, Timoney JF. LruA and LruB antibodies in sera of humans with leptospiral uveitis. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:1019–23.
- 74 Priya CG, Rathinam SR, Muthukkaruppan V. Evidence for endotoxin as a causative factor for leptospiral uveitis in humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:5419–24.
- 75 Verma A, Kumar P, Babb K, Timoney JF, Stevenson B. Cross-reactivity of antibodies against leptospiral recurrent uveitis-associated proteins A and B (LruA and LruB) with eye proteins. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4:e778.
- 76 Bal AM, Bharadwaj RS, Gita N, Joshi SA, Thakare JP. Guillain-Barre syndrome in a pediatric patient following infection due to *Leptospira*. *Jpn J Infect Dis* 2003;56:29–31.
- 77 Rugman FP, Pinn G, Palmer MF, Waite M, Hay CR. Anticardiolipin antibodies in leptospirosis. *J Clin Pathol* 1991;44:517–9.
- 78 Johnson RC, Muschel LH. Antileptospiral activity of normal serum. *J Bacteriol* 1965;89:1625–6.
- 79 Johnson RC, Harris VG. Antileptospiral activity of serum. II. Leptospiral virulence factor. *J Bacteriol* 1967;93:513–9.
- 80 Charon NW, Johnson RC, Muschel LH. Antileptospiral activity in lower-vertebrate sera. *Infect Immun* 1975;12:1386–91.
- 81 Zipfel PF, Würzner R, Skerka C. Complement evasion of pathogens: common strategies are shared by diverse organisms. *Mol Immunol* 2007;44:3850–7.
- 82 Verma A, Hellwage J, Artiushin S *et al.* LfhA, a novel factor H-binding protein of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* 2006;74:2659–66.
- 83 Stevenson B, Choy HA, Pinne M *et al.* *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. *PLoS One* 2007;2:e1188.
- 84 Verma A, Brissette CA, Bowman AA, Shah ST, Zipfel PF, Stevenson B. Leptospiral endostatin-like protein A is a bacterial cell surface receptor for human plasminogen. *Infect Immun* 2010;78:2053–9.
- 85 Barbosa AS, Monaris D, Silva LB *et al.* Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. *Infect Immun* 2010;78:3207–16.
- 86 Cinco M, Perticarari S, Presani G, Dobrina A, Liut F. Biological activity of a peptidoglycan extracted from *Leptospira interrogans*: *in vitro* studies. *J Gen Microbiol* 1993;139:2959–64.
- 87 Monahan AM, Callanan JJ, Nally JE. Review paper: host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis. *Vet Pathol* 2009;46:792–9.
- 88 Nally JE, Chow E, Fishbein MC, Blanco DR, Lovett MA. Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus chronic *Leptospira interrogans* infections. *Infect Immun* 2005;73:3251–60.
- 89 Clay CD, Soni S, Gunn JS, Schlesinger LS. Evasion of complement-mediated lysis and complement C3 deposition are regulated by *Francisella tularensis* lipopolysaccharide O antigen. *J Immunol* 2008;181:5568–78.
- 90 Monahan AM, Callanan JJ, Nally JE. Proteomic analysis of *Leptospira interrogans* shed in urine of chronically infected hosts. *Infect Immun* 2008;76:4952–8.
- 91 Ristow P, Bourhy P, Kerneis S *et al.* Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. *Microbiology* 2008;154:1309–17.
- 92 Kharazmi A. Mechanisms involved in the evasion of the host defence by *Pseudomonas aeruginosa*. *Immunol Lett* 1991;30:201–5.
- 93 Haake DA. Hamster model of leptospirosis. *Curr Protoc Microbiol* 2006;Chapter 12(Unit 12E.2).
- 94 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;73:7014–7.
- 95 Pereira MM, Da Silva JJ, Pinto MA *et al.* Experimental leptospirosis in marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*): a new model for studies of severe pulmonary leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg* 2005;72:13–20.
- 96 Silva EF, Santos CS, Athanazio DA *et al.* Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. *Vaccine* 2008;26:3892–6.
- 97 Silva EF, Medeiros MA, McBride AJ *et al.* The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. *Vaccine* 2007;25:6277–86.
- 98 Vernel-Pauillac F, Merien F. Proinflammatory and immunomodulatory cytokine mRNA time course profiles in hamsters infected with a virulent variant of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* 2006;74:4172–9.
- 99 Vernel-Pauillac F, Goarant C. Differential cytokine gene expression according to outcome in a hamster model of leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4:e582.
- 100 Koizumi N, Watanabe H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. *Vaccine* 2004;12:1545–52.
- 101 Santos CS, Macedo JO, Bandeira M *et al.* Different outcomes of experimental leptospiral infection in mouse strains with distinct genotypes. *J Med Microbiol* 2010;59:1101–6.
- 102 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.
- 103 Athanazio DA, Silva EF, Santos CS *et al.* *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. *Acta Trop* 2008;105:176–80.
- 104 Martínez R, Pérez A, Quiñones Mdel C *et al.* Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba. *Rev Panam Salud Publica* 2004;15:249–55.
- 105 Yan Y, Chen Y, Liou W *et al.* An evaluation of the serological and epidemiological effects of the outer envelope vaccine to leptospira. *J Chin Med Assoc* 2003;66:224–30.
- 106 Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J *et al.* Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol Microbiol* 2003;49:929–45.