

CASSIA MOREIRA SANTOS

**Subversão do sistema complemento por leptospiras como possível
mecanismo de evasão imune no rim**

São Paulo

2023

CASSIA MORERIA SANTOS

**Subversão do sistema complemento por leptospiras como possível
mecanismo de evasão imune no rim**

Versão corrigida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Angela Silva Barbosa

São Paulo
2023

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

4321
FMVZ

Santos, Cassia Moreira
Subversão do sistema complemento por Leptospiras como possível mecanismo de evasão imune no rim / Cassia Moreira Santos. – 2023.
68 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2023.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientadora: Dra. Angela Silva Barbosa.

1. Leptospira. 2. Células HK-2. 3. Sistema complemento. I. Título.



*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

São Paulo, 10 de abril de 2023
CEUAx N 7975040121

Ilmo(a). Sr(a):
Responsável: Angela Silva Barbosa
Área: Doenças Infecciosas

Título da proposta: "Subversão do sistema complemento por leptospiros como possível mecanismo de evasão imune no rim".

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo, na reunião de 10/04/2023, **ANALISOU** e **APROVOU** a proposta acima referenciada. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da proposta.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão da proposta.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Angela Silva Barbosa

Área: Bacteriologia

Equipe envolvida: Cassia Moreira Santos - (executante);

Título da proposta: "Subversão do sistema complemento por leptospiros como possível mecanismo de evasão imune no rim".

Parecer Consubstanciado da CEUA IB

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan de São Paulo, na reunião de 07/02/2023, **ANALISOU e APROVOU** a proposta acima referenciada. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da proposta.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão da proposta.



Luis Roberto de Camargo Gonçalves
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan de São Paulo



Milene Silva Tino
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SANTOS, Cassia Moreira

Título: Subversão do sistema complemento por leptospiras como possível mecanismo de evasão imune no rim

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: 27/04/2023

Banca Examinadora

Prof^a. Dra. Angela Silva Barbosa

Instituição: Instituto Butantan

Julgamento: _____

Prof^a. Dra. Paula Carvalhal Lage von Buettner Ristow

Instituição: Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Julgamento: _____

Dr. Felipe Silva de França

Instituição: Instituto Butantan

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha querida avó Cecília (in memoriam) que acreditava que a educação é a única ferramenta capaz de mudar o mundo e, portanto, dedicou parte de sua vida ensinando crianças e jovens a ler e a escrever.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus que me dá força, persistência e sabedoria para trilhar meu caminho.

Agradeço aos meus pais Maria Cecília e José Carlos, minha base, minha fortaleza, meus exemplos de vida, que sempre acreditaram em mim mesmo quando eu não acreditei. Sem vocês eu nada seria.

Aos meus irmãos Alex e Thais, e a irmãzinha que ganhei Franciele, pelo incentivo, companheirismo e paciência.

Ao Lucas, amor da minha vida todinha! Por toda paciência, respeito, amor e companheirismo. Meu companheiro em todas as aventuras!

Aos meus tios e primos que sempre me incentivaram a estudar. Em especial, a tia Lourdinha, sempre presente, mesmo a quilômetros de distância.

Às minhas madrinhas, Maria Amélia e Conceição, e ao meu padrinho Francisco.

À minha querida orientadora Angela Barbosa por toda paciência e dedicação comigo e com este trabalho. Sem você nada disso seria possível!

Aos meus queridos professores Adriana, Amane e Bruno, que me deram toda base e apoio para continuar na área acadêmica.

À Dra. Cecília pela colaboração e apoio.

Aos meus queridos amigos de infância, do colégio e da faculdade que sempre estiveram ao meu lado.

Aos meus amigos queridos: Dani, Luan e Matilde, por todo apoio, paciência e boas risadas que tornaram meus dias mais leves.

Aos amigos que fiz na Bacteriologia: Alejandra, Bianca, Gabriel, Iago, Ester, Mayre, Miriam e Nayara. Por todo carinho e companheirismo.

Aos pesquisadores e funcionários da Bacteriologia do Instituto Butantan, por toda ajuda e incentivo.

Aos pesquisadores e funcionários do departamento de Medicina Veterinária Preventiva, por todo apoio.

Aos meus amores “peludos”: Afrodite, Artemis, Apolo, Carol, Meg e Pipoca.

E a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES: “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 33002010123P4”.

À FAPESP: “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – processo nº 2021/00539-3”.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”
Cora Coralina

RESUMO

SANTOS, C. M. Subversão do sistema complemento por leptospiras como possível mecanismo de evasão imune no rim, 2023. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Espiroquetas pertencentes ao gênero *Leptospira* são bactérias causadoras da leptospirose. Altamente móveis, leptospiras patogênicas penetram no hospedeiro por abrasões na pele ou mucosas e rapidamente atingem os órgãos-alvo. O rim é sempre considerado como um sítio imunoprivilegiado na leptospirose, dada a persistência destas espiroquetas neste órgão. As células renais HK-2 produzem importantes proteínas do complemento como C3, Fator B e Fator H, além de moléculas pertencentes às outras vias deste sistema como C1q, C2 e C4. Sendo assim, neste estudo avaliamos se *L. interrogans* sorovar Manilae (L495), uma espécie patogênica, virulenta, regularmente mantida em laboratório como modelo de estudo, seria capaz de subverter a ação da via alternativa do sistema complemento, inativando moléculas da cascata produzidas localmente por estas células renais. Para tal, células HK-2 foram cultivadas e submetidas à infecção com *L. interrogans*. Os resultados indicam que células HK-2 apresentam maior síntese de C3, Fator B e Fator H em decorrência da infecção. O componente C5 não foi detectado no sobrenadante das células (infectadas ou não). Leptospiras fazem aquisição de Fator H localmente e este permanece funcional, atuando como cofator de Fator I na inativação de C3b e aumentando a sobrevivência dessas bactérias em soro depletado de Fator H. Nas células infectadas houve degradação de C3: C3b deposita-se nas bactérias, podendo eventualmente agir como opsonina, e C3a acumula-se no sobrenadante ao longo do período de incubação. Curiosamente, os níveis de C3a são inferiores aos basais nas primeiras 24 h de infecção, nos levando a especular que esse fragmento de C3 possa, eventualmente, se ligar a seu receptor nas células HK-2. Essa hipótese, bem como as consequências desta eventual interação, será melhor investigada. Em suma, leptospiras se ligam ao Fator H produzido pelas células renais HK-2 e este regulador negativo permanece ativo. O sistema complemento é localmente ativado na presença das bactérias e seus produtos de ativação talvez possam desencadear uma resposta inflamatória local relacionada à nefrite intersticial aguda observada na leptospirose.

Palavras-chave: *Leptospira*. Células HK-2. Sistema complemento.

ABSTRACT

SANTOS, C. M. Complement system subversion by leptospire as a possible mechanism of renal immune evasion, 2023. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Spirochetes belonging to the genus *Leptospira* are bacteria that cause leptospirosis. Highly mobile, pathogenic leptospire penetrate the host through skin abrasions or mucous membranes and rapidly reach target organs. The kidney is always considered an immunoprivileged site in leptospirosis, given persistence of these spirochetes in this organ. HK-2 renal cells produce complement proteins such as C3, Factor B and Factor H, in addition to molecules belonging to the other pathways of this system such as C1q, C2 and C4. Therefore, in this study, we evaluated whether *L. interrogans* serovar Manilae (L495), a pathogenic, virulent species, regularly kept in the laboratory as a study model, would be able to subvert the action of the alternative pathway of the complement system, inactivating locally produced molecules of the complement cascade. To this end, HK-2 cells were cultivated and infected with *L. interrogans*. According to our data, HK-2 infected cells synthesize greater amounts of C3, Factor B and Factor H. The C5 component was not detected in the supernatant of cells (infected or not). Leptospire acquire Factor H locally and this regulator remains functional, acting as a cofactor for Factor I in the inactivation of C3b, besides increasing the survival of these bacteria in Factor H depleted serum. In infected cells C3 was cleaved into C3a and C3b. While C3b is deposited on the bacteria, eventually acting as an opsonin, C3a accumulates in the supernatant over the incubation period. Interestingly, C3a levels are lower in the supernatant of infected cells compared to the control in the first 24 h of infection, leading us to speculate that this C3 fragment may eventually bind to its receptor on HK-2 cells. This hypothesis, as well as the consequences of this possible interaction, will be further investigated. In short, leptospire bind Factor H produced by HK-2 kidney cells and this negative regulator remains active. The complement system is locally activated in the presence of bacteria and its activation products may trigger a local inflammatory response related to the acute interstitial nephritis seen in leptospirosis.

Keywords: *Leptospira*. HK-2 Cells. Complement system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Micrografias eletrônicas de <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Copenhageni	16
Figura 2 - Imuno-histoquímica de rim de hamster infectado por leptospiros.....	18
Figura 3 - Imuno-histoquímica de túbulos renais de hamster após 10 dias de infecção por <i>L. kirschneri</i> sv. Grippytyphosa.....	19
Figura 4 - Ativação do sistema complemento.....	23
Figura 5 - Formação do complexo de ataque a membrana (MAC).....	24
Figura 6 - Mecanismos de evasão ao complemento apresentados por leptospiros patogênicas.....	28
Figura 7 - Células HK-2 visualizadas em microscópio 24h após infecção.....	38
Figura 8 - Produção de C3 pelas células HK-2.....	39
Figura 9 - Produção de Fator B pelas células HK-2.....	40
Figura 10 - Produção de Fator I pelas células HK-2.....	41
Figura 11 - Produção de Fator H pelas células HK-2.....	42
Figura 12 - Expressão gênica de Properdina pelas células HK-2.....	43
Figura 13 - Expressão gênica de Fator D pelas células HK-2.....	44
Figura 14 - Interação de leptospiros com Fator H produzido pelas células HK-2.....	45
Figura 15 - Sobrevivência de <i>L. interrogans</i> sv. Manilae (L495) em soro humano.....	47
Figura 16 - Funcionalidade do Fator H produzido pelas células HK-2.....	49
Figura 17 - Quantificação de C3a gerado no sobrenadante de células HK-2 infectadas com <i>L. interrogans</i>	50
Figura 18 - Deposição de C3b na superfície de <i>L. interrogans</i> sv. Manilae (L495).....	51
Figura 19 - Modelo de interação de leptospiros patogênicas com componentes da via alternativa do sistema complemento no ambiente renal.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers utilizados na RT-qPCR.....	34
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Leptospirose.....	14
1.2. <i>Leptospira</i> spp.	15
1.3. Leptospiras no Ambiente Renal.....	17
1.4. Resposta Imune e Mecanismos de Evasão à Imunidade Inata	19
1.4.1. Sistema Complemento	20
1.4.2. Interação das Leptospiras com Sistema Complemento	26
1.5. Resposta Imune Renal	29
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo geral	30
2.2. Objetivos específicos	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. Cultivo de leptospiras	31
3.2. Infecção das células HK-2 com <i>L. interrogans</i> sorovar Manilae	31
3.2.1. Cultivo celular	31
3.2.2. Infecção das células HK-2	31
3.3. Detecção de proteínas do complemento nos sobrenadantes de HK-2	32
3.3.1. <i>Western blot</i>	32
3.4. PCR Quantitativo em tempo real (RT-qPCR)	33
3.5. Avaliação da aquisição de Fator H secretado pelas células HK-2 por <i>L. interrogans</i> sorovar Manilae	34
3.5.1. <i>Western blot</i>	34
3.5.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET	34
3.6. Avaliação da funcionalidade do Fator H ligado às leptospiras.....	35
3.6.1. Atividade de cofator	35
3.6.2. Análise da sobrevivência das bactérias em soro depletado de Fator H	36
3.7. Ativação do sistema complemento no sobrenadante de células HK-2 infectadas com <i>L. interrogans</i> sorovar Manilae.....	37
3.7.1. Dosagem de C3a	37
3.8 Análise de densitometria <i>ImageJ</i>	37

4.	RESULTADOS	38
4.1.	Síntese de componentes do complemento por células HK-2.....	38
4.2.	Aquisição de Fator H proveniente das células HK-2 por <i>L. interrogans</i>	44
4.3.	Funcionalidade do Fator H produzido pelas células HK-2.....	46
4.4.	Ativação da via alternativa nas células HK-2.....	49
4.5.	Deposição de C3b em <i>L. interrogans</i> sv. Manilae.....	51
5.	DISCUSSÃO	52
6.	CONCLUSÃO	55
7.	REFERÊNCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leptospirose

A leptospirose é uma zoonose mundialmente disseminada causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. Estima-se que anualmente ocorram mais de 1 milhão de casos no mundo, resultando em aproximadamente 58 mil óbitos (COSTA et al., 2015). Entretanto, a leptospirose é uma doença negligenciada, e o impacto sobre a saúde pública ainda é subestimado, sobretudo em países em desenvolvimento (MARTINS; SPINK, 2020).

A leptospirose é endêmica em países de clima tropical devido às características pluviométricas dessas áreas, que favorecem a manutenção e disseminação do patógeno no ambiente. No Brasil, cerca de 10 mil casos de leptospirose são reportados anualmente, sendo a maioria nos períodos com maior índice pluviométrico (ROMERO et al., 2003; McBRIDE et al., 2005).

Ao longo da evolução, leptospiras se adaptaram a diferentes hospedeiros, os quais são responsáveis pela manutenção do patógeno na natureza, através da excreção das bactérias pela urina e fluidos corpóreos (HAAKE; LEVETT, 2015; PICARDEAU, 2017a). A transmissão pode ser direta, através do contato direto com urina de animais infectados, ou por via indireta, através do contato com água e/ou solo contaminados (HAAKE; LEVETT, 2015). Em áreas urbanas, os principais reservatórios de leptospirose são os roedores sinantrópicos - em especial o *Rattus norvegicus* - que representam um fator de risco significativo para a transmissão da leptospirose em humanos (SARKAR et al., 2002). Em estudo realizado em uma área endêmica do Brasil, observou-se que 80,3% dos ratos capturados eram portadores de leptospiras (de FARIA et al., 2008), enquanto Santos et al. (2015) mostraram que 44% dos *R. norvegicus* capturados em uma região da Bahia, foram positivos para leptospirose por imuno-histoquímica, demonstrando que a leptospirose é uma zoonose de grande impacto na saúde única.

Leptospiras penetram no organismo do hospedeiro por meio de pele lesionada ou mucosas, e atingem a circulação sanguínea, onde persistem por aproximadamente sete dias, induzindo a produção de anticorpos (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Durante a infecção, as bactérias provocam lesões no endotélio vascular e migram para diversos órgãos e tecidos, em especial os rins e fígado. A manifestação clínica da leptospirose é inespecífica, com início súbito de febre e dores musculares, comum em outras doenças febris como dengue e malária. A gravidade do quadro também pode variar entre doença febril leve e autolimitante à

casos mais graves, com desenvolvimento de insuficiência renal e/ou hepática e distúrbios hemorrágicos, estado conhecido como síndrome de *Weil* (HAAKE; LEVETT, 2015; da SILVA JUNIOR et al., 2018; de BRITO et al, 2018). Ainda, sugere-se que a gravidade da leptospirose possa estar associada à “tempestade de citocinas”, que é a elevação na concentração de citocinas séricas em resposta à infecção provocada pelas leptospirosas (REIS et al., 2013).

Devido ao fato de a leptospirose provocar sintomatologia clínica similar a outras doenças febris, o estabelecimento de um diagnóstico precoce e definitivo é essencial para o tratamento eficaz da doença em pacientes. Dentre os métodos diagnósticos existentes o teste de aglutinação microscópica (MAT) é considerado o padrão ouro. O objetivo deste teste é identificar anticorpos anti-*Leptospira* no soro. Entretanto, se realizado na fase inicial da infecção, pode gerar um resultado falso-negativo, sendo necessária repetição do teste para avaliar possível soro-conversão (GORIS; HARTSKEERL, 2014). Outros testes para diagnóstico de leptospirose incluem PCR de sangue e urina, cultura e isolamento da bactéria, e testes rápidos para detecção de IgM (ESTEVEZ et al., 2018; SYKES et al., 2022).

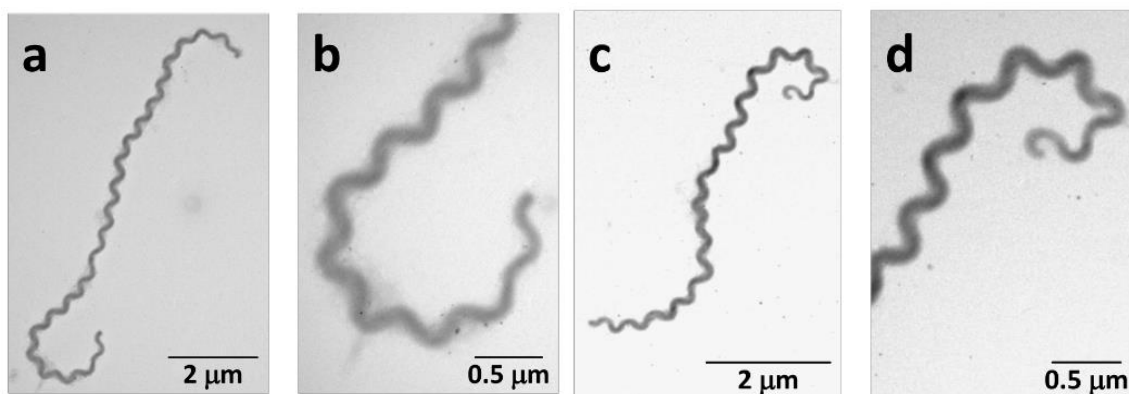
1.2. *Leptospira* spp.

As bactérias do gênero *Leptospira* são usualmente classificadas em sorovares com base na variabilidade dos lipopolissacarídeos (LPS), ou em espécies, a partir de análises genômicas de *average nucleotide identity* (ANI). Estudos recentes utilizando sequenciamento de DNA *high-throughput* permitiram a classificação dessas espiroquetas em 66 espécies distribuídas em 4 subclados: S1 e S2 compreendem as espécies saprófitas, de vida livre, que não causam doença, e P1 e P2 englobam leptospirosas patogênicas de interesse em saúde pública. O subclado P1 é associado ao desenvolvimento de doença grave em seres humanos, enquanto o P2 está relacionado ao desenvolvimento de doença leve ou, às vezes, assintomática (VINCENT et al., 2019; CAIMI; RUYBAL, 2020; CASANOVAS-MASSANA et al., 2021). A classificação sorológica de leptospirosas, baseada na heterogeneidade estrutural dos carboidratos do LPS, é também bastante empregada e útil do ponto de vista epidemiológico, uma vez que permite a identificação de sorogrupos e sorovares de leptospirosas em testes de aglutinação microscópica (SYKES et al., 2022). Até então, mais de 300 sorovares patogênicos de *Leptospira* foram descritos (PICARDEAU, 2017a).

Leptospirosas são bactérias Gram negativas. Possuem aproximadamente 0,1 a 0,2 µm de diâmetro e 6 a 20 µm de comprimento (LEVETT, 2001) (Fig. 1). São formadas por uma

membrana citoplasmática interna sobre a qual há uma camada de peptidoglicano, e uma membrana externa composta por fosfolipídios e LPS - que é composto por um lipídeo A, unidades de açúcares e antígeno O - além de proteínas ancoradas voltadas para o meio extracelular. O LPS presente nas leptospiros contribui para sua virulência (MURRAY et al., 2010) e para a diversidade antigênica da bactéria.

Figura 1. Micrografias eletrônicas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. As imagens (a, c) destacam a estrutura alongada e a forma espiralada helicoidal e (b, d) o gancho característico, que pode estar presente nas extremidades das células bacterianas.



Fonte: As imagens foram gentilmente cedidas por Sylvia Mendes Carneiro, Swiany Silveira Lima e Paulo Lee Ho, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.

No espaço periplasmático possuem endoflagelos, que partem de cada uma das extremidades e conferem movimentos de rotação e impulsão quando presentes em fluidos. Em um processo infeccioso a motilidade contribui tanto para a migração sobre superfícies celulares quanto para a translocação. Os endoflagelos de leptospiros possuem proteínas FlaB e FlaA, que são essenciais para a motilidade dessas bactérias. Estudos de mutagênese mostraram que FlaA contribui não somente para a motilidade como também para a morfologia celular e virulência das estirpes (PICARDEAU et al., 2001; LAMBERT et al., 2012).

Além da motilidade, leptospiros patogênicas possuem alta capacidade de adesão à superfície celular (TAHARA et al., 2018). Em estudos com diferentes estirpes de leptospiros, as patogênicas apresentaram maior capacidade de adesão e *crawling* (capacidade de rastejar) sobre a superfície de células renais, enquanto a maioria das saprófitas continuavam em suspensão no sobrenadante celular (XU et al., 2020; SEBASTIÁN et al., 2021). Essa

capacidade de adesão parece contribuir para interação de leptospiras patogênicas com proteínas da matriz extracelular e para a translocação da bactéria para o lúmen renal.

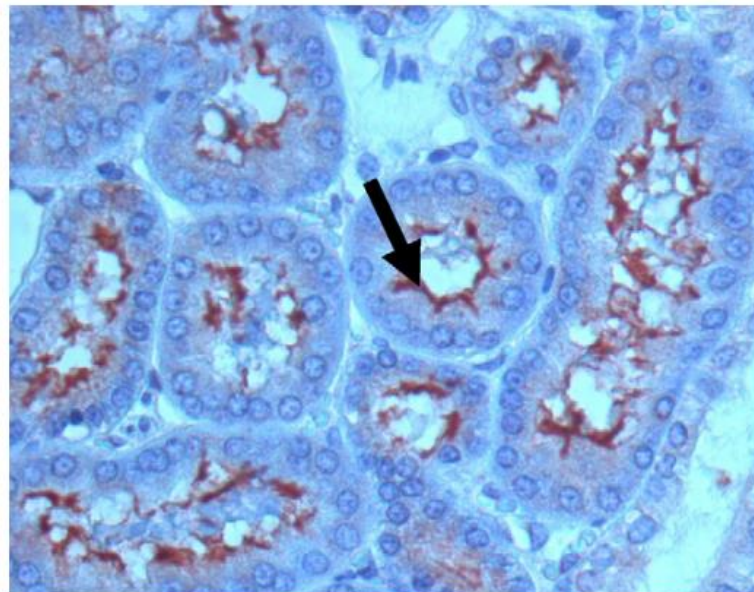
1.3. Leptospiras no Ambiente Renal

Na leptospirose o acometimento renal é frequente dada a permanência da bactéria neste órgão (Fig. 2). Estima-se que 40-60% dos pacientes com leptospirose grave desenvolvam doença renal aguda (SITPRIJA, 2006), devido às alterações hemodinâmicas associadas aos danos provocados pela translocação das leptospiras dos capilares peritubulares para os túbulos renais (SITPRIJA et al., 1980), além da resposta imune local provocada pela permanência das bactérias nos túbulos.

As lesões podem variar de leves, marcadas por proteinúria e sedimentos urinários, a graves, com insuficiência renal aguda. Em infecção experimental em camundongos com *L. interrogans* sorovar Pomona, foi observada a presença das espiroquetas no interstício renal entre quatro a oito dias pós-infecção, com presença do patógeno no lúmen tubular em torno de dez dias após a infecção (MARSHALL, 1976). Sitprija *et al.* (1980) analisaram rins de pacientes humanos com diagnóstico de leptospirose e rins de hamsters inoculados com *L. interrogans* sv. Bataviae e observaram presença das leptospiras aderidas à borda em escova dos túbulos contorcidos proximais. Também observaram degeneração tubular, edema intersticial e marcado infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleares. Barnett *et al.* (1999) detectaram LPS, OmpL1 e LipL41, presentes na membrana externa de *L. kirschneri* sv. Grippytyphosa, após 10 e 28 dias de infecção em túbulos renais de hamsters por imunohistoquímica (Fig. 3). Também detectaram essas proteínas em células fagocíticas 28 dias após a infecção, sugerindo que componentes da membrana externa de leptospiras patogênicas possam contribuir para o desenvolvimento da nefrite intersticial. Na análise histopatológica dos rins, observaram contração tubular com material proteico e eritrócitos, congestão vascular e infiltrado precoce de linfócitos e monócitos. A diapedese dos monócitos para os túbulos promove a ativação de inflamassoma que medeia a expressão de caspase-1 e a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1b e IL-18 (LI et al., 2018) que agravam a lesão tubular. Além disso, proteínas presentes na membrana de leptospiras, como a LipL32, também estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, a produção de óxido nítrico, proteínas quimiotáticas de monócitos (CCL2/MCP-1) e fator de necrose tumoral (TNF- α) (HAAKE et al., 2000; YANG et al., 2002).

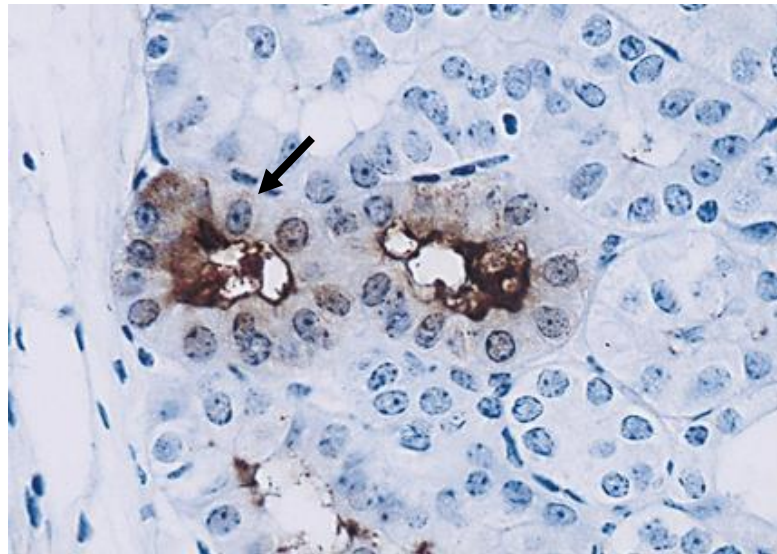
A progressão da nefrite túbulo-intersticial desencadeia doença renal crônica. Um dos fatores que contribuem para a cronicidade da doença é o processo fibrótico e atrofia tubular, decorrentes da alteração da morfologia celular e acúmulo de matriz extracelular (TIAN et al., 2006). É interessante observar que nestes estudos não foram observadas lesões glomerulares, ressaltando que a migração das leptospiros para os túbulos renais desencadeia nefrite túbulo-intersticial aguda.

Figura 2: Imuno-histoquímica de rim de hamster infectado por leptospiros. A seta indica leptospiros marcadas com antissoro específico revestindo os túbulos renais proximais.



Fonte: Adler e De La Peña Moctezuma (2010).

Figura 3: Imuno-histoquímica de túbulos renais de hamster após 10 dias de infecção por *L. kirschneri* sv. *Grippotyphosa*. A seta indica LPS de *Leptospira* detectado por anticorpo monoclonal específico.



Fonte: adaptado de Barnett *et al.*, (1999).

1.4. Resposta Imune e Mecanismos de Evasão à Imunidade Inata

Após a infecção, leptospiros rapidamente se disseminam para órgãos e tecidos através dos vasos sanguíneos. Para conter a disseminação, células do sistema imune reconhecem padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), estruturas conservadas nos microrganismos, a partir dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs). A ativação dos PRRs estimula células inflamatórias a produzirem citocinas e quimiocinas necessárias na resposta imune.

Dentre os PRRs mais estudados na leptospirose estão os receptores do tipo *toll-like 2* e *toll-like 4* (TLR2 e TLR4) e os receptores do tipo *Nucleotide-binding Oligomerization Domain* (NOD)-like. Estudos com TLRs mostraram que leptospiros ativam macrófagos humanos via CD14 e TLR2, enquanto células murinas reconhecem LPS destas espiroquetas via TLR2 e TLR4 (WERTS *et al.*, 2001; NAHORI *et al.*, 2005), o que poderia contribuir para o desenvolvimento da doença em humanos, mas não em camundongos. Já os receptores do tipo *NOD-like* reconhecem muropeptídeos derivados de peptidoglicanos, que estão presentes na parede celular de microrganismos patogênicos, e iniciam resposta pró-inflamatória a partir da ativação de NF- κ B. Um estudo realizado por Ratet *et al.* (2017) demonstrou que a proteína de membrana LipL21 está fortemente ligada ao peptidoglicano de leptospiros patogênicas, podendo dificultar a liberação de fragmentos de muropeptídeos, impedindo o reconhecimento

por NOD1 e NOD2. Além disso, a proteína LipL21 parece inibir a mieloperoxidase de neutrófilos (VIEIRA et al., 2018).

Após o reconhecimento do patógeno, o sistema imune leva alguns dias para elevar o nível de anticorpos circulantes, sendo a resposta imune inata, mediada pelo sistema complemento, primordial para eliminação bacteriana. Entretanto, ao longo da evolução, algumas bactérias patogênicas adquiriram a capacidade de resistir à atividade lítica do sistema complemento como mecanismo de escape imunológico, como é o caso das leptospiras.

1.4.1. Sistema Complemento

O sistema complemento é uma importante via da imunidade inata, primeira linha de defesa do hospedeiro contra microrganismos invasores. Foi descrito pela primeira vez em meados de 1890 por Jules Bordet, que se referiu ao complemento como componentes termolábeis capazes de potencializar a destruição de patógenos pelos anticorpos (WALPORT, 2001; ISAAC, 2009). Atualmente sabe-se que o sistema complemento é composto por mais de 50 tipos de moléculas e produtos decorrentes da clivagem de moléculas, como *pattern recognition molecules* (PRMs), proteases, anafilotoxinas como C3a, C4a e C5a, moléculas reguladoras, receptores, opsoninas, entre outros (BOHLSON et al., 2019). Quando ativas, as proteínas do complemento podem se depositar sobre patógenos culminando na lise celular e/ou atuar como opsoninas para células fagocíticas. Indivíduos deficientes de componentes do complemento são mais suscetíveis a infecções e ao desenvolvimento de doenças graves (FIJEN et al., 1999). Além disso, proteínas do complemento contribuem para o *clearance* de células apoptóticas e *debris* celulares ligando-se à membrana e atuando como receptor para células fagocíticas (NAUTA et al., 2004; BAUDINO et al., 2014).

Inicialmente, acreditava-se que as proteínas do complemento eram produzidas apenas pelos hepatócitos. Entretanto, células extra-hepáticas, incluindo células renais, podem sintetizar essas proteínas e ativá-las localmente. Há relatos da produção de C3 e C4 por células mesangiais glomerulares (SACKS et al., 1993; ZHOU et al., 1993) e a produção de C2, C4, Fator H e Fator B por células epiteliais do túbulo proximal (VAN DEN DOBBELSTEEN et al., 1994; GERRITSMAN et al., 1996). Células epiteliais HK-2 imortalizadas, provenientes dos túbulos contorcidos proximais humanos, também são capazes de sintetizar C3, Fator H, Fator I e Fator B (PEAKE et al., 1999).

O sistema complemento pode ser ativado por três vias: (a) clássica; (b) alternativa e (c) das lectinas. Quando ativadas, as três vias convergem para uma via comum, a via terminal (Fig. 4).

a. Via Clássica

A via clássica recebeu este nome por ser a primeira via do complemento a ser descrita. Esta via é ativada quando o complexo C1 interage com imunoglobulinas ligadas ao patógeno. O complexo C1 possui massa molecular de aproximadamente 790 kDa, e é composto por C1q, C1r e C1s, sendo as duas últimas serino-proteases (LACHMANN; HUGHES-JONES, 1984; DUNCAN; GREG, 1988). O C1q pode ser ativado por diferentes componentes, como regiões constantes dos anticorpos (Fc) ligadas ao antígeno, proteína C reativa, componentes de microorganismos como LPS e moléculas liberadas por células apoptóticas (revisado em BJANES; NIZET, 2021). Ao se ligar a um desses componentes, C1q sofre uma mudança conformacional que leva à autoativação de C1r que, passando a ter atividade de serino-protease, ativa C1s. Quando ativada, C1s passa a exibir um sítio catalítico de serino-protease e cliva C4 (gerando C4a e C4b) e C2. C4b se liga à C2a e, juntos formam a C3-convertase das vias clássica e das lectinas (Fig. 4) (LACHMANN; HUGHES-JONES, 1984; DUNCAN; GREG, 1988; WALPORT, 2001).

b. Via das Lectinas

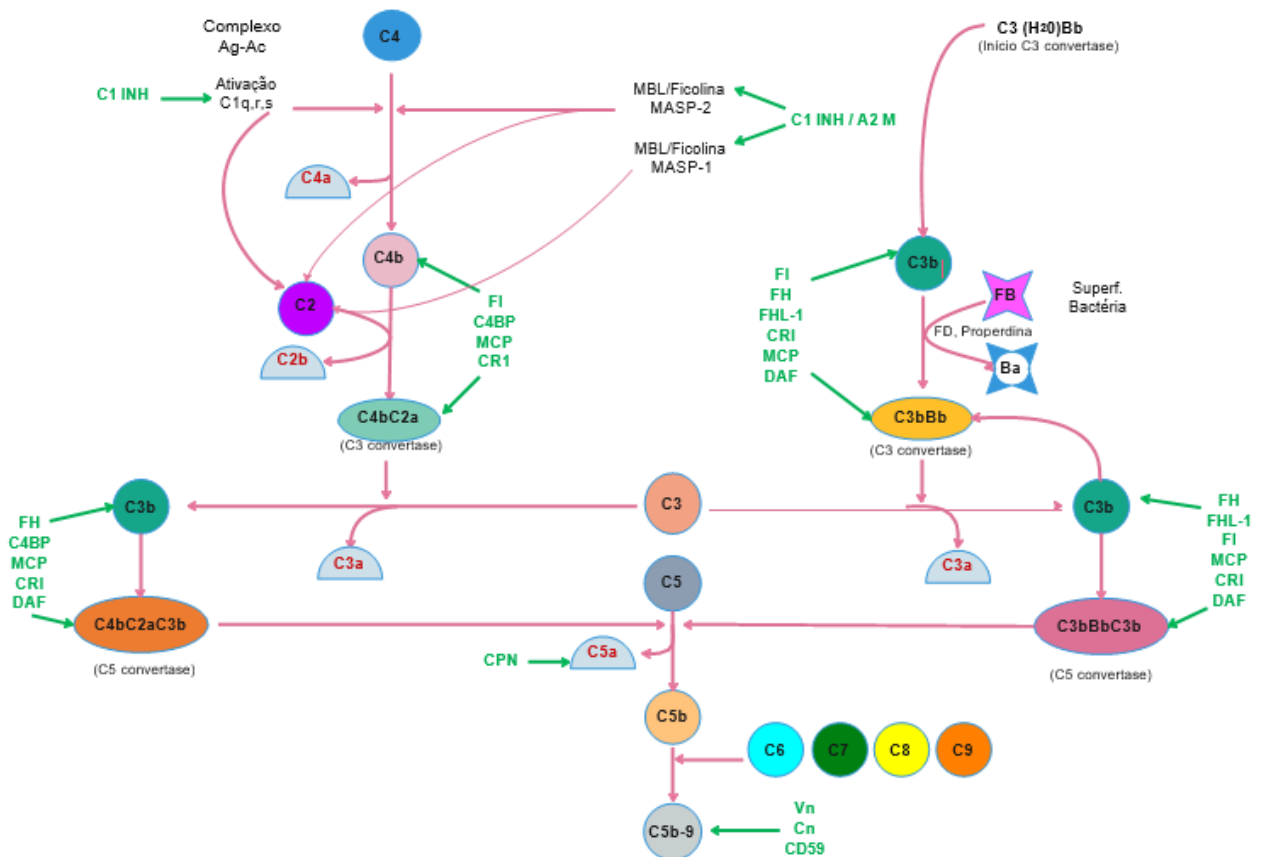
A via das lectinas pode ser iniciada por *mannose-binding lectin* (MBL) (THIELENS et al., 2001), colectina-10, colectina-11, ficolina-1 (M-ficolina), ficolina-2 (L-ficolina) ou ficolina-3 (H-ficolina) (MATSUSHITA et al., 2000; MATSUSHITA et al., 2002; LIU et al., 2005). A MBL foi a primeira molécula da via das lectinas a ser estudada. Pertence ao grupo das colectinas e possui estrutura semelhante a C1q. Para ser ativada, precisa reconhecer açúcares do tipo glicose, manose e/ou N-acetil-glicosamina, açúcares esses que não são encontrados nas células do hospedeiro. Já as ficolinas reconhecem grupos acetil, também presentes na superfície bacteriana. Essas moléculas se associam à serino-proteases *mannan-binding lectin serine proteases* 1, 2 e 3 (MASP-1, MASP-2 e MASP-3) e se ligam a sítios específicos na superfície de patógenos. Esse reconhecimento leva a uma mudança conformacional na MASP-2 permitindo a clivagem de C2 e C4, seguindo assim a ativação da cascata proteolítica. Em condições fisiológicas, MASP-1 é

necessária para ativação de MASP-2 e ambas são capazes de clivar C2 quando ativas (Fig. 4) (THIELENS et al., 2001; ZUNDEL et al., 2004; revisado em GARRED et al., 2016).

c. Via Alternativa

A ativação da via alternativa inicia-se com a hidrólise espontânea na ligação tiol-éster de C3, componente central da cascata do complemento, formando C3(H₂O), também conhecido como C3b-like, uma forma bioativa de C3 em fase fluida. A forma bioativa de C3 é gerada em pequenas quantidades no plasma e de forma constante com a função de detectar precocemente possíveis agentes patogênicos. Este processo também é conhecido como *tick-over* da via alternativa (PANGBURN; MÜLLER-EBERHARD, 1983). Ao sofrer hidrólise espontânea, C3(H₂O) passa a exibir sítios para ligação de outras proteínas, como o Fator B. A ligação de C3(H₂O) ao Fator B, leva à formação do complexo C3(H₂O) B. Este complexo pode ser clivado por Fator D, também presente no plasma sanguíneo, gerando moléculas de C3(H₂O) Bb, uma C3-convertase de fase fluida que na presença de íons de magnésio permite a clivagem de C3 em C3a, uma importante anafilotoxina, e C3b, uma opsonina que reconhece e se liga covalentemente à superfície celular. Assim como sua forma bioativa, C3b passa por uma mudança conformacional expondo novos sítios de ligação quando ligado à superfície celular. Há o recrutamento de moléculas de Fator B que, ao se ligar covalentemente, forma a pró-convertase C3bB. Há então novas mudanças conformacionais que expõem novo sítio de ligação para o Fator D. Esta ligação permite que o Fator B seja clivado por Fator D, liberando o fragmento Ba, formando então a C3-convertase, C3bBb. As C3-convertases atuam como amplificadoras pois, ao serem formadas, expõem novos sítios para ligação de C3, clivando-o e gerando mais moléculas de C3a e C3b (PANGBURN et al., 1981; FORNERIS et al., 2010). Porém, a meia-vida desses complexos é curta, sendo necessária a ligação à properdina, proteína reguladora positiva da via alternativa com função estabilizadora da C3-convertase. A properdina também pode depositar-se na superfície de patógenos ou células em apoptose, permitindo a deposição de mais moléculas de C3b (*clearance*) (FEARON; AUSTEN, 1975).

Figura 4. Ativação e regulação do sistema complemento. A ativação pode ser desencadeada por três vias distintas: alternativa, lectinas e via clássica. Todas essas vias levam à geração de C3-convertases que clivam C3 nos fragmentos C3a e C3b. A associação de C3b com as C3-convertases gera C5-convertases que clivam C5 em fragmentos C5a e C5b. Todas as três vias convergem para uma via terminal comum que leva à formação do complexo de ataque à membrana (C5b-9). Várias proteínas reguladoras do complemento são responsáveis por regular positivamente (properdina) ou negativamente (indicado em fonte verde) a ativação desse sistema. FH: Fator H; FD: Fator D; FB: Fator B; FI: Fator I; FHL-1: Fator H like-1; CR1: Complemento Receptor 1; MCP: Proteína do Cofator de Membrana; DAF: Fator Acelerador de Decaimento; MBL: Lectina de Ligação a Manose; MASP: Serina Protease associada a MBL; C1INH: inibidor de C1; alfa2 macroglobulina; CPN: Carboxipeptidase N; A2M; Vn: Vitronectina; Cn: Clusterina; C5b-9: Complexo de Ataque à Membrana.



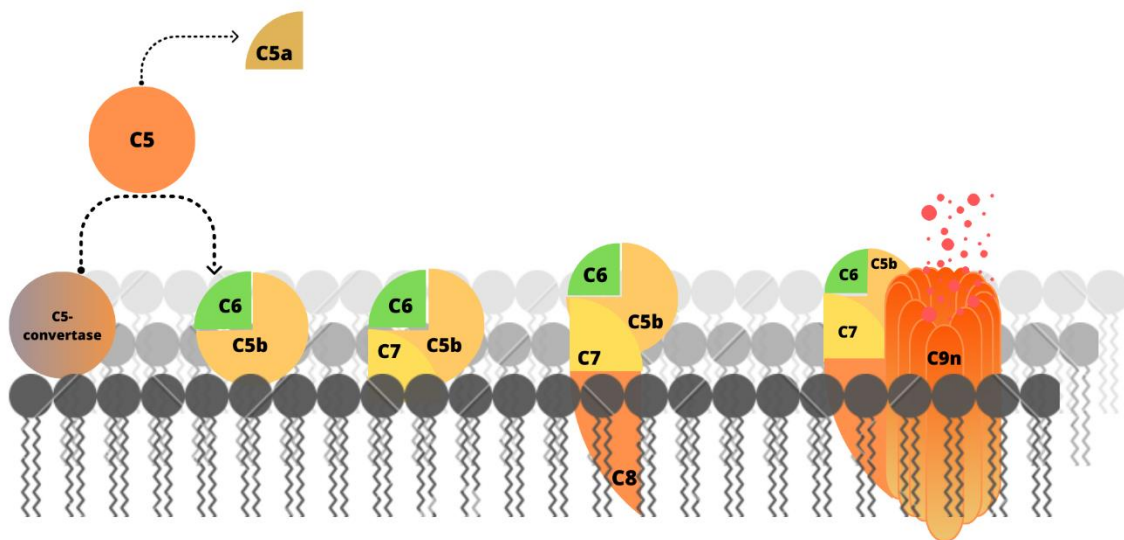
Fonte: BARBOSA e ISAAC (2018)

d. MAC

O destino das três vias do sistema complemento é o mesmo: a via terminal. Quando ativadas, as 3 vias produzem C3-convertases que clivam moléculas de C3. Essa clivagem é essencial para dar continuidade à cascata do complemento, pois C3b gerado se liga a C4b2a (vias clássica e das lectinas) formando C4b2a3b, ou se liga a C3bBb (via alternativa), formando C3bBbC3b. Esses novos complexos recebem o nome de C5-convertases com atividade de clivar moléculas de C5 gerando C5a, importante anafilotoxina, e C5b, que se liga à superfície da célula alvo. C5b sofre mudança

conformacional permitindo a subsequente ligação de moléculas de C6 formando C5b6, um complexo estável. C7 se liga a C5b6, tornando o complexo lipofílico, e depois C8, capaz de atravessar a membrana celular, se junta às demais moléculas. Por fim, várias subunidades de C9 se ligam formando um poro sobre a superfície celular, ou complexo de ataque à membrana (MAC). Esses poros geram um desbalanço osmótico causando a ruptura ou lise do microrganismo ou da célula alvo (MÜLLER-EBERHARD, 1986; BUBECK, 2014) (Fig. 5).

Figura 5: Formação do complexo de ataque a membrana (MAC). C5b se liga à superfície do microrganismo e expõe o sítio de ligação para C6, formando C5b6. A este complexo se associam C7, C8 e várias unidades de C9, formando o MAC sobre a superfície celular. Os poros gerados sobre a superfície celular promovem desbalanço osmótico, acarretando ruptura da membrana plasmática.



Fonte: Santos, C. M. (2023)

1.4.1.1. Anafilatoxinas do Complemento

A ativação do sistema complemento resulta na clivagem de diversas proteínas em fragmentos menores. Estes fragmentos podem desempenhar importantes funções no organismo, como é o caso de C3a e C5a, oriundos da clivagem de C3 e C5, respectivamente. Estes fragmentos possuem papel fundamental na resposta inflamatória, induzindo a quimiotaxia de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos (MURAKAMI et al., 1993; EHRENGRUBER et al.,

1994; DAFFERN et al., 1995), regulando a vasodilatação no local da infecção, que por sua vez aumenta a permeabilidade dos vasos, (KLOS et al., 2009), além de ativarem células que possuem seus respectivos receptores. A ligação de C3a e C5a a seus receptores (C3aR e C5aR) altera a conformação dos últimos em seus domínios intracelulares permitindo o acoplamento da proteína G e induzindo uma cascata de sinalização. A consequência desta ligação varia de acordo com o tipo de célula que está expressando o receptor, podendo haver indução de quimiotaxia, fagocitose e degranulação de células polimorfonucleares (DUNKELBERGER; SONG, 2010). Esses receptores também já foram descritos em células não-imunes como células endoteliais, neurônios e microglia, assim como em células renais, pulmonares, hepáticas, cardíacas, intestinais e musculares (KLOS et al., 2009). Nessas células, a ativação excessiva dessas vias pode contribuir para a alteração da morfologia celular, como ocorre na transição epitélio-mesenquimal em células epiteliais (TANG et al., 2009). Além de C3a e C5a, há a geração de C4a a partir da clivagem de C4. Embora este componente seja descrito como anafilotoxina, não se sabe ao certo o seu real potencial inflamatório, uma vez que não parece possuir receptor específico nas células (revisado em BARNUM, 2015).

1.4.1.2.Reguladores do Complemento

A resposta exacerbada do sistema complemento é prejudicial ao organismo. Portanto, a cascata precisa ser estritamente regulada a fim de se evitar o consumo exagerado de proteínas que a compõem e uma ativação imprópria do sistema com consequentes danos às células do hospedeiro. Essa regulação é assegurada por proteínas solúveis ou presentes na membrana das células, que restringem a formação de C3b ou C4b ou ainda impedem a formação do MAC nas células hospedeiras. A ativação da via clássica pode ser controlada pelo inibidor de C1q (C1Inh), que se liga a C1r e C1s, desfazendo o complexo C1 e liberando C1q. C1Inh também pode inibir a via das lectinas, inibindo a ativação de MASP-1 e MASP-2. Outras proteínas que inibem a via das lectinas são MASP-3, Map144 e Map19. Essas proteínas possuem afinidade por MBL e ficolinas, competindo com MASP-1 e MASP-2 (revisado em MERLE et al., 2015).

Os principais reguladores solúveis do sistema complemento são Fator H e *C4b Binding Protein* (C4BP), responsáveis pela regulação das vias alternativa, e clássica e das lectinas, respectivamente (BARNUM, 1991; WALPORT, 2001). Esses reguladores dissociam as C3 convertases (C3bBb e C4b2a respectivamente) (WEILER et al., 1976; GIGLI et al., 1979; MISASI et al., 1989) e agem como co-fatores de Fator I, serino-protease responsável pela clivagem e inativação de C3b e C4b (LAMBRIS et al., 1996). Além desses, outras moléculas

também podem atuar como cofatores para o Fator I como *membrane cofactor protein* (MCP), que atua como cofator para inativar C3b e C4b, e o receptor 1 (CR1), que atua como cofator na clivagem de C3b em iC3b e C3f, e clivagem de iC3b em C3c e C3d, acelerando o decaimento de C3-convertase e C5-convertase (ISAAC, 2009; revisado em MERLE et al., 2015) (revisado em MERLE et al., 2015). Como consequência, a cascata do complemento não progride para a via terminal, não havendo formação do MAC.

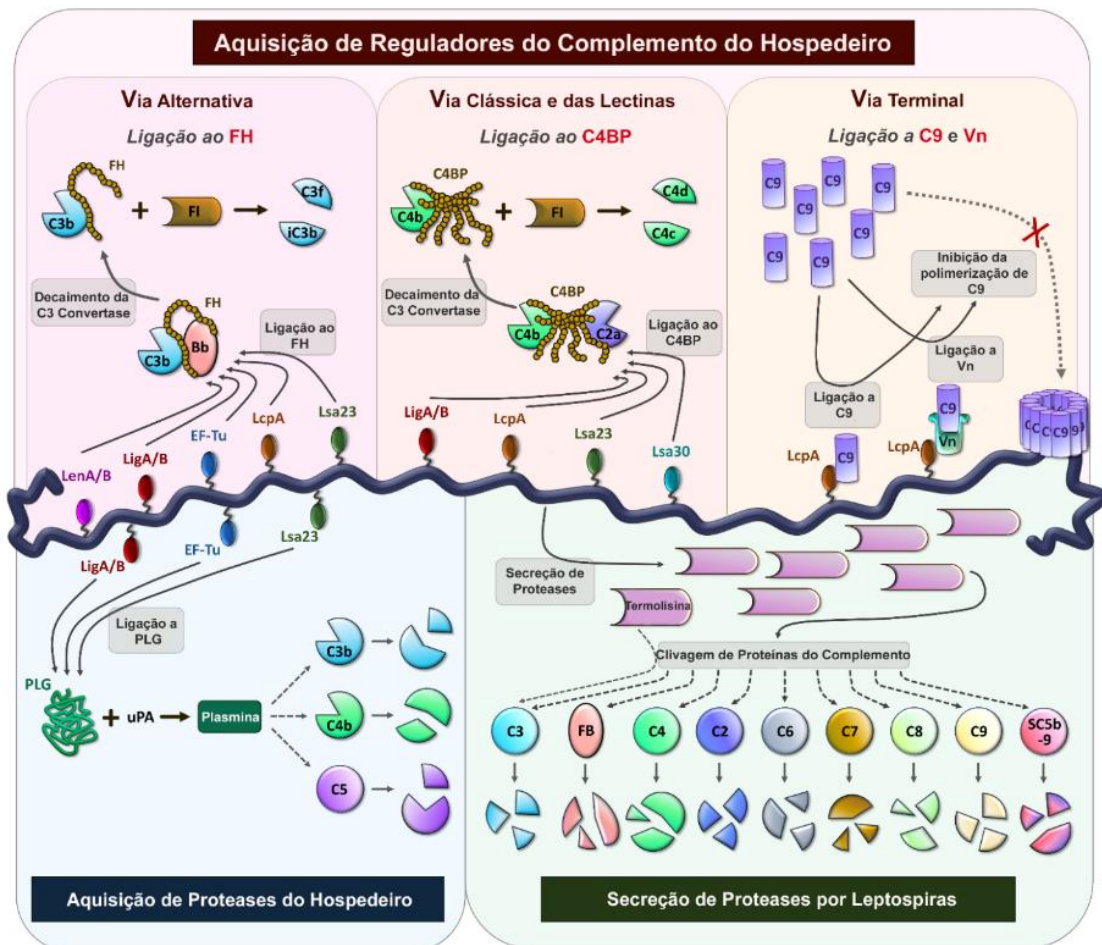
1.4.2. Interação das Leptospiras com Sistema Complemento

Leptospiras patogênicas subvertem a ação do complemento empregando estratégias universais. Em 1966, Johnson e Muschel relataram a resistência de leptospiras patogênicas ao soro normal, enquanto estirpes não patogênicas demonstraram maior suscetibilidade. Em 2005, Meri *et al.* compararam a sensibilidade de diferentes estirpes ao soro normal, sendo possível observar pela primeira vez que, embora ocorra a deposição de C3b em todas as estirpes, apenas na *L. biflexa* sv. Patoc houve deposição de MAC, e isso ocorreu devido à aquisição de Fator H presente no soro humano pelas estirpes patogênicas. Essas bactérias também interagem com C4BP, regulador da via clássica e das lectinas do complemento, e com vitronectina, regulador da via terminal (MERI et al., 2005; BARBOSA et al., 2009; da SILVA et al., 2015). Diversas proteínas presentes na membrana externa de espécies patogênicas de leptospiras já foram descritas como ligantes dos reguladores acima mencionados. Dentre elas estão as proteínas Lig A e Lig B (CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012), a *leptospiral endostatin-like protein A* (LenA) (STEVENSON et al., 2007), a proteína LcpA (BARBOSA et al., 2010) e as proteínas *moonlighting Elongation factor Tu* (EF-Tu), que também se liga ao plasminogênio (WOLFF et al., 2013), e enolase (SALAZAR et al., 2017). Esses trabalhos sugerem que a ligação de proteínas de superfície de leptospiras a reguladores negativos pode representar uma importante estratégia de subversão ao sistema complemento do hospedeiro.

Além de se ligarem a reguladores do complemento, leptospiras interagem com o sistema fibrinolítico do hospedeiro. Foi demonstrado que essas bactérias fazem a aquisição de plasminogênio que, ao ser convertido em plasmina na superfície da bactéria, cliva C3b, C4b e C5, interferindo na lise e opsonização do patógeno (VIEIRA et al., 2011; WOLFF et al., 2013; CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2016a; SIQUEIRA et al., 2017). Outros estudos também vêm demonstrando a importância de metalopeptidases secretadas por leptospiras que atuam clivando e inativando proteínas do complemento, interferindo na formação do MAC (FRAGA et al., 2014b; AMAMURA et al., 2017; CHURA-CHAMBI et al., 2018; da SILVA et al.,

2018). Tais estratégias garantem a inativação de C3b e C4b, a inibição da formação do MAC e a degradação de moléculas efetoras da cascata. A Figura 6 sumariza as principais estratégias adotadas por leptospiros patogênicos para subverter a ação do sistema complemento.

Figura 6: Mecanismos de evasão ao complemento apresentados por leptospiiras patogênicas. Leptospiras patogênicas desenvolveram estratégias de evasão imune para neutralizar a ativação do complemento: (1) aquisição de reguladores solúveis do complemento do hospedeiro, como Fator H, proteína de ligação a C4b (C4BP), e vitronectina (Vn), potencialmente permitindo a regulação negativa de todas as três vias do complemento, bem como da via terminal. Fator H e C4BP atuam como cofatores para o Fator I na clivagem de C3b e C4b e aceleram a dissociação das C3 convertases (C3bBb e C4b2a, respectivamente). Vn e a proteína LcpA ligam-se a C9 e interferem na formação do complexo de ataque à membrana; (2) aquisição de proteases do hospedeiro, como o plasminogênio, que é convertido em plasmina ativa na presença do contribui ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (uPA). A plasmina ligada à leptospira cliva C3b, C4b e C5 e para regular negativamente a ativação do complemento na superfície bacteriana e (3) e proteínas do complemento por proteases endógenas. As metaloproteases secretadas por cepas de *Leptospira* têm como alvo várias proteínas do complemento, incluindo Fator B (FB), C2, C3, C4, C6, C7, C8, C9 e o complexo terminal solúvel (SC5b-9). Em alguns casos, a degradação proteolítica só é observada com moléculas do complemento purificadas. Metaloproteases secretadas por leptospiiras patogênicas também têm como alvo as moléculas do complemento. A termolisina codificada por *lic13322* é uma das metaloproteases responsáveis por essas clivagens, degradando C3 e C6. Proteínas de membrana externa da *Leptospira* que interagem com os reguladores do complemento mencionados acima, bem como com o plasminogênio do hospedeiro, são mostradas na Figura: LenA/B, LigA/B, LcpA, EF-Tu, Lsa23 e Lsa30.



Fonte: FRAGA *et al.* (2023)

1.5. Resposta Imune Renal

Após a fase inicial da doença (bacteremia), leptospiras são detectadas nos órgãos e tecidos alvo. O rim é sempre mencionado como um sítio imunoprivilegiado devido a persistência das bactérias neste órgão (RATET et al., 2014; PICARDEAU, 2017). Alguns estudos sugerem mecanismos que possibilitam a sobrevivência de leptospiras no tecido renal, como a formação de biofilme neste local (RISTOW et al., 2008; SANTOS et al., 2021). Em um estudo realizado por Kharazmi (1991), bactérias *Pseudomonas aeruginosa* utilizam a formação de biofilmes para evadir ao sistema imunológico, uma vez que ficam protegidas de agentes antimicrobianos do hospedeiro. Ainda, análises proteômicas indicam uma diminuição da expressão proteica e de antígenos durante a infecção renal por leptospiras em ratos, o que facilitaria sua persistência no hospedeiro (MONAHAN et al., 2008).

Além dos mecanismos acima mencionados, levantamos aqui a hipótese de que a sobrevivência e a persistência de leptospiras nos rins pudesse estar correlacionada à capacidade dessas bactérias de interagir com reguladores do sistema complemento no ambiente renal, notadamente com Fator H, que é sabidamente produzido por células renais (PEAKE et al., 1999). Sabe-se que não somente este regulador, mas outras moléculas da via alternativa, como C3 e Fator I são produzidas por células tubulares renais (ZHOU et al., 2001). Portanto, especula-se se leptospiras teriam a capacidade de inativar o sistema complemento localmente, nos rins, assim como o fazem na circulação, no início da infecção. Tal mecanismo poderia contribuir para a persistência dessas espiroquetas nestes órgãos.

Para avaliar a ação de leptospiras sobre o tecido renal, estudos recentes têm utilizado células HK-2 imortalizadas, oriundas do túbulo renal proximal humano, como modelo *in vitro* (PEAKE et al., 1999; TIAN et al., 2006; WAN et al., 2013). Há relatos de que as células HK-2 produzem proteínas da via alternativa do sistema complemento como C3, Fator B e Fator H, além de moléculas pertencentes às outras vias deste sistema como C1q, C2 e C4 (PEAKE et al., 1999; ZHOU et al., 2001). Sendo assim, neste estudo avaliamos se *L. interrogans* sorovar Manilae, uma estirpe patogênica, virulenta, regularmente mantida em laboratório como modelo de estudo, seria capaz de subverter a ação da via alternativa do sistema complemento, inativando moléculas da cascata produzidas localmente por estas células renais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a interação de leptospiros com componentes do sistema complemento produzidos por células tubulares renais HK-2 como possível mecanismo de evasão imune no rim.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar a gama de componentes das vias alternativa e terminal do sistema complemento produzidos pelas células HK-2 tanto em condições normais de cultivo quanto após infecção por leptospiros;
- Avaliar se *L. interrogans* sorovar Manilae interage com Fator H produzido pelas células HK-2;
- Avaliar se FH ligado às leptospiros permanece funcional, realizando-se ensaio de cofator (clivagem de C3b por Fator I tendo Fator H como cofator), e avaliando-se a sobrevivência das bactérias oriundas da infecção em soro humano depletado de Fator H;
- Avaliar a ativação do sistema complemento após a infecção por dosagem de C3a no sobrenadante e deposição de C3b nas bactérias.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultivo de leptospiras

A estirpe virulenta *Leptospira interrogans* sorovar Manilae L495, fornecida pelo Dr. Elsio Wunder (Universidade de Yale, EUA) foi cultivada em meio *Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris* (EMJH) modificado, suplementado com 10% de Difco® *Leptospira Enrichment EMJH* (Becton, Dickinson and Co., Sparks, USA). As bactérias foram mantidas em aerobiose, temperatura entre 29°C a 30°C e utilizadas, no máximo, até a sexta passagem *in vitro*. Os subcultivos foram realizados a cada sete dias, transferindo 10% do volume total do meio para um meio novo.

3.2. Infecção das células HK-2 com *L. interrogans* sorovar Manilae

3.2.1. Cultivo celular

HK-2 são células humanas epiteliais do túbulo proximal renal. São células imortalizadas pela transdução com genes do papilomavirus humano 16 (HPV-16) (RYAN et al., 1994). Para o cultivo celular, as células HK-2 foram mantidas no meio *Dubbelco's modified Eagle medium/Ham's F12* (LGC Biotecnologia), acrescido de 5% de soro fetal bovino, 0,4 µg/mL de hidrocortisona, 5 µg/mL de transferrina e 5 µg/mL de selenito de sódio em garrafas T25 ou T75. As HK-2 foram semeadas na concentração 5×10^5 células e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, até atingirem 80-85% de confluência (LENTZ et al., 2011; YUN et al., 2018). Após 48 h de crescimento, foram realizadas duas trocas de meio de cultura em intervalos de 24 h utilizando-se meio sem soro fetal bovino. Para soltar as células das garrafas, utilizou-se a solução *TrypIE express* (Gibco, EUA), conforme indicado pelo fabricante, e as células foram quantificadas em câmara de Neubauer.

3.2.2. Infecção das células HK-2

Após as 48 h da retirada do soro fetal bovino, as células HK-2 foram submetidas à infecção por *L. interrogans* sorovar Manilae. As bactérias cultivadas em meio EMJH modificado foram ressuspendidas em meio de cultivo celular sem adição de soro. A quantidade de bactérias por mililitros foi determinada por contagem em câmara de *Petroff-Hausser* em microscópio de campo escuro. As bactérias foram adicionadas às garrafas contendo as células HK-2 em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 50:1 e os sobrenadantes foram coletados

nos períodos de 24, 48 e 72 h. Os sobrenadantes foram imediatamente centrifugados a 10.000 x g durante 10 minutos para remoção de leptospiras em suspensão e *debris* celulares, e então armazenados a -20°C para posterior análise dos componentes do complemento, incluindo C3, Fator B, Fator H, Fator I, Fator D e properdina, e da via terminal C5, C6, C7, C8 e C9.

3.3.Deteção de proteínas do complemento nos sobrenadantes de HK-2

3.3.1. Western blot

Para a deteção de proteínas por *Western blot* foram utilizados sobrenadantes do cultivo de HK-2 coletados nos tempos de 24, 48 e 72 h, acrescidos de tampão de amostra SDS com β -mercapto-etanol (Tris 250 mM, SDS 10 %, azul de bromofenol 0,5 %, glicerol 50 %, β -mercapto-etanol 500 mM, água ultrapurificada qsp.), e aquecidas durante 5 min à 96°C. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE 10 % ou 12 %, em tampão de corrida (Tris base 0,5 M, ácido aminoacético P.A., SDS 10 %, água ultrapurificada qsp.), e transferidas para membranas de nitrocelulose pelo sistema *semi-dry* (Tran-Blot SD, Bio-Rad) utilizando tampão de transferência (Tris 48 mM, ácido aminoacético P.A. 39 mM diluído em 20 % de etanol, SDS 1,3 mM, água ultrapurificada qsp.). Para inibir ligações inespecíficas, as membranas foram bloqueadas com solução de leite em pó desnatado 10 % em *Tris-Buffered Saline* (Tris 0,5 M, cloreto de sódio 1,38 M, cloreto de potássio 0,027 M, água ultrapurificada qsp.) acrescido de Tween 20 a 0,01% (TBS-T). A membrana foi incubada *overnight* a 4°C. Após incubação, a membrana foi lavada três vezes com TBS-T por cinco minutos sob agitação. Em seguida, a membrana foi incubada por 1 h com anticorpos humano policlonal produzido em cabra sendo estes anti-C3, -Fator B, -Fator I, -Fator D, -properdina, -C5, -C6, -C7, -C8 e -C9 (Complement Technology, Inc., EUA), e anti-Fator H (Quidel Corp., California, EUA) em solução de TBS-T, acrescida de leite em pó desnatado 5% em temperatura ambiente sob agitação, e lavada três vezes com TBS-T por 5 min em cada agitação. Após a lavagem, a membrana foi incubada com anti-IgG de cabra conjugado a peroxidase em solução TBS-T acrescida de leite desnatado a 5 % por 1 h em temperatura ambiente e sob agitação. A membrana foi novamente lavada em TBS-T e a revelação foi realizada utilizando *SuperSignal® West Pico Enhanced Chemiluminescent Substrate* (Thermo Fisher Scientific, EUA) seguindo as instruções do fabricante. As imagens foram adquiridas no fotodocumentador UVITec (UVITec Cambridge, Inglaterra).

3.4.PCR Quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

Para avaliar a expressão gênica de componentes do complemento não identificados por *Western blot* foi realizada RT-qPCR das células HK-2 infectadas ou não com *L. interrogans* sv. Manilae. Para tal experimento, 5×10^5 células foram cultivadas em placas para cultivo celular de 6 poços (Kasvi, Brasil). Após 48 h de crescimento, as células foram infectadas com a bactéria, conforme anteriormente descrito. As células foram lisadas e o RNA total foi extraído com *RNAspin Mini* (Cytiva, Amersham, Reino Unido), conforme instruções do fabricante, e armazenado à -80°C . Para avaliação da integridade do RNA, 5 μL de cada amostra acrescida de 1 μL de *Blue Green Loading dye I* (LGC Biotec.) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (100 mL Tris-acetato-EDTA e 1g de agarose). Para avaliar a qualidade do RNA extraído, foi realizada espectrofotometria de cada amostra no leitor Nanodrop, para obtenção da relação entre os comprimentos de onda a 260 nm e 280 nm.

Para a obtenção do cDNA, 0,5 μg de oligo dT e 10 mM de dNTP foram adicionados a 250 ng de RNA extraído. A amostra foi aquecida a 65°C por 5 min e resfriada a 4°C . Em seguida foi utilizado o kit *SuperScript™ III Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EUA), conforme orientações do fabricante. A amostra foi novamente aquecida a 50°C por 60 min e 75°C por 15 min. Ao final da reação, as amostras foram diluídas em água ultra purificada livre de DNase e RNase na proporção de 1:4.

Para reação de RT-qPCR, 2 μL de cada cDNA foram aplicados, em triplicata técnica, em placas de 96 poços, acrescidos de 5 μL de *Fast SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems), 2,2 μL de água ultra purificada livre de DNase e RNase e 0,8 μL de *primers forward* e *reverse* específicos para cada componente analisado, totalizando 10 μL por poço. Os *primers* foram obtidos utilizando-se a ferramenta *Primer-BLAST*, disponibilizada na plataforma digital *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, EUA) (Tabela 1). Para análise de expressão relativa, foram utilizados os genes constitutivos *Peptidylprolyl Isomerase A* (PPIA) e *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1* (HPTR1). As amostras foram amplificadas em sistema *StepOnePlus Real Time* (Applied Biosystems) a 95°C por 20 seg, 60° por 30 seg, 95°C por 15 seg, 60°C por 1 min e 95°C por 15 seg (40 ciclos). A expressão gênica foi obtida pela fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Tabela 1: *Primers* utilizados na RT-qPCR.

<i>Genes</i>	<i>Foward 5'-3'</i>	<i>Reverse 5'-3'</i>
<i>C5</i>	AGTGTGTGGAAGGGTGGGAAG	GTTCTCTCGGGCTTCAACAG
<i>Fator D</i>	ATACAGCGAAGTTCCGGGTC	AGACGCTCACATTCCCCTTG
<i>Properdina</i>	ACGTGTCTCCGCAGTAAAGG	ATGCGTCTCTTCACAAGGGG

3.5.Avaliação da aquisição de Fator H secretado pelas células HK-2 por *L. interrogans* sorovar Manilae

3.5.1. Western blot

Leptospiras (2×10^9) foram lavadas com PBS filtrado e depois incubadas com sobrenadante das células HK-2 (previamente cultivadas por 72 h) por 2 h a 37°C, em agitação. Para remoção do Fator H que não se ligou às bactérias, a suspensão bacteriana foi lavada 5 vezes em PBS filtrado e centrifugada a 10.000 x g, por 10 min a 4°C. O *pellet* contendo as bactérias foi ressuspendido em 60µL de PBS e submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%) sob condições não redutoras. Como controle das lavagens, utilizou-se o sobrenadante obtido na última centrifugação das bactérias. As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose em sistema *semi-dry* (Tran-Blot SD, Bio-Rad). Após bloqueio com leite desnatado 10 %, as membranas foram incubadas com anti-FH humano policlonal produzido em cabra (Quidel Corp., EUA) diluído em leite desnatado 5% (1:5.000), e em seguida com anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase (Complement Technology, Inc., EUA), diluído em leite desnatado 5% (1:10.000). Os sinais positivos foram detectados por quimiluminescência utilizando revelador *SuperSignal® West Pico Enhanced Chemiluminescent Substrate* (Thermo Fisher Scientific, EUA). As imagens foram adquiridas no fotodocumentador UVITec (UVITec Cambridge, Inglaterra).

3.5.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET

Segundo dados da literatura, há deposição de C3b, mas não de MAC em leptospiras patogênicas incubadas com soro humano normal. Esta regulação se deve à aquisição de Fator H sérico por proteínas presentes na superfície das bactérias (MERI et al., 2005). Portanto,

avaliou-se a aquisição de Fator H e deposição de C3b oriundo das células HK-2 sobre as leptospiros por MET em colaboração com a Dra. Cecília Abe, do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan. Culturas de *L. interrogans* sorovar Manilae incubadas conforme descrito acima foram fixadas com paraformaldeído 2% em PBS por 1 h a temperatura ambiente. As preparações foram lavadas 3 vezes (centrifugações a 5.000 x g por 10 min) com PBS e bloqueadas com PBS contendo 0,2% de BSA por 30 min. As bactérias foram incubadas *overnight* em temperatura ambiente com anti-Fator H humano (Quidel Corp., EUA) ou anti-C3 humano (Complement Technology, Inc., EUA), diluído 1:10 em PBS/BSA, e sem o anticorpo primário (controle negativo). Após três lavagens com PBS, as preparações foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de cabra, marcado com partículas de ouro coloidal (Sigma-Aldrich, Co., EUA), diluído 1:10 em PBS/BSA durante 4 h, a temperatura ambiente. Após duas lavagens com PBS e uma lavagem com água destilada, as preparações foram negativamente contrastadas com acetato de uranila a 2% em água. Para tanto, as preparações foram diluídas na proporção de 1:1 na solução contrastante e aplicadas sobre grades de níquel previamente revestidas com Formvar, sobre a qual foram deixadas por 2 min a temperatura ambiente. O excesso de líquido foi retirado com papel de filtro, e as preparações secas ao ar. As bactérias foram observadas por MET (LEO 906E - BmgH Microsystems Leica, Alemanha) a 80 kV.

3.6.Avaliação da funcionalidade do Fator H ligado às leptospiros

3.6.1. Atividade de cofator

A atividade de cofator de FH ligado à superfície das leptospiros foi avaliada detectando-se a clivagem de C3b mediada pelo Fator I conforme descrito em da Silva *et al.* (2015). As células (5×10^4) foram semeadas e cultivadas até atingirem confluência. Após 72 h de crescimento, o sobrenadante foi coletado e transferido para tubo cônico estéril juntamente com 2×10^9 leptospiros/mL. As leptospiros foram previamente centrifugadas a 10.000 x g, por 10 min a 21°C para remoção do meio EMJH e incubadas a 37°C por 2 h para aquisição de FH produzido pelas células. Como controle, 2×10^9 leptospiros/mL foram incubadas em meio de cultura sem Fator H. Após incubação, foram realizadas cinco lavagens com PBS filtrado para remoção de FH não aderido às bactérias. As leptospiros foram ressuspendidas em PBS e incubadas com 500 ng de C3b purificado (Complement Technology, Inc., EUA) e 250 ng de Fator I (Complement Technology, Inc., EUA). Paralelamente, o sobrenadante das células (92,5 µL) foi incubado com 500 ng de C3b purificado e 250 ng de Fator I purificado (C3b + Fator I +

HK-2) ou apenas com C3b purificado (C3b + HK-2). Como controles foram realizadas incubações com 500 ng de C3b purificado acrescido de PBS (C3b); 500 ng de C3b purificado, 250 ng de Fator I purificado e PBS (C3b + FI); 500 ng de C3b purificado, 250 ng de Fator I purificado, 1 µg de Fator H purificado (Quidel Corp., EUA) e PBS (C3b + Fator H + Fator I). Todas as incubações com moléculas purificadas foram realizadas por 2 h a 37°C. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%) sob condições redutoras. As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose. Após bloqueio com leite desnatado 10 %, as membranas foram incubadas com anti-C3 humano policlonal produzido em cabra, diluído 1:5.000, (Complement Technology, Inc., EUA), e em seguida com anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase 1:10.000 (Complement Technology, Inc., EUA). Os sinais positivos foram detectados por quimiluminescência.

3.6.2. Análise da sobrevivência das bactérias em soro depletado de Fator H

Dados já publicados do nosso grupo mostraram que leptospiras virulentas apresentam baixa taxa de sobrevivência (~30%) em soro humano depletado de Fator H (CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012). A contribuição deste componente, oriundo das células HK-2 e adquirido pelas bactérias mediante incubação com sobrenadante (conforme acima descrito), foi avaliada estimando-se a sobrevivência das leptospiras em soro depletado de Fator H. Para tal, 5×10^7 bactérias foram centrifugadas a $5.000 \times g$, por 10 min a 21°C, para remoção do meio EMJH. Em seguida, o *pellet* foi ressuscitado em 40% de soro humano depletado de Fator H (Complement Technology, Inc., EUA) e suplementado com sobrenadante de células HK-2 (5×10^4 células/mL previamente cultivadas por 72 h). Como controle, 5×10^7 bactérias foram incubadas com 40% de soro depletado e Fator H purificado (50 µg/mL) ou sem Fator H purificado acrescido de PBS. A sobrevivência foi estimada contando-se as bactérias viáveis em câmara de *Petroff-Hausser* utilizando-se microscopia de campo escuro. Para fins de comparação, consideramos a sobrevivência de leptospiras incubadas com Fator H purificado comercial como sendo equivalente a 100%.

3.7. Ativação do sistema complemento no sobrenadante de células HK-2 infectadas com *L. interrogans* sorovar Manilae

3.7.1. Dosagem de C3a

A via alternativa pode ser ativada por lipopolissacarídeos presentes na membrana de várias bactérias. Nesse processo, a cadeia α de C3 é clivada em C3a (~10 kDa) e C3b (~107 kDa). Portanto, a dosagem de C3a no sobrenadante de células HK-2 infectadas com leptospiros permite uma avaliação da ativação do sistema complemento após infecção. Para isso, 5×10^4 células, cultivadas conforme descrito anteriormente, foram infectadas com *L. interrogans* sv. Manilae na MOI de 50:1. Os sobrenadantes foram coletados nos períodos de 0, 24, 48 e 72 h, centrifugados a $10.000 \times g$, 4°C , 10 min, e armazenados em freezer -80°C até o momento do uso. Para dosagem, utilizamos o kit comercial *BD OptEIA Human C3a ELISA* (BD Bioscience) segundo orientações do fabricante.

3.8 Análise de densitometria *ImageJ*

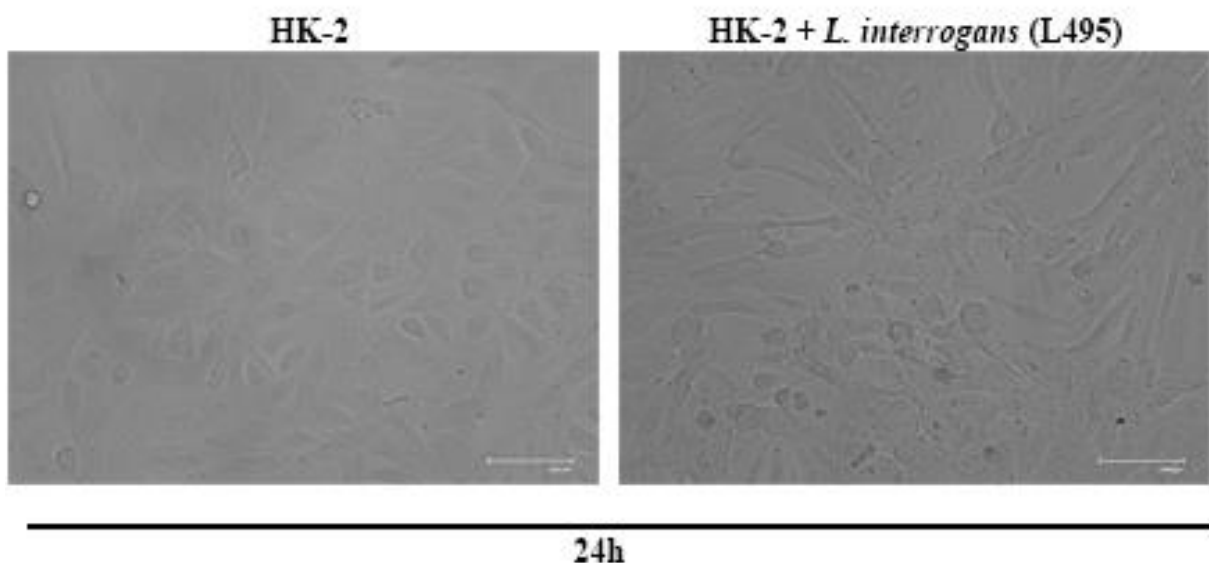
Com o objetivo de realizar análise quantitativa dos componentes do complemento no sobrenadante celular, a intensidade das bandas obtidas no *Western blot* foi quantificada através do software *Image Processing and Analysis in Java (ImageJ)* (RASBAND, 2018). As imagens foram convertidas em 8-bit, e em seguida foram feitas seleção e análise das áreas das bandas, seguindo as orientações do guia de usuário (FERREIRA; RASBAND, 2012). As áreas obtidas foram comparadas com o seu respectivo controle. Para fins de comparação, consideramos arbitrariamente os controles de 24, 48 e 72 h como equivalente a 1. Para avaliar aumento ou diminuição nos diferentes tempos, comparamos os dados obtidos nas infecções com *L. interrogans* com os dados dos controles.

4. RESULTADOS

4.1. Síntese de componentes do complemento por células HK-2

Após a fase de leptospiremia, as leptospiras migram para diversos órgãos e tecidos e se instalam, principalmente, nos túbulos contorcidos proximais renais. Portanto, primeiramente avaliamos se a infecção de células HK-2 com leptospiras poderia induzir maior síntese e liberação de componentes do complemento. Para isso, as células foram cultivadas e infectadas com leptospiras na MOI de 50:1 por 24, 48 ou 72 h. Nota-se uma mudança na morfologia das células infectadas ao longo do tempo, provavelmente relacionada ao processo de transição epitélio-mesenquimal que sofrem em decorrência da infecção por leptospiras (Fig. 7).

Figura 7: Células HK-2 visualizadas em microscópio 24 h após infecção. 5×10^5 células foram cultivadas em duplicata. Uma das réplicas foi infectada com *L. interrogans* sorovar Manilae na MOI de 50:1.

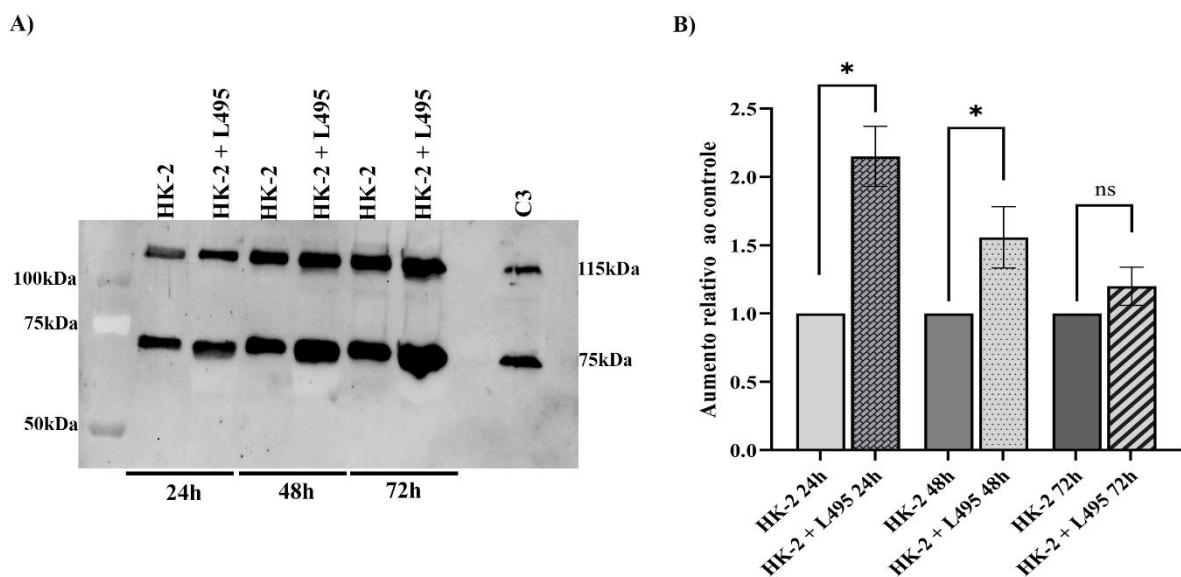


Os sobrenadantes das células foram coletados e analisados por *Western blot*, e as bandas posteriormente quantificadas através do software *ImageJ*. Para comparar a síntese dos componentes em relação aos seus respectivos controles, consideramos arbitrariamente os valores obtidos com os controles (células HK-2 não infectadas) como 1.

A primeira molécula identificada no sobrenadante celular foi C3, componente central da cascata do complemento. O componente C3 possui massa molecular de aproximadamente 190 kDa e é composto pelas cadeias α (~115 kDa) e β (~75 kDa). Em nossos resultados

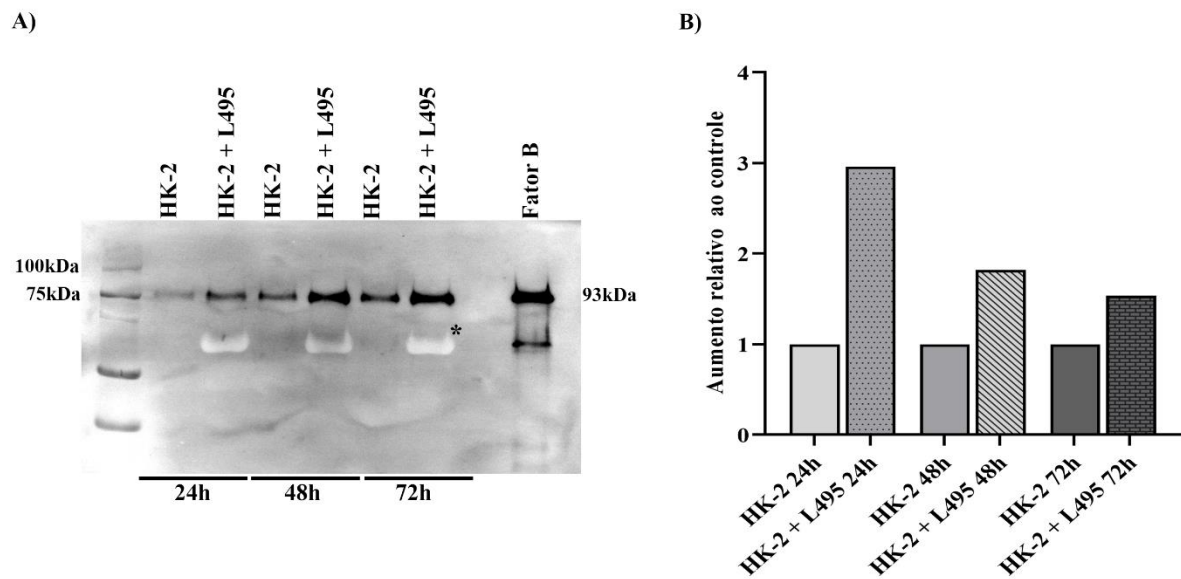
observamos maior produção deste componente nas células infectadas com leptospiras em comparação com seus respectivos controles, principalmente nas primeiras 48 h após infecção (Fig. 8). Portanto, leptospiras elevam a expressão dos níveis de C3 em relação ao basal nestas células renais. A Fig. 8A traz uma imagem representativa de 3 experimentos, e a Fig. 8B é o resultado da quantificação desses 3 experimentos, tendo como base a intensidade das bandas (cadeia β de C3).

Figura 8: Produção de C3 pelas células HK-2. (A) Detecção de C3 no sobrenadante de cultura de células HK-2 infectadas com *L. interrogans* sv. Manilae (L495) ou não infectadas (controle) por *Western blot*. A membrana foi incubada com anti-C3 humano produzido em cabra (1:5000) e anti-IgG de cabra conjugado a peroxidase (1:10.000). As cadeias α (115 kDa) e β (75 kDa) do componente C3 estão indicadas na lateral direita. (B) Análises de densitometria foram realizadas utilizando-se a cadeia β de C3 pelo software *ImageJ*. Dados representam a média de três experimentos. Cada ponto foi comparado ao seu respectivo controle (HK-2), arbitrariamente fixado como 1. * $P \leq 0.05$; ns: não significativo. *Student t test paired*.



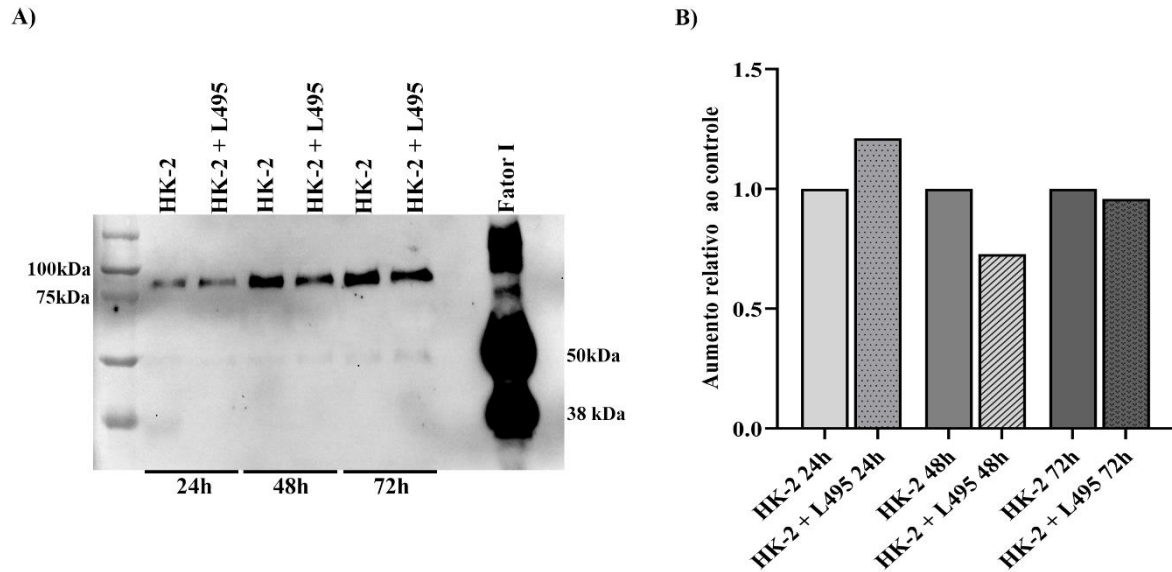
O segundo componente identificado no sobrenadante celular foi Fator B, composto por uma única cadeia polipeptídica com massa molecular de 93 kDa. Fator B é um componente importante da via alternativa pois, uma vez clivado pelo Fator D, permite a formação da C3-convertase. De forma similar a C3, a secreção desta proteína parece ser maior nas células submetidas à infecção em comparação aos seus respectivos controles (Fig. 9). Neste caso, foi realizado um único experimento.

Figura 9: Produção de Fator B pelas células HK-2. (A) Detecção de Fator B no sobrenadante de células HK-2 infectadas com *L. interrogans* sv. Manilae (L495) e não infectadas (controle) por *Western blot*. A membrana foi incubada com anti-Fator B humano produzido em cabra (1:5.000) e anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase (1:10.000). A cadeia polipeptídica de 93 kDa está indicada à direita. O asterisco corresponde à proteína albumina (aprox. 66 kDa) presente no meio EMJH utilizado no cultivo de leptospiras. (B) Análises de densitometria foram realizadas pelo software *ImageJ*. Dados representam apenas 1 experimento. Os pontos foram comparados aos seus respectivos controles (HK-2), arbitrariamente fixados como 1.



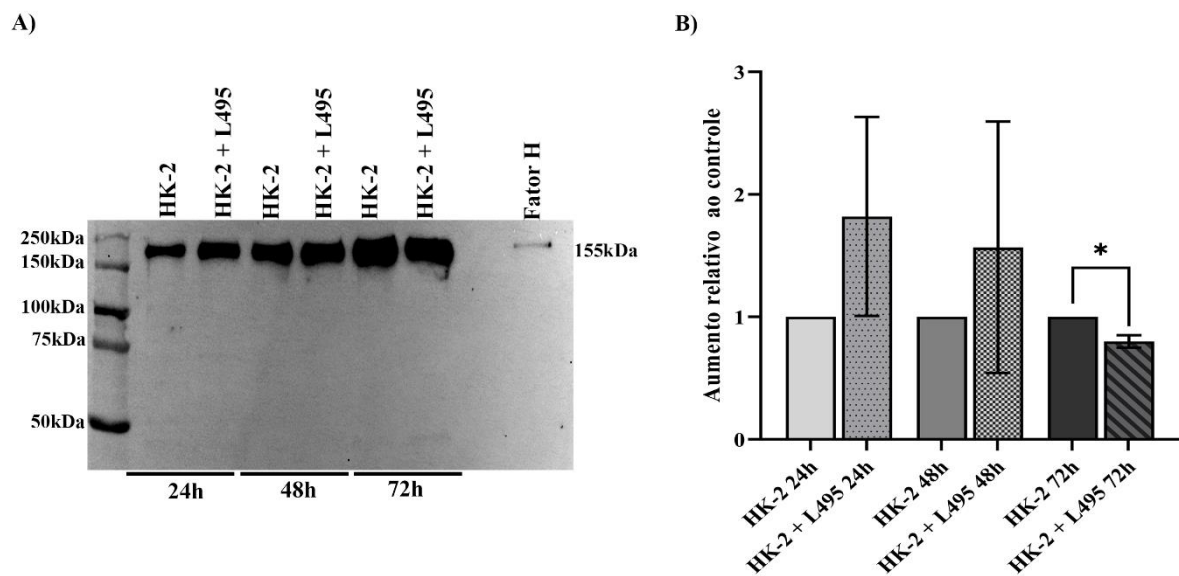
O Fator I é uma molécula com massa molecular de 88 kDa, composta de duas cadeias polipeptídicas de 50 kDa e 38 kDa. Este componente cliva as cadeias alfa de C3b e C4b na presença de Fator H e de C4BP, respectivamente, inativando e impedindo a progressão da cascata do complemento. Nos ensaios com HK-2, a síntese de Fator I aumentou levemente nas primeiras 24 h nas células infectadas em comparação com as células não infectadas. Diferentemente do ocorrido com C3 e Fator B, não houve aumento de expressão em células infectadas x células não-infectadas às 48 e 72 h. Inclusive, a quantidade deste componente nas células infectadas com leptospiras no tempo de 48 h foi menor em comparação às células não infectadas (Fig. 10). Curiosamente, embora a eletroforese tenha sido realizada em condições redutoras, o Fator I produzido pelas células migrou como uma banda única com massa molecular compatível com a soma das cadeias α e β (~88 kDa).

Figura 10: Produção de Fator I pelas células HK-2. (A) Detecção de Fator I no sobrenadante de células HK-2 infectadas com *L. interrogans* sv. Manilae (L495) e não infectadas (controle) por *Western blot*. A membrana foi incubada com anti-Fator I humano produzido em cabra (1:5.000) e anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase (1:10.000). As cadeias α (50 kDa) e β (38 kDa) estão indicadas à direita. (B) Análises de densitometria foram realizadas pelo software *ImageJ*. Dados representam apenas 1 experimento. Os pontos foram comparados aos seus respectivos controles (HK-2), arbitrariamente fixados como 1.



Outra molécula da via alternativa do complemento identificada no sobrenadante celular foi o regulador solúvel Fator H. Este componente possui massa molecular de 155 kDa, com cadeia polipeptídica única. É um importante regulador da via alternativa, pois dissocia a C3 convertase e também atua como cofator para o Fator I, o que leva à formação de iC3b (C3b inativo). Os resultados obtidos mostraram que, embora não seja estatisticamente significativo, parece haver aumento na produção de Fator H nas primeiras 48 h nas células infectadas, comparadas aos respectivos controles. No tempo de 72 h, a situação se inverte, havendo detecção de menores quantidades de Fator H no sobrenadante das células infectadas em comparação às não infectadas (Fig. 11). A Fig. 11A traz uma imagem representativa de 3 experimentos, e a Fig. 11B é o resultado da quantificação desses 3 experimentos.

Figura 11: Produção de Fator H pelas células HK-2. (A) Detecção de Fator H em sobrenadante de células HK-2 infectadas com *L. interrogans* sv. Manilae (L495) e não infectadas (controle) por *Western blot*. A membrana foi incubada com anti-Fator H humano produzido em cabra (1:5.000) e anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase (1:10.000). A cadeia polipeptídica única de 155 kDa do componente é indicada. (B) Análise de densitometria realizada pelo software *ImageJ*. Dados representam a média de três experimentos. Os pontos foram comparados aos seus respectivos controles (HK-2), arbitrariamente fixados como 1. * $P \leq 0.05$; ns: não significativo. *Student test t paired*.



A produção de componentes da via terminal (C5 a C9) e de properdina e Fator D pelas células HK-2 também foi avaliada, mas nenhuma dessas moléculas foi detectada no sobrenadante por *Western blot* (dados não mostrados). Levantamos a hipótese de que a secreção desses componentes pelas células poderia ser ínfima, e, portanto, não poderiam ser identificados por *Western blot*. Assim, avaliamos a expressão gênica de C5, properdina e Fator D pelas células HK-2 por RT-qPCR.

C5 é composto pelas cadeias α (~115 kDa) e β (~75 kDa). É a primeira molécula da via terminal, sendo necessária sua ativação para que a cascata do complemento siga até a formação do MAC. Portanto, avaliamos se as células HK-2, infectadas ou não, expressariam este componente. Os dados de RT-qPCR não foram suficientemente conclusivos, mas são

sugestivos de que talvez não haja expressão de C5 pelas células HK-2. Esses dados deverão ser confirmados.

Visto que as células infectadas produzem maiores quantidades de C3 e Fator B, avaliamos a expressão de Fator D, importante na clivagem de Fator B quando ligado à C3b, e de Properdina, proteína reguladora positiva da via alternativa. Como mostrado na Fig. 12, houve aumento estatisticamente significativo na expressão de Properdina nas células infectadas após 72 h. Embora a expressão de Properdina às 24 h e 48 h após infecção, e a expressão de Fator D (Fig. 13) nos três tempos não sejam estatisticamente significantes é possível afirmar que estes componentes são expressos pelas células HK-2, e pode ser que estejam contribuindo para ativação da via alternativa localmente.

Figura 12: Expressão de Properdina pelas células HK-2. Células HK-2 foram infectadas com *L. interrogans* sv. Manilae e não infectadas (controle). O RNA total foi obtido 24, 48 e 72 h após infecção. A expressão gênica de Properdina foi avaliada por RT-qPCR. Dados representam a média de três experimentos independentes. Todos os pontos foram comparados aos seus respectivos controles (HK-2). * $P \leq 0,05$. *Student t test paired*.

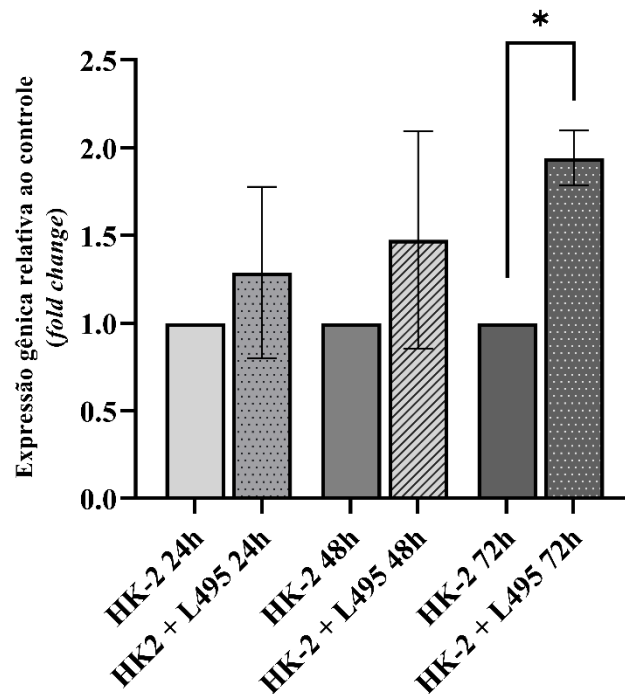
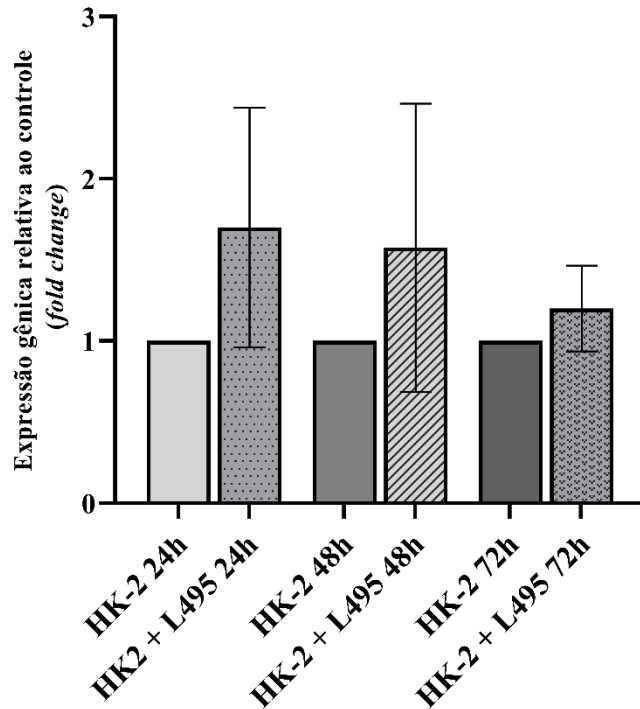


Figura 13: Expressão de Fator D pelas células HK-2. Células HK-2 foram infectadas com *L. interrogans* sv. Manilae e não infectadas (controle). O RNA total foi obtido 24, 48 e 72 h após infecção. A expressão gênica de Fator D foi avaliada por RT-qPCR. Dados representam a média de três experimentos independentes. Todos os pontos foram comparados aos seus respectivos controles (HK-2). *Student t test paired*.

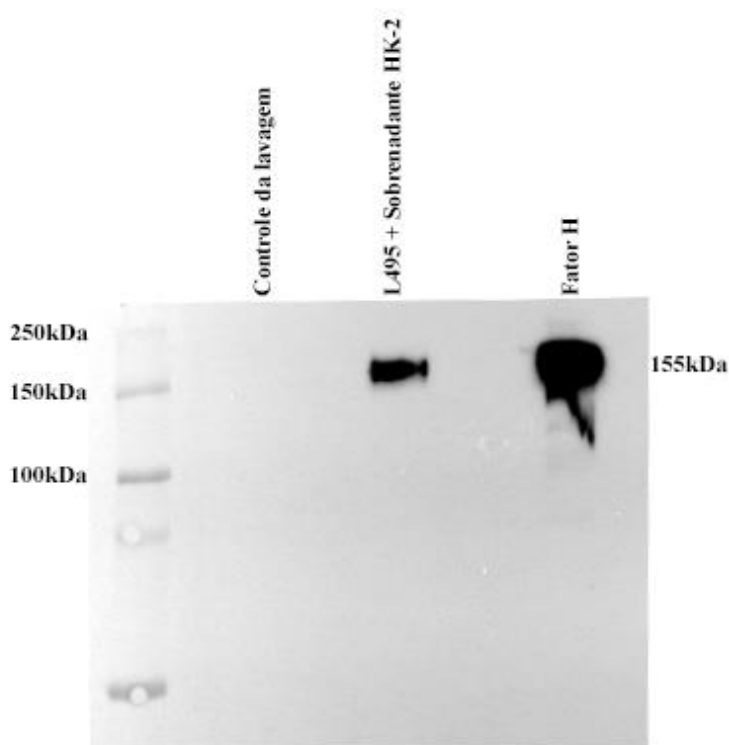


4.2. Aquisição de Fator H proveniente das células HK-2 por *L. interrogans*

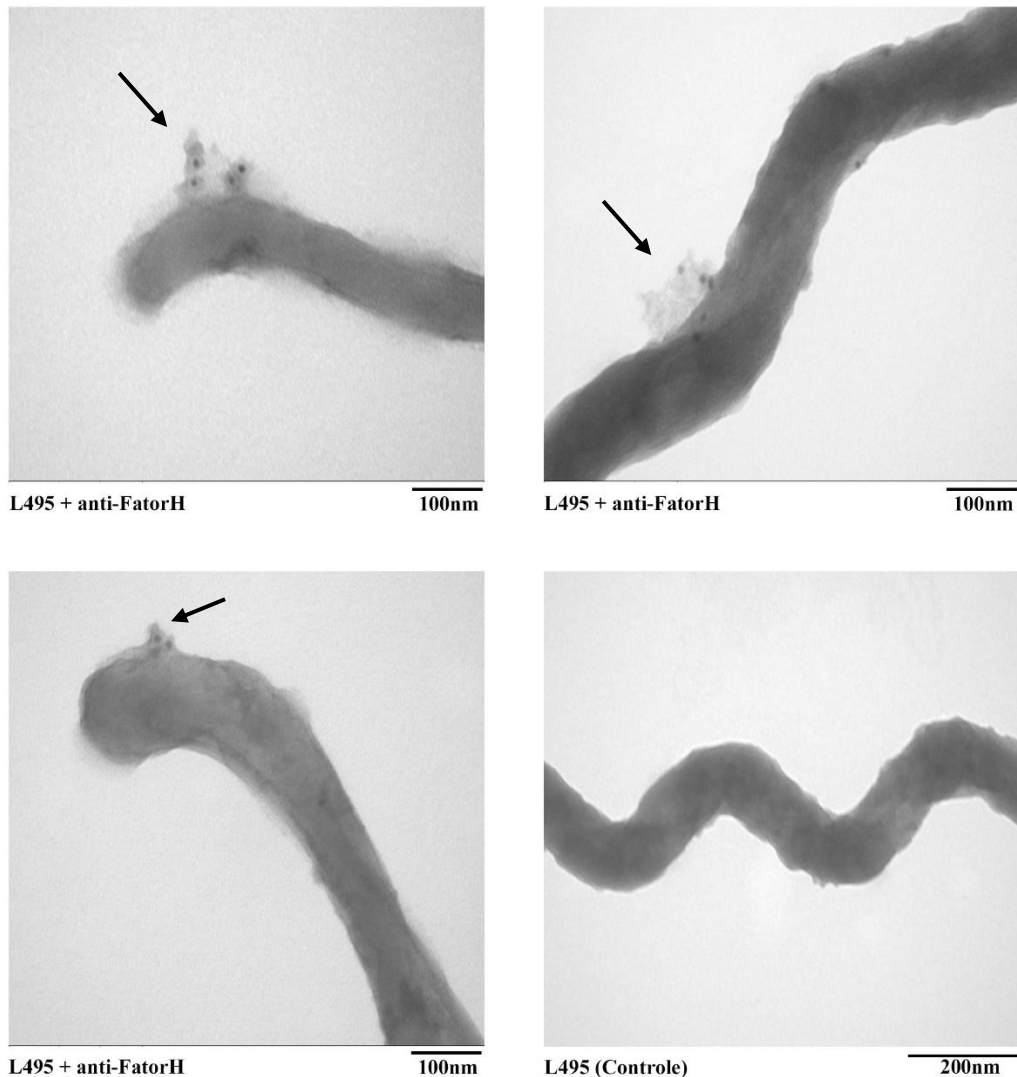
Conforme mostrado na Fig. 11, as células HK-2 sintetizam Fator H, e este é liberado no meio extracelular. É interessante observar que a produção deste regulador solúvel é um pouco maior nas células infectadas durante as primeiras 48 h e que, após 72 h, há uma inversão neste padrão. Sendo assim, levantamos a hipótese de que as leptospiras estariam se ligando ao Fator H secretado pelas células como um mecanismo de evasão ao sistema complemento do hospedeiro, à semelhança do que ocorre quando são incubadas em soro humano como fonte de complemento (MERI et al., 2005; CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012; DA SILVA et al., 2015). As bactérias foram incubadas por 2 h em sobrenadante celular obtido de uma cultura de 72 h. Após a incubação, foram realizadas lavagens com PBS para remoção total de Fator H não aderido à superfície bacteriana. O *pellet* bacteriano foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida, assim como o sobrenadante da última

lavagem, utilizado como controle. O resultado do *Western blot* indica que as leptospiros fizeram aquisição do Fator H produzido pelas células HK-2 (Fig. 14A). Como análise complementar, também foi realizada microscopia eletrônica de transmissão com as leptospiros incubadas em sobrenadante de células HK-2 por 2 h. A seta indica detecção de Fator H aderido à superfície bacteriana (Fig. 14B).

Figura 14: Aquisição de Fator H produzido pelas células HK-2 por leptospiros. (A) *L. interrogans* sv. Manilae foram incubadas com sobrenadante de células HK-2 por 2 h. Após lavagens com PBS, foi realizado *Western blot* sob condições não redutoras. A membrana foi incubada com anti-Fator H humano produzido em cabra (1:5.000) e anti-IgG de cabra conjugado a peroxidase (1:10.000). A cadeia polipeptídica única de 155 kDa do Fator H purificado é indicada à direita. Como controle, foi utilizado sobrenadante da última lavagem. (B) *L. interrogans* sv. Manilae foram incubadas com sobrenadante de células HK-2 por 2 h. Em seguida, as bactérias foram lavadas e fixadas em paraformaldeído a 2%. As leptospiros foram incubadas com anti-Fator H humano produzido em cabra (1:10) e anti-IgG de cabra conjugado com ouro coloidal (1:10). Como controle, as bactérias foram incubadas apenas com o anticorpo secundário. As setas indicam a deposição de Fator H na superfície bacteriana.



A.



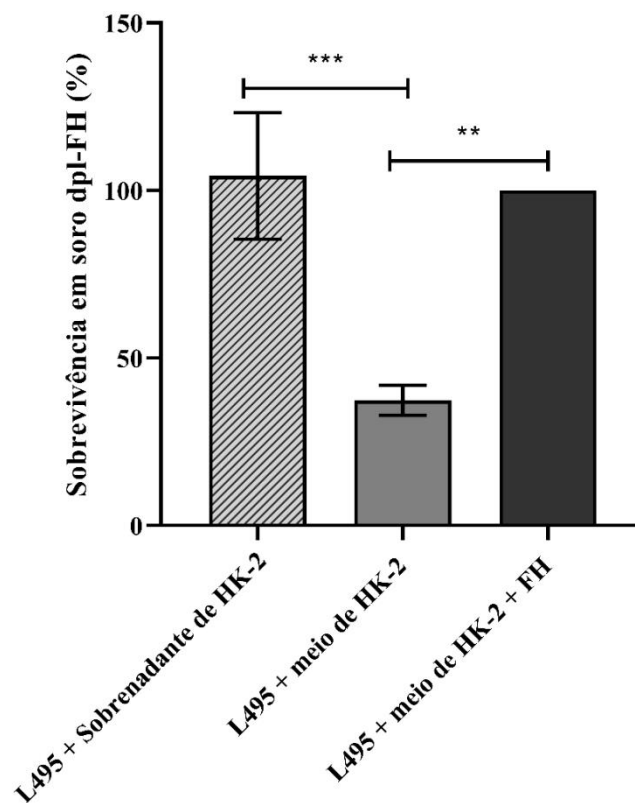
B.

4.3. Funcionalidade do Fator H produzido pelas células HK-2

A seguir, avaliamos a funcionalidade do Fator H produzido pelas células HK-2 e adquirido pelas leptospiras. Para isso, foram realizados dois ensaios. No primeiro, avaliamos se as leptospiras sobreviveriam em soro humano ao se ligarem ao Fator H produzido pelas células HK-2. Para isso, incubamos as leptospiras com sobrenadante celular acrescido de 40% de soro humano depletado de Fator H. Como controles, leptospiras foram incubadas em meio de cultura de células suplementado ou não com Fator H purificado. Após incubação, as bactérias foram contadas em microscópio de campo escuro. O resultado obtido indica que as leptospiras incubadas em sobrenadante celular, e que, portanto, possui Fator H, tiveram maior

taxa de sobrevivência em soro humano comparado às bactérias que foram incubadas em meio sem este componente. A suplementação de Fator H elevou a taxa de sobrevivência das bactérias, que se comparou àquela observada quando se utilizou o sobrenadante celular e soro depletado de Fator H (Fig. 15).

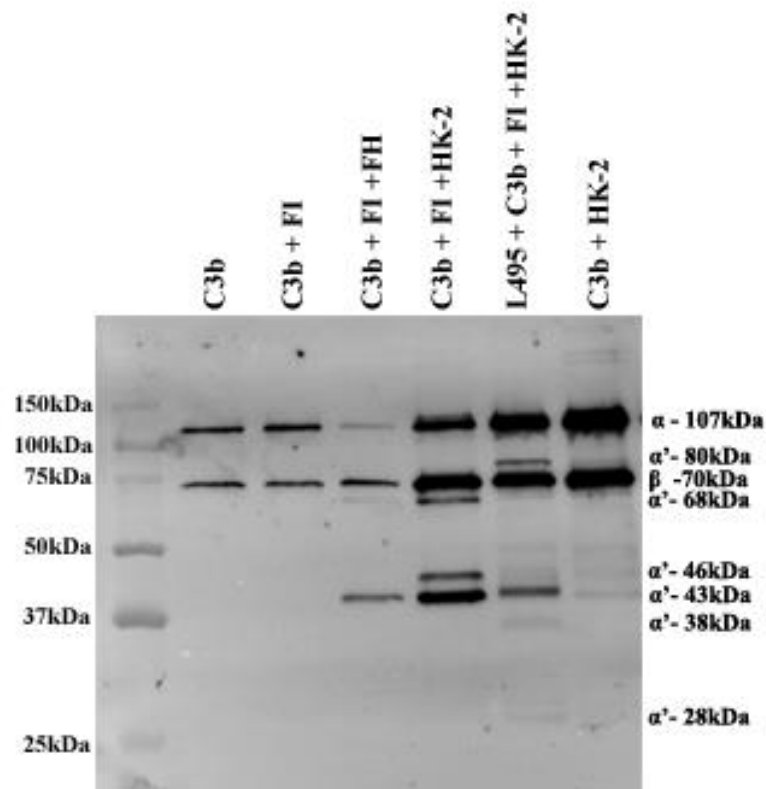
Figura 15: Sobrevivência de *L. interrogans* em soro humano. *L. interrogans* sv. Manilae foram incubadas em sobrenadante de células HK-2, previamente cultivadas por 72 h, acrescidas de 40% de soro humano depletado de Fator H (Complement Technology, Inc., EUA), por 2 h a 37°C. Nos controles, as bactérias foram incubadas em meio de cultura celular acrescido ou não de Fator H purificado. As leptospiras foram contadas em microscópio de campo escuro. Foram realizados três experimentos independentes. ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$. *One-Way ANOVA*.



No segundo ensaio, avaliamos se as leptospiras seriam capazes de utilizar o Fator H adquirido das células HK-2 como cofator para o Fator I clivar C3b. Para isso, inicialmente incubamos as leptospiras com sobrenadante de HK-2 por 2 h. Após lavagens, foram realizadas incubações com C3b e Fator I purificados. Como controle, realizamos uma incubação com Fator H (Quidel), C3b e Fator I purificados, adquiridos comercialmente (Complement Technology, Inc.). As amostras foram submetidas a *Western blot* com anti-C3. Quando C3b é

incubado apenas com Fator I, a molécula permanece intacta. Entretanto, na presença do regulador solúvel Fator H, há clivagem da cadeia α de C3b (Fig. 16). Para avaliar a funcionalidade do Fator H produzido pelas células HK-2, foi realizada incubação de C3b e Fator I com sobrenadante de cultura celular (C3b + FI + HK-2). Neste caso ocorreu clivagem da cadeia α em fragmentos menores de 68, 46 e 43 kDa. Quando leptospiros foram previamente incubadas com sobrenadante de HK-2, C3b foi clivado em fragmentos ainda menores com massas moleculares de 43, 38 e 28 kDa (quinta canaleta, Fig. 16). A degradação de C3b nesta condição resulta tanto da ação de Fator I (tendo Fator H como co-fator) quanto da ação de proteases produzidas pelas bactérias (FRAGA et al., 2014). A incubação de C3b com sobrenadante de células HK-2 não resultou em clivagem substancial da molécula.

Figura 16: Funcionalidade do Fator H produzido pelas células HK-2. Incubações com 500 ng de C3b purificado e PBS (C3b), 500 ng de C3b, 250 ng de Fator I e PBS (C3b + FI), e 500 ng de C3b, 250 ng de Fator I, 1 µg de Fator H purificado e PBS (C3b + FI + FH), foram realizadas como controles. Para avaliar a funcionalidade do Fator H produzido pelas células HK-2 foi realizada incubação com 500 ng de C3b, 250 ng de Fator I e 92,5 µL de sobrenadante celular (C3b + FI + HK-2). Também foi realizada incubação com 500 ng de C3b e 95 µL de sobrenadante celular (C3b + HK-2). Para avaliar atividade de cofator de Fator H ligado à superfície das leptospiros, as bactérias foram previamente incubadas em sobrenadante de células HK-2 por 2 h. Após incubação, foram realizadas lavagens, e as leptospiros foram ressuspensas em PBS com 500 ng de C3b e 250 ng de Fator I (L495 + HK-2 + C3b + FI). Foi realizado *Western blot* das amostras e as membranas foram incubadas com anti-C3 humano produzido em cabra (1:5.000) e anti-IgG de cabra (1:10.000). As cadeias α (107 kDa) e β (70 kDa) de C3b e os produtos de clivagem da cadeia α estão indicados na lateral direita da figura.



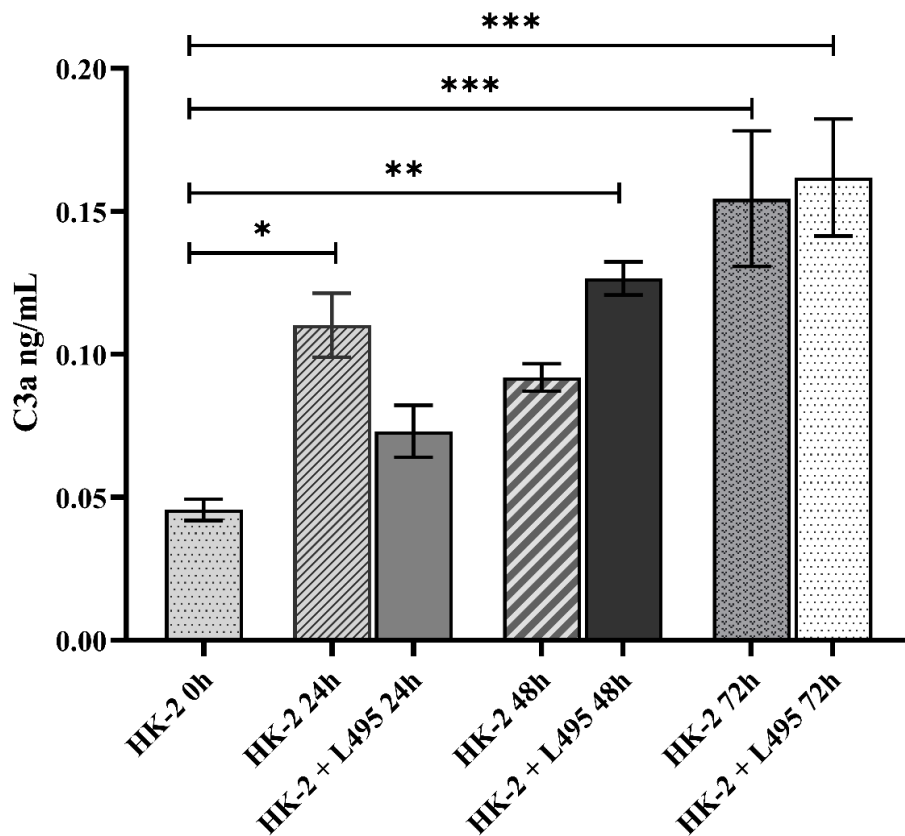
4.4. Ativação da via alternativa nas células HK-2

Como demonstrado anteriormente, as células HK-2 são capazes de produzir maiores quantidades de C3 quando infectadas com *L. interrogans*. Avaliamos, a seguir, se C3 estaria

sendo clivado em C3a e C3b. Para isso, o C3a gerado no sobrenadante de células HK-2 infectadas (ou não) com *L. interrogans* foi quantificado utilizando kit comercial.

Foi possível observar que há aumento significativo na geração de C3a no sobrenadante celular às 48 e às 72 h. Entretanto, curiosamente, às 24 h houve redução de C3a nas células infectadas com *L. interrogans* em comparação com as células não infectadas no mesmo período (geração basal de C3a) (Fig. 17). A nossa hipótese é de que este componente esteja se ligando ao seu receptor C3aR, também expresso em células HK-2, nas primeiras horas após a infecção e, que após este período, haja saturação desses receptores, aumentando a concentração de C3a no sobrenadante celular.

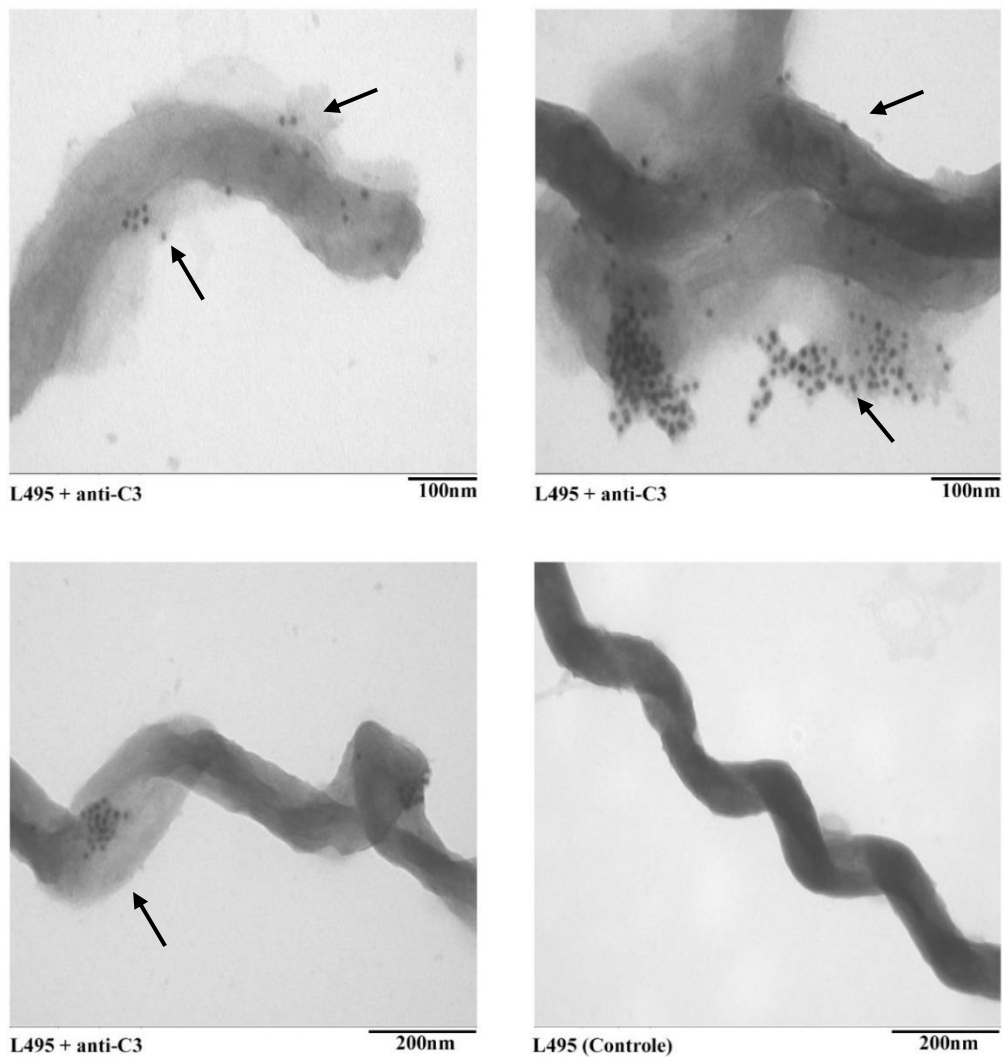
Figura 17: Quantificação de C3a gerado no sobrenadante de células HK-2 infectadas com *L. interrogans*. 5×10^4 células/mL foram cultivadas por até 72 h, infectadas ou não com *L. interrogans* sv. Manilae, em três experimentos independentes. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C até o momento do uso. Para quantificação do C3a gerado, foi utilizado *Human C3a ELISA Kit* (BD Bioscience). * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$. *One-Way ANOVA test*.



4.5. Deposição de C3b em *L. interrogans* sv. *Manilae*

Além da geração de C3a, também foi avaliada a deposição de C3b na superfície bacteriana. C3b é uma importante opsonina resultante da ativação do complemento. Para isso, as leptospiras foram incubadas em sobrenadante de células HK-2 e depois submetidas à microscopia eletrônica de transmissão. Na imagem obtida, pode-se observar claramente a deposição do componente C3b nas leptospiras (Fig. 18).

Figura 18: Deposição de C3b na superfície de *L. interrogans* sv. *Manilae*. *L. interrogans* sv. *Manilae* foram incubadas com sobrenadante de células HK-2 por 2 h. Em seguida, as bactérias foram lavadas e fixadas em paraformaldeído a 2%. As leptospiras foram incubadas com anti-C3 humano produzido em cabra (1:10) e anti-IgG de cabra conjugado com ouro coloidal (1:10). Como controle, as bactérias foram incubadas apenas com o anticorpo secundário.



5. DISCUSSÃO

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo contra microrganismos patogênicos. Dentre os mecanismos que constituem a imunidade inata temos o sistema complemento, composto por proteínas e receptores celulares, que ao serem ativados apresentam atividades inflamatórias, opsônicas e líticas (MORLEY; WALPORT, 1999; ISAAC, 2009; RICKLIN et al., 2010). Dada a importância deste sistema, microrganismos patogênicos desenvolveram mecanismos de evasão ao complemento, como é o caso das leptospiras. O primeiro trabalho que mostrou a capacidade de escape ao sistema complemento por leptospiras foi publicado em 2005 (MERI et al., 2005), embora relatos antigos já demonstrassem maior susceptibilidade de estirpes saprófitas à ação lítica do soro humano (JOHNSON; MUSCHEL, 1966; JOHNSON; HARRIS, 1967). No estudo de Meri *et al.* (2005), correlacionou-se a resistência de leptospiras patogênicas ao soro humano normal à capacidade destas bactérias captarem Fator H do soro.

A síntese dos componentes do complemento é majoritariamente hepática, entretanto, estudos mostram que células renais também são capazes de sintetizar proteínas desta cascata. Células imortalizadas HK-2, provenientes de túbulos contorcidos proximais, têm servido de modelo para estudos *in vitro* envolvendo infecção com *L. interrogans* (TIAN et al., 2006). Sendo assim, investigamos neste trabalho se leptospiras patogênicas teriam a capacidade de inativar o sistema complemento no ambiente renal e se este mecanismo poderia contribuir para sua persistência neste órgão.

Para isso, inicialmente avaliamos se as células HK-2 também produziram componentes da via terminal do complemento (C5 a C9), além de Properdina, principal regulador positivo da via alternativa. Em nossas análises por *Western blot* com sobrenadante celular identificamos os componentes C3, Fator B, Fator I e Fator H, como esperado. Foi possível observar maior síntese de Fator H ao longo do tempo, porém observamos que às 72h após a infecção houve diminuição deste componente nas células infectadas comparadas às não infectadas. Levantamos a hipótese de que este componente poderia estar se ligando às leptospiras. Portanto, avaliamos a aquisição deste componente pelas bactérias por *Western blot* e MET, incubando-as com sobrenadante celular, e foi possível detectar Fator H na membrana das leptospiras. Algumas proteínas de membrana externa de leptospiras já foram descritas como ligantes de Fator H como LenA, LigA/LigB e LcpA (STEVENSON et al., 2007; CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012; DA SILVA et al., 2015). A aquisição de

Fator H pelas leptospiras contribui para sua sobrevivência, como já descrito em Meri *et al.*, (2005). Portanto, avaliamos a funcionalidade do Fator H produzido pelas células HK-2 e adquirido pelas leptospiras. Nossos resultados mostraram que as bactérias, quando incubadas previamente com sobrenadante celular, apresentaram maior taxa de sobrevivência em soro depletado de Fator H em relação àquelas incubadas em meio sem este componente. Além disso, o Fator H produzido pelas células e captado pelas leptospiras se mostrou funcional, sendo capaz de inativar C3b na presença de Fator I, corroborando os resultados encontrados por Castiblanco-Valencia *et al.* (2012).

Embora tenham sido identificados os componentes C3, Fator B e Fator I nos sobrenadantes de cultura das células HK-2, não foram detectados C5, Fator D e Properdina por *Western blot*. Com base em nossos resultados, levantamos duas hipóteses a respeito dos componentes da via terminal do complemento. A primeira refere-se à possibilidade de as células HK-2 produzirem uma quantidade ínfima destas moléculas, que não seriam detectadas pela técnica utilizada, uma vez que a concentração destes componentes já é fisiologicamente baixa na circulação (ISAAC, 2009). Dessa forma, a expressão de C5 em células HK-2 foi avaliada por PCR quantitativo em tempo real. Os resultados são sugestivos de que não haja expressão do gene pelas células, mesmo quando submetidas à infecção. Em função deste dado, os demais componentes da via terminal não foram avaliados. Por outro lado, observamos que há expressão de Properdina e de Fator D nas células infectadas com leptospiras, seguindo o padrão do que foi observado para os demais componentes da via alternativa.

A segunda hipótese seria de que os componentes da via terminal chegam ao tecido renal através de células mononucleares e polimorfonucleares, atraídas por quimiocinas liberadas no processo infeccioso. Hung *et al.*, (2006) demonstraram que lipoproteínas presentes na membrana externa de leptospiras induzem maior síntese de CXCL1/KC em células epiteliais renais. Trabalhos publicados mostram que monócitos e macrófagos são capazes de produzir componentes do complemento, como C2, C3, C4, C5, Fator B, Fator D e properdina (DE CEULAER; PAPAZOGLU; WHALEY, 1980; MCPHADEN; WHALEY, 1993; LUBBERS *et al.*, 2017). Além disso, Camussi *et al.* (1983) mostraram que a borda em escova dos túbulos contorcidos proximais é capaz de ativar a via alternativa quando incubada com soro humano normal. Já Brenchley *et al.* (1992) mostraram a presença de C3dg, produto de clivagem de C3, e o complexo C5b-9 na urina de pacientes com proteinúria decorrente de nefropatias.

Também foi possível observar que quando submetidas à infecção com leptospiras, as células HK-2 apresentaram maior produção de C3 e Fator B. Conforme apresentado, houve maior detecção de C3 no sobrenadante celular entre 48 e 72 h de infecção. É interessante observar que a presença destes componentes pode favorecer a formação da C3-convertase da via alternativa uma vez que C3 está sendo clivado em C3a e C3b.

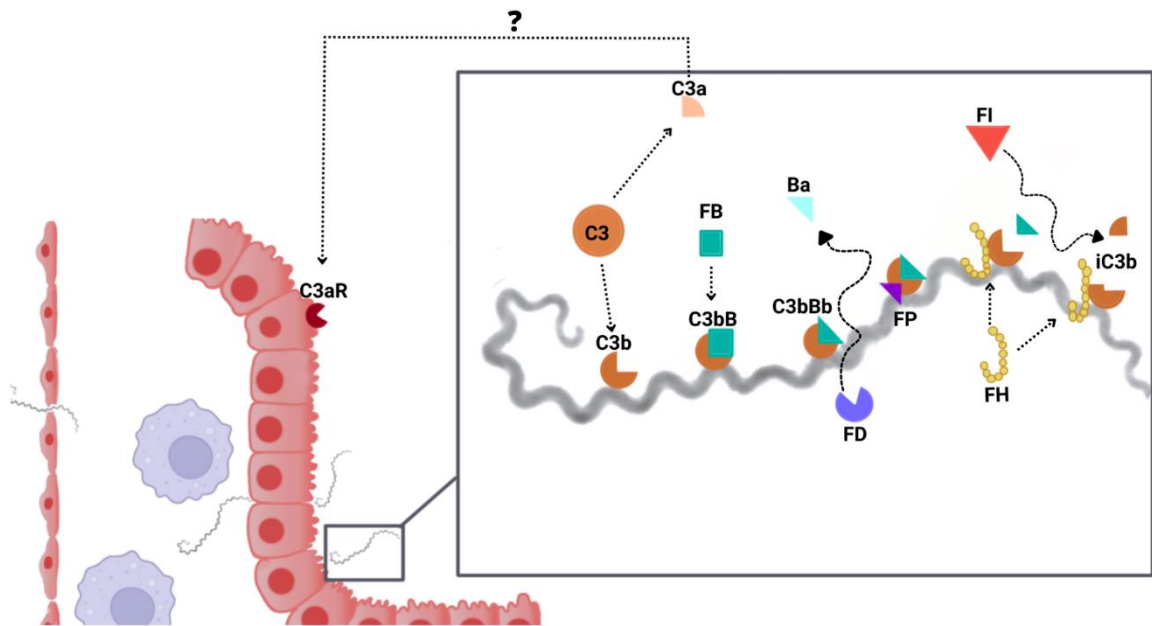
C3a e C5a são importantes anafilatoxinas que promovem respostas pró-inflamatórias quando interagem com seus respectivos receptores. Já se sabe que células do epitélio renal expressam receptores para C3a (C3aR) e que a ativação deste receptor também permite expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, TNF- α e TGF- β (PEAKE et al., 1999), que podem levar a danos no tecido renal, resultando em um processo fibrótico (PRADO; BARBOSA, 2021). Em um trabalho publicado por Liu *et al.*, (2011) foi demonstrado que células HK-2 quando incubadas com C3a e C5a por 72 h mostraram alterações morfológicas e perda de microvilosidades na superfície celular. Os autores também observaram que houve maior expressão de α -SMA, E-caderina e TGF- β . Em nossos ensaios, foi possível observar mudanças morfológicas nas células HK-2 quando submetidas à infecção com leptospiras. Portanto, levando em consideração a possível ativação da via alternativa e as mudanças morfológicas visualizadas, quantificamos a geração de C3a no sobrenadante de células HK-2 ao longo das 72 h. Notavelmente, houve maior geração deste componente ao longo das 72h, confirmando a hipótese de ativação da via alternativa localmente. Porém, curiosamente, observamos que houve menor detecção de C3a no sobrenadante celular obtido às 24 h nas células infectadas. Nossa hipótese é de que este componente estaria se ligando ao seu receptor C3aR, e que ao longo do tempo, ocorra saturação deste receptor, levando à maior detecção deste componente livre no sobrenadante celular, corroborando o aumento de C3 visto anteriormente.

Visto que houve maior geração de C3a e que, portanto, está ocorrendo ativação local, investigamos se o componente C3b deposita-se covalentemente na superfície das leptospiras. Com base nas imagens de microscopia eletrônica, foi possível observar a deposição deste componente, também corroborando a ativação inicial da cascata do complemento. No entanto, como demonstrado no ensaio de cofator, é possível que C3b seja inativado por Fator I na presença de Fator H, uma vez que ambos reguladores também são secretados pelas células HK-2 e o Fator H capturado pelas leptospiras. Vale lembrar que na MET foi utilizado anticorpo policlonal, capaz de detectar também a forma inativa de C3b, o iC3b.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho investigamos se as células renais produzem componentes da via alternativa do complemento e se a síntese destes componentes é induzida em virtude da infecção por *L. interrogans*. Em nossos resultados, constatamos que leptospiros se ligam ao Fator H localmente, produzido por células HK-2, e a atividade de cofator deste regulador permanece ativa, levando à inativação de C3b na presença de Fator I. Portanto, as bactérias podem, em teoria, inativar a via alternativa localmente. No entanto, não parece haver produção de C5 da via terminal pelas células HK-2, impossibilitando a lise de leptospiros por deposição de MAC, o que poderia justificar sua permanência nos túbulos renais. Entretanto, especula-se que moléculas da via terminal possam chegar aos túbulos contorcidos proximais por outras fontes. Caso isto ocorra, leptospiros teriam mecanismos de impossibilitar a progressão da cascata, pela via alternativa, mediante aquisição de Fator H. Por outro lado, a via alternativa do sistema complemento é ativada localmente durante a infecção e os produtos desta ativação, como C3a, podem levar à ativação de vias pró-inflamatórias e contribuir para o desenvolvimento da nefrite intersticial aguda e posterior fibrose renal. A interação C3a-C3aR deverá ser melhor investigada, avaliando-se suas consequências localmente. O modelo de interação de leptospiros patogênicos com componentes do sistema complemento no ambiente renal encontra-se na Figura 19.

Figura 19: Modelo de interação de leptospiras patogênicas com componentes da via alternativa do sistema complemento no ambiente renal. Leptospiras migram dos capilares peritubulares para o interstício e lúmen tubular. Ao translocarem para os túbulos contorcidos proximais, se aderem à borda em escova do epitélio tubular. A presença de leptospiras estimula maior síntese de componentes da via alternativa do complemento. C3 secretado pelas células é clivado gerando C3a, que pode se ligar a seu receptor C3aR, e C3b liga-se à membrana da bactéria. Fator B se liga à C3b e é clivado pelo Fator D, gerando C3-convertase, que cliva mais moléculas de C3 em C3a e C3b. Leptospiras também se ligam ao Fator H, contribuindo para a inativação de C3b por Fator I. FD: Fator D; FI: Fator I; FB: Fator B; FH: Fator H; FP: Properdina.



Fonte: Santos, C. M. (2023)

7. REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3–4, p. 287–296, 2010.
- AMAMURA, T. A. et al. Pathogenic Leptospira Secreted Proteases Target the Membrane Attack Complex : A Potential Role for Thermolysin in Complement Inhibition. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. May, p. 1–16, 2017.
- BARBOSA, A.; ISAAC, L. Complement Immune Evasion by Spirochetes. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 415, p. 215–238, 2018.
- BARBOSA, A. S. et al. Immune evasion of Leptospira species by acquisition of human complement regulator C4BP. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 3, p. 1137–1143, 2009.
- BARNETT, J. K. et al. Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 2, p. 853–861, 1999.
- BARNUM, S. R. C4b-Binding protein, a regulatory protein of complement. **Immunologic Research**, v. 10, n. 1, p. 28–42, 1991.
- BARNUM, S. R. C4a: An Anaphylatoxin in Name only. **Journal of Innate Immunity**, v. 7, n. 4, p. 333–339, 2015.
- BAUDINO, L. et al. C3 opsonization regulates endocytic handling of apoptotic cells resulting in enhanced T-cell responses to cargo-derived antigens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 4, p. 1503–1508, 2014.
- BJANES, E.; NIZET, V. More than a Pore: Nonlytic Antimicrobial Functions of Complement and Bacterial Strategies for Evasion. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 85, n. 1, p. 1–27, 2021.
- BOHLSON, S. S. et al. Complement nomenclature-deconvoluted. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. JUN, p. 1–6, 2019.

BRENCHLEY, P. E. et al. Urinary C3dg and C5b-9 indicate active immune disease in human membranous nephropathy. **Kidney International**, v. 41, n. 4, p. 933–937, 1992.

BUBECK, D. The making of a macromolecular machine: Assembly of the membrane attack complex. **Biochemistry**, v. 53, n. 12, p. 1908–1915, 2014.

CAIMI, K.; RUYBAL, P. *Leptospira* spp., a genus in the stage of diversity and genomic data expansion. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 81, n. August 2019, p. 104241, 2020.

CAMUSSI, G. et al. The Brush Border of Proximal Tubules of Normal Human Kidney Activates the Alternative Pathway of the Complement System In Vitro. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 420, n. 1, p. 321–324, 1983.

CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M. et al. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 6, p. 995–1004, 2012.

CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M. et al. Plasmin cleaves fibrinogen and the human complement proteins C3b and C5 in the presence of *Leptospira interrogans* proteins: A new role of LigA and LigB in invasion and complement immune evasion. **Immunobiology**, v. 221, n. 5, p. 679–689, 2016.

CHURA-CHAMBI, R. M. et al. *Leptospira interrogans* thermolysin refolded at high pressure and alkaline pH displays proteolytic activity against complement C3. **Biotechnology Reports**, v. 19, p. e00266, 2018.

COSTA, F. et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 0–1, 2015.

DA SILVA JUNIOR, G. et al. Acute kidney injury in leptospirosis: Overview and perspectives. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 11, n. 10, p. 549–554, 2018.

DA SILVA, L. B. et al. Pathogenic *Leptospira* species acquire factor H and vitronectin via the surface protein LcpA. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 3, p. 888–897, 2015.

DAFFERN, P. J. et al. C3a Is a Chemotaxin for Human Eosinophils but Not for Neutrophils. I. C3a Stimulation of Neutrophils Is Secondary to Eosinophil Activation. **J. Exp. Med.**, v. 181, p. 2119–2127, 1995.

DE BRITO, T.; SILVA, A. M. G. da; ABREU, P. A. E. Pathology and pathogenesis of human leptospirosis: a commented review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 60, n. January, p. 1–10, 2018.

DE CEULAER, C.; PAPAZOGLU, S.; WHALEY, K. Increased biosynthesis of complement components by cultured monocytes, synovial fluid macrophages and synovial membrane cells from patients with rheumatoid arthritis. **Immunology**, v. 41, n. 1, p. 37–43, 1980.

DE FARIA, M. T. et al. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 108, n. 1, p. 1–5, out. 2008.

DUNCAN, A. R.; GREG, W. The binding site for C1q on IgG. **Nature**, v. 332, p. 738–740, 1988.

DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W. C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell Research**, v. 20, n. 1, p. 34–50, 2010.

EHRENGRUBER, M. U.; GEISER, T.; DERANLEAU, D. A. Activation of human neutrophils by C3a and C5A Comparison of the effects on shape changes, chemotaxis, secretion, respiratory burst. **FEBS letters**, v. 346, p. 181–184, 1994.

ESTEVEZ, L. M. et al. Diagnosis of Human Leptospirosis in a Clinical Setting: Real-Time PCR High Resolution Melting Analysis for Detection of *Leptospira* at the Onset of Disease. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 9213, 2018.

FEARON, D. T.; AUSTEN, K. F. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b dependent C3 convertase. **Journal of Experimental Medicine**, v. 142, n. 4, p. 856–863, 1975.

FERREIRA, T.; RASBAND, W. **ImageJ User Guide**, 28 jul. 2012. . Disponível em: <<https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/user-guide.pdf>>.

FIJEN, C. A. P. et al. Assessment of complement deficiency in patients with meningococcal disease in the Netherlands. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, n. 1, p. 98–105, 1999.

FORNERIS, F. et al. Structures of C3b in complex with factors B and D give insight into complement convertase formation. **Science**, v. 330, n. 6012, p. 1816–1820, 2010.

FRAGA, T. R. et al. Immune Evasion by Pathogenic *Leptospira* Strains: The Secretion of Proteases that Directly Cleave Complement Proteins. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 6, p. 876–886, 15 mar. 2014.

GARRED, P. et al. A journey through the lectin pathway of complement—MBL and beyond. **Immunological Reviews**, v. 274, n. 1, p. 74–97, 2016.

GERRITSMA, J. S. J. et al. Interleukin-1 α enhances the biosynthesis of complement C3 and factor B by human kidney proximal tubular epithelial cells in vitro. **Molecular Immunology**, v. 33, n. 10, p. 847–854, 1996.

GIGLI, I.; FUJITA, T.; NUSSENZWEIG, V. Modulation of the classical pathway C3 convertase by plasma proteins C4 binding protein and C3b inactivator. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 12, p. 6596–6600, 1 dez. 1979.

GORIS, M. G. A.; HARTSKEERL, R. A. Leptospirosis Serodiagnosis by the Microscopic Agglutination Test. **Curr Protoc Microbiol**, v. 32, p. Unit 12E.5.-Unit 12E.5., 2014.

HAAKE, D. A. et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 4, p. 2276–2285, 2000.

HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N. Leptospirosis in Humans. In: **Veterinary Microbiology**. [s.l: s.n.]387p. 65–97.

HUNG, C.-C. et al. Upregulation of Chemokine CXCL1/KC by Leptospiral Membrane

Lipoprotein Preparation in Renal Tubule Epithelial Cells. **Kidney Int**, v. 69, n. 10, p. 1814–1822, 2006.

ISAAC, L. Sistema Complemento. In: **Imunologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter, 2009. p. 95–112.

JOHNSON, R. C.; HARRIS, V. G. Antileptospiral Activity of Serum IL. Leptospiral Virulence Factor. **Journal of bacteriology**, v. 93, n. 2, p. 513–519, 1967.

JOHNSON, R. C.; MUSCHEL, L. H. Antileptospiral Activity of Serum. I. Normal and Immune Serum. **Journal of bacteriology**, v. 91, n. 4, p. 1403–1409, abr. 1966.

KHARAZMI, A. Mechanisms involved in the evasion of the host defence by *Pseudomonas aeruginosa*. **Immunology Letters**, v. 30, n. 2, p. 201–205, 1991.

KLOS, A. et al. The role of the anaphylatoxins in health and disease. **Molecular Immunology**, v. 46, n. 14, p. 2753–2766, 2009.

LACHMANN, P. J.; HUGHES-JONES, N. C. Initiation of complement activation. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 7, n. 2–3, p. 143–162, 1984.

LAMBERT, A. et al. Fla proteins in *Leptospira interrogans* are essential for motility and virulence but are not required for formation of the flagellum sheath. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 6, p. 2019–2025, 2012.

LAMBRIS, J. D. et al. Dissection of CR1, factor H, membrane cofactor protein, and factor B binding and functional sites in the third complement component. **The Journal of Immunology**, v. 156, n. 12, p. 4821–4832, 15 jun. 1996.

LENTZ, E. K. et al. Differential response of the human renal proximal tubular epithelial cell line HK-2 to shiga toxin types 1 and 2. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 9, p. 3527–3540, 2011.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **American Society for Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 296–326, 2001.

- LI, S. et al. *Leptospira interrogans* infection leads to IL-1 β and IL-18 secretion from a human macrophage cell line through reactive oxygen species and cathepsin B mediated-NLRP3 inflammasome activation. **Microbes and Infection**, v. 20, n. 4, p. 254–260, 2018.
- LIU, F. et al. Effect of anaphylatoxin C3a, C5a on the tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro. **Chinese Medical Journal**, v. 124, n. 23, p. 4039–4045, 2011.
- LIU, Y. et al. Human M-Ficolin Is a Secretory Protein That Activates the Lectin Complement Pathway. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 5, p. 3150–3156, 1 set. 2005.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2 $^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.
- LUBBERS, R. et al. Production of complement components by cells of the immune system. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 188, n. 2, p. 183–194, 2017.
- MARSHALL, R. B. The Route of Entry of Leptospire Into the Kidney Tubule. **J. Med. Microbiol.**, v. 9, 1976.
- MARTINS, M. H. da M.; SPINK, M. J. P. A leptospirose humana como doença duplamente negligenciada no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, n. 3, p. 919–928, mar. 2020.
- MATSUSHITA, M. et al. Activation of the Lectin Complement Pathway by H-Ficolin (Hakata Antigen). **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 7, p. 3502–3506, 1 abr. 2002..
- MATSUSHITA, M.; ENDO, Y.; FUJITA, T. Cutting Edge: Complement-Activating Complex of Ficolin and Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 5, p. 2281–2284, 1 mar. 2000.
- MCBRIDE, A. J. A. et al. Leptospirosis: current opinion in infectious diseases. **Curr Opin Infect Dis**, v. 18, p. 376–386, 2005.
- MCPHADEN, A. R.; WHALEY, K. **Complement biosynthesis by mononuclear phagocytes** *Immunologic Research*, 1993. .

MERI, T. et al. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospire. **Microbial Pathogenesis**, v. 39, n. 4, p. 139–147, out. 2005.

MERLE, N. S. et al. Complement system part I - molecular mechanisms of activation and regulation. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. JUN, p. 1–30, 2015.

MISASI, R. et al. Human complement factor H: An additional gene product of 43kDa isolated from human plasma shows cofactor activity for the cleavage of the third component of complement. **European Journal of Immunology**, v. 19, n. 9, p. 1765–1768, 1989.

MONAHAN, A. M.; CALLANAN, J. J.; NALLY, J. E. Proteomic Analysis of *Leptospira interrogans* Shed in Urine of Chronically Infected Hosts. v. 76, n. 11, p. 4952–4958, 2008.

MORLEY, B. J.; WALPORT, M. J. **The Complement FactsBook**. 1. ed. Lodon: Academic Press, 1999.

MÜLLER-EBERHARD, H. J. The membrane attack complex of complement. **Annual review of immunology**, v. 4, p. 503–528, 1986.

MURAKAMI, Y.; IMAMICHI, T.; NAGASAWA, S. Characterization of C3a anaphylatoxin receptor on guinea-pig macrophages. **Immunology**, v. 79, n. 4, p. 633–8, 1993.

MURRAY, G. L. et al. Mutations Affecting *Leptospira Interrogans* Lipopolysaccharide Attenuate Virulence. **Mol Microbiol**, v. 78, n. 3, p. 701–709, 2010.

NAHORI, M.-A. et al. Differential TLR Recognition of Leptospiral Lipid A and Lipopolysaccharide in Murine and Human Cells. **J Immunol**, v. 175, n. 9, p. 6022–6031, 2005.

NAUTA, A. J. et al. Opsonization with C1q and Mannose-Binding Lectin Targets Apoptotic Cells to Dendritic Cells. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 5, p. 3044–3050, 2004.

PANGBURN, M. K.; MÜLLER-EBERHARD, H. J. Initiation of the alternative complement pathway due to spontaneous hydrolysis of the thioester of c3. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 421, n. 1 Chemistry and, p. 291–298, dez. 1983.

PANGBURN, M. K.; SCHREIBER, R. D.; MÜLLER-EBERHARD, H. J. Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. **Journal of Experimental Medicine**, v. 154, n. 3, p. 856–867, 1 set. 1981.

PEAKE, P. W. et al. C3a is made by proximal tubular HK-2 cells and activates them via the C3a receptor. **Kidney International**, v. 56, p. 1729–1736, 1999.

PICARDEAU, M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: Still terra incognita? **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 297–307, 2017.

PICARDEAU, M.; BRENOT, A.; SAINT GIRONS, I. First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. Inactivation of *L. biflexa* *flaB* results in non-motile mutants deficient in endoflagella. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 189–199, 2001.

PRADO, L. G.; BARBOSA, A. S. Understanding the renal fibrotic process in leptospirosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 19, p. 1–21, 2021.

RASBAND, W. **ImageJ**. Bethesda, Maryland, USA, 2018. Disponível em: <<https://imagej.nih.gov/ij/>>.

RATET, G. et al. Live Imaging of Bioluminescent *Leptospira* interrogans in Mice Reveals Renal Colonization as a Stealth Escape from the Blood Defenses and Antibiotics. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, 2014.

RATET, G. et al. LipL21 Lipoprotein Binding to Peptidoglycan Enables *Leptospira* Interrogans to Escape NOD1 and NOD2 Recognition. **PLoS Pathog**, v. 13, n. 12, p. e1006725–e1006725, 2017.

REIS, E. A. G. et al. Cytokine Response Signatures in Disease Progression and Development of Severe Clinical Outcomes for Leptospirosis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 9, p. e2457–e2457, 2013.

RICKLIN, D. et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nat. Immunol**, v. 11, n. 9, p. 785–797, 2010.

RISTOW, P. et al. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. **Microbiology**, v. 154, n. 5, p. 1309–1317, 1 maio 2008.

ROMERO, E. C.; BERNARDO, C. C. da M.; YASUDA, P. H. Human Leptospirosis: A Twenty-Nine-Year Serological Study in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 45, n. 5, p. 245–248, 2003.

RYAN, M. J. et al. HK-2: An immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. **Kidney International**, v. 45, n. 1, p. 48–57, 1994.

SACKS, S. et al. C3 and C4 gene expression and interferon-gamma-mediated regulation in human glomerular mesangial cells. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 93, n. 3, p. 411–417, 1993.

SALAZAR, N. et al. The multifaceted roles of *Leptospira* enolase. **Research in Microbiology**, v. 168, n. 2, p. 157–164, 2017.

SANTOS, A. A. N. et al. *Leptospira interrogans* biofilm formation in *Rattus norvegicus* (Norway rats) natural reservoirs. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 9, p. e0009736, 8 set. 2021.

SARKAR, U. et al. Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. **Am J Trop Med Hyg**, v. 66, n. 5, p. 605–610, 2002.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 5 jun. 2008.

SEBASTIÁN, I. et al. Disassembly of the apical junctional complex during the transmigration of *Leptospira interrogans* across polarized renal proximal tubule epithelial cells. **Cellular Microbiology**, p. 1–17, 2021.

SIQUEIRA, G. H. et al. The role of Lsa23 to mediate the interaction of *Leptospira interrogans* with the terminal complement components pathway. **Microbial Pathogenesis**, v. 112, p. 182–189, 2017.

SITPRIJA, V. et al. Pathogenesis of renal disease in leptospirosis: Clinical and experimental studies. **Kidney International**, v. 17, n. 6, p. 827–836, 1980.

SITPRIJA, V. Renal Dysfunction in Leptospirosis: A View from the Tropics. **Nat Clin Pract Nephrol**, v. 2, n. 12, p. 658–659, 2006.

STEVENSON, B. et al. Leptospira Interrogans Endostatin-like Outer Membrane Proteins Bind Host Fibronectin, Laminin and Regulators of Complement. **PloS one**, v. 2, n. 11, p. e1188, nov. 2007.

SYKES, J. E. et al. Role of Diagnostics in Epidemiology, Management, Surveillance, and Control of Leptospirosis. **Pathogens**, v. 11, n. 4, p. 1–24, 2022.

TAHARA, H. et al. The mechanism of two-phase motility in the spirochete Leptospira: Swimming and crawling. **Science Advances**, v. 4, n. 5, p. 1–7, 2018.

TANG, Z. et al. C3a Mediates Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Proteinuric Nephropathy. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, n. 3, p. 593–603, mar. 2009.

THIELENS, N. M. et al. Interaction Properties of Human Mannan-Binding Lectin (MBL)-Associated Serine Proteases-1 and -2, MBL-Associated Protein 19, and MBL. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 8, p. 5068–5077, 15 abr. 2001.

TIAN, Y.-C. et al. Leptospiral Outer Membrane Protein Induces Extracellular Matrix Accumulation through a TGF-Beta1/Smad-Dependent Pathway. **J Am Soc Nephrol**, v. 17, n. 10, p. 2792–2798, 2006.

VAN DEN DOBBELSTEEN, M. E. A. et al. Regulation of C3 and factor H synthesis of human glomerular mesangial cells by IL-1 and interferon-gamma. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 95, n. 1, p. 173–180, 1994.

VIEIRA, M. L. et al. In vitro evidence for immune evasion activity by human plasmin associated to pathogenic Leptospira interrogans. **Microbial Pathogenesis**, v. 51, n. 5, p. 360–365, 2011.

VIEIRA, M. L. et al. *Leptospira Interrogans* Outer Membrane Protein LipL21 Is a Potent Inhibitor of Neutrophil Myeloperoxidase. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 414–425, 2018.

WALPORT, M. J. Complement. First of two parts. **The New England journal of medicine**, v. 344, n. 14, p. 1058–66, 2001.

WAN, J. et al. Role of Complement 3 in TNF- α -Induced Mesenchymal Transition of Renal Tubular Epithelial Cells In Vitro. **Molecular Biotechnology**, v. 54, n. 1, p. 92–100, maio 2013.

WEILER, J. M. et al. Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein B1H. **Immunology**, v. 73, n. 9, p. 3268–3272, 1976.

WERTS, C. et al. Leptospiral Lipopolysaccharide Activates Cells through a TLR2-Dependent Mechanism. **Nat Immunol**, v. 2, n. 4, p. 346–352, 2001.

WOLFF, D. G. et al. Interaction of *Leptospira* elongation factor Tu with plasminogen and complement factor H: A metabolic leptospiral protein with moonlighting activities. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–10, 2013.

XU, J.; KOIZUMI, N.; NAKAMURA, S. Crawling Motility on the Host Tissue Surfaces Is Associated With the Pathogenicity of the Zoonotic Spirochete *Leptospira*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. August, 2020.

YANG, C. et al. The *Leptospira* Outer Membrane Protein LipL32 Induces Tubulointerstitial Nephritis-Mediated Gene Expression in Mouse Proximal Tubule Cells. n. 6, p. 2037–2045, 2002.

YUN, B. et al. Polymyxin B causes DNA damage in HK-2 cells and mice. **Archives of Toxicology**, v. 92, n. 7, p. 2259–2271, 2018.

ZHOU, W. et al. Interferon- γ regulation of C4 gene expression in cultured human glomerular epithelial cells. **European Journal of Immunology**, v. 23, n. 10, p. 2477–2481, 1993.

ZHOU, W.; MARSH, J. E.; SACKS, S. H. Intrarenal synthesis of complement. **Kidney**

International, v. 59, p. 1227–1235, 2001.

ZUNDEL, S. et al. Characterization of Recombinant Mannan-Binding Lectin-Associated Serine Protease (MASP)-3 Suggests an Activation Mechanism Different from That of MASP-1 and MASP-2. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 7, p. 4342–4350, 1 abr. 2004.