

LUAN GAVIÃO PRADO

**Avaliação da transição epitélio-mesenquimal em células HK-2 e fibrose renal
em modelo murino de infecção por *Leptospira interrogans***

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

São Paulo

2022

LUAN GAVIÃO PRADO

**Avaliação da transição epitélio-mesenquimal em células HK-2 e fibrose renal
em modelo murino de infecção por *Leptospira interrogans***

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Pós-graduação em Microbiologia

Orientadora: Angela Silva Barbosa

Coorientador: Niels Olsen Saraiva Câmara

Versão corrigida

São Paulo

2022

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Gavião Prado, Luan

Avaliação da transição epitélio-mesenquimal em células HK-2 e fibrose renal em modelo murino de infecção por *Leptospira interrogans* / Luan Gavião Prado; orientadora Angela Silva Barbosa; coorientador Niels Olsen Saraiva Câmara. -- São Paulo, 2022.

91 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Transição epitélio mesenquimal. 2. Leptospirose. 3. Fibrose renal. 4. Comunicação celular. 5. Células HK-2. I. Silva Barbosa, Angela, orientador. II. Olsen Saraiva Câmara, Niels, coorientador. III. Título.



ATA DE DEFESA

Aluno: 42132 - 11128671 - 1 / Página 1 de 1

Ata de defesa de Tese do(a) Senhor(a) Luan Gavião Prado no Programa: Ciências Biológicas (Microbiologia), do(a) Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Aos 08 dias do mês de fevereiro de 2023, no(a) Edifício Biomédicas I realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Luan Gavião Prado, apresentada para a obtenção do título de Doutor intitulada:

"Avaliação da transição epitélio-mesenquimal em células HK-2 e fibrose renal em modelo murino de infecção por *Leptospira interrogans*"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Ângela Silva Barbosa	Presidente	IB(ICB)	Não Votante
Marcos Bryan Heinemann	Titular	FMVZ - USP	<u>aprovado</u>
Ana Marcia de Sá Guimarães	Titular	ICB - USP	<u>aprovado</u>
Elsio Augusto Wunder Junior	Titular	YALE - Externo	<u>aprovado</u>

Resultado Final: Aprovado

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Lucianna Vicente da Silva _____, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 08 dias do mês de fevereiro de 2023.

Marcos Bryan Heinemann

Ana Marcia de Sá Guimarães

Elsio Augusto Wunder Junior

Ângela Silva Barbosa

Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em 14/02/23 e, portanto, o(a) aluno(a) 132 jus ao título de Doutor em Ciências obtido no Programa Ciências Biológicas (Microbiologia) - Área de concentração: Microbiologia.

Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Profa. Dra. Ana Paula Lepique
Presidente da CPG/ICB

CERTIFICADO : EMENDA v08/11/2022

Certificamos que a EMENDA (versão de 08/11/2022) da proposta intitulada "Avaliação de transição epitélio-mesenquimal em células HK-2 e fibrose renal em modelo murino de infecção por *Leptospira interrogans*", CEUA nº 9259010620 (ID 089098), sob a responsabilidade de **Angela Silva Barbosa e equipe; Luan Gavião Prado** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) em 06/12/2022.

Término previsto: **09/2020** : (0 meses).

Origem: Biotério Central do Instituto Butantan

Espécie: Camundongos isogênicos

sexo: Fêmeas

Peso ou
idade: 8 a 12 semanas N: 0

Linhagem: C57BL/6

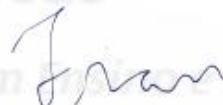
ANIMAIS UTILIZADOS

		Quantidade Aprovada	Quantidade Utilizada
Camundongos isogênicos	Fêmeas	63	0

São Paulo, 06 de dezembro de 2022



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação de transição epitélio-mesênquimal em células HK-2 e fibrose renal em modelo murino de infecção por *Leptospira interrogans*", protocolada sob o CEUA nº 9421030620 (10.002101), sob a responsabilidade de **Angela Silva Barbosa e equipe; Luan Gavião Prado** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 17/06/2020.

We certify that the proposal "Evaluation of epithelial-mesenchymal transition in HK-2 cells and renal fibrosis in the murine model of infection by *Leptospira interrogans*", utilizing 100 Isogenics mice (100 females), protocol number CEUA 9421030620 (10.002101), under the responsibility of **Angela Silva Barbosa and team; Luan Gavião Prado** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 06/17/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2020 a 07/2023**

Área: **Bacteriologia**

Origem: **Biotério Central**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **8 a 12 semanas**

N: **100**

Linhagem: **C57BL/6**

Peso: **22 a 25 g**

Local do experimento: **Laboratório de Bacteriologia**

São Paulo, 02 de dezembro de 2022



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



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



**Uso de animais
para experimentação**



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que

Luan Gavião Prado

participou do Curso “Uso de Animais em Experimentação” com carga horária total de 10 horas, em formato ensino a distância, realizado pela Comissão de Biotérios do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 15 abril 2019
Comissão de Biotérios
ICB USP



Declaro, para os devidos fins, que

Luan Gavião Prado

concluiu o Curso "Armazenamento, Manuseio e Descarte de Produtos Químicos",
realizado no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 22 de março de 2021
(Declaração válida por 5 anos)

Profa. Dra. Katiucia Batista da Silva Paiva
Presidente da Comissão de Segurança Química

Prof. Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira
Diretor do ICB



Certificado



Certificamos que **Luan Gavião Prado** participou do Treinamento em Biossegurança realizado no Departamento de Microbiologia/ICB-USP, no dia 04 de dezembro de 2019, com carga horária total de 6 horas.

Prof. Dr. Gabriel Padilla
Responsável pelo Treinamento

Veridiana Munford
Técnica Responsável pelo Treinamento

Dedico esta tese ao meu filho, Ezequiel.

AGRADECIMENTOS

Ao meu filho, Ezequiel, por me ensinar o significado da palavra amor.

Ao meu marido, Moisés, pelo companheirismo, paciência e compreensão durante essa jornada. Nada disso seria possível sem você.

À Angela Silva Barbosa, pela orientação e ensinamentos, pelas conversas e pelos conselhos. Obrigado por me acolher e me dar a oportunidade para trabalhar no laboratório.

Ao Niels Olsen Saraiva Câmara, por todas as orientações. Por me receber de braços abertos e ajudar no desenvolvimento desse trabalho. Muito obrigado!

À Patrícia Aniz, muito obrigado pelas conversas, pelo acolhimento e pelo carinho.

À Ana Marcia de Sá Guimarães por me abrir as portas e me acolher no início do doutorado. Obrigado pelo carinho e pela atenção de sempre.

À toda equipe do LaPAM, especialmente Taiana e Naila, por todo carinho.

À Matilde Costa, sem você nada seria possível. Obrigado por tudo, pelas horas de conversa, pelas risadas, pelo carinho e atenção.

À Daniela Courrol, por estar sempre disposta a me ajudar, por todos ensinamentos e contribuições. Obrigado pelo carinho de sempre.

À Cassia Moreira Santos, por toda ajuda e compreensão. Obrigado por toda a ajuda para realização desse trabalho, pela paciência, pelo carinho e atenção.

À Mayriele da Silva Machado, pelos momentos de descontração, pelas risadas e pelas conversas. Vou sentir saudades.

À Kerstin Muner, por todo incentivo, pelos ensinamentos e pela paciência.

À Andrea Borrego e José Ricardo Jensen, por toda ajuda nas análises de biologia molecular.

Ao Magaiver Andrade Silva, por estar sempre disponível e por toda ajuda intelectual e prática que foram extremamente necessárias para a conclusão deste trabalho.

À Eleonora de Assis, minha companheira para todas as horas, pelo apoio incondicional, pelas horas sem fim de conversas e conselhos. Mesmo de longe, sua presença foi imprescindível.

Aos integrantes do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, funcionários e pesquisadores, meu muito obrigado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

PRADO, L. G. **Avaliação da transição epitélio-mesenquimal em células HK-2 e fibrose renal em modelo murino de infecção por *Leptospira interrogans***. 2022. f. 91. Tese - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

A leptospirose é uma zoonose negligenciada distribuída mundialmente, que acomete seres humanos e animais. A doença clínica é caracterizada por febre, mialgia, cefaleia, injúria renal aguda, hemorragia pulmonar e morte. Em animais considerados reservatórios, ratos e camundongos, a doença ocorre de forma branda ou sem sintomas e a *Leptospira* é capaz de se manter nos túbulos contorcidos proximais dos rins desses animais. A fibrose é um dos sinais presentes nos rins de animais e seres humanos após a ocorrência de leptospirose aguda. A transição epitélio mesenquimal é um processo no qual células epiteliais adquirem características mesenquimais, como produção de proteínas de matriz extracelular, produção de mediadores inflamatórios e capacidade de migração. Células HK-2 imortalizadas derivam do túbulo contorcido proximal de rins humanos, e, são consideradas bons modelos experimentais para se estudar respostas fisiológicas e patológicas de alterações renais. Camundongos são modelos animais amplamente utilizados para se estudar infecção crônica por *Leptospira*, uma vez que se mantêm infectados, apesar de não desenvolverem leptospirose clínica. O objetivo desse trabalho foi avaliar as vias de comunicação celulares envolvidas na indução da transição epitélio mesenquimal em células HK-2 e a ocorrência da transição e fibrose nos rins de camundongos cronicamente infectados por *Leptospira interrogans*. As vias do TGF- β 1, Wnt/ β -catenina e do NF- κ B são ativadas durante a infecção de células HK-2 por *Leptospira interrogans*, demonstrado pela translocação de pSmad2 para o núcleo das células HK-2 e aumento da concentração de β -catenina no interior do núcleo destas células. A ocorrência de transição epitélio-mesenquimal em células HK-2 após a infecção por *L. interrogans* foi avaliada e confirmada por meio de análises moleculares, constatando um aumento significativo da produção de proteínas matriz extracelular, como a fibronectina, e morfológicas com aquisição de morfologia celular compatível com células mesenquimais. Além disso, a infecção também leva a alterações metabólicas nestas células como o

acúmulo de gotículas de lipídeos no citoplasma das células e provável redução da ativação da autofagia. Em camundongos, a infecção por *Leptospira interrogans* induz à ativação da transição epitélio mesenquimal em células epiteliais dos túbulos contorcidos proximais e à fibrose leve após 60 dias de infecção por dois sorovares distintos. A infecção por *Leptospira interrogans* é capaz de induzir transição epitélio mesenquimal *in vitro* e *in vivo*, e em modelo murino pode ser considerada como uma das formas de indução de fibrose e inflamação renal. Estudos conduzidos para se entender melhor o papel da transição epitélio mesenquimal em leptospirose crônica podem ajudar na seleção de tratamentos farmacológicos a fim de se reduzir a possibilidade de fibrose renal e doença renal crônica em pacientes acometidos pela doença.

Palavras-chave: Transição epitélio mesenquimal. Leptospirose. Fibrose renal. Comunicação celular. Células HK-2.

ABSTRACT

PRADO, L. G. **Evaluation of epithelial-mesenchymal transition in HK-2 cells and renal fibrosis in the murine model of infection by *Leptospira interrogans***. 2022. 91 f. Thesis - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Leptospirosis is a neglected and widely distributed zoonosis that affects humans and animals. Clinical disease is characterized by fever, myalgia, headache, acute kidney injury, pulmonary hemorrhage, and death. In reservoir hosts, such as mice and rats, there is a mild to unapparent disease, and leptospires remain in the proximal convoluted tubules. Fibrosis is one of the signs observed in chronic disease in reservoir hosts and humans. Epithelial-to-mesenchymal transition is a process in which epithelial cells acquire mesenchymal features, with extracellular matrix proteins overproduction, inflammatory cytokines production, and capacity of migration. HK-2, an immortalized kidney human cell line from proximal convoluted tubules, is considered a good cellular model to study physiological and pathological processes underlying renal diseases. Mice are widely used as models of chronic leptospirosis, because they maintain the infection despite the resistance to acute infection. The aim of this thesis was to assess cellular communication pathways involved in epithelial-to-mesenchymal transition in HK-2 cells, and kidney fibrosis in mice chronically infected by *Leptospira interrogans*. TGF- β 1, Wnt/ β -catenin and NF- κ B are activated during HK-2 infection by *Leptospira interrogans*, which are confirmed by nuclear translocation of pSmad2 of HK-2 cells and increase in β -catenin inside cells' nucleus. Epithelial-to-mesenchymal transition occurrence after *L. interrogans* infection was evaluated and confirmed by molecular analysis, in which it was possible to evidence an increased production of extracellular matrix proteins, such as fibronectin, and the acquisition of mesenchymal features. Besides, the infection also leads to metabolic alterations and to lipid droplets accumulation in the cytoplasm, and a possible reduction in autophagy. In mice, the infection induced epithelial-to-mesenchymal transition in tubular epithelial cells and fibrosis after 60 days of infection by two different serovars. Infection by *Leptospira interrogans* is capable to induce epithelial-to-mesenchymal transition *in vitro* and *in vivo* and may be considered as a fibrosis and inflammation inductor in mice. Studies aiming to better understand the role of

epithelial-to-mesenchymal transition in chronic leptospirosis may help the development of pharmacological treatment to reduce the occurrence of kidney fibrosis and chronic kidney disease in leptospirosis-cured patients.

Keywords: Epithelial-to-mesenchymal transition. Leptospirosis. Kidney fibrosis. Cellular communication. HK-2 cells.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
CACT	Carnitina Acilcarnitina Transferase
CD36	<i>Cluster of differentiation 36</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CKDu	<i>Chronic Kidney disease of unknown ethiology</i>
CPT1A	Carnitina Palmitoil Transferase 1A
CPT2	Canitina Palmitoil Transferase 1
EMJH	Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
FABP	<i>Fatty Acid Binding Protein</i>
FAT	<i>Fatty Acid Translocase</i>
FATP	<i>Fatty Acid Transport Protein</i>
FITC	Isotiocinato de fluoresceína
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloprotease
MOI	Multiplicidade de infecção
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NF- κ B	<i>Nuclear Factor κB</i>
PAMP	Padrões moleculares associados à patógenos
PBS	<i>Phophate buffered saline</i>
PBS-T	<i>Phophate buffered saline</i> com 0,05% de Tween 20

PPR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
Smad	Small Mothers Against Decapentaplegic
SnoN	<i>Ski Novel</i>
TBS-T	<i>Tris buffered saline</i> com 0,05% de Tween 20
TGF- β 1	Fator de crescimento transformante β 1
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
ZEB1	<i>Zinc finger E-box Binding Homebox 1</i>
ZEB2	<i>Zinc finger E-box Binding Homebox 2</i>
α -SMA	Actina de músculo liso α

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Detecção de fibronectina (A), colágeno IV (B) e decorina (C) no sobrenadante de células HK-2 infectadas com <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Copenhageni L1-130.	44
Figura 2. Detecção de laminina no sobrenadante de células HK-2 infectadas com <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Copenhageni L1-130.....	45
Figura 3. Detecção de fibronectina no sobrenadante de células HK-2 infectadas com <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Manilae L495 por Western blot.	46
Figura 4. Detecção de fibronectina secretada pelas células HK-2 após infecção com <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Manilae L495 por imunofluorescência.....	46
Figura 5. Detecção de colágeno IV a partir do sobrenadante de células HK-2 infectadas com <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Manilae L495 por Western blot e imunofluorescência.....	47
Figura 6. Detecção de p-Smad3 em lisado celular de células HK-2 após infecção por <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Copenhageni L1-130.	50
Figura 7. Detecção de p-Smad2 em células HK-2 após infecção com <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Manilae L495.	51
Figura 8. Detecção de β -catenina, citoplasmática (A) e intranuclear (B) em células HK-2 infectadas por <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Copenhageni L1-130.	52
Figura 9. Zimografia do sobrenadante de células HK-2 infectadas com <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Copenhageni L1-130 e Western blot para MMP7 do sobrenadante de células HK-2 infectadas com <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Copenhageni L1-130.	53
Figura 10. Células HK-2 infectadas por <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Copenhageni L1-130 adquirem fenótipo compatível com EMT.....	55
Figura 11. Células HK-2 infectadas por <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Manilae L495 adquirem fenótipo compatível com EMT	56
Figura 12. Detecção de NF- κ B p50 em lisado de células HK-2 infectadas por <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Copenhageni L1-130 e sorovar Manilae L495.	57
Figura 13. Secreção de citocinas pró-inflamatórias após infecção de células HK-2 por <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Copenhageni L1-130 e por <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Manilae L495.	59
Figura 14. Células HK-2 infectadas por <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Copenhageni L1-130 sofrem apoptose.....	61

Figura 15. Detecção de fibronectina em células HK-2 infectadas por <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Copenhageni L1-130 mediante tratamento com HGF humano recombinante.....	62
Figura 16. Detecção de fibronectina em células HK-2 infectadas por <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Manilae L495 mediante tratamento com HGF.....	63
Figura 17. Microscopia óptica de células HK-2 infectadas por <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Manilae L495.....	64
Figura 18. Detecção de β -catenina em células HK-2 infectadas por <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Manilae L495 tratadas com HGF	65
Figura 19. Secreção de TGF- β 1 por células HK-2 após infecção por <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Manilae L495	66
Figura 20. Acúmulo de gotículas de lipídeos no citoplasma de células HK-2 infectadas por <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Copenhageni L1-130.	68
Figura 21. Produção de LC3I e LC3II pelas células HK-2 infectadas por L. interrogans sorovar Copenhageni L1-130	69
Figura 22. Fotomicrografias de rim dos animais infectados com <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Copenhageni L1-130 nas doses de 1×10^6 leptospiros/animal e 2×10^8 leptospiros/animal.....	71
Figura 23. Escore de inflamação renal após infecção por L. interrogans sorovar Copenhageni L1-130 em diferentes tempos e duas doses infectantes.	72
Figura 24. Fotomicrografias de cortes histológicos dos rins de camundongos C57BL/6 infectados com <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Copenhageni L1-130 evidencia a deposição de colágeno em interstício e peritubular.	72
Figura 25. Imunohistoquímica para colágeno IV dos cortes de rins dos animais infectados por L. interrogans sorovar Manilae L495.....	74
Figura 26. Imunohistoquímica para colágeno IV dos cortes de rins dos animais infectados por <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Manilae L495.	76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1 <i>Leptospira</i> spp. e leptospirose	26
2.2 Leptospirose crônica versus infecção crônica por <i>Leptospira</i>	28
2.3 Transição epitélio mesenquimal	29
2.4 Fator de crescimento transformante beta 1 (TGF- β 1) e a regulação pelo fator de crescimento de hepatócitos (HGF)	30
2.5 Wnt/ β -catenina	32
2.6 Metabolismo lipídico em células epiteliais	32
2.7 Autofagia	34
3 OBJETIVOS	36
3.1 Objetivos específicos	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Cultivo bacteriano	37
4.2 Cultivo e manutenção das linhagens celulares	37
4.3 Infecção das células HK-2	37
4.4 Western blot	38
4.5 Imunofluorescência	40
4.6 Zimografia	41
4.7 Citometria de fluxo para avaliação da ativação de caspase 3	41
4.8 ELISA	42
4.9 Infecção de camundongos	42
4.10 Análise histológica e imunohistoquímica	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 A infecção por <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni L1-130 e por <i>L. interrogans</i> sorovar Manilae L495 induz a produção de proteínas de matriz extracelular pelas células HK-2	44
5.2 A infecção por <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni L1-130 e por <i>L. interrogans</i> sorovar Manilae L495 induz a ativação da via do TGF- β 1	49
5.3 A infecção por <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni L1-130 ativa a via Wnt/ β -catenina e induz a produção e ação de metaloproteases pelas células HK-2	52
5.4 A infecção por <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni L1-130 e por <i>L. interrogans</i> sorovar Manilae L495 induz a alteração morfológica de células HK-2	54

5.5 A infecção por <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni L1-130 ativa a via do NF- κ B nas células HK-2	56
5.6 A infecção das células HK-2 por <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni L1-130 e <i>L. interrogans</i> sorovar Manilae L495 induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias. .	57
5.7 A infecção por <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni L1-130 induz as células HK-2 a apoptose mediada pela caspase 3.....	60
5.8 O fator de crescimento de hepatócitos (HGF) reduz a produção de proteínas de matriz extracelular pelas células HK-2 após infecção por <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni L1-130 e sorovar Manilae L495.....	61
5.9 A infecção de células HK-2 por <i>L. interrogans</i> sorovares Copenhageni L1-130 e Manilae L495 induz à secreção de TGF- β 1	65
5.10 A infecção de células HK-2 por <i>L. interrogans</i> leva ao acúmulo de gotículas de lipídeos no citoplasma e a alteração no fluxo autofágico.....	67
5.11 A infecção de camundongos C57BL/6 por <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni L1-130 induz à EMT, inflamação e fibrose renal.....	70
6 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	78
ANEXOS	90

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose negligenciada amplamente distribuída, que acomete todos os vertebrados. Atualmente são descritas 66 espécies, agrupadas quatro subclados. Os subclados P1 e P2 são compostos pelas espécies patogênicas, capazes de causar doença clínica nos hospedeiros susceptíveis.

Em seres humanos a doença é caracterizada pelo aparecimento de sintomas inespecíficos como cefaleia, mialgia e febre, podendo evoluir para quadros mais graves como hemorragia pulmonar, injúria renal aguda e morte. Quadros graves ocorrem entre 5 e 20% dos pacientes que apresentam sintomatologia para a doença. Raramente, seres humanos que se recuperam da doença após tratamento podem se tornar cronicamente infectados pelo patógeno, que fica alojado nos rins destes pacientes, mas a ocorrência da liberação intermitente de *Leptospira* por pacientes cronicamente infectados também já foi descrita, o que pode ocasionar contaminação e manutenção da doença em ambientes que favoreçam a sobrevivência da bactéria.

Em animais, como bovinos e suínos, há também o surgimento de sinais clínicos da doença. Além daqueles já citados, problemas reprodutivos como aborto, natimortalidade e nascimento de animais fracos, redução da produção leiteira e descarte precoce de animais também são elencados como importantes sinais a serem observados em rebanhos comerciais, o que acarreta perdas financeiras para o produtor.

Os roedores são considerados hospedeiros reservatórios da doença. Destacam-se o camundongo (*Mus musculus*) e os ratos (*Rattus norvegicus* e *Rattus rattus*), por serem resistentes à doença clínica e por seus hábitos sinantrópicos. Após a infecção dos hospedeiros reservatórios, há replicação bacteriana e leptospiremia, e após três a cinco dias as bactérias são encontradas colonizando os rins destes animais. Ocorre liberação intermitente de *Leptospira* pela urina dos roedores, com consequente contaminação ambiental e manutenção da doença.

Países tropicais em desenvolvimento apresentam maiores prevalências de leptospirose, pois há maior concentração de ambientes úmidos, sujeitos a alagamentos. Falta de saneamento básico e acesso à atenção básica em saúde são

fatores de risco para ocorrência da doença. Atualmente, há uma crescente preocupação sobre a ocorrência de leptospirose crônica e a possibilidade do desenvolvimento de doença renal crônica em pacientes infectados por *Leptospira*. A injúria constante e alterações locais parecem induzir transição epitélio-mesenquimal (EMT) em células de túbulos contorcidos proximais. Além disso, alterações metabólicas e no fluxo autofágico em células epiteliais renais são descritos como fatores indutores de EMT em modelos *in vitro* e *in vivo* de fibrose renal.

A EMT é um processo celular caracterizado pela aquisição de características de células mesenquimais pelas células epiteliais. Durante o processo de transição há expressão de genes relacionados à maior produção de proteínas de matriz extracelular, alteração da morfologia da célula, que passa a apresentar-se fusiforme, e maior expressão de fatores de transcrição de EMT. Há um espectro de transição, no qual as células podem adquirir totalmente características mesenquimais ou realizarem EMT parcialmente. Nestes casos há também a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células.

Células dos túbulos contorcidos proximais dependem exclusivamente de β -oxidação para obtenção de energia, por meio da produção de ATP. Esta singularidade garante que a grande concentração de glicose reabsorvida pelas células seja translocada de volta para a circulação sanguínea, sem alterar o funcionamento correto das células. Quando expostas cronicamente a insultos extracelulares, como a hiperglicemia presente na *diabetes mellitus*, há alteração do metabolismo celular, com aumento da utilização de glicólise para obtenção de energia, podendo levar a célula a realizar EMT. Outros insultos, como a infecção por patógenos intra ou extracelulares também são fatores desencadeantes para a ocorrência de EMT em células epiteliais renais ou de outros tecidos.

As vias do Fator de Crescimento Transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) e Wnt/ β -catenina são descritas como importantes na indução e ativação de respostas celulares envolvidas na EMT. Quando cronicamente ativada, a via do TGF- $\beta 1$ tem função pró-fibrótica, caracterizada pela ativação de proteínas efetoras conhecidas como Smads e a expressão de genes responsáveis pela produção de proteínas de matriz extracelular, como a fibronectina, e repressão de genes de proteínas responsáveis pela adesão célula-célula, como a e-caderina. A β -catenina também possui função na

adesão célula-célula e está intimamente relacionada à e-caderina. Insultos que levem à degradação de e-caderina podem levar à ativação não canônica da via do Wnt/ β -catenina, com a liberação de β -catenina não fosforilada, que possui função de fator de transcrição, levando à expressão de genes também relacionados à produção de proteínas de matriz extracelular e de metaloproteases (MMP), especialmente a MMP7.

Danos diretos à mitocôndria podem levar a alteração no metabolismo celular, se a ocorrência do insulto permanecer por tempos maiores que a capacidade de regulação celular. A autofagia é um processo celular responsável pela manutenção da homeostasia celular e destruição de organelas e proteínas citoplasmáticas lesionadas. Além disso, a autofagia também é utilizada pelas células como forma de eliminação de patógenos presentes em vacúolos de fagocitose ou endocitose. Sabe-se que há uma interação íntima entre a autofagia e o metabolismo lipídico, sendo que a inibição do fluxo autofágico leva a um acúmulo de ácidos graxos no citoplasma, sob a forma de gotículas de lipídeos. Patógenos intra e extracelulares são capazes de subverter tanto o fluxo autofágico quanto inibir a β -oxidação, e tais eventos podem desencadear a indução e ativação de EMT.

A presente tese tem por objetivo avaliar as vias de comunicação celulares envolvidas no processo de EMT induzido pela infecção de células HK-2 e a ocorrência de EMT em células de túbulo contorcido proximal de camundongos infectados por *Leptospira interrogans*, mediados pela ativação de vias de comunicação celular como TGF- β 1, Wnt/ β -catenina e NF- κ B, levando ao aumento da produção de proteínas de matriz extracelular e desequilíbrio na homeostase celular, especialmente no metabolismo lipídico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Foram realizadas pesquisas nas principais bases de dados disponíveis para realização do levantamento bibliográfico, utilizado para compreensão dos temas abordados na tese.

2.1 *Leptospira* spp. e leptospirose

A leptospirose é uma doença infecciosa e zoonótica. Atualmente o número de casos vem aumentando em todo o mundo, sendo considerada uma doença emergente ou reemergente em países desenvolvidos, como nos da Europa, e uma doença endêmica e negligenciada em países em desenvolvimento, como países do leste Asiático, Américas Central e do Sul (ALLAN et al., 2015; CASSADOU et al., 2016; MARTELI et al., 2020; REIS et al., 2008; TORGERSON et al., 2015; YANG et al., 2015). A infecção é causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* que possuem características únicas, como seu formato fino e alongado, alta motilidade, a presença de dois endoflagelos e a composição de sua parede celular (ADLER, 2015; GIBSON et al., 2020; HOLZAPFEL et al., 2020; MURRAY et al., 2010; WUNDER et al., 2016).

Bactérias do gênero *Leptospira* pertencem ao filo Spirochaete, que possui outros gêneros de bactérias causadores de doenças em seres humanos e animais, como a sífilis (*Treponema pallidum*), doença de Lyme (*Borrelia burgdorferi*) e espiroquetoses intestinais (*Brachyspira aalborgi* e *Brachyspira pilosicoli*). Atualmente são descritas 66 espécies dentro do gênero *Leptospira*, que estão agrupadas entre espécies saprófitas ou de vida livre (subclados S1 e S2), intermediárias (subclado P2) e patogênicas (subclado P1) (ADLER, 2015; CAIMI; RUYBAL, 2020; CASANOVAS-MASSANA et al., 2021; GUPTA; MAHMOOD; ADEOLU, 2013; LEE et al., 1993; RADOLF et al., 2012; VINCENT et al., 2019).

A presença de lipopolissacarídeos (LPS) na membrana, característica exclusiva de bactérias Gram-negativas, é considerada um fator de virulência e de escape ao sistema imune inato. Diferenças na composição do LPS de leptospiros, como a metilação de um fosfato, e no tamanho da molécula fazem com que seja menos endotóxico e menos reconhecido pelos receptores de reconhecimento de

padrões (Pattern Recognition Receptors – PRRs), respectivamente (BONHOMME et al., 2020; MURRAY et al., 2010; QUE-GEWIRTH et al., 2004).

Além disso, o LPS é responsável pela classificação sorológica das espécies de *Leptospira* em sorovares. Essa classificação é baseada na heterogeneidade estrutural do LPS da parede celular bacteriana. A classificação sorológica é baseada na aglutinação mediada pela formação de complexos antígeno-anticorpo quando a bactéria é exposta a um soro específico (BROWN et al., 2003; COSATE et al., 2017). Análises moleculares do *locus* responsável pela codificação do LPS de *L. interrogans* sorovar Hardjo e *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo revelaram uma homologia de até 99%, o que demonstra que, apesar de serem espécies diferentes possuem LPS idênticos (ADLER, 2015; DE LA PEÑA-MOCTEZUMA et al., 1999; VINCENT et al., 2019).

A infecção pela *Leptospira*, independentemente do hospedeiro, se dá por abrasões cutâneas ou por meio de membranas mucosas. A partir do local de entrada do patógeno, ele se dissemina no organismo do hospedeiro pela via hematogênica, alcançando os órgãos-alvo, como fígado, pulmões e rins. Cada hospedeiro responde diferentemente à infecção e esta resposta está relacionada à espécie do hospedeiro, se susceptível ou resistente, à idade, nutrição e condição de saúde. Estes fatores podem determinar a ocorrência de casos brandos ou graves da doença (ADLER, 2015; BHARTI et al., 2003; DUARTE-NETO et al., 2019; SEGURO; ANDRADE, 2013; SPICHLER et al., 2008).

Os sinais clínicos da doença em seres humanos podem variar de sintomas leves e semelhantes aos da gripe, como febre, mialgia, dores de cabeça, náusea e vômitos, ou evoluir para quadros mais graves como icterícia, injúria renal aguda, síndrome hemorrágica pulmonar e morte por choque séptico e falência múltipla dos órgãos (DIAS et al., 2007; DUARTE-NETO et al., 2019; GOUVEIA et al., 2008). Pacientes que se recuperam da fase aguda da doença podem se livrar da infecção, seja por meio de tratamento antibiótico ou pela ação do sistema imune, ou se tornarem doentes crônicos, com a presença do patógeno nos rins por até dois anos após a fase aguda da doença (BRETT-MAJOR; COLDREN, 2012; SUPUTTAMONGKOL et al., 2004; YANG, 2018; YANG et al., 2015).

A infecção crônica por *Leptospira* é marcada pela presença do patógeno nos rins e pela ocorrência de fibrose renal, leve a moderada (CHOU et al., 2021; FANTON D'ANDON et al., 2014; NAIR et al., 2021; YANG, 2007, 2018). Fibrose, seja renal ou em outros tecidos, é caracterizada pelo aumento de produção e deposição de proteínas da matriz extracelular (MEC) no espaço intersticial, principalmente de colágenos do tipo I e IV e fibronectina (BÜLOW; BOOR, 2019; HUMPHREYS, 2018; MIZUNO; MATSUMOTO; NAKAMURA, 2001; TIAN et al., 2006, 2011; ZUO; LIU, 2018). Em modelos murinos de infecção, a leptospirose é considerada crônica 28 dias após a infecção, com a presença de bactérias viáveis em túbulos contorcidos proximais e fibrose renal intersticial, sem que haja diferenças nos padrões de lesão encontrados nos rins, após tempos superiores a 28 dias (CHOU et al., 2021; FANTON D'ANDON et al., 2014).

2.2 Leptospirose crônica versus infecção crônica por Leptospira.

A definição e a real ocorrência de leptospirose crônica em hospedeiros susceptíveis são ainda controversas. Há na literatura a descrição e a utilização de modelos animais que mimetizam a infecção crônica por *Leptospira* ainda que o estado portador do animais não caracterize doença crônica (FANTON D'ANDON et al., 2014). Por outro lado, a descrição de pacientes humanos eliminando a bactéria na urina, após aproximadamente dois anos da cura clínica da leptospirose aguda acende a discussão sobre a real importância de pacientes humanos com infecção crônica pelo patógenos (YANG, 2018; YANG et al., 2015).

Há uma crescente preocupação no meio médico com a possibilidade da indução ou agravamento da doença renal crônica (DRC) após a infecção por *Leptospira*. Em locais onde há alta prevalência da doença, parece haver também um aumento do número de casos de DRC. Mas é preciso cautela ao se relacionar ambas as doenças, já que outros fatores, ambientais ou infecciosos, podem também estar relacionados aos aumentos dos casos de DRC. Além disso, países em que os casos de leptospirose são raros, também relatam um aumento significativo nos diagnósticos de DRC (BIKBOV et al., 2020; JHA et al., 2013; YANG, 2018).

2.3 Transição epitélio mesenquimal

De acordo com o consenso sobre definições para pesquisa em transição epitélio mesenquimal (YANG et al., 2020) este evento é definido como “um processo durante o qual as células epiteliais adquirem fenótipos mesenquimais seguidos de repressão de características epiteliais” (YANG et al., 2020). A EMT pode ocorrer de forma completa ou parcial, e os fenótipos encontrados entre epitelial e mesenquimal, recebem a classificação de EMT parcial (NIETO et al., 2016).

A ocorrência de EMT na vida extrauterina está descrita em duas patologias importantes: câncer e fibrose tecidual (PRADO; BARBOSA, 2021). Durante a injúria, direta ou indireta, de células de túbulos contorcidos proximais, há ativação da via e a expressão de fatores de transcrição exclusivos de EMT como ZEB1, ZEB2, Snail1, Snail2, Twist1, que irão determinar as alterações fenotípicas características do processo (GRANDE et al., 2015; LEBLEU et al., 2013; LOVISA et al., 2015; VEGA et al., 2004; YANG et al., 2020). EMT e suas possíveis formas intermediárias parecem estar diretamente relacionadas com a ocorrência de fibrose em diferentes órgãos, inclusive nos rins (NIETO et al., 2016).

Muitos são os mecanismos descritos que levam à ativação de EMT, como a via do TGF- β 1, do Wnt/ β -catenina, da Renina-angiotensina-aldosterona, da interleucina 6 e do Notch1 (ABAURREA; ARAUJO; CAFFAREL, 2021; KATSUNO; DERYNCK, 2021; LI et al., 2021; PALLASCH; SCHUMACHER, 2020; WANG et al., 2014; YANG; DAI; LIU, 2005). O bloqueio da ação dos fatores de transcrição de EMT e a utilização de fatores de crescimento antagonistas da ação do TGF- β 1 inibem a ocorrência da transição em células de túbulo contorcido proximal imortalizadas (YANG; DAI; LIU, 2005).

Além das alterações sistêmicas e metabólicas, a infecção por patógenos intra e extracelulares também pode desencadear a ativação da EMT. O reconhecimento dos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) pelos PRR das células leva à ativação de vias de comunicação celulares que, por meio de intercomunicações, levam à ativação das vias supracitadas (HOFMAN; VOURET-CRAVIARI, 2012). A infecção pulmonar e renal de suínos e de células epiteliais imortalizadas por *Heamophilus parasuis* levou a um aumento de β -catenina, ruptura das junções

aderentes e alterações fenotípicas características de EMT. Tais achados demonstram que há participação da via do Wnt/ β -catenina na ocorrência de EMT em células epiteliais pulmonares e renais de suínos (HUA et al., 2018).

Outros marcadores importantes das alterações induzidas pela EMT são a redução de proteínas envolvidas na adesão célula-célula e o aumento da produção de proteínas de matriz extracelular. A redução da expressão e produção de e-caderina e o aumento da produção de α -SMA e fibronectina são considerados importantes marcadores moleculares de EMT. O estudo conjunto da expressão dos fatores de transcrição, das alterações fenotípicas e da produção destes marcadores moleculares é essencial para a descrição da ocorrência completa ou parcial de EMT (NIETO et al., 2016; YANG et al., 2020).

2.4 Fator de crescimento transformante beta 1 (TGF- β 1) e a regulação pelo fator de crescimento de hepatócitos (HGF)

A via do TGF- β 1 é constituída pelo ligante do receptor de TGF, os receptores TGF-I e TGF-II, e pelas proteínas efetoras, chamadas Smads (*Small Mothers Against Decapentaplegic*). Os receptores de TGF I e II formam complexos heteroméricos após a ligação dos ligantes. O receptor de TGF-II possui função de quinase e fosforila regiões próximas à membrana citoplasmática interna do receptor de TGF-I. Ao ser fosforilado, o receptor de TGF-I é então capaz de fosforilar e ativar os Smads (CHUNG et al., 2009; HATA; CHEN, 2016; HU et al., 2018; MENG et al., 2015; PRADO; BARBOSA, 2021; XU et al., 2020).

Os Smads são as proteínas efetoras da via. Existem três tipos diferentes de Smads, os ativados pelos receptores (Smads 2 e 3), co-Smad (Smad 4) e os inibidores (Smad 7). Após a ativação dos receptores para TGF- β 1 há fosforilação do Smad2 e/ou Smad3 e a formação de um complexo com Smad4 e translocação para o núcleo (BATLLE; MASSAGUÉ, 2019; BUDI; DUAN; DERYNCK, 2017; LAN; CHUNG, 2012).

O TGF- β 1 apresenta ação pró-fibrótica em células dos túbulos contorcidos proximais e em outras células renais, como podócitos. Os principais mecanismos envolvidos na fibrose renal são o aumento na produção de MEC pelas células mesenquimais, a diminuição da ação de enzimas de degradação da MEC e a transição epitélio-mesenquimal (FU et al., 2019; GRANDE et al., 2015; IEKUSHI et al., 2010;

LIU, 2006; LOVISA, 2021; LOVISA et al., 2015; LOVISA; GENOVESE; DANESE, 2019; MENG et al., 2015; NIETO et al., 2016). Tian et al. (2006) demonstraram que há aumento na produção de colágenos tipos I e IV em células HK-2 após estímulo com proteínas de membrana externa de *Leptospira santarosai* sorovar Shermani. Essa resposta foi observada devido à ativação da via do TGF- β 1.

O HGF é um fator de crescimento pleiotrópico secretado principalmente por células mesenquimais e sua produção e secreção ocorrem após estímulo pró-inflamatório (MIZUNO et al., 2000; MOLNARFI et al., 2015; NAKAMURA et al., 2011). IL-6, TNF- α e IL-1 β conduzem a resposta de fase aguda e estimulam a produção de HGF, que age para suprimir a resposta inflamatória (COUDRIET et al., 2010; GONG et al., 2008; ITO et al., 2010). A administração de HGF reduz lesões renais em vários modelos de roedores com doença renal crônica (DWORKIN et al., 2004; GONG et al., 2003; INOUE et al., 2003), obstrução ureteral unilateral (MIZUNO; MATSUMOTO; NAKAMURA, 2001; YANG; LIU, 2002), e nefropatia diabética (MIZUNO; NAKAMURA, 2004). Embora a atividade antifibrótica do HGF provavelmente explique a maior parte de sua ação benéfica nesses diferentes modelos, a supressão da inflamação renal também pode contribuir para o seu papel protetor (GONG et al., 2004, 2008; GONG; RIFAI; DWORKIN, 2006a, 2006b).

Mizuno et al. (2000) demonstraram que existe um balanço entre a expressão e a produção do HGF e do TGF- β 1. Utilizando camundongos que apresentam nefrose congênita, eles mostraram que quando há um aumento da expressão do TGF- β 1, há uma diminuição da produção local de HGF. Devido à autorregulação das concentrações de TGF- β 1 e de HGF no local da lesão, o estudo da ação do HGF como regulador da expressão e secreção de TGF- β 1 é essencial, uma vez que o processo de fibrose renal pode ser controlado ou evitado com a administração exógena de moléculas importantes envolvidas, como o HGF ou bloqueadores de TGF- β 1 (MIYAZAWA, 2010; MOLNARFI et al., 2015; TIAN et al., 2006). Apesar da importância desse balanço na fibrose renal, há uma escassez de informações sobre o assunto na leptospirose crônica e fibrose associada.

2.5 Wnt/ β -catenina

Outra via importante envolvida na ativação de EMT e, conseqüentemente, fibrose, é a via do Wnt/ β -catenina. Existem duas formas de ativação desta via, chamadas canônica e não canônica. Durante a ativação canônica, há ligação de um Wnt solúvel ao receptor *frizzled* acoplado a uma proteína G. A ativação do receptor induz a fosforilação de proteínas adaptadoras que inibem o complexo de destruição, liberando a β -catenina não fosforilada livre para translocar ao núcleo e realizar sua função de fator de transcrição, levando a expressão dos genes da MMP7, Snail1 e redução da expressão do gene do HGF (DEVAUX; MEZOUAR; MEGE, 2019; KE et al., 2017; PRADO; BARBOSA, 2021; ROUTLEDGE; SCHOLPP, 2019; SCHAALE et al., 2011; TAN et al., 2014; ZUO; LIU, 2018)

Já na ativação não canônica da via, proteases capazes de clivar e-caderina ou diretamente a ligação entre a β -catenina e a e-caderina induzem a translocação da β -catenina não-fosforilada livre para o núcleo da célula, onde, novamente, ela é capaz de induzir a expressão de genes como descrito acima (PRADO; BARBOSA, 2021; VINCAN, 2008).

A ativação da via do Wnt/ β -catenina é capaz de induzir a fosforilação e ativação de Smad2 e Smad3; assim, a ação de ambas as vias é sinérgica e complementar (WANG et al., 2011). Devido a esta interação cruzada entre as vias, as alterações fenotípicas de EMT muitas vezes ainda são vistas quando se bloqueia apenas uma das vias (PRADO; BARBOSA, 2021).

Em células de túbulos contorcidos proximais submetidas a diferentes condições, como aumento na concentração de glicose no meio celular e em modelos *in vivo* de indução de EMT, observam-se alterações no metabolismo lipídico que parecem ocorrer antes que haja alterações fenotípicas do processo, atuando como uma das formas de indução de EMT (XU et al., 2014).

2.6 Metabolismo lipídico em células epiteliais

O metabolismo de ácidos graxos em células epiteliais se inicia pela captação e translocação de ácidos graxos livres na corrente sanguínea para o citoplasma. São

três os principais transportadores presentes na membrana citoplasmática: CD36 (*cluster of differentiation 36*) ou translocase de ácidos graxos (*fatty acid translocase* (FAT)), proteína de ligação a ácidos graxos (*fatty acid binding protein* (FABP)) e proteína de transporte de ácidos graxos (*fatty acid transport protein* (FATP)) (ANDERSON; STAHL, 2013; DIRUSSO et al., 2005; FURUHASHI, 2019; JAY; HAMILTON, 2018; LUIKEN; BONEN; GLATZ, 2002; PEPINO et al., 2014; SCHWENK et al., 2010).

O CD36 é uma proteína transmembrana de aproximadamente 88 kDa envolvida em inúmeras funções como transporte de ácidos graxos e reconhecimento de padrões de patógenos, capaz de reconhecer LPS de Gram-negativas e ácido lipoteicoico de Gram-positivas (POMBINHO; SOUSA; CABANES, 2018). Além disso, este receptor está envolvido em doenças metabólicas e sistêmicas como aterosclerose, lipidose hepática não-alcoólica e diabetes mellitus (HOU et al., 2015; HUA et al., 2015; PEPINO et al., 2014; YANG et al., 2017). Há descrição do reconhecimento da LipL32 por outros receptores da mesma família do CD36, os *scavengers receptors*, demonstrando a possibilidade da participação do CD36 no reconhecimento, fagocitose e resposta imune contra a infecção por *Leptospira* (POMBINHO; SOUSA; CABANES, 2018).

Os receptores FABP e FATP são duas famílias distintas de receptores de ácidos graxos. FABP possui maior afinidade por ácidos graxos de cadeia longa e essa afinidade aumenta à medida que a hidrofobicidade dos ácidos graxos também aumenta. São nove os FABP já descritos, que atuam principalmente como chaperonas, facilitando a entrada dos ácidos graxos no citoplasma. Já os receptores FATP são uma família com seis diferentes transportadores já descritos. Eles são proteínas integrais de membrana e funcionam adicionando um grupo acil ao ácido graxo, passo inicial no processo de β -oxidação destas moléculas (ANDERSON; STAHL, 2013; DIRUSSO et al., 2005; FURUHASHI, 2019; GORBENKO et al., 2010; HOU et al., 2015; HUA et al., 2015; JAY; HAMILTON, 2018; LUIKEN; BONEN; GLATZ, 2002; MARÉCHAL et al., 2018; MELTON et al., 2013; PEPINO et al., 2014; POMBINHO; SOUSA; CABANES, 2018; SATO; COBURN, 2017; SILVERSTEIN; FEBBRAIO, 2010; STORCH, 1993; STORCH; MCDERMOTT, 2009; YANG et al., 2017).

Após sua entrada na célula, as moléculas de ácidos graxos passam por uma série de reações, catalisadas por enzimas. Inicialmente, há a ligação de uma molécula de acil-CoA, reação catalisada pela ácido graxo acil-CoA sintetase. Ácidos graxos de cadeias muito longas devem passar por uma rodada de reações em peroxissomos, antes de serem ativados pela ácido graxo acil-CoA sintetase. Já na membrana externa mitocondrial, a enzima Carnitina Palmitoil Transferase 1A (CPT1A) é responsável pela translocação da molécula, adicionando uma molécula de carnitina, gerando ésteres de acylcarnitina. Em seguida, a enzima Carnitina Acilcarnitina Transferase (CACT), realiza a transferência de um ester de acilcarnitina por uma carnitina livre para a matriz mitocondrial. Por fim, a enzima Carnitina Palmitoil Transferase 2 (CPT2) catalisa a importação de ácido graxo acyl-CoA para a membrana interna da mitocôndria, transferindo os grupos acil dos ésteres de acilcarnitina, gerando ésters de acil-CoA. Na matriz mitocondrial, acil-CoA é clivada para formar ácido graxo-acil-CoA, por meio de β -oxidação, e então entra no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, para geração de ATP pelas células (ADEVA-ANDANY et al., 2019; BERNDT et al., 2019; GEWIN, 2021).

Patógenos intra e extracelulares são capazes de subverter e utilizar o aparato celular para obtenção de energia por meio de β -oxidação para sobrevivência no interior da célula, ou em proximidade com as células, levando a danos celulares, como redução do funcionamento mitocondrial e acúmulo de gotículas de lipídeos no citoplasma, além de induzirem inibição ou ativação do processo de autofagia, descrito como intimamente ligado ao metabolismo lipídico (BARBA et al., 1997; BARLETTA et al., 2016; DIAS et al., 2020; EPISCOPIO et al., 2019; MONSON et al., 2021; SAMSA et al., 2009; WALTHER; FARESE, 2012).

2.7 Autofagia

Autofagia é um mecanismo celular envolvido na regulação e manutenção da homeostasia. Células em metabolismo basal, sem receber nenhum tipo de agressão ou injúria, utilizam este processo para *turnover* de organelas velhas ou lesadas e proteínas degradadas. Células infectadas por patógenos intracelulares também se utilizam deste processo para eliminação do patógeno, fundindo vesículas lisossomais aos vacúolos autofágicos contendo os patógenos (GALLUZZI et al., 2012;

MIZUSHIMA; KOMATSU, 2011; SANTECCHIA et al., 2022; SINGH et al., 2009; TAKABATAKE et al., 2014).

3 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as alterações morfológicas e moleculares em decorrência da transição epitélio-mesenquimal em células HK-2 e fibrose renal em camundongos infectados por *L. interrogans*.

3.1 Objetivos específicos

- Descrever as alterações na produção e deposição de proteínas de matriz extracelular por células HK-2 infectadas com *L. interrogans*.
- Avaliar a ativação de vias de comunicação celular envolvidas no processo de EMT em células HK-2 infectadas por *L. interrogans*.
- Descrever as alterações fenotípicas de células HK-2 infectadas por *L. interrogans*.
- Investigar a participação do metabolismo lipídico de células HK-2 e suas alterações após a infecção por *L. interrogans*.
- Avaliar a ocorrência de EMT e fibrose renal em modelo murino de infecção crônica por *L. interrogans*.
- Avaliar a ocorrência de EMT em células de túbulos contorcidos proximais de rins de camundongos infectados por *L. interrogans*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos e experimentos descritos foram aprovados pela CEUA ICB sob número 9259010620, e pela CEUA IB sob o número 9421030620. Foram realizadas ao menos três replicatas biológicas de cada experimento descrito a seguir, com exceção dos experimentos envolvendo animais.

4.1 Cultivo bacteriano

Leptospira interrogans sorovar Copenhageni L1-130 e *Leptospira interrogans* sorovar Manilae L495 (espécies patogênicas) e *Leptospira biflexa* sorovar Patoc (espécie saprófita) foram cultivadas em meio EMJH suplementado com 10% de Difco® Leptospira Enrichment EMJH (Becton, Dickinson and Co., Sparks, USA) em aerobiose a 29° C. O subcultivo foi realizado a cada sete dias, transferindo 10% da cultura para um novo meio. Os sorovares Copenhageni L1-130 e Manilae L495 foram utilizados nos ensaios até a sexta passagem, garantindo, assim, a sua virulência. Na sexta passagem os sorovares patogênicos foram inoculados em hamsters (*Mesocricetus auratus*) (CEUA IB 7744160321) e isolados dos rins e fígado dos animais após aparecimento dos sintomas da doença.

4.2 Cultivo e manutenção das linhagens celulares

As células HK-2 foram mantidas em meio DMEM/Ham's F12 (Dubbelco's modified Eagle medium/Ham's F12 – LGC Biotecnologia Ltda., Brasil), suplementado com 5% de soro fetal bovino (LGC Biotecnologia, Ltda., Brasil), 2mM de glutamina (LGC Biotecnologia Ltda., Brasil), 20mM de tampão HEPES, 0,4 µg/mL de hidro cortisona (Sigma Aldrich, EUA), 5 µg/mL de insulina, 5 µg/mL de transferrina e 5 µg/mL de selenito de sódio (ITS – Roche, EUA) em garrafas T75 ou T25. O meio foi trocado a cada 2-3 dias e as células foram ressemeadas quando a confluência atingiu aproximadamente 95%.

4.3 Infecção das células HK-2

As células HK-2 foram semeadas em placas de 96, 24 ou 6 poços, na concentração de 1×10^5 células/mL. O meio das células foi substituído por meio sem soro fetal bovino 24 horas antes da infecção para sincronizar o ciclo celular. No dia da

infecção as células de três poços (placa de 96 poços) ou de um poço (placa de 24 poços) foram soltas utilizando TrypLEExpress (Gibco, EUA) e contadas para cálculo da multiplicidade de infecção (MOI 50:1).

Para a infecção *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130, *L. interrogans* sorovar Manilae L495 e *L. biflexa* sorovar Patoc foram contadas em câmara de Petroff-Hausser para determinação da concentração de bactérias no cultivo celular. Após o cálculo da MOI as bactérias foram centrifugadas a 5432 x *g*, durante 30 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as bactérias ressuspensas em meio específico para cada célula. Nos experimentos utilizando HGF recombinante humano (R&D Biosystems, #294-HG) nas células HK-2 nas doses de 25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL e 200 ng/mL, o fator de crescimento foi adicionado aos poços contendo as células no momento da infecção.

Sobrenadante, células e lisados celulares foram coletados a cada 24 horas durante três dias, processados e armazenados a -20° C ou -80° C para posterior análise.

4.4 Western blot

O sobrenadante das células foi centrifugado a 5432 x *g*, durante 30 minutos a 4° C para retirada de qualquer bactéria que possa ter ficado em suspensão. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um microtubo contendo um coquetel de inibidores de protease (Roche, EUA) na concentração final de 1x. As amostras foram mantidas a -20° C até análise.

As células foram lisadas para obtenção de proteínas citoplasmáticas e nucleares segundo descrito por Clarke; Liu (2014). Brevemente, as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e foi adicionado ao poço o tampão de lise (HEPES 10 mM (pH 7.5), NaCl 50 mM, Triton X-100 1% e EDTA 2 mM) (QU et al., 2020) contendo coquetel de inibidores de protease (Roche, #11697498001) e inibidores de fosfatase (Sigma Aldrich, #78420). Em seguida, foi coletado todo o conteúdo do poço e mantido a 4° C sob agitação durante 45 minutos, para que ocorresse a lise das células. As amostras foram centrifugadas a 16.100 x *g* durante 10 minutos e o sobrenadante transferido para um novo microtubo e mantido a -80° C até análise.

Os sobrenadantes das células HK-2 foram adicionados ao tampão de amostra SDS e fervidos durante 5 minutos a 96° C. As amostras foram separadas por eletroforese em SDS-PAGE a 10% e transferidas para membranas de nitrocelulose. Ligações não específicas foram bloqueadas utilizando solução de leite desnatado a 10% em PBS-T (*Phosphate buffered saline* com 0,05% de Tween 20) ou TBS-T (*Tris buffered saline* com 0,05% de Tween 20) *overnight*. A membrana foi incubada durante uma hora a temperatura ambiente e sob agitação com anticorpos primários, anti-colágeno IV diluição de 1:1000 (Sigma, #C1926), anti-fibronectina diluição de 1:5000 (Sigma, #F3648), anti-laminina diluição de 1:1000 (Sigma #L9393), anti-decorina diluição de 1:5000 (R&D Biosystems #AF143) e anti-MMP7 diluição de 1:1000 (Santa Cruz, #sc515703HRP), diluídos em solução de leite desnatado 5% ou albumina sérica bovina 5% em TBS-T. Anticorpos secundários conjugados com peroxidase anti-IgG produzido em cabra 1:10000, anti-IgG produzido em camundongo 1:5000 e anti-igG produzido em coelho 1:10000 foram incubados à temperatura ambiente, sob agitação durante uma hora. As proteínas foram visualizadas utilizando SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, #34580) ou SuperSignal™ West Dura Extendend Duration Substrate (Thermo Scientific, # 34075) e registradas em fotodocumentador UVITEC (Cambridge, Reino Unido).

Os lisados celulares foram adicionados ao tampão de amostra SDS e fervidos durante 5 minutos a 96° C. As amostras foram separadas em SDS-PAGE a 10% e eletroblotadas em membrana de nitrocelulose. Ligações inespecíficas foram bloqueadas utilizando albumina sérica bovina (BSA – vWR LifeSciences) a 5% em TBS-T durante 2 horas a temperatura ambiente e sob agitação ou a 4° C *overnight* sem agitação. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários, anti-Smad2 diluição de 1:1000 (ThermoFisher Scientific, #44-246G e Cell Signaling, #3108S), anti-Smad3 diluição de 1:1000 (ThermoFisher Scientific, #44-244G), anti-Nf-κB p50 diluição de 1:1000 (Invitrogen, #51-3500), anti-beta catenina diluição de 1:1000 (Invitrogen, #MA1-301), anti-LC3I/LC3II diluição de 1:1000 (ThermoFisher #PA1-1693) e anti-beta actina diluição de 1:5000 (Sigma, #A5441) diluídos em TBS-T durante duas horas a temperatura ambiente e sob agitação ou *overnight* a 4° C. Os anticorpos secundários conjugados com peroxidase anti-IgG produzido em camundongo 1:5000 e anti-igG produzido em coelho 1:10000 foram incubados por 45 a 60 minutos, a temperatura ambiente e sob agitação. As proteínas foram visualizadas

utilizando SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, #34580) ou SuperSignal™ West Dura Extendend Duration Substrate (Thermo Scientific, # 34075) e registradas em fotodocumentador UVITEC (Cambridge, Reino Unido).

4.5 Imunofluorescência

As células HK-2 foram semeadas em placas de 6 poços contendo lamínulas de vidro de 18 mm (Knittel, # 100018) no fundo de cada poço na concentração de 1×10^5 células/mL e incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C durante 72 horas. Às 24 horas pré-infecção o meio de células foi substituído por meio sem soro fetal bovino. As células foram infectadas na MOI de 50:1 com *L. interrogans* sorovar Manilae L495 durante 72 horas. Nos tempos de 24, 48 e 72 horas, o sobrenadante foi retirado e as células foram fixadas em solução de formalina a 2% em PBS durante 15 minutos. Após a fixação as células foram lavadas três vezes em PBS, ficando submersas durante 1 minuto entre as lavagens. Então, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 0,1% em PBS durante quatro minutos e foram lavadas conforme descrito acima. Após as lavagens as células foram bloqueadas em solução de 2% de BSA (vWR LifeSciences) em PBS, durante 30 minutos. Os anticorpos primários anti-colágeno IV diluição de 1:400 (Sigma, #C1926), anti-fibronectina diluição de 1:500 (Sigma, #F3648) e anti-Smad2 diluição de 1:500 (Cell Signaling, #3108S) foram diluídos em solução de 2% de BSA em PBS e as células foram incubadas com os anticorpos primários durante uma hora. As células foram lavadas três vezes com solução de 2% de BSA em PBS, ficando submersas durante 1 minuto entre as lavagens. As células foram então incubadas com os anticorpos secundários anti-coelho conjugado com FITC diluição de 1:1000 (Sigma, #F0382) ou anti-camundongo conjugado com FITC diluição de 1:1000 (TermoFisher Scientific) em solução de 2% de BSA em PBS contendo iodeto de propídio ou DAPI na concentração de 1:1000, durante 1 hora. As células foram lavadas com PBS por 3 vezes, ficando submersas por um minuto entre as lavagens. Uma gota de solução de montagem Citifluor (Electron Microscopy Sciences, #17976-25) foi colocada em uma lâmina de microscopia e as lamínulas foram colocadas com a face contendo as células em contato com a solução de montagem e seladas com esmalte para unhas.

As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência EVOS® FL (ThermoFisher Scientifics, USA) nos filtros GFP and Texas Red no aumento de 40x e em microscópio confocal TCS SP8, Leica, Alemanha.

4.6 Zimografia

Os sobrenadantes das células foram coletados, centrifugados a 5432 x g durante 30 minutos a 4° C para retirada de qualquer bactéria em suspensão. Os sobrenadantes não receberam tratamento com inibidores de proteases e foram mantidos a -20° C até o momento da análise.

As amostras foram adicionadas ao tampão de amostra SDS sem β -mercaptoetanol (condição não redutora) e mantidas a temperatura ambiente até o momento de aplicar no gel. As proteínas foram separadas em SDS-PAGE 10% contendo 0,1% de gelatina utilizando 25 mA por gel durante no máximo 90 minutos para se evitar aquecimento do sistema e desnaturação das proteínas. Logo após a separação o gel foi colocado em uma solução renaturante contendo 2,5% de Triton X-100 durante 30 minutos a temperatura ambiente e sob agitação. O gel foi então lavado com água destilada e colocado em uma solução de desenvolvimento 0,05M Tris-HCl, pH 7,8, 0,2M NaCl, 0,005M CaCl_2 e 0,02% de IGEPAL e incubado a temperatura ambiente, durante 30 minutos, sob agitação. Em seguida, a solução de desenvolvimento foi descartada e substituída por nova e o gel foi incubado a 37° C durante 18 horas. Para visualização das bandas de degradação da gelatina, o gel foi inicialmente corado por Coomassie Blue durante 2 horas sob agitação e descorado com solução descorante até que as bandas de degradação pudessem ser observadas (TOTH; SOHAIL; FRIDMAN, 2012).

4.7 Citometria de fluxo para avaliação da ativação de caspase 3

As células HK-2 infectadas com *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 foram soltas dos poços de uma placa de 24 poços utilizando TrypLE Express (Gibco, EUA) conforme indicação do fabricante. As células foram centrifugadas a 200 x g, por 10 minutos a temperatura ambiente e ressuspensas em 1mL de PBS contendo 2% de BSA, numa concentração de 5×10^5 células/mL. As análises de citometria de fluxo foram realizadas nos tempos de 24, 48 e 72 horas pós infecção. O kit para análise de

morte celular CellEvent™ Caspase 3/7 Green Flow Cytometry (Thermo Fisher Scientific, EUA) foi utilizado conforme recomendações do fabricante.

As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACS Canto™ II Cell Analyzer (BD Uniscience, EUA) e os dados analisados no software FlowJo (BD Uniscience, EUA).

4.8 ELISA

Os sobrenadantes das células foram avaliados para produção de TGF- β 1, IL-1, IL-6 e TNF- α por meio de kit comercial de ELISA de captura (ThermoFisher Scientific) conforme recomendações do fabricante. Resumidamente, o anticorpo de captura foi adicionado aos poços da placa de ELISA de alta adesão e incubou-se a 4°C *overnight* para adesão completa à placa. As amostras foram adicionadas aos poços e incubadas a 4°C *overnight* e o anticorpo conjugado à peroxidase foi adicionado e uma nova incubação a 4°C *overnight* foi realizada. Após a incubação as reações foram reveladas e paradas utilizando ácido sulfúrico 2N e a cor gerada foi analisada em leitor de ELISA no comprimento de onda de 450 nm.

4.9 Infecção de camundongos

Foram utilizados 28 camundongos C57BL/6 entre 8 e 12 semanas de vida com peso médio de 17 gramas. Os animais foram ambientados no biotério de experimentação do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan durante uma semana antes do início do experimento. Foram oferecidas ração balanceada para roedores comercial e água potável *ad libitum*, e os animais foram mantidos em regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão, durante todo o período do experimento.

Os animais foram distribuídos em cinco caixas de plástico fosco contendo maravalha. Em uma caixa ficaram quatro animais do grupo controle, no restante das caixas foram alocados seis animais em cada. Foram estabelecidos 3 grupos, 1) grupo controle (4 animais), 2) grupo que recebeu 2×10^8 bactérias – 12 animais e 3) grupo que recebeu 1×10^6 bactérias – 12 animais.

No dia da infecção, *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 e *L. interrogans* sorovar Manilae L495 foram contadas em câmara de Petroff-Hausser para determinação da concentração bacteriana na cultura e calculou-se a quantidade de

bactérias necessárias para a infecção dos camundongos. A cultura foi centrifugada a $5432 \times g$ durante 30 minutos a temperatura ambiente e as bactérias ressuspensas em PBS na concentração adequada. A infecção foi realizada por via intraperitoneal, com um volume de 200 μL por camundongo, com um total de 2×10^8 e 1×10^6 bactérias por animal. O grupo controle recebeu injeção intraperitoneal de 200 μL de PBS estéril.

Os camundongos foram monitorados diariamente para observação de mudanças comportamentais ou aparecimento de sintomatologia clínica de leptospirose. O peso foi aferido semanalmente durante as duas primeiras semanas e depois quinzenalmente para acompanhamento clínico dos animais. Nos tempos 15, 30, 45 e 60 dias, um animal do grupo controle e três animais de cada grupo experimental foram eutanasiados com sobredose anestésica, utilizando xilazina (30 mg/kg p.v.) e quetamina (300 mg/kg p.v.).

Os rins foram imediatamente coletados e fixados em formalina neutra tamponada. Após 24 horas, os órgãos foram seccionados transversalmente e colocados em cassetes histológicos e mantidos em formalina neutra tamponada até o momento do processamento. Os rins foram incluídos em parafina e foram realizados cortes de aproximadamente 5 μm . Os cortes foram então desparafinados, desidratados em xilol, seguidamente por álcool em absoluto, 95% e 70%, respectivamente e lavados em água destilada. Ao final, os cortes foram corados por Hematoxilina e Eosina para avaliação da inflamação e por Picrosírius Red para avaliação da fibrose.

4.10 Análise histológica e imunohistoquímica

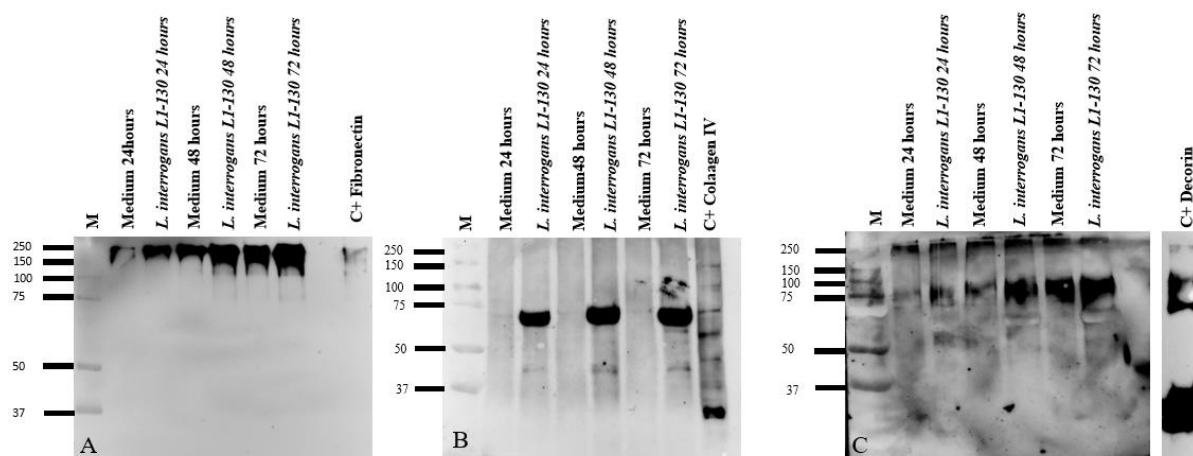
Para mensuração da fibrose foi utilizado o escore de inflamação renal descrito por Fanton D'Andon et al. (2014), que utiliza classificação de 0 a 5, sendo 0 - sem inflamação; 1- células mononucleares dispersas no interstício; 2- infiltrado mononuclear moderado difuso; 3- infiltrado mononuclear focal nodular; 4- infiltrado mononuclear difuso e nodular sem presença de tubulite; 5- infiltrado mononuclear difuso e nodular com tubulite significativa. A fibrose renal foi avaliada qualitativamente, por meio da análise das lâminas coradas por Picrosírius Red e observação de áreas de deposição de colágeno.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 A infecção por *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 e por *L. interrogans* sorovar Manilae L495 induz a produção de proteínas de matriz extracelular pelas células HK-2

Após a infecção das células HK-2 por *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 pode-se observar um aumento da produção de proteínas de MEC pelas células. As análises de Western blot realizadas com sobrenadantes das células infectadas com *L. interrogans* nos tempos 24, 48 e 72 horas demonstram um aumento progressivo da produção de fibronectina, colágeno tipo IV e decorina (Fig. 1).

Figura 1. Detecção de fibronectina (A), colágeno IV (B) e decorina (C) no sobrenadante de células HK-2 infectadas com *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni L1-130.

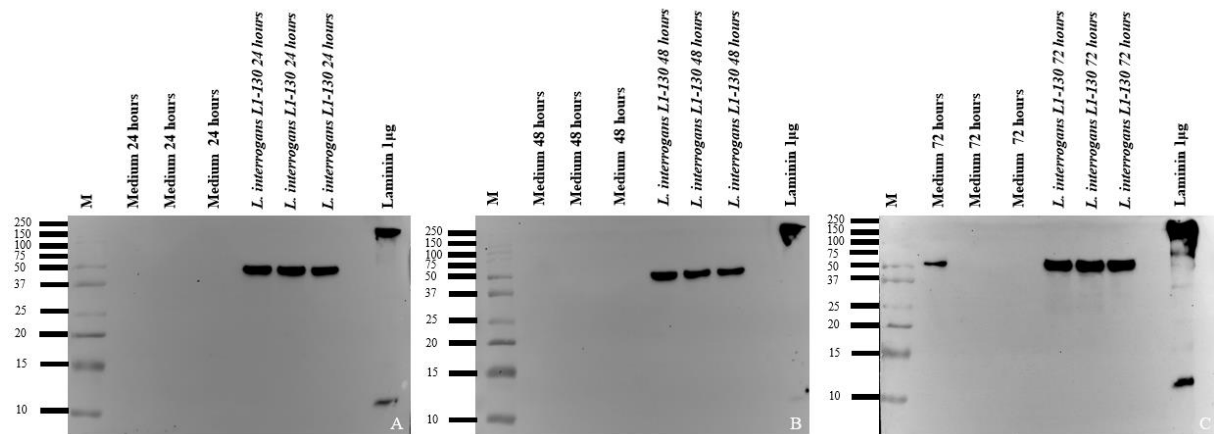


Após eletroforese em condições redutoras, as proteínas dos sobrenadantes das células HK-2 foram transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos diluídos em leite desnatado 5% em PBS-T: primários: anti-fibronectina produzido em coelho 1:5.000; anti-colágeno IV produzido em camundongo 1:1.000; anti-decorina produzido em cabra 1:1.000. Secundários: anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase 1:10.000; anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase 1:5.000; anti-IgG de cabra conjugado à peroxidase 1:10.000. As bandas foram observadas após revelação com o kit SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific).

Houve também indução da produção de laminina pelas células HK-2 após a infecção por *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 (Fig. 2 A, B e C), que não foi observada pela infecção com *L. biflexa* sorovar Patoc (dados não mostrados). O padrão de bandas observadas no Western blot para laminina, apesar de não coincidir com o controle positivo da molécula purificada, é esperado devido ao processamento

dessa proteína após sua secreção para o meio extracelular, seja por proteases bacterianas quanto celulares (SENYÜREK et al., 2010, 2014).

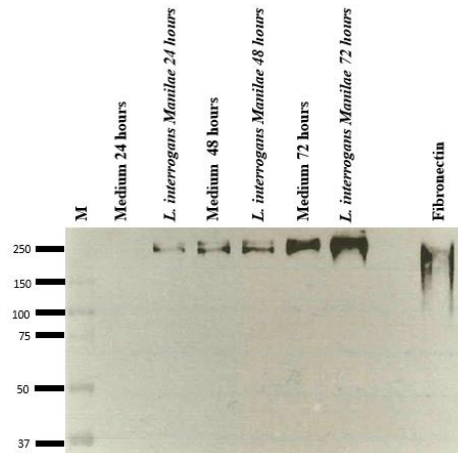
Figura 2. Detecção de laminina no sobrenadante de células HK-2 infectadas com *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni L1-130.



Após eletroforese em condições redutoras, as proteínas dos sobrenadantes das células HK-2 nos tempos 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C) foram transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos diluídos em leite desnatado 5% em PBS-T: primário: anti-laminina produzido em coelho 1:1000. Secundário: anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase 1:5.000. As bandas foram observadas após revelação com o kit SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific).

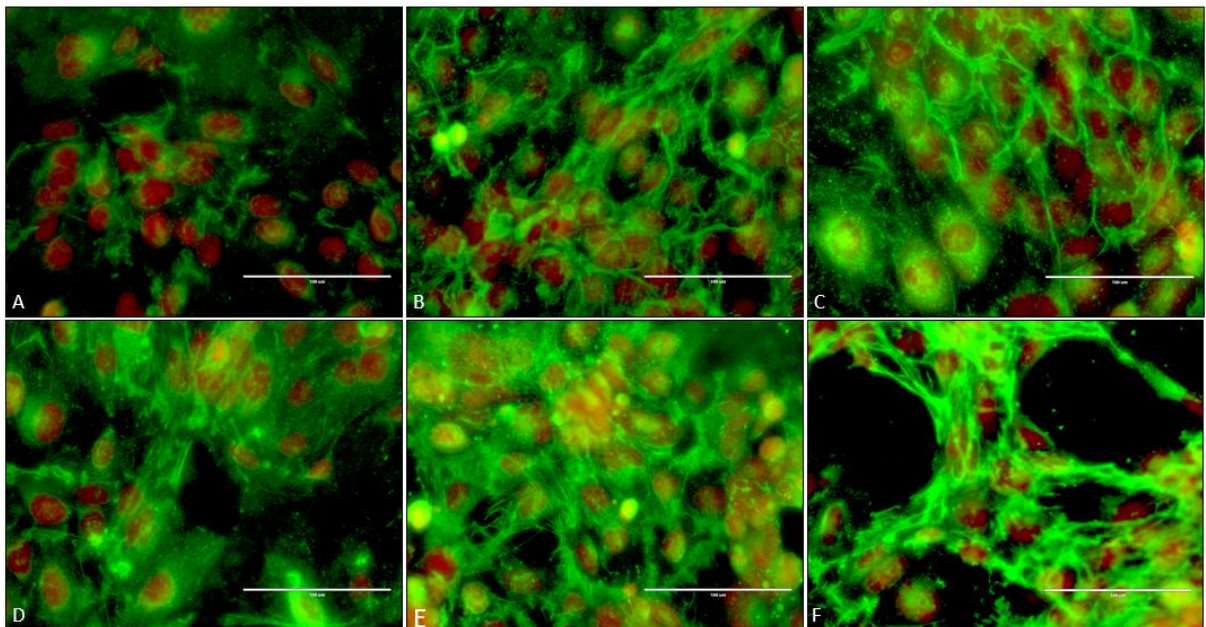
Um aumento da produção de fibronectina também foi evidente nas células HK-2 infectadas com *L. interrogans* sorovar Manilae L495 (Fig. 3). Análises por imunofluorescência demonstram que há aumento progressivo da produção e deposição de fibronectina pelas células (Fig. 4). Além do aumento da quantidade de fibronectina, há alteração no padrão de deposição das fibras quando se compara o controle negativo (células contendo apenas meio de cultivo) com as células infectadas. Apesar de não ser possível avaliar nas imagens de imunofluorescência, sabe-se que proteases secretadas por *Leptospira* são capazes de clivar a fibronectina (COURROL et al., 2022). A alteração das fibras de fibronectina segue as alterações morfológicas celulares, mas há a possibilidade do envolvimento destas proteases na mudança do padrão de deposição desta proteína.

Figura 3. Detecção de fibronectina no sobrenadante de células HK-2 infectadas com *Leptospira interrogans* sorovar Manilae L495 por Western blot.



Após eletroforese em condições redutoras, as proteínas dos sobrenadantes das células HK-2 foram transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com os seguintes anticorpos diluídos em leite desnatado 5% em PBS-T: primário: anti-fibronectina produzido em coelho 1:5.000. Secundário: anti-IgG de coelho 1:10.000. As bandas foram observadas após revelação com o kit SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific).

Figura 4. Detecção de fibronectina secretada pelas células HK-2 após infecção com *Leptospira interrogans* sorovar Manilae L495 por imunofluorescência.

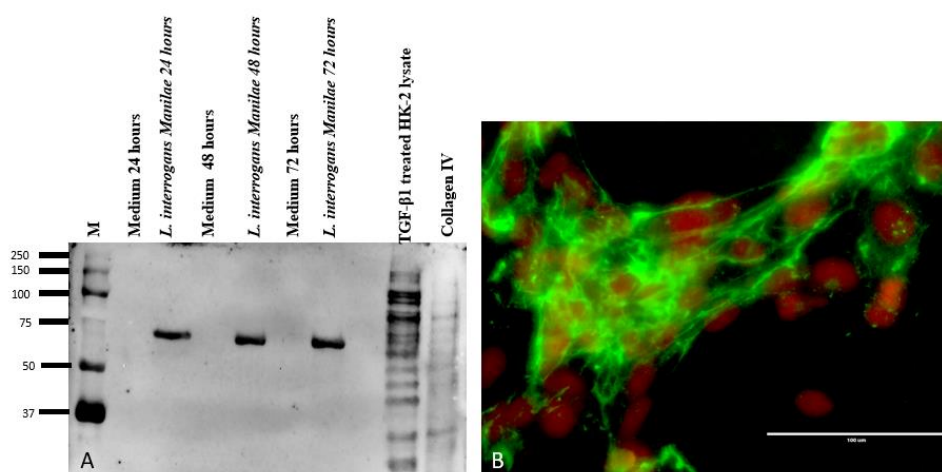


As células HK-2 foram cultivadas em lamínula e após a infecção durante 24 horas (A e D), 48 horas (B e E) e 72 horas (C e F), respectivamente, realizou-se fixação e marcação das células utilizando os seguintes anticorpos: primário: anti-fibronectina 1:400. Secundário: anti-IgG de coelho conjugado com FITC 1:1.000. Barra lateral inferior esquerda 100 µm. Imagens capturadas em microscópio de fluorescência EVOS® FL (ThermoFisher Scientific, USA).

A infecção por *L. interrogans* sorovar Manilae L495 também induz à produção de colágeno IV pelas células HK-2 em todos os períodos de infecção, conforme

observado nas células infectadas por *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130. A Figura 5 evidencia a produção de colágeno IV pelas células HK-2 por Western Blot (Fig. 5 A) e por imunofluorescência no tempo de 72 horas após a infecção, momento em que há maior produção desta proteína pelas células, demonstrado na Figura representativa (Fig. 5 B).

Figura 5. Detecção de colágeno IV a partir do sobrenadante de células HK-2 infectadas com *Leptospira interrogans* sorovar Manilae L495 por Western blot e imunofluorescência



A) Após eletroforese em condições redutoras, as proteínas dos sobrenadantes das células HK-2 foram transferidas para membranas de nitrocelulose. A membrana foi incubada com os seguintes anticorpos diluídos em leite desnatado 5% em PBS-T: primário: anti-colágeno IV produzido em camundongo 1:1.000. Secundário: anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase 1:5.000. As bandas foram observadas após revelação com o kit SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific). B) As células HK-2 foram cultivadas em lamínula e após a infecção realizou-se fixação e marcação das células utilizando os seguintes anticorpos: primário: anti-colágeno produzido em camundongo IV 1:500. Secundário: anti-IgG de camundongo conjugado com FITC 1:1.000. Barra lateral inferior esquerda 100 μ m. Imagens capturadas em microscópio de fluorescência EVOS® FL (ThermoFisher Scientific, USA).

Na infecção crônica por *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 há aumento da produção e deposição de MEC em rins de camundongos C57BL/6 (FANTON D'ANDON et al., 2014). *In vitro*, utilizando células HK-2, Tian et al. (2006) demonstraram que a estimulação das células HK-2 com extrato de proteínas de membrana externa de *L. santarosai* sorovar Shermani induz a produção de proteínas de MEC, como fibronectina e colágenos I e IV.

Conforme mostrado nas Fig. 1 - 5 a infecção por *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 e sorovar Manilae L495 induziu a produção e secreção de fibronectina, colágeno IV e decorina. O colágeno IV está presente principalmente na membrana basal das células dos túbulos contorcidos proximais em quantidades muito pequenas e o aumento de sua produção e deposição estão relacionados com

espessamento e fibrose tubular. Já a fibronectina e a decorina estão presentes em maior quantidade no espaço intersticial e seus aumentos estão relacionados com uma fibrose intersticial (BLACK; LEVER; AGARWAL, 2019; BÜLOW; BOOR, 2019).

Em modelos celulares, o aumento da produção de proteínas de matriz extracelular está, também, relacionado com a ocorrência de EMT. A fibronectina é um importante marcador molecular de EMT em células HK-2 (GUO et al., 2016) e seu aumento indica uma provável ocorrência da transição epitélio mesenquimal após a infecção das células pelos sorovares Copenhageni L1-130 e Manilae L495. Estes resultados são indicativos de que a infecção *in vitro* de células HK-2 por *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 e *L. interrogans* sorovar Manilae L495 induz EMT nas células HK-2.

A laminina, assim como o colágeno IV, também está presente na membrana basal dos túbulos renais e, apesar da indução observada, não é comumente descrita como importante para o processo de fibrose renal nem da ativação de EMT (BÜLOW; BOOR, 2019; TOMLIN; PICCININI, 2018). Todavia, a indução da expressão e secreção de laminina e seu posterior processamento gerando peptídeos bioativos por células epiteliais e mesenquimais é um fenômeno já descrito (SENYÜREK et al., 2010, 2014; TOMLIN; PICCININI, 2018). Peptídeos derivados do processamento da laminina presente na pele de pacientes humanos apresentando ferida crônica com ou sem infecção possuem função antimicrobiana e auxiliam no processo de cicatrização e reepitelização. Pacientes com menores concentrações destes peptídeos apresentam um processo de cicatrização retardado além de serem predispostos à infecção bacteriana (SENYÜREK et al., 2014).

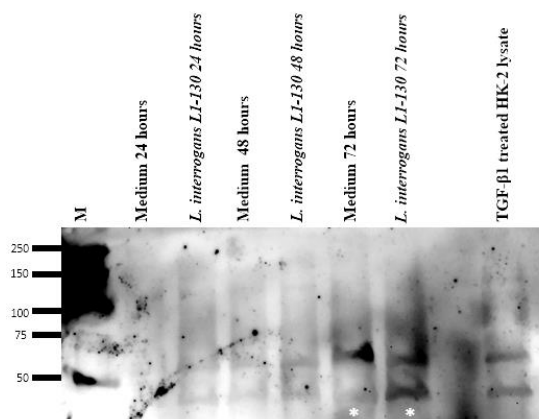
A identificação de um peptídeo de aproximadamente 50 kDa no sobrenadante das células de túbulos contorcidos proximais, derivado da laminina (Fig. 2), é sugestiva de que pode haver processamento dessa proteína induzido pela infecção, já que não há identificação do peptídeo nos grupos controles negativos em nenhum dos tempos estudados. Por se tratar de um tecido epitelial lesionado pela infecção e que apresenta indução da produção da laminina, especula-se que o peptídeo gerado possa ter papel na cicatrização e no controle da infecção.

5.2 A infecção por *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 e por *L. interrogans* sorovar Manilae L495 induz a ativação da via do TGF- β 1

A via do TGF- β 1 está envolvida em várias funções como diferenciação celular durante a embriogênese, migração celular, EMT e regulação imune, mas parece estar especialmente envolvida nos quadros de fibrose renal associada a injúrias renais decorrentes de *diabetes mellitus* e hipertensão arterial sistêmica. Estudos utilizando várias formas de bloqueio demonstraram que a ativação da via do TGF- β 1 é uma das principais responsáveis pela transcrição de genes relacionados à produção de proteínas de MEC e da ocorrência de EMT (DWORKIN et al., 2004; LIU, 2006; MIZUNO et al., 2000; STEMMMLER et al., 2019; TIAN et al., 2006; XU et al., 2020).

Frente à infecção por *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130, pode-se observar aumento na quantidade de Smad 3 fosforilado (p-Smad3) no citoplasma das células HK-2 (Fig. 6 observar as bandas destacadas por * demonstrando aumento na produção de p-Smad3 às 72 horas). Aumento na quantidade de p-Smad 3 demonstra que há ativação da via do TGF- β 1 que está relacionada com a indução de EMT *in vitro* e a produção de proteínas de matriz extracelular, como a fibronectina e colágeno IV (TIAN et al., 2006). Apesar da evidência da ativação da via do TGF- β 1 em células HK-2, outros pesquisadores não conseguiram identificar a ativação desta via em modelos murinos de infecção por *L. interrogans* (FANTON D'ANDON et al., 2014; FERRER et al., 2018; MATSUI et al., 2016). No entanto, como demonstrado na Figura 1, a infecção de células HK-2 por *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 induz a produção e a secreção de proteínas da MEC, demonstrando a provável indução de EMT mediada pela ativação da via do TGF- β 1 nestas células.

Figura 6. Detecção de p-Smad3 em lisado celular de células HK-2 após infecção por *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni L1-130.

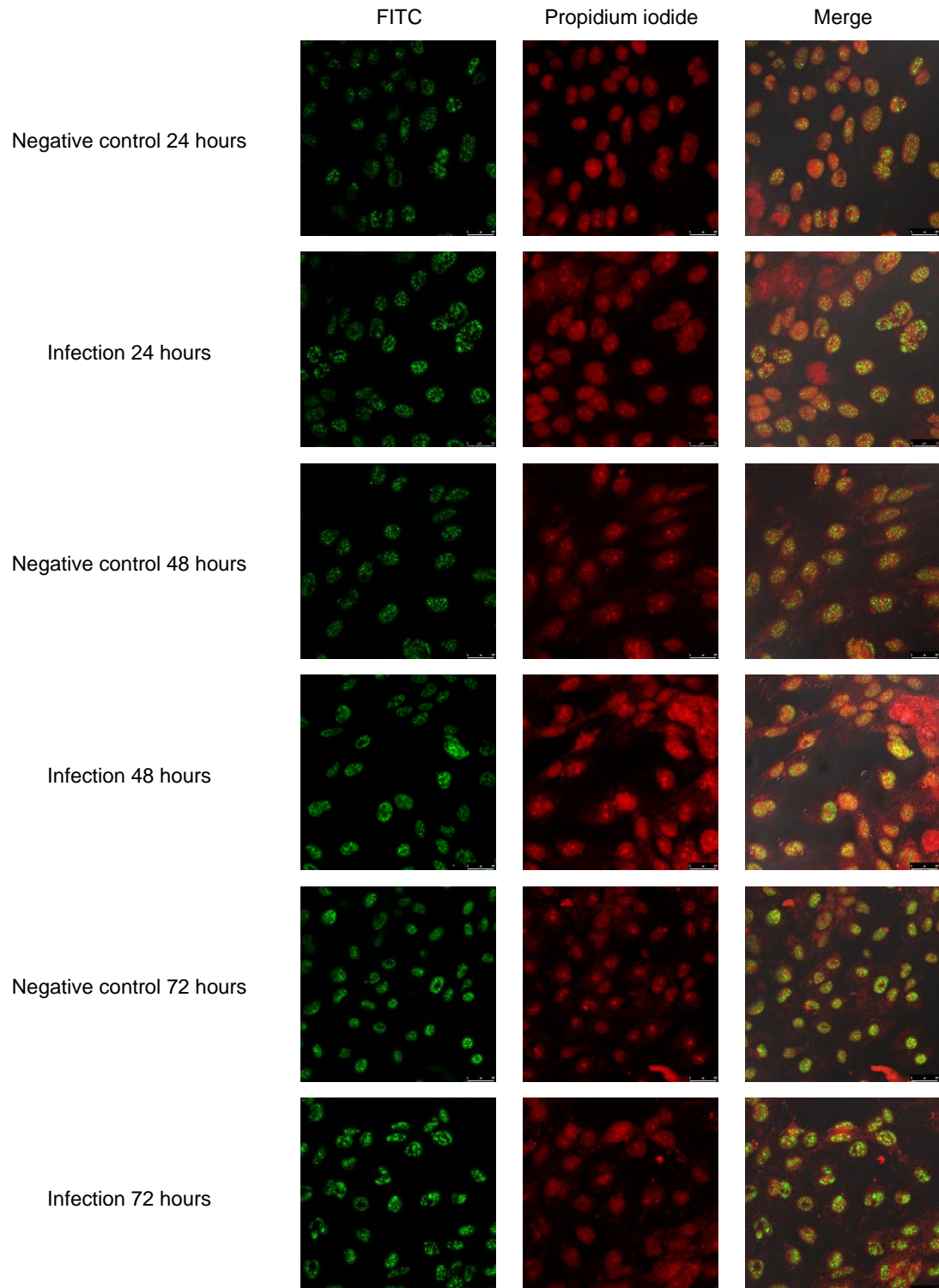


Após eletroforese em condições redutoras, as proteínas dos sobrenadantes das células HK-2 foram transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com os seguintes anticorpos diluídos em albumina sérica bovina 5% em TBS-T: primário: anti-p-Smad3 produzido em coelho 1:300. Secundário: anti IgG de coelho conjugado à peroxidase 1:1.000. As bandas foram observadas após revelação com o kit SuperSignal™ West Dura Extendend Duration Substrate (Thermo Scientific).

Houve aumento também na quantidade de p-Smad2 translocado para o núcleo das células após a infecção por *L. interrogans* sorovar Manilae L495 (Fig. 7). O aumento da concentração de p-Smad2 no núcleo das células HK-2 demonstra que houve ativação da via do TGF- β 1 e que esta via está provavelmente envolvida na indução da EMT e no aumento da produção e secreção de proteínas da MEC.

Durante a leptospirose crônica as leptospiros aderem às células de túbulos contorcidos proximais onde permanecem causando alterações patológicas. O estímulo constante destas células leva à ativação da via do TGF- β 1, em diferentes modelos de indução de EMT e fibrose renal como na nefropatia diabética e na obstrução ureteral unilateral. Mas outras vias envolvidas na EMT e na fibrose renal, como Wnt/ β -catenina, NF- κ B ou MAPK, podem ser ativadas independentemente, ou pode ainda haver uma interação entre essas vias (FU et al., 2019; GUO et al., 2016; WANG et al., 2020, 2011). Tendo em vista a possibilidade de ativação de outras vias importantes na ativação da EMT e a descrição da ativação dessas vias devido a ocorrência de *crosstalk*, o próximo passo foi investigar quais dessas vias estariam potencialmente ativadas nas células HK-2 em consequência à infecção por *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 ou *L. interrogans* sorovar Manilae L495.

Figura 7. Detecção de p-Smad2 em células HK-2 após infecção com *Leptospira interrogans* sorovar Manilae L495.

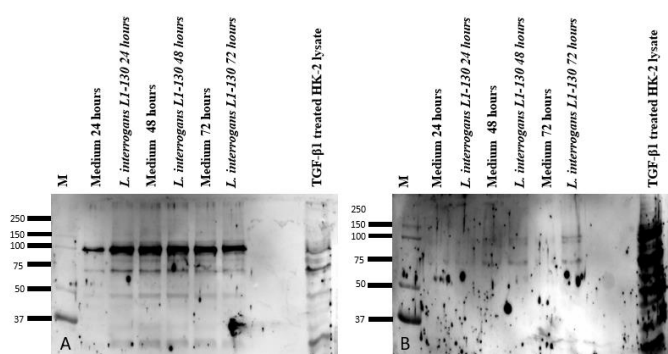


As células HK-2 foram cultivadas em lamínula e após a infecção realizou-se fixação e marcação das células utilizando os seguintes anticorpos: primário: anti-p-Smad2 1:500. Secundário: anti-IgG de coelho conjugado com FITC 1:1.000. Barra lateral inferior esquerda 100 µm. Imagens capturadas em microscópio confocal TCS SP8, Leica, Alemanha.

5.3 A infecção por *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 ativa a via Wnt/ β -catenina e induz a produção e ação de metaloproteases pelas células HK-2

A translocação nuclear de β -catenina em células HK-2 parece estar envolvida na ocorrência de EMT induzida também pela ativação da via do TGF- β 1 (GUO et al., 2016; KANLAYA et al., 2020). A produção de Wnt1, um importante ligante do receptor *Frizzled* da via Wnt/ β -catenina está aumentada em células epiteliais após a fosforilação e translocação nuclear dos fatores de transcrição da via do TGF- β 1 (WANG et al., 2020). Na avaliação da produção de β -catenina citoplasmática, pode-se notar um aumento da detecção da proteína às 24 horas. Já as 24 horas pós infecção há semelhança entre a detecção da proteína nos grupos controle e infecção com posterior redução da concentração de β -catenina no citoplasma das células infectadas às 72 horas. Um padrão inverso é notado quando se avalia a presença de β -catenina no interior dos núcleos das células HK-2, com maiores concentrações sendo observadas às 72 horas pós infecção (Fig. 8), demonstrando que há ativação da via do Wnt/ β -catenina, uma vez que a β -catenina funciona como fator de transcrição da via. Este resultado é sugestivo de que não só a ativação da via do TGF- β 1 é responsável pelo aumento da produção de MEC observada na infecção das células por *L. interrogans*, mas que outras vias parecem se sobrepor e atuarem sinergicamente levando ao quadro observado.

Figura 8. Detecção de β -catenina, citoplasmática (A) e intranuclear (B) em células HK-2 infectadas por *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni L1-130.

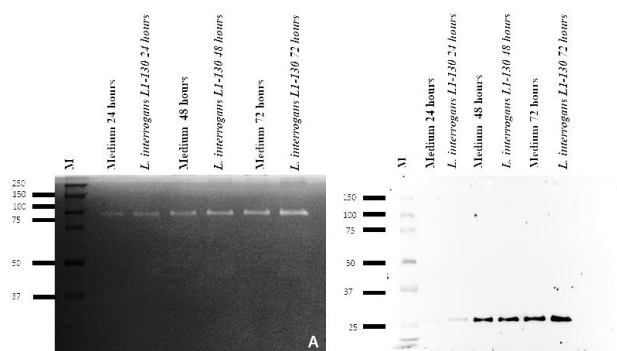


Após eletroforese em condições redutoras, as proteínas dos sobrenadantes das células HK-2 foram transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos diluídos em albumina sérica bovina 5% em TBS-T: primário: anti- β -catenina produzido em camundongo 1:1.000. Secundário: anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase 1:5.000. As bandas foram observadas após revelação com o kit SuperSignal™ West Dura Extendend Duration Substrate (Thermo Scientific).

A via do Wnt/ β -catenina tem como um de seus genes alvos os genes que codificam a produção de metaloproteases, como a MMP7, MMP2 e MMP9 (PRADO; BARBOSA, 2021). Metaloproteases são uma família de proteases com similaridades estruturais e apresentam ação proteolítica sobre proteínas da MEC. Todas as proteases dessa família apresentam um resíduo de cisteína conservado em seu pró-domínio e a presença de uma molécula de zinco reativo em seu sítio catalítico (JENKINS, 2008). Além da função de degradação de proteínas da MEC, há descrição de ativação do TGF- β pelas MMP2 e MMP9. A ativação dessa citocina e consequentemente sua ação sobre as células, leva a uma maior expressão e secreção dessas metaloproteases (KIM; KIM; MOON, 2004). A MMP7, envolvida no EMT e fibrose renal, *in vivo*, também é produzida e secretada por células de túbulos contorcidos proximais e responsável pela degradação de proteínas da MEC e de e-caderina (KE et al., 2017; ZHOU et al., 2017).

A análise por zimografia do sobrenadante das células HK-2 mostrou que há atividade gelatinolítica na altura compatível com a massa molecular de MMP 9 ativa (92 kDa) (TOTH; SOHAIL; FRIDMAN, 2012). Já a MMP 7 (25 kDa) foi detectada por meio de Western blot. Ambas metaloproteases apresentam leve indução da produção ao longo dos tempos de infecção, apresentando maior concentração após 72 horas (Fig. 9).

Figura 9. Zimografia do sobrenadante de células HK-2 infectadas com *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 e Western blot para MMP7 do sobrenadante de células HK-2 infectadas com *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni L1-130.



A) Após eletroforese dos sobrenadantes das células HK-2, em condições não redutoras, o gel de acrilamida 10% contendo 1% de gelatina foi incubado a 37° C para ação das metaloproteases. B) Após eletroforese em condições redutoras, as proteínas dos sobrenadantes das células HK-2 foram transferidos para membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com os seguintes anticorpos diluídos em leite desnatado 5% em PBS-T: primário: anti-MMP7 produzido em camundongo 1:500. Secundário: anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase. As bandas foram observadas após revelação com o kit SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific).

A MMP7 apresenta ação proteolítica contra proteínas da MEC, e induz indiretamente a produção destas pela ativação do TGF- β 1 latente (KE et al., 2017). Outra proteína alvo da MMP7 é a e-caderina, responsável pela manutenção da adesão de células epiteliais e a sua degradação leva à diminuição da adesão celular e ativação da via da β -catenina independente do receptor Wnt e, consequentemente indução de EMT e aumento da produção de MMP7 (HU et al., 2020; KE et al., 2017; LYNCH et al., 2010). Nas células HK-2 houve indução da produção e translocação para o núcleo da β -catenina após a infecção por *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 (Fig. 8 A e B). Além da degradação direta de proteínas da MEC e de e-caderina pela MMP7, essa enzima possui ação sobre as pró-MMP2 e MMP9 e a ativação delas pela MMP7 está associada à degradação das proteínas da zona de oclusão presente nas células HK-2 (HU et al., 2020).

Estes resultados indicam que parece haver uma sobreposição de vias ativas relacionadas ao EMT em células HK-2 infectadas por *L. interrogans* e que os produtos da ativação das vias atuam como amplificadores, como é o caso da MMP7, que é produzida após a ativação da via do Wnt/ β -catenina e possui função direta na ativação não canônica da via pela degradação da e-caderina e ação indireta na via do TGF- β 1, por degradar MEC e ativar o TGF- β 1 presente nessas proteínas e, também, por ativar as MMP2 e MMP9 (HU et al., 2020; JENKINS, 2008; KE et al., 2017; WANG et al., 2011; ZUO; LIU, 2018). Apesar dos resultados encontrados da produção e da atividade de MMP9 e MMP7 pelas células HK-2, estas metaloproteases não parecem ser indispensáveis para ocorrência de EMT nestas células, devido ao pequeno aumento observado.

À análise dos resultados referentes à indução da EMT em células HK-2, tornou-se evidente a necessidade de se estudar os padrões fenotípicos observados nas células durante o processo de EMT nas células HK-2.

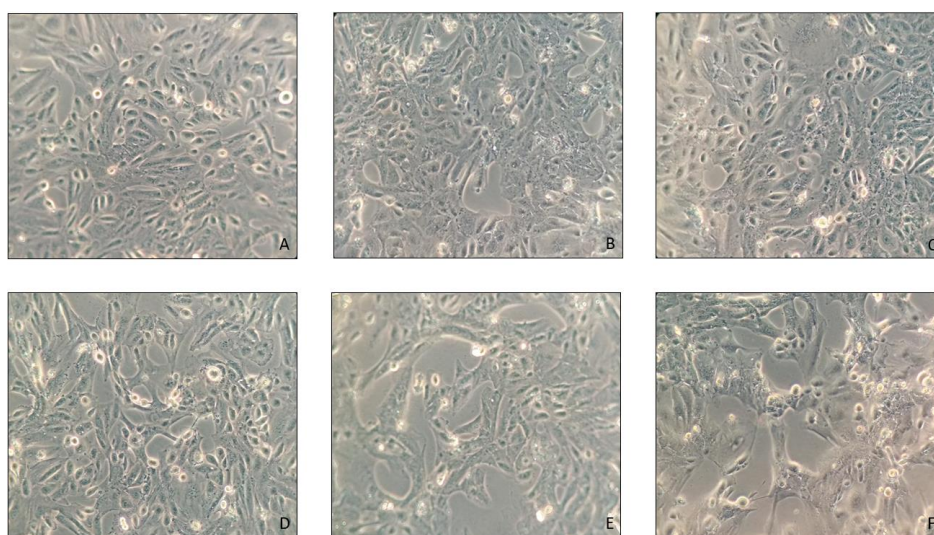
5.4 A infecção por *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 e por *L. interrogans* sorovar Manilae L495 induz a alteração morfológica de células HK-2

Uma das características importantes da EMT em células HK-2 é a alteração fenotípica e aquisição de características mesenquimais, como formato fusiforme

(HOSPER et al., 2013; LI et al., 2018; LOVISA, 2021; LOVISA; GENOVESE; DANESE, 2019; NIETO et al., 2016). Essa transição parece ser majoritariamente governada pela ativação da via do TGF- β 1, seguida da fosforilação dos Smads2/3.

Após a infecção por *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 e *L. interrogans* sorovar Manilae L495 as células HK-2 assumem um formato compatível com o descrito para EMT em células de túbulo contorcido proximal humanas, apresentam-se alongadas e há perda de contato entre as células. Há maior evidência das alterações no tempo de 72 horas pós-infecção, com a maior parte das células presentes nos poços das placas assumindo o padrão fenotípico esperado (Fig. 10 e 11).

Figura 10. Células HK-2 infectadas por *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 adquirem fenótipo compatível com EMT

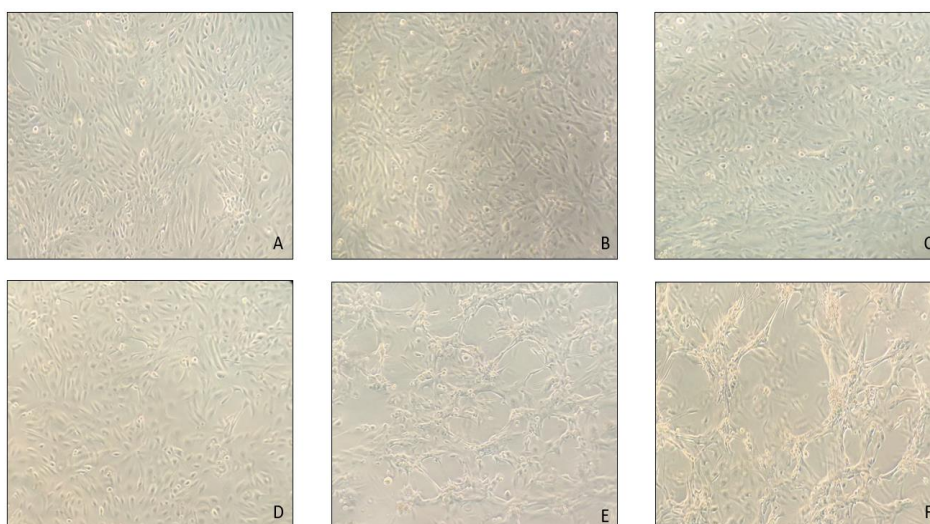


Fotomicrografias das células HK-2 infectadas por *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni L1-130. As células foram cultivadas em placas de 6 poços e incubadas em estufa a 37° C e 5% de CO₂ até o momento da infecção e mantidas nas mesmas condições durante os tempos de infecção. A, B e C: Controles negativos dos tempos 24 horas, 48 horas e 72 horas, respectivamente. D, E e F: Células HK-2 infectadas por *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 (MOI 50:1) nos tempos 24 horas, 48 horas e 72 horas, respectivamente.

As alterações morfológicas observadas após infecção das células HK-2, com maior evidência após 72 horas, demonstram que *Leptospira* viva é capaz de induzir EMT. Tais alterações já foram demonstradas em inúmeros trabalhos que utilizam TGF- β 1 purificado ou frações de *Leptospira*, como proteínas de membrana externa ou LipL32, uma lipoproteína abundante na parede celular (GUO et al., 2016; HOSPER et al., 2013; KANLAYA et al., 2020; PYO et al., 2020; TIAN et al., 2006, 2011; TIAN; PHILLIPS, 2003; WANG et al., 2017; YAN et al., 2009). A utilização de proteínas

purificadas induz EMT de uma forma mais rápida e intensa, sendo possível já notar as alterações em até 24 horas após o estímulo. Já a utilização da bactéria viva induz de forma mais lenta e menos intensa nas primeiras 48 horas após a infecção, provavelmente devido a uma menor concentração das proteínas e lipoproteínas responsáveis pela ativação da via do TGF- β 1 e indução da EMT.

Figura 11. Células HK-2 infectadas por *Leptospira interrogans* sorovar Manilae L495 adquirem fenótipo compatível com EMT



Fotomicrografias das células HK-2 infectadas por *Leptospira interrogans* sorovar Manilae L495. As células foram cultivadas em placas de 6 poços e incubadas em estufa a 37° C e 5% de CO₂ até o momento da infecção e mantidas nas mesmas condições durante os tempos de infecção. A, B e C: Controles negativos dos tempos 24 horas, 48 horas e 72 horas, respectivamente. D, E e F: Células HK-2 infectadas por *L. interrogans* sorovar Manilae L495 (MOI 50:1) nos tempos 24 horas, 48 horas e 72 horas, respectivamente.

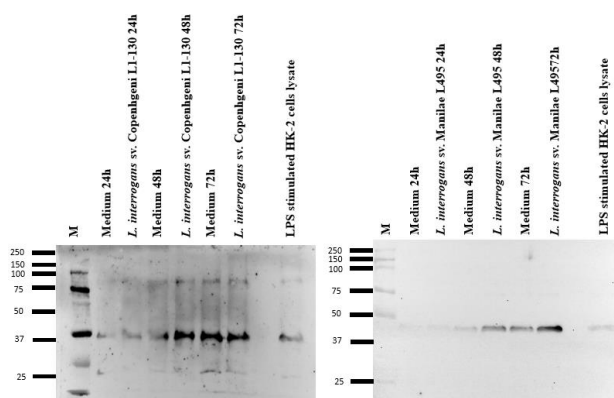
5.5 A infecção por *L. interrogans* sorovar Copenhageni L 1-130 ativa a via do NF- κ B nas células HK-2

A via do NF- κ B possui muitas proteínas efetoras que se coordenam para realizar suas ações específicas como produção de citocinas inflamatórias e resposta inflamatória, sobrevivência e proliferação celular, e outras funções como angiogênese e metástase (LIU et al., 2017b). O reconhecimento de leptospiros por receptores de membrana levam à ativação da via do NF- κ B e de outras vias como MAPK (HSU et al., 2021). Fatores de transcrição como *zinc finger E-box binding homebox 2* (ZEB2) estão envolvidos no controle da transcrição das proteínas da via do NF- κ B e sua expressão está diminuída durante a ativação da via em células HK-2. Este fator de transcrição também está diretamente envolvido na ocorrência de EMT nas células de

túbulos contorcidos proximais, demonstrando interligação entre a via do NF- κ B e EMT (DING et al., 2018; STEMMLER et al., 2019).

A ativação da via do NF- κ B nas células HK-2 ocorre de forma tempo dependente e há maior produção de p50 no tempo de 48 horas, em comparação com o grupo controle de 48 horas nas células infectadas por *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 (Fig. 12). Devido ao menor reconhecimento do LPS de *Leptospira* por TLR2/4 humanos, a ativação da via do NF- κ B provavelmente é coordenada por meio de interações com outras vias, como TGF- β 1, MAPK e JNK (BIERNACKA; DOBACZEWSKI; FRANGOIANNIS, 2011; DU et al., 2018; GRYNBERG; MA; NIKOLIC-PATERSON, 2017; HUNG et al., 2006; ZHANG et al., 2017).

Figura 12. Detecção de NF- κ B p50 em lisado de células HK-2 infectadas por *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 e sorovar Manilae L495.



Após eletroforese em condições redutoras, as proteínas dos sobrenadantes das células HK-2 foram transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos diluídos em albumina sérica bovina 5% em TBS-T: primário: anti-p50 produzido em coelho 1:300. Secundário: anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase 1:1.000. As bandas foram observadas após revelação com o kit SuperSignal™ West Dura Extendend Duration Substrate (Thermo Scientific).

A ativação da via do NF- κ B está envolvida na produção de citocinas pró-inflamatórias e na indução de EMT em células HK-2, mediada pela produção do fator de transcrição ZEB2 (COUDRIET et al., 2010; DING et al., 2018). A evidência da ativação da via do NF- κ B nos levou a avaliar a produção de citocinas e óxido nítrico após a infecção por *L. interrogans*.

5.6 A infecção das células HK-2 por *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 e *L. interrogans* sorovar Manilae L495 induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias.

A ativação da via do NF- κ B demonstra que há uma resposta pró-inflamatória desencadeada pela infecção das células HK-2 por *L. interrogans*. Após a infecção por *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 a produção de TNF- α apresentou aumento significativo apenas após 72 horas de infecção. Já a produção de IL-6 aumentou apenas às 24 horas após a infecção, quando comparada com seu controle negativo (Fig. 13). A produção de IL-1 β não apresentou mudanças durante todo o período do experimento (dados não apresentados).

A infecção por *L. interrogans* sorovar Manilae L495 induziu a uma produção de IL-6 semelhante ao padrão encontrado para o sorovar Copenhageni L1-130 (Fig. 13). Apesar disso, houve diferenças nos padrões de resposta das células na produção de TGF- β 1. Diferentemente do encontrado para o sorovar Copenhageni L1-130, as células dos controles negativos produziram maior quantidade da citocina quando comparado com as células dos controles negativo do sorovar Manilae L495. Esta diferença se deve, provavelmente, à uma resposta individual das células no momento do experimento. Apesar disso, o aumento da produção de TGF- β 1 pelas células infectadas por ambos sorovares permaneceu semelhante.

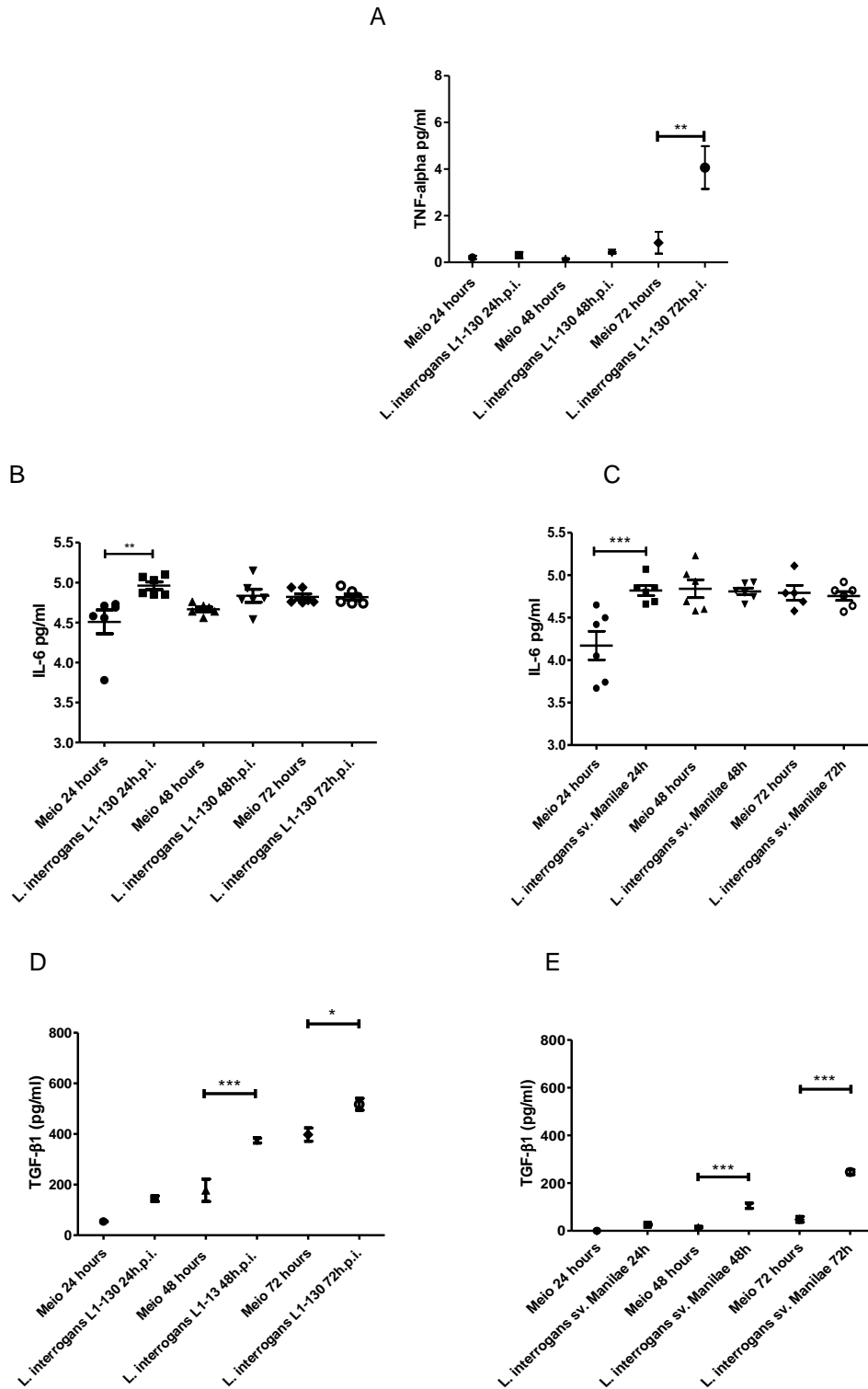
Não houve a possibilidade da mensuração da produção de TNF- α pelas células infectadas pelo sorovar Manilae L495, impossibilitando a comparação entre os sorovares.

Os resultados da produção das citocinas mostram que há indução de inflamação após a infecção das células por *L. interrogans*. A expressão e secreção das interleucinas avaliadas está bem descrita na literatura e os dados encontrados corroboram os dados já publicados (CAGLIERO; VILLANUEVA; MATSUI, 2018; MATSUI et al., 2016).

Houve também a necessidade de se avaliar a produção de óxido nítrico pelas células HK-2 após a infecção por *L. interrogans*, já que em células fagocíticas e em modelo murino, não há produção de espécies reativas de nitrogênio para destruição de leptospiros potencialmente fagocitadas por estas células (SANTECCHIA et al., 2022). Apesar de não serem células diretamente relacionadas à fagocitose e controle bacteriano, há descrição da produção de óxido nítrico por células HK-2 em modelo de lesão por cristais de ácido úrico e posterior EMT mediados pela via do NF- κ B (LIU et al., 2017a). As células HK-2 infectadas por *L. interrogans* não produziram quantidades

significativas de óxido nítrico, demonstrando que *Leptospira* também não ativa as vias envolvidas na produção de espécies reativas de nitrogênio nestas células (dados não mostrados).

Figura 13. Secreção de citocinas pró-inflamatórias após infecção de células HK-2 por *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 e por *Leptospira interrogans* sorovar Manilae L495.



Os sobrenadantes das células HK-2 infectadas por *Leptospira interrogans* sorovares Copenhageni L1-130 e Manilae L495 foram utilizados para mensuração das citocinas TNF- α (A), interleucina 6 (B) e (C) e TGF- β 1 (D) e (E) por meio de kit de ELISA comerciais (ThermoFisher). Teste estatístico: One-way ANOVA seguida do Teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Após as análises da produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células HK-2 e a não identificação da produção de interleucina 1 β , envolvida no processo de piroptose, o próximo passo foi avaliar se as células HK-2 sofriam apoptose após a infecção por *L. interrogans*.

5.7 A infecção por *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 induz as células HK-2 a apoptose mediada pela caspase 3

Apesar de controverso, há relatos de que espécies de *Leptospira* são capazes de sobreviver no interior de macrófagos e impedir a fusão de lisossoma e fagossoma e a consequente destruição do patógeno (TOMA et al., 2011). Um dos mecanismos que bactérias intracelulares utilizam para evasão do sistema imune é a indução da apoptose ou outra morte celular programada não inflamatória (AMARAL et al., 2019). Na maioria das vezes a apoptose é induzida por essas bactérias já que é uma morte celular programada e controlada, e não associada a uma resposta pró-inflamatória, como por exemplo a piroptose, garantindo a sobrevivência e disseminação do patógeno (GALLUZZI et al., 2018).

A ativação da via do TGF- β 1 e consequentemente a indução de EMT nas células HK-2, entre outras consequências, inibe a ativação de fatores pró-apoptóticos e induz a ativação de fatores anti-apoptóticos. Em células MDCK a transfecção com o gene de Snail, um importante fator de transcrição ativado durante a EMT, levou a parada do ciclo celular e manutenção das células na fase G0/G1 (VEGA et al., 2004).

Após infecção das células HK-2 por *L. interrogans* sorovar L1-130, nas primeiras 24 horas houve um aumento discreto da porcentagem de células apresentando ativação de caspase3 (Fig. 14). A produção e ativação de caspase3 se manteve nos tempos seguintes de forma leve, sem que muitas células entrassem em apoptose (Fig. 14). Os resultados demonstram que nas células infectadas há indução de morte celular mediada por caspase3. Apesar disso, a indução de morte após a infecção ocorre em uma porcentagem pequena das células, visto que a ocorrência de EMT leva à inibição parcial das vias de morte celular.

Figura 14. Células HK-2 infectadas por *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 sofrem apoptose.

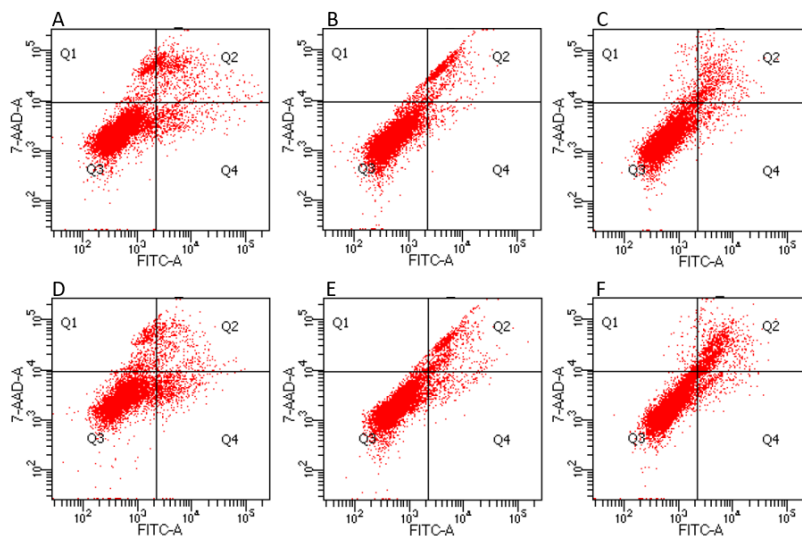


Gráfico de dispersão da citometria de fluxo das células HK-2 marcadas com o kit CellEvent™ Caspase 3/7 Green Flow Cytometry (Thermo Fisher Scientific, EUA).. A – C) Controles negativos nos tempos 24, 48 e 72 horas pós infecção, respectivamente. D – F) Infecção por *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 nos tempos 24, 48 e 72 horas pós infecção. A citometria foi realizada em citômetro de fluxo BD FACS Canto™ II Cell Analyzer (BD Uniscience, EUA) e os dados analisados no software FlowJo (BD Uniscience, EUA).

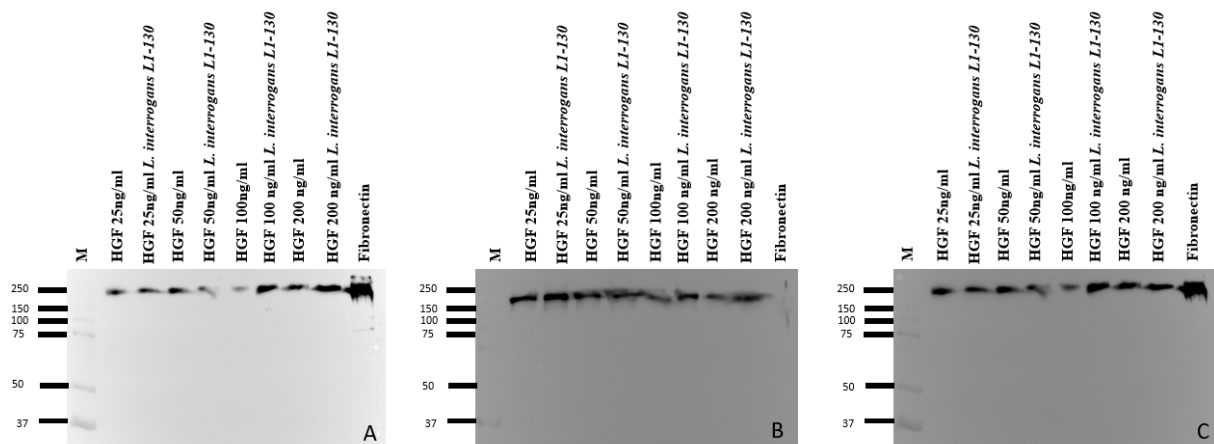
Tendo avaliado as principais vias de comunicação celular envolvidas no processo de EMT associada à infecção por *L. interrogans* e seus efeitos nas células HK-2, como produção de citocinas pró-inflamatórias e indução de apoptose, o próximo passo foi estudar a ação do HGF nas células HK-2, e como esse fator de crescimento influencia na inibição da EMT induzida pela infecção pela *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 e por *L. interrogans* sorovar Manilae L495.

5.8 O fator de crescimento de hepatócitos (HGF) reduz a produção de proteínas de matriz extracelular pelas células HK-2 após infecção por *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 e sorovar Manilae L495

A fim de se avaliar a influência do HGF na produção de proteínas da MEC, as infecções foram realizadas em células tratadas com o fator de crescimento ao longo dos tempos do experimento. Foram testadas diferentes concentrações de HGF para se determinar qual delas apresentaria melhor ação. Assim, utilizamos 25, 50, 100 e 200 ng/mL e as células foram infectadas com *L. interrogans* sorovar Copenhageni nos tempos 24, 48 e 72 horas. A produção de fibronectina pelas células HK-2 foi avaliada por western blot. O tratamento das células HK-2 com HGF recombinante humano

diminuiu a produção excessiva de fibronectina pelas células infectadas por *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130, igualando-a aos níveis basais (controles sem infecção) (Fig. 15). Parece não haver diferenças na inibição da produção de fibronectina em relação às doses utilizadas. Devido à participação de outras vias de comunicação celular, como a do Wnt/ β -catenina, e a especificidade do HGF em antagonizar a via do TGF- β 1, há ainda indução da produção de fibronectina pelas células HK-2 infectadas por *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130.

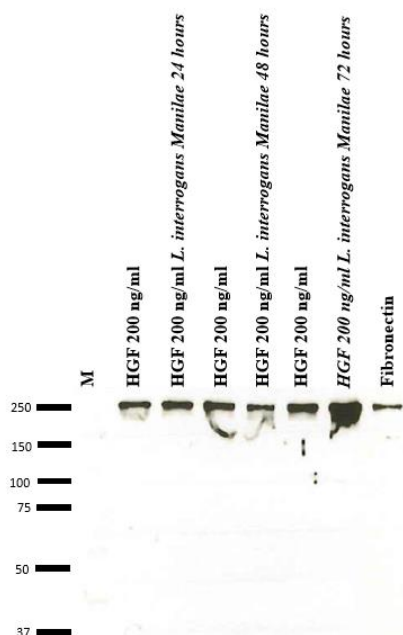
Figura 15. Detecção de fibronectina em células HK-2 infectadas por *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 mediante tratamento com HGF humano recombinante.



Após eletroforese em condições redutoras, as proteínas dos sobrenadantes das células HK-2 tratadas com as doses de 25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL e 200 ng/mL de HGF nos tempos de 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C) foram transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos diluídos em leite desnatado 5% em PBS-T: primário: anti-fibronectina produzido em coelho 1:5.000. Secundário: anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase 1:10.000. As bandas foram observadas após revelação com o kit SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific).

Na infecção por *L. interrogans* sorovar Manilae L495 a resposta ao tratamento com 200 ng/mL de HGF recombinante humano foi semelhante ao observado na infecção pelo sorovar Copenhageni L1-130, à exceção do tempo de 72 h (Fig. 16). A produção de fibronectina não foi completamente abolida aos níveis da produção das células do grupo controle negativo.

Figura 16. Detecção de fibronectina em células HK-2 infectadas por *Leptospira interrogans* sorovar Manilae L495 mediante tratamento com HGF.



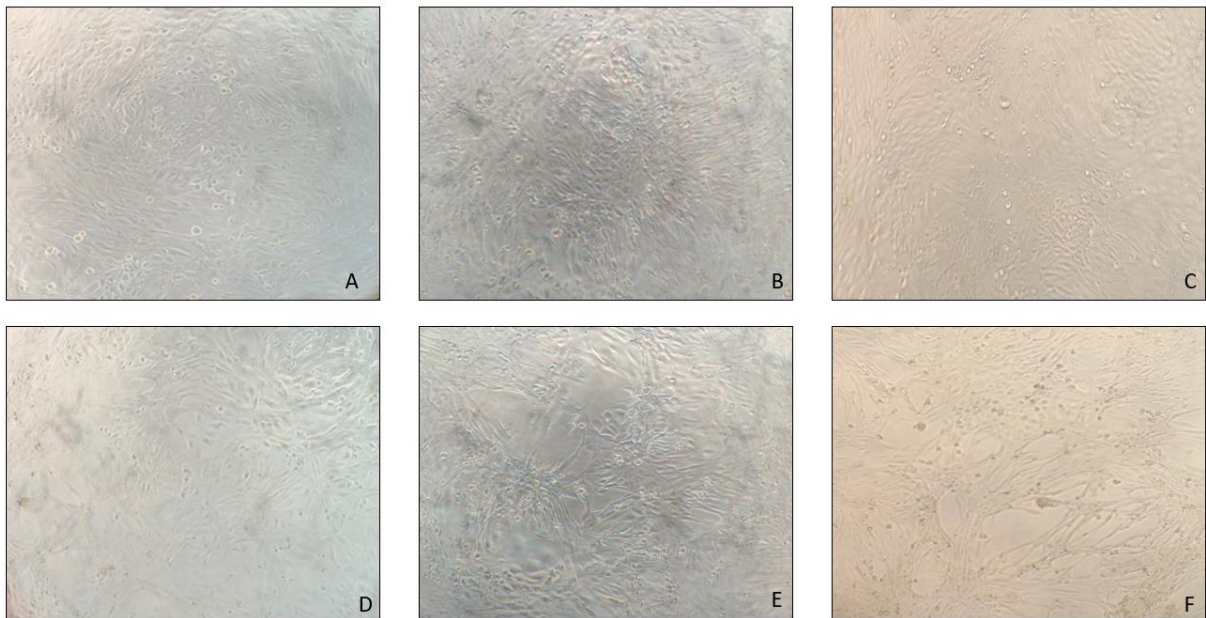
Após eletroforese em condições redutoras, as proteínas dos sobrenadantes das células HK-2 tratadas com a dose de 200 ng/mL de HGF nos tempos de 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C) foram transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com os seguintes anticorpos diluídos em leite desnatado 5% em PBS-T: primário: anti-fibronectina produzido em coelho 1:5.000. Secundário: anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase 1:10.000. As bandas foram observadas após revelação com o kit SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific).

Além do controle da produção fibronectina, o tratamento das células com HGF recombinante humano não reduziu as alterações fenotípicas observadas nas células HK-2 na infecção por *L. interrogans* sorovar Manilae L95 (Fig. 17). Tais alterações são controladas por diferentes vias, como já demonstrado, assim, apesar da redução da produção fibronectina, as alterações fenotípicas das células não foram controladas pela ação do HGF.

Uma das ações da via do Wnt/ β -catenina é a diminuição da expressão e, consequentemente, da produção do HGF. Essa via é ativada durante a infecção nas células HK-2 com aumento da produção e translocação nuclear da β -catenina, com isso o balanço entre TGF- β 1 e HGF fica desregulado, com predominância da primeira via, que é responsável pela transcrição de genes relacionados à produção de proteínas da MEC (DWORKIN et al., 2004; IEKUSHI et al., 2010; INOUE et al., 2003). Todavia, essa produção não é controlada unicamente pelo TGF- β 1. Em células HK-2 a via do Wnt/ β -catenina é também responsável pelo aumento da produção de

fibronectina quando ativada (GUO et al., 2016; KANLAYA et al., 2020; WANG et al., 2011).

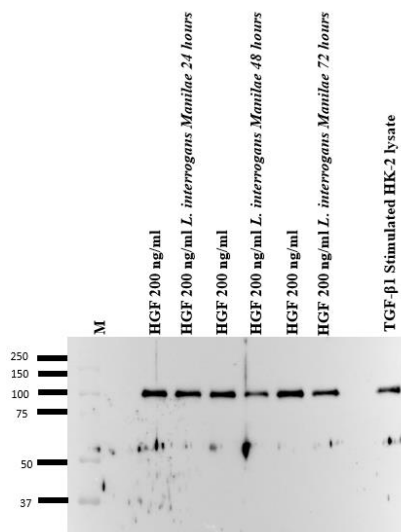
Figura 17. Microscopia óptica de células HK-2 infectadas por *Leptospira interrogans* sorovar Manilae L495.



Fotomicrografias das células HK-2 infectadas por *Leptospira interrogans* sorovar Manilae L495. As células foram cultivadas em placas de 6 poços e incubadas em estufa a 37° C e 5% de CO₂ até o momento da infecção e mantidas nas mesmas condições durante os tempos de infecção. A, B e C: Controle negativos tratados com 200 ng/mL de HGF humano recombinante dos tempos 24 horas, 48 horas e 72 horas, respectivamente. D, E e F: Células HK-2 infectadas por *L. interrogans* sorovar Manilae L495 (MOI 50:1) tratadas com 200 ng/mL de HGF humano recombinante nos tempos 24 horas, 48 horas e 72 horas, respectivamente.

Em células HK-2 tratadas com 200 ng/mL de HGF e infectadas com *L. interrogans* sorovar Manilae L495 houve uma redução discreta da produção de β -catenina identificada no citoplasma desta célula nos tempos de 48 e 72 h (Fig. 18), demonstrando que a utilização de HGF pode reduzir a indução de EMT mediada pelas vias do TGF- β 1 e do Wnt/ β -catenina na infecção por *Leptospira*.

Figura 18. Detecção de β -catenina em células HK-2 infectadas por *Leptospira interrogans* sorovar Manilae L495 tratadas com HGF



Após eletroforese em condições redutoras, as proteínas dos sobrenadantes das células HK-2 tratadas com a dose de 200 ng/mL de HGF foram transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com os seguintes anticorpos diluídos em leite desnatado 5% em PBS-T: primário: anti- β -catenina produzido em camundongo 1:1.000. Secundário: anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase 1:5.000. As bandas foram observadas após revelação com o kit SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific).

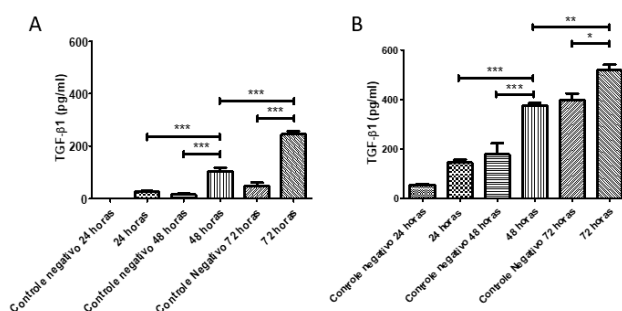
Com os resultados obtidos a partir do tratamento das células HK-2 e a sua influência nas respostas celulares frente a infecção, o próximo passo foi entender qual a influência direta do HGF na produção do TGF- β 1 pelas células HK-2 infectadas por *L. interrogans*.

5.9 A infecção de células HK-2 por *L. interrogans* sorovares Copenhageni L1-130 e Manilae L495 induz à secreção de TGF- β 1

A infecção de células HK-2 por *L. interrogans* sorovar Manilae L495 induz a produção de TGF- β 1 já nas primeiras 24 horas de infecção. Às 48 horas pós- infecção há evidente aumento da produção e secreção de TGF- β 1 comparado ao controle negativo de células HK-2 não infectadas ($p < 0,001$) e essa diferença se mantém às 72 horas pós-infecção ($p < 0,001$). O aumento é tempo dependente e a cada 24 horas há duplicação da quantidade de TGF- β 1 presente nos sobrenadantes das células infectadas ($p < 0,001$). Quando tratadas com HGF houve produção de TGF- β 1 já às 24 horas pós-infecção, mas é importante notar que também houve produção pelas células do controle negativo. Além disso, apesar da produção do fator de crescimento, a diferença entre as células não infectadas para as células infectadas foi menor no

tempo de 72 horas pós-infecção ($p < 0,05$). Quando comparados a produção de TGF- β 1 nas células infectadas nos tempos 48 horas, o aumento foi de aproximadamente uma vez e no tempo de 72 horas o aumento foi de aproximadamente 20% ($p < 0,01$). Já nas células não tratadas, esse aumento às 72 horas foi aproximadamente de seis vezes, quando comparada com a produção da citocina pelas células não infectadas (Fig. 19).

Figura 19. Secreção de TGF- β 1 por células HK-2 após infecção por *Leptospira interrogans* sorovar Manilae L495



Os sobrenadantes das células HK-2 infectadas por *Leptospira interrogans* sorovar Manilae L495 não tratadas e tratadas com 200 ng/mL de HGF humano recombinante (R&D Biosystems, #294-HG) no momento da infecção foram utilizados para mensuração de TGF- β 1, por meio de kit de ELISA comercial (ThermoFisher) A) Células HK-2 não receberam nenhum tratamento durante a infecção. B) Células HK-2, controle e infectadas, receberam 200 ng/mL de HGF humano recombinante (R&D Biosystems, #294-HG) no momento da infecção. Teste estatístico: One-way ANOVA seguida do teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

O aumento da secreção de TGF- β 1 pelas células HK-2 na infecção por *L. interrogans* sorovar Manilae L495 mostra que a presença da bactéria viva nas células do túbulo contorcido proximal é capaz de induzir uma resposta pró-fibrótica, como observada por outros autores ao utilizarem frações de *Leptospira* para estimularem essa resposta (CHOU et al., 2021; HUNG et al., 2006; TIAN et al., 2006).

Existe um balanço regulatório que coordena a produção e secreção dos fatores de crescimento HGF e TGF- β 1, garantindo que haja uma resposta extremamente afinada, evitando elevação exagerada tanto de um quanto de outro. Em um modelo murino de fibrose renal, caracterizada por nefrose congênita, a expressão e secreção local de TGF- β 1 está aumentada, enquanto há uma redução dos níveis de HGF, demonstrando a importância dessa sintonia fina na regulação local e na homeostase, impedindo que haja fibrose renal (MIZUNO et al., 2000).

O HGF antagoniza a resposta ao TGF- β 1 induzindo a expressão de um regulador negativo da via, o SnoN. Células de túbulo contorcido proximal apresentam EMT quando estimuladas com TGF- β 1 purificado. Entretanto, quando previamente tratadas com HGF há um aumento significativo de SnoN, sem que haja diminuição da fosforilação de Smad2. Os autores demonstraram que o controle da via acontece por uma interação física entre Smad2 e SnoN, impedindo que haja ligação do fator de transcrição ao sítio promotor e consequentemente, evitando que haja expressão dos genes-alvo da via (DEHEUNINCK; LUO, 2009; YANG; DAI; LIU, 2005).

Diferentemente do encontrado por Ejaz et al. (2019), que demonstraram que há redução da expressão de mRNA de TGF- β 1 em fibroblastos derivados de prepúcio humano tratados com diferentes doses de HGF recombinante humanos, encontramos um aumento da produção de TGF- β 1 pelas células HK-2 tratadas com 200 ng/mL de HGF durante todos os tempos de infecção. Na realidade, o aumento é evidente em todos os tempos dos controles negativos comparados aos controles negativos sem o tratamento, e há aumento progressivo com o passar do tempo de infecção. Acredita-se que esse aumento esteja relacionado à tentativa das células em manter homeostase local: ao aumentar a quantidade de HGF do meio as células passaram a produzir mais TGF- β 1, como forma compensatória.

5.10 A infecção de células HK-2 por L. interrogans leva ao acúmulo de gotículas de lipídeos no citoplasma e a alteração no fluxo autofágico.

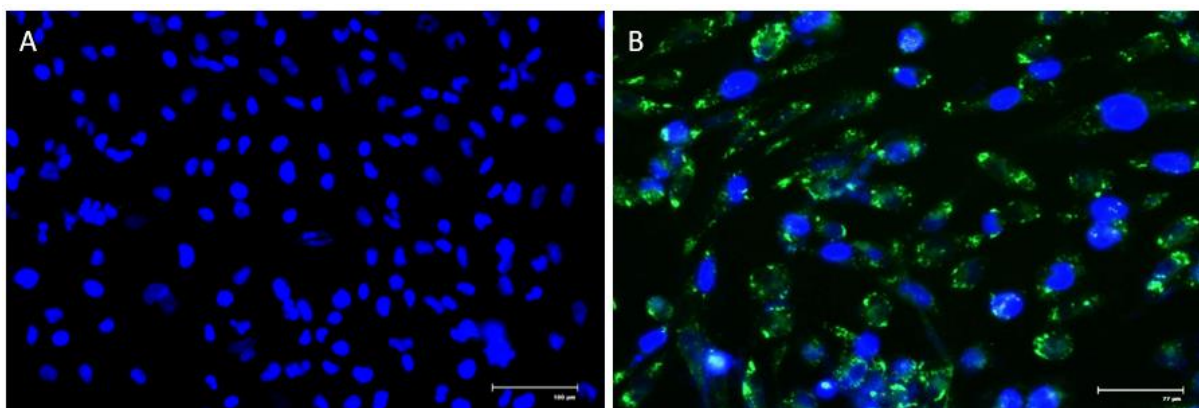
Células de túbulos contorcidos proximais dependem exclusivamente de β -oxidação para obtenção de energia. Insultos locais, como hiperglicemia decorrente de *diabetes mellitus* induzem ao acúmulo de gotículas de lipídeos e, posteriormente, à EMT em células HK-2 (XU et al., 2014). O aumento da expressão de Twist1, um fator de transcrição de EMT, leva a uma regulação negativa de genes associados ao metabolismo lipídico e à β -oxidação, dentre eles o gene de CPT1A, em células HK-2 (LIU et al., 2022).

A infecção das células HK-2 por *L. interrogans* induziu ao acúmulo de gotículas de lipídeos no citoplasma destas células, evidenciado pela marcação de ácidos graxos neutros pela probe BODIPY® (Fig. 20). A indução do acúmulo de gotículas de lipídeo no citoplasma de células infectadas por patógenos intracelulares como

Mycobacterium tuberculosis e *Mycobacterium leprae* é extensivamente descrita. Estes patógenos utilizam ácidos graxos presentes nas gotículas para manutenção e crescimento intracelular (DE MATTOS et al., 2012; PEREIRA-DUTRA et al., 2019).

Patógenos extracelulares são capazes de alterar o metabolismo lipídico das células, além de utilizarem lipídeos da membrana celular para processos vitais para seu crescimento, evasão imune, patogênese e manutenção no hospedeiro. *Borrelia burgdorferi*, espiroqueta causadora da doença de Lyme em seres humanos, é capaz de utilizar colesterol proveniente da membrana citoplasmática de células HeLa e incorporá-lo à sua membrana. Além disso, essa espiroqueta é capaz de incorporar glicolipídeos de colesterol, altamente antigênicos, na membrana das células HeLa, como provável mecanismo envolvido na patogênese da doença de Lyme (CROWLEY et al., 2013).

Figura 20. Acúmulo de gotículas de lipídeos no citoplasma de células HK-2 infectadas por *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni L1-130.



As células HK-2 foram cultivadas em lamínula e após a infecção realizou-se fixação e marcação das células utilizando 2 μ M de BODIPY®. Barra lateral inferior esquerda 100 μ m. Imagens capturadas em microscópio confocal TCS SP8, Leica, Alemanha, no tempo de 48 horas após a infecção das células por *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni L1-130.

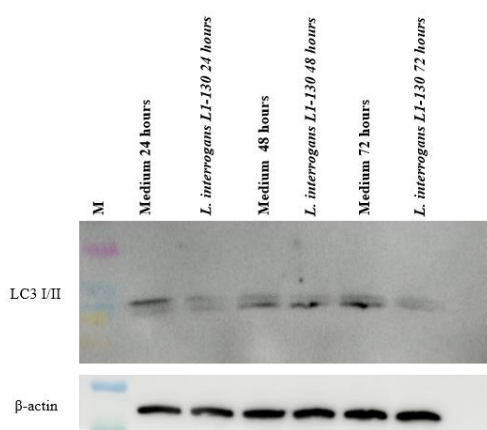
Apesar de não se saber o mecanismo exato envolvido na indução do acúmulo de lipídeos no citoplasma das células HK-2, a descrição da subversão do metabolismo lipídico por outros patógenos indica que há a possibilidade de alteração do metabolismo lipídico levando ao resultado encontrado (ITO et al., 2004; WELTE, 2015; WUNDER et al., 2006).

A partir dos resultados relacionados ao acúmulo de gotículas de lipídeo em células HK-2, perguntou-se se haveria relação entre os achados e a alteração do fluxo

autofágico nestas células. A infecção por *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 levou a uma redução da concentração de LC3 I e II nas células HK-2 (Fig. 21).

LC3 I e II são considerados marcadores da ativação de autofagia. O aumento da expressão de ambos, especialmente de LC3II demonstra a ativação e funcionamento da via nas células. Conforme é possível observar na Figura 21 as células do grupo controle apresentam produção de ambos LC3 demonstrando que as células não infectadas possuem o fluxo autofágico inalterado. Já nas células infectadas, pode-se notar uma redução do fluxo autofágico, especialmente às 72 h após a infecção.

Figura 21. Produção de LC3I e LC3II pelas células HK-2 infectadas por *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130



Após eletroforese em condições redutoras, as proteínas dos sobrenadantes das células HK-2 foram transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com os seguintes anticorpos diluídos em albumina sérica bovina em TBS-T: primário: anti-LC3I/II produzido em camundongo 1:1.000. Secundário: anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase 1:5.000. As bandas foram observadas após revelação com o kit SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific).

O metabolismo lipídico está intimamente relacionado e controlado pela ativação de autofagia (SINGH et al., 2009; YAN et al., 2018), mas ainda existem controvérsias em relação ao papel da autofagia na indução do acúmulo ou no aumento da oxidação de ácidos graxos pelas células. Em células HK-2, tratamento com TGF- β 1 levou a um acúmulo de lipídeo, que foi reduzido quando o gene da Beclina-1 foi silenciado, demonstrando que o acúmulo de lipídeos em células HK-2 é Beclina-1 dependente. *In vivo*, o tratamento de camundongos submetidos à obstrução ureteral unilateral com inibidores da autofagia, impediu o depósito de lipídeos em células dos túbulos contorcidos proximais (YAN et al., 2018).

Diferentemente do encontrado por Yan et al. (2018) a infecção por *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 inibiu o fluxo autofágico. Os resultados encontrados são compatíveis com a descrição da ocorrência de EMT e acúmulo de lipídeos mediado pela inibição do fluxo autofágico descritos por Singh et al. (2009). Apesar disso, é necessária cautela ao se afirmar que a infecção por *L. interrogans* induz a um acúmulo de lipídeos mediada pela inibição da autofagia em células HK-2.

5.11 A infecção de camundongos C57BL/6 por L. interrogans sorovar Copenhageni L1-130 induz à EMT, inflamação e fibrose renal

Camundongos, assim como ratos, são naturalmente resistentes à leptospirose aguda e raramente apresentam sintomatologia clínica da doença (BOEY; SHIOKAWA; RAJEEV, 2019; GOMES-SOLECKI; SANTECCHIA; WERTS, 2017) e, por isso, são considerados bons modelos animais para estudo de leptospirose crônica e fibrose renal (FANTON D'ANDON et al., 2014).

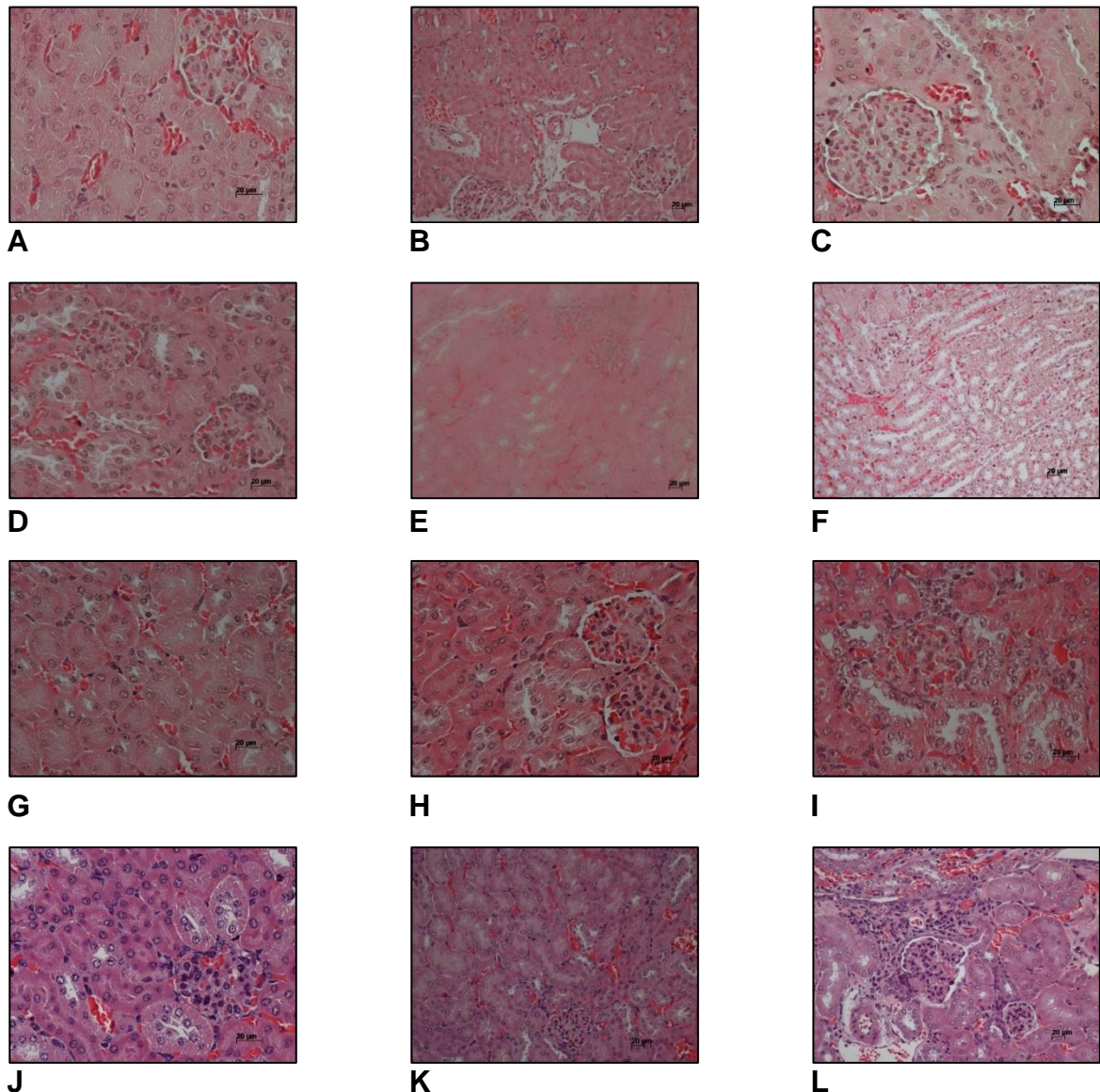
Camundongos C57BL/6 foram infectados com duas doses distintas, 1×10^6 e 2×10^8 leptospiras, respectivamente, por via intraperitoneal e acompanhados diariamente até 60 dias pós infecção (d.p.i.). Um grupo controle recebeu apenas injeção de PBS estéril por via intraperitoneal. Nenhum animal apresentou alteração de comportamento ou sinais clínicos compatíveis com leptospirose aguda como perda de peso, diminuição da limpeza dos pelos, presença de pelos eriçados ou diminuição da deambulação. Não se notaram sinais de dor ou desconforto nos animais infectados.

As eutanásias foram realizadas conforme descrito e os rins foram imediatamente coletados e fixados em formalina neutra tamponada a 10% para posterior processamento histológico. As análises dos rins foram realizadas de forma cega por um mesmo avaliador. A inflamação renal foi caracterizada por infiltrado inflamatório mononuclear intersticial discreto e difuso (Figura 22 A – L). No grupo que recebeu 1×10^6 leptospira/animal a inflamação foi mais evidente aos 15 d.p.i. com redução do escore de inflamação próximo ao dos animais do grupo controle aos 45 d.p.i. Já os animais que receberam a 2×10^8 leptospira/animal apresentaram inflamação renal durante os 60 dias avaliados (Figura 23). Como esperado, nenhum

animal do estudo apresentou sinais clínicos de leptospirose aguda. Não foram observados animais com perda de peso ou moribundos durante os 60 dias de observação.

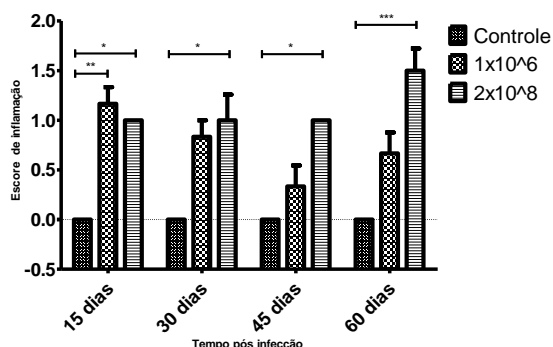
Por serem resistentes à doença aguda, já se esperava que os animais fossem capazes de resolver a inflamação renal causada pela migração e colonização pela *L. interrogans*. Apenas os animais que receberam 1×10^6 leptospira/animal foram capazes de iniciar a resolução da inflamação aos 45 d.p.i., diferentemente dos animais infectados com 2×10^8 leptospira/animal que ainda apresentavam sinais de inflamação moderada aos 60 d.p.i.

Figura 22. Fotomicrografias de rim dos animais infectados com *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 nas doses de 1×10^6 leptospiros/animal e 2×10^8 leptospiros/animal.



Cortes histológicos de rins de camundongos C57BL/6 infectados por *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni L1-130. Após a eutanásia os rins foram imediatamente coletados e fixados em formalina neutra tamponada a 10% e, posteriormente, processados e corados por hematoxilina e eosina. A, D, G e J) Grupo controle nos tempos 15, 30, 45 e 60 dias pós infecção (d.p.i.), respectivamente. B, E, H e K) Grupo 1×10^6 leptospira/animal nos tempos 15, 30, 45 e 60 d.p.i., respectivamente. C, F, I e L) Grupo 2×10^8 leptospira/animal nos tempos 15, 30, 45 e 60 d.p.i., respectivamente. Coloração Hematoxilina e Eosina. Barra lateral = 20µm.

Figura 23. Escore de inflamação renal após infecção por *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 em diferentes tempos e duas doses infectantes.

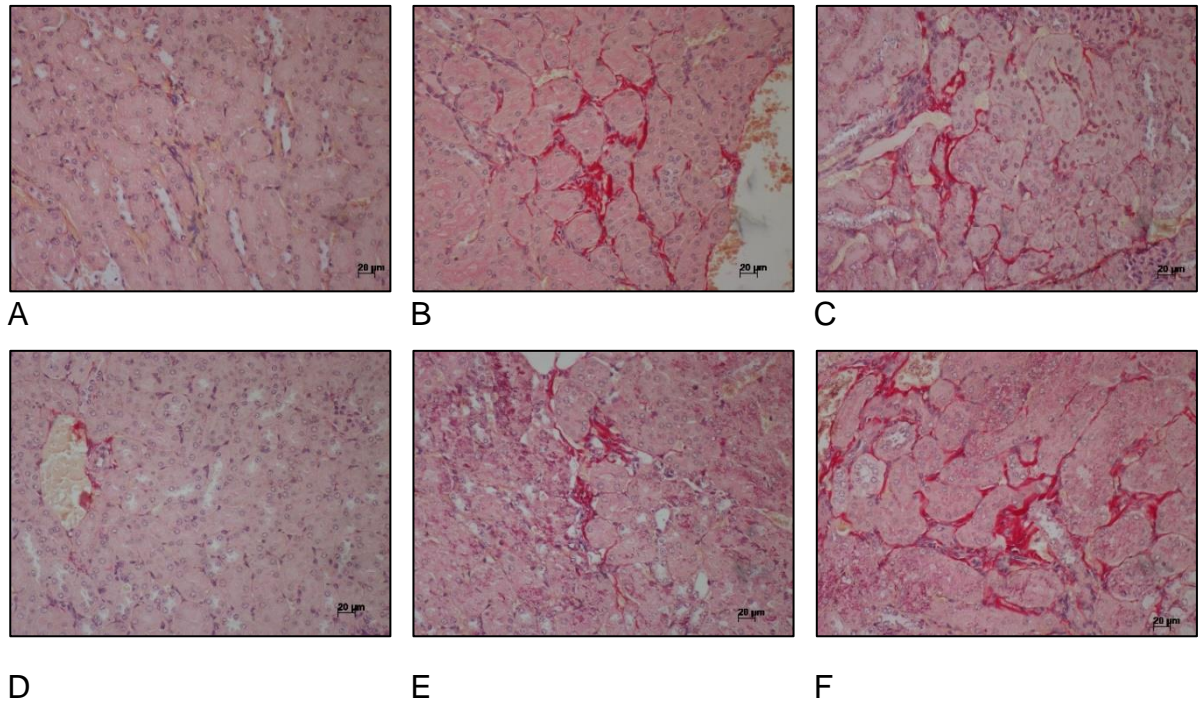


Análise dos escores de inflamação dos cortes histológicos de rins de camundongos infectados por *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni L1-130. Teste estatístico: Two way ANOVA, seguido por Teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A avaliação da deposição de colágenos e, conseqüentemente, da ocorrência de fibrose renal, mostrou que a partir dos 15 d.p.i. já existe início de uma resposta pró-fibrótica, com evidência de deposição de colágeno intersticial e peritubular. No grupo que recebeu 2×10^8 leptospira/animal, aos 60 d.p.i. a deposição de colágeno foi evidente e difusa (Fig. 24 A – F).

Conforme descrito por Fanton D'Andon et al. (2014) há ocorrência de fibrose renal em camundongos C57BL/6 infectados com doses subletais de *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130. As imagens acima evidenciam a deposição de colágenos pela marcação em vermelho nos cortes histológicos corados por *Picrosirius Red* (Fig. 24). A utilização de duas doses diferentes no presente estudo se deu pela necessidade de se avaliar qual delas induziria fibrose renal mais evidente. Pela avaliação unicamente qualitativa não se observaram diferenças na distribuição das áreas com deposição de fibrose, mas parece haver maior quantidade de colágeno nos rins dos animais que receberam a dose mais alta.

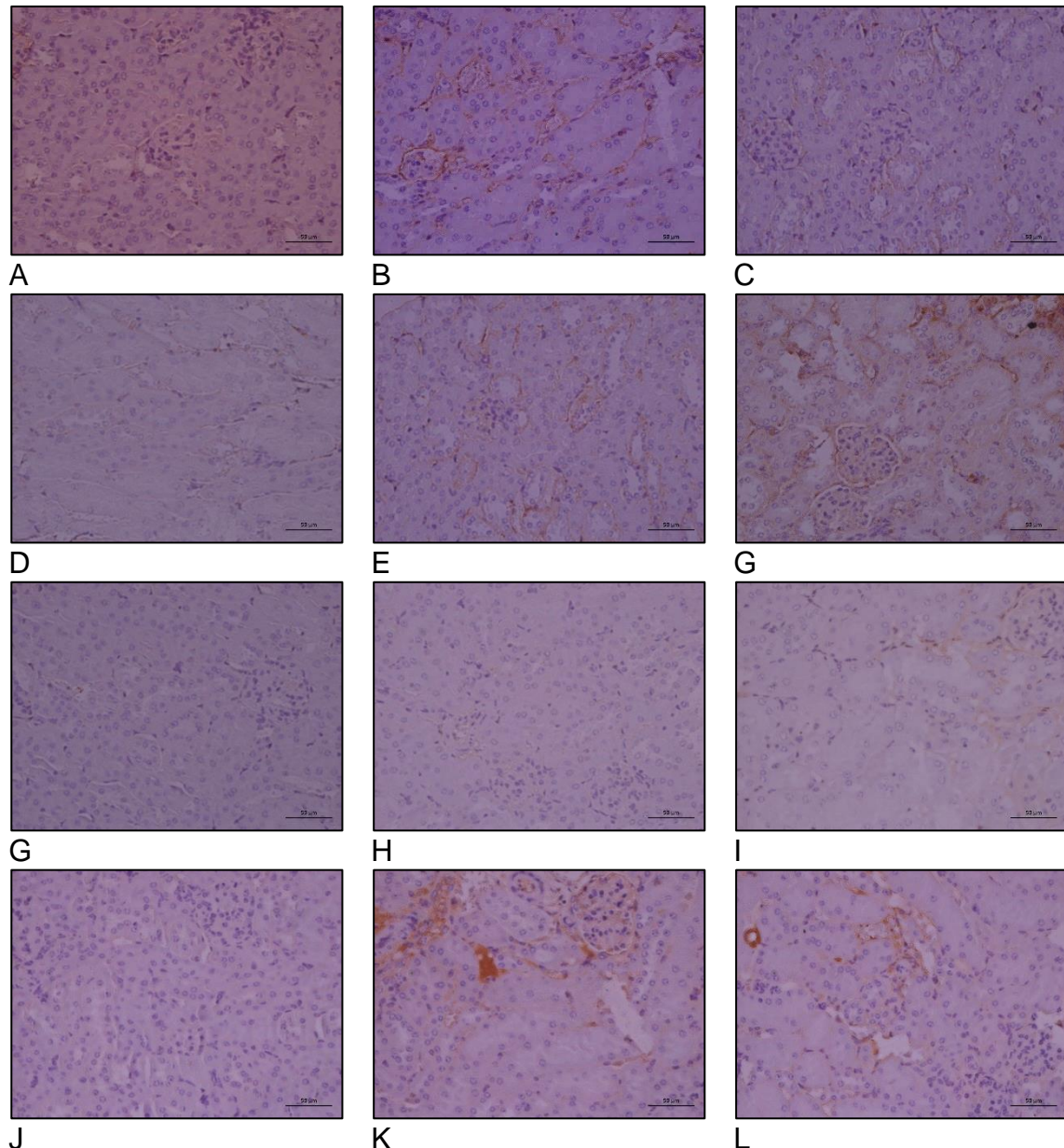
Figura 24. Fotomicrografias de cortes histológicos dos rins de camundongos C57BL/6 infectados com *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 evidencia a deposição de colágeno em interstício e peritubular.



Cortes histológicos de rins de camundongos C57BL/6 infectados por *Leptospira interrogans* sorovar Manilae L495. Após a eutanásia os rins foram imediatamente coletados e fixados em formalina neutra tamponada a 10% e, posteriormente, processados. A) Controle negativo 15 dias pós infecção (d.p.i.); B e C) Doses alta e baixa, respectivamente, 15 d.p.i.; E e F) Doses alta e baixa, respectivamente, 60 d.p.i. Coloração *Picrosirius Red*, barra lateral = 20µm.

Devido à maior afinidade do Picrosírius red a colágenos I e III, para complementar o resultado encontrado anteriormente e analisar a deposição de colágeno peritubular, foi realizada imunohistoquímica para colágeno IV dos cortes de rins de camundongos infectados por *L. interrogans*. É possível observar deposição de colágeno IV ao redor dos túbulos dos animais infectados por ambas as doses, comprovando que há indução da produção desta proteína de matriz extracelular nestes animais (Fig. 25).

Figura 25. Imunohistoquímica para colágeno IV dos cortes de rins dos animais infectados por *L. interrogans* sorovar Manilae L495.



Cortes histológicos de rins de camundongos C57BL/6 infectados por *Leptospira interrogans* sorovar Manilae L495. Após a eutanásia os rins foram imediatamente coletados e fixados em formalina neutra tamponada a 10% e, posteriormente, processados. A, D, G e J) Grupo controle nos tempos 15, 30, 45 e 60 dias pós infecção (d.p.i.), respectivamente. B, E, H e K) Grupo 1×10^6 leptospira/animal nos tempos 15, 30, 45 e 60 d.p.i., respectivamente. C, F, I e L) Grupo 2×10^8 leptospira/animal nos tempos 15, 30, 45 e 60 d.p.i, respectivamente. Imunohistoquímica, anticorpo primário anti-colágeno IV 1:500. Barra lateral = 50µm.

O colágeno IV é uma proteína presente em lâmina basal e o seu aumento está relacionado à fibrose peritubular em rins. O aumento da produção de colágeno IV está relacionado à maior adesão e invasão de patógenos como *Streptococcus gallolyticus* e *Escherichia coli* O157:H7 (FARFAN et al., 2011; VOLLMER et al., 2010). Apesar disso, a possibilidade da utilização do colágeno IV para adesão e manutenção de *L.*

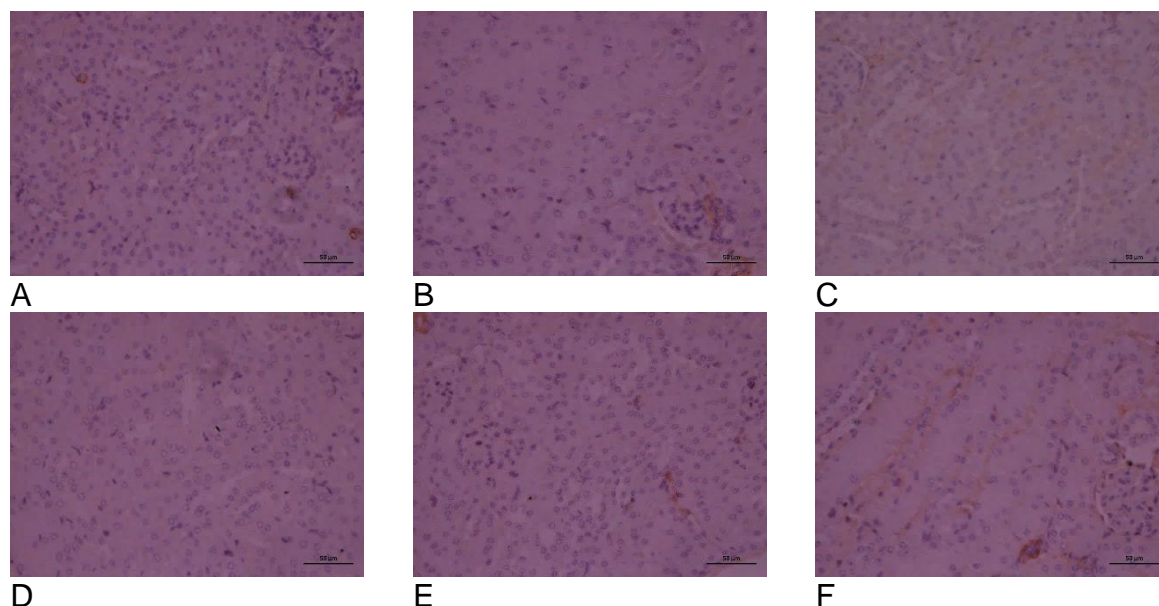
interrogans nos rins de camundongos é pouco provável, devido à localização em membrana basal da proteína no rim dos animais.

Conforme mostrado, a indução de EMT em células epiteliais de túbulos contorcidos proximais leva à produção de proteínas de matriz extracelular, e o aumento específico de colágeno IV é descrito como um dos sinais da fibrose peritubular, em conjunto com o aumento da deposição de colágenos I e III (BLACK; LEVER; AGARWAL, 2019; BÜLOW; BOOR, 2019). Os resultados encontrados confirmam a ocorrência de fibrose renal após a infecção crônica por *L. interrogans* sorovares Copenhageni L1-130 e Manilae L495.

O mecanismo exato da indução da fibrose em rins de camundongos ainda não foi completamente elucidado. A fim de se avaliar a ocorrência de EMT nas células epiteliais de túbulos contorcidos proximais como um dos fatores indutores da fibrose nos rins de camundongos, foi realizada a marcação por imunohistoquímica de um dos marcadores moleculares, o α -SMA.

A infecção por *L. interrogans* sorovar Manilae L495 induziu a produção e expressão de α -SMA pelas células epiteliais de túbulos contorcidos proximais. De acordo com o resultado encontrado por outros autores, há produção de α -SMA e ocorrência de EMT, sem que haja desprendimento ou migração das células da lâmina basal dos túbulos. A detecção do marcador foi maior aos 60 dias após a infecção nos animais que receberam a dose infectante de 2×10^8 leptospiros/animal (Fig. 26).

Figura 26. Imunohistoquímica para α -SMA dos cortes de rins dos animais infectados por *Leptospira interrogans* sorovar Manilae L495.



Cortes histológicos de rins de camundongos C57BL/6 infectados por *Leptospira interrogans* sorovar Manilae L495. Após a eutanásia os rins foram imediatamente coletados e fixados em formalina neutra tamponada a 10% e, posteriormente, processados. A) Controle negativo 15 dias pós infecção (d.p.i.); B e C) Doses alta e baixa, respectivamente, 15 d.p.i.; E e F) Doses alta e baixa, respectivamente, 60 d.p.i. Imunohistoquímica, anticorpo primário anti- α -SMA 1:500. Barra lateral = 50 μ m.

A produção de α -SMA pelas células de túbulos contorcidos proximais de rins de camundongos após a infecção por *L. interrogans* sorovar Manilae demonstra que há participação da EMT no processo de fibrose renal na leptospirose crônica. A descrição de EMT em modelos experimentais de fibrose renal (obstrução ureteral unilateral ou nefrectomia 5/6) nos indica que este é um dos mecanismos envolvidos (GRANDE et al., 2015; LIU, 2006; LOVISA et al., 2015). Apesar de a fibrose renal em modelos de infecção crônica por *Leptospira* spp. ser bastante descrita (FANTON D'ANDON et al., 2014; FERRER et al., 2018; MATSUI et al., 2016) a análise de EMT nestes modelos ainda não é bastante explorada.

6 CONCLUSÃO

A infecção de células HK-2 por *L. interrogans* induziu a ocorrência da transição epitélio-mesenquimal mediada pelas vias de comunicação celular ativação TGF- β 1 e a via do Wnt/ β -catenina. As alterações morfológicas celulares compatíveis com EMT e a produção excessiva de proteínas de matriz extracelular, principalmente fibronectina, demonstram a importância do processo na infecção destas células por sorovares virulentos de *L. interrogans*. A descrição de EMT *in vitro* em células HK-2 após infecção por *L. interrogans* pode explicar a ocorrência de quadros de fibrose renal em hospedeiros, susceptíveis ou reservatórios, após a infecção ou leptospirose aguda.

A identificação da ocorrência de EMT em células dos túbulos contorcidos proximais e fibrose renal em camundongos C57BL/6 demonstra que, mesmo animais considerados resistentes à doença clínica apresentam lesão leve a moderada e que, novamente, o processo de EMT parece ser o indutor da fibrose renal observada nesses animais.

Assim, conclui-se que a infecção por *L. interrogans* em células HK-2 e em modelo murino, é capaz de induzir alterações compatíveis com EMT e tais alterações estão relacionadas com a ocorrência de fibrose renal nos rins de animais acometidos pela infecção pelo patógeno, abrindo novos caminhos para o entendimento das lesões crônicas causadas pela infecção e a possibilidade de desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas à redução da ocorrência de EMT e, conseqüentemente, da fibrose renal.

REFERÊNCIAS

- ABAURREA, A.; ARAUJO, A. M.; CAFFAREL, M. M. The Role of the IL-6 Cytokine Family in Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 15, 1 ago. 2021.
- ADEVA-ANDANY, M. M. et al. Mitochondrial β -oxidation of saturated fatty acids in humans. **Mitochondrion**, v. 46, p. 73–90, 1 maio 2019.
- ADLER, B. **Current topics in microbiology and immunology: Leptospira and leptospirosis**. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2015. v. 387
- ALLAN, K. J. et al. Epidemiology of Leptospirosis in Africa: A Systematic Review of a Neglected Zoonosis and a Paradigm for ‘One Health’ in Africa. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 1–25, 2015.
- AMARAL, E. P. et al. A major role for ferroptosis in Mycobacterium tuberculosis – induced cell death and tissue necrosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 216, n. 3, p. 556–570, 2019.
- ANDERSON, C. M.; STAHL, A. SLC27 fatty acid transport proteins. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 2–3, p. 516–528, 1 abr. 2013.
- BARBA, G. et al. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 4, p. 1200–1205, 18 fev. 1997.
- BARLETTA, A. B. F. et al. Emerging role of lipid droplets in Aedes aegypti immune response against bacteria and Dengue virus. **Scientific reports**, v. 6, 18 fev. 2016.
- BATLLE, E.; MASSAGUÉ, J. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 924–940, 2019.
- BERNDT, N. et al. Characterization of Lipid and Lipid Droplet Metabolism in Human HCC. **Cells**, v. 8, n. 5, 1 maio 2019.
- BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. December, p. 757–771, 2003.
- BIERNACKA, A.; DOBACZEWSKI, M.; FRANGOIANNIS, N. G. TGF- β signaling in fibrosis. **Growth Factors**, v. 29, n. 5, p. 196–202, 2011.
- BIKBOV, B. et al. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, v. 395, n. 10225, p. 709–733, 2020.
- BLACK, L. M.; LEVER, J. M.; AGARWAL, A. Renal Inflammation and Fibrosis: A Double-edged Sword. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 67, n. 9, p. 663–681, 2019.
- BOEY, K.; SHIOKAWA, K.; RAJEEV, S. Leptospira infection in rats: A literature review of global prevalence and distribution. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 8, p. 1–24, 2019.

BONHOMME, D. et al. Leptospiral LPS escapes mouse TLR4 internalization and TRIF-associated antimicrobial responses through O antigen and associated lipoproteins. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 8, p. 1–26, 2020.

BRETT-MAJOR, D. M.; COLDREN, R. Antibiotics for leptospirosis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2012.

BROWN, R. A. et al. Comparison of three different leptospiral vaccines for induction of a type 1 immune response to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. **Vaccine**, v. 21, n. 27–30, p. 4448–4458, 2003.

BUDI, E. H.; DUAN, D.; DERYNCK, R. Transforming Growth Factor- β Receptors and Smads: Regulatory Complexity and Functional Versatility. **Trends in Cell Biology**, v. 27, n. 9, p. 658–672, 2017.

BÜLOW, R. D.; BOOR, P. Extracellular Matrix in Kidney Fibrosis: More Than Just a Scaffold. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 67, n. 9, p. 643–661, 2019.

CAGLIERO, J.; VILLANUEVA, S. Y. A. M.; MATSUI, M. Leptospirosis pathophysiology: Into the storm of cytokines. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–8, 2018.

CAIMI, K.; RUYBAL, P. *Leptospira* spp., a genus in the stage of diversity and genomic data expansion. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 81, n. 104241, p. 1–17, 2020.

CASANOVAS-MASSANA, A. et al. *Leptospira dzianensis* and *leptospira putramalaysiae* are later heterotypic synonyms of *leptospira yasudae* and *leptospira stimsonii*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 71, n. 4713, p. 1–2, 2021.

CASSADOU, S. et al. Underestimation of Leptospirosis Incidence in the French West Indies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1–10, 2016.

CHOU, L.-F. et al. Transcriptomic Signatures of Exacerbated Progression in Leptospirosis Subclinical Chronic Kidney Disease with Secondary Nephrotoxic Injury. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, n. March, 2021.

CHUNG, A. C. K. et al. Disruption of the Smad7 gene promotes renal fibrosis and inflammation in unilateral ureteral obstruction (UUO) in mice. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 24, n. 5, p. 1443–1454, 2009.

CLARKE, D. C.; LIU, X. Measuring the Absolute Abundance of the Smad Transcription Factors Using Quantitative Immunoblotting. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2014.

COSATE, M. R. V. et al. Molecular typing of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo isolates from leptospirosis outbreaks in Brazilian livestock. **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2017.

COUDRIET, G. M. et al. Hepatocyte growth factor modulates interleukin-6 production in bone marrow derived macrophages: Implications for inflammatory mediated diseases. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, p. 1–7, 2010.

COURROL, D. DOS S. et al. Leptolysin, a *Leptospira* secreted metalloprotease of

the pappalysin family with broad-spectrum activity. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, n. August, p. 1–20, 2022.

CROWLEY, J. T. et al. Lipid Exchange between *Borrelia burgdorferi* and Host Cells. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 1, 2013.

DA SILVA GOMES DIAS, S. et al. Lipid droplets fuel SARS-CoV-2 replication and production of inflammatory mediators. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 12, p. e1009127, 16 dez. 2020.

DE LA PEÑA-MOCTEZUMA, A. et al. Comparative analysis of the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovar Hardjo: *Leptospira interrogans* subtype Hardjoprajitno and *Leptospira borgpetersenii* subtype Hardjobovis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 177, n. 2, p. 319–326, 1999.

DE MATTOS, K. A. et al. Deciphering the contribution of lipid droplets in leprosy: multifunctional organelles with roles in *Mycobacterium leprae* pathogenesis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107 Suppl 1, n. SUPPL.1, p. 156–166, dez. 2012.

DEHEUNINCK, J.; LUO, K. Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF- β signaling. **Cell Research**, v. 19, n. 1, p. 47–57, 2009.

DEVAUX, C. A.; MEZOUAR, S.; MEGE, J. L. **The E-Cadherin Cleavage Associated to Pathogenic Bacteria Infections Can Favor Bacterial Invasion and Transmigration, Dysregulation of the Immune Response and Cancer Induction in Humans** **Frontiers in Microbiology**, 2019.

DIAS, J. P. et al. Factors associated with *Leptospira* sp infection in a large urban center in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 5, p. 499–504, 2007.

DING, Q. et al. ZEB2 Attenuates LPS-Induced Inflammation by the NF- κ B Pathway in HK-2 Cells. **Inflammation**, v. 41, n. 2, p. 722–731, 2018.

DIRUSSO, C. C. et al. Comparative Biochemical Studies of the Murine Fatty Acid Transport Proteins (FATP) Expressed in Yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 17, p. 16829–16837, 29 abr. 2005.

DU, P. et al. A novel Fas-binding outer membrane protein and lipopolysaccharide of *Leptospira interrogans* induce macrophage apoptosis through the Fas/FasL-caspase-8/-3 pathway. **Emerging Microbes and Infections**, v. 7, n. 1, 2018.

DUARTE-NETO, A. N. et al. Severe Leptospirosis Features in the Spleen Indicate Cellular Immunosuppression Similar to That Found in Septic Shock. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. April, p. 1–15, 2019.

DWORKIN, L. D. et al. Hepatocyte growth factor ameliorates progression of interstitial fibrosis in rats with established renal injury. **Kidney International**, v. 65, n. 2, p. 409–419, 2004.

EJAZ, A. et al. Adipose-Derived Stem Cell Therapy Ameliorates Ionizing Irradiation Fibrosis via Hepatocyte Growth Factor-Mediated Transforming Growth Factor- β Downregulation and Recruitment of Bone Marrow Cells. **Stem Cells**, v. 37, n. 6, p. 791–802, 2019.

EPISCOPIO, D. et al. Atorvastatin restricts the ability of influenza virus to generate lipid droplets and severely suppresses the replication of the virus. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 8, p. 9516, 1 ago. 2019.

FANTON D'ANDON, M. et al. Leptospira Interrogans Induces Fibrosis in the Mouse Kidney through Inos-Dependent, TLR- and NLR-Independent Signaling Pathways. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 11, 2014.

FARFAN, M. J. et al. Long polar fimbriae of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 bind to extracellular matrix proteins. **Infection and immunity**, v. 79, n. 9, p. 3744–3750, set. 2011.

FERRER, M. F. et al. Macrophages and Galectin 3 Control Bacterial Burden in Acute and Subacute Murine Leptospirosis That Determines Chronic Kidney Fibrosis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. October, p. 1–15, 2018.

FU, D. et al. FKN Facilitates HK-2 Cell EMT and Tubulointerstitial Lesions via the Wnt/ β -Catenin Pathway in a Murine Model of Lupus Nephritis. **Frontiers in immunology**, v. 10, n. April, p. 784, 2019.

FURUHASHI, M. Fatty Acid-Binding Protein 4 in Cardiovascular and Metabolic Diseases. **Journal of atherosclerosis and thrombosis**, v. 26, n. 3, p. 216–232, 2019.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107–120, 2012.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death and Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486–541, 2018.

GEWIN, L. S. Sugar or fat? Renal tubular metabolism reviewed in health and disease. **Nutrients**, v. 13, n. 1580, 9 maio 2021.

GIBSON, K. H. et al. An asymmetric sheath controls flagellar supercoiling and motility in the leptospira spirochete. **eLife**, v. 9, p. 1–24, 2020.

GOMES-SOLECKI, M.; SANTECCHIA, I.; WERTS, C. Animal models of leptospirosis: Of mice and hamsters. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. FEB, 2017.

GONG, R. et al. Hepatocyte Growth Factor Modulates Matrix Metalloproteinases and Plasminogen Activator/Plasmin Proteolytic Pathways in Progressive Renal Interstitial Fibrosis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 12, p. 3047–3060, 2003.

GONG, R. et al. Hepatocyte growth factor ameliorates renal interstitial inflammation in rat remnant kidney by modulating tubular expression of macrophage chemoattractant protein-1 and RANTES. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 11, p. 2868–2881, 2004.

GONG, R. et al. Hepatocyte growth factor suppresses proinflammatory NF κ B activation through GSK3 β inactivation in renal tubular epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 12, p. 7401–7410, 2008.

GONG, R.; RIFAI, A.; DWORKIN, L. D. Anti-inflammatory effect of hepatocyte growth

- factor in chronic kidney disease: Targeting the inflamed vascular endothelium. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 9, p. 2464–2473, 2006a.
- GONG, R.; RIFAI, A.; DWORKIN, L. D. Hepatocyte growth factor suppresses acute renal inflammation by inhibition of endothelial E-selectin. **Kidney International**, v. 69, n. 7, p. 1166–1174, 2006b.
- GORBENKO, O. et al. Identification of novel PTEN-binding partners: PTEN interaction with fatty acid binding protein FABP4. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 337, n. 1–2, p. 299–305, 13 abr. 2010.
- GOUVEIA, E. L. et al. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 505–508, 2008.
- GRANDE, M. T. et al. Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. **Nature Medicine**, v. 21, n. 9, p. 989–997, 8 set. 2015.
- GRYNBERG, K.; MA, F. Y.; NIKOLIC-PATERSON, D. J. The JNK Signaling Pathway in Renal Fibrosis. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. 829, p. 1–12, 2017.
- GUO, L. et al. Hydrogen sulfide inhibits transforming growth factor- β 1-induced EMT via Wnt/catenin pathway. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2016.
- GUPTA, R. S.; MAHMOOD, S.; ADEOLU, M. A phylogenomic and molecular signature based approach for characterization of the phylum spirochaetes and its major clades: Proposal for a taxonomic revision of the phylum. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. JUL, p. 1–18, 2013.
- HATA, A.; CHEN, Y. G. TGF- β Signaling from Receptors to Smads. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 8, n. 9, 1 set. 2016.
- HOFMAN, P.; VOURET-CRAVIARI, V. Microbes-induced EMT at the crossroad of inflammation and cancer. **Gut microbes**, v. 3, n. 3, p. 176–185, 2012.
- HOLZAPFEL, M. et al. Escape of TLR5 Recognition by *Leptospira* spp.: A Rationale for Atypical Endoflagella. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. August, p. 1–20, 2020.
- HOSPER, N. A. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition in fibrosis: Collagen type I expression is highly upregulated after EMT, but does not contribute to collagen deposition. **Experimental Cell Research**, v. 319, n. 19, p. 3000–3009, 2013.
- HOU, Y. et al. CD36 is involved in high glucose-induced epithelial to mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 468, n. 1–2, p. 281–286, 4 dez. 2015.
- HSU, S. H. et al. Peptidoglycan mediates *Leptospira* outer membrane protein Loa22 to toll-like receptor 2 for inflammatory interaction: a novel innate immune recognition. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–16, 2021.
- HU, H. H. et al. New insights into TGF- β /Smad signaling in tissue fibrosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 292, n. 229, p. 76–83, 2018.
- HU, Q. et al. MMP7 damages the integrity of the renal tubule epithelium by activating MMP2/9 during ischemia–reperfusion injury. **Journal of Molecular Histology**, v. 51, n. 6, p. 685–700, 2020.

HUA, K. et al. Haemophilus parasuis Infection Disrupts Adherens Junctions and Initializes EMT Dependent on Canonical Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway.

Frontiers in cellular and infection microbiology, v. 8, n. SEP, 12 set. 2018.

HUA, W. et al. CD36 Mediated Fatty Acid-Induced Podocyte Apoptosis via Oxidative Stress. **PloS one**, v. 10, n. 5, 22 maio 2015.

HUMPHREYS, B. D. Mechanisms of Renal Fibrosis. **Annual Review of Physiology**, v. 80, n. 1, p. 309–326, 2018.

HUNG, C. C. et al. Leptospiral membrane proteins stimulate pro-inflammatory chemokines secretion by renal tubule epithelial cells through toll-like receptor 2 and p38 mitogen activated protein kinase. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 21, n. 4, p. 898–910, 2006.

IEKUSHI, K. et al. Hepatocyte growth factor attenuates renal fibrosis through TGF- β 1 suppression by apoptosis of myofibroblasts. **Journal of Hypertension**, v. 28, n. 12, p. 2454–2461, 2010.

INOUE, T. et al. Hepatocyte growth factor counteracts transforming growth factor- β 1, through attenuation of connective tissue growth factor induction, and prevents renal fibrogenesis in 5/6 nephrectomized mice. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 17, n. 2, p. 268–270, 2003.

ITO, W. et al. Effect of the hepatocyte growth factor on allergic inflammatory cells. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 152, n. SUPPL. 1, p. 96–100, 2010.

ITO, Y. et al. Cloning of a Cholesterol-glucosyltransferase from Helicobacter pylori * □ S. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 27765–27772, 2004.

JAY, A. G.; HAMILTON, J. A. The enigmatic membrane fatty acid transporter CD36: New insights into fatty acid binding and their effects on uptake of oxidized LDL. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 138, p. 64–70, 1 nov. 2018.

JENKINS, G. The role of proteases in transforming growth factor- β activation. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 40, n. 6–7, p. 1068–1078, 2008.

JHA, V. et al. Chronic kidney disease: Global dimension and perspectives. **The Lancet**, v. 382, n. 9888, p. 260–272, 2013.

KANLAYA, R. et al. Epigallocatechin-3-gallate prevents TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition and fibrotic changes of renal cells via GSK-3 β / β -catenin/Snail1 and Nrf2 pathways. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 76, p. 108266, 2020.

KATSUNO, Y.; DERYNCK, R. Epithelial plasticity, epithelial-mesenchymal transition, and the TGF- β family. **Developmental cell**, v. 56, n. 6, p. 726–746, 22 mar. 2021.

KE, B. et al. Matrix Metalloproteinases-7 and Kidney Fibrosis. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. 21, p. 1–7, 2017.

KIM, E. S.; KIM, M. S.; MOON, A. TGF- β -induced upregulation of MMP-2 and

- MMP-9 depends on p38 MAPK, but not ERK signaling in MCF10A human breast epithelial cells. **International journal of oncology**, v. 25, n. 5, p. 1375–1382, 2004.
- LAN, H. Y.; CHUNG, A. C. K. TGF- β /Smad Signaling in Kidney Disease. **Seminars in Nephrology**, v. 32, n. 3, p. 236–243, 2012.
- LEBLEU, V. S. et al. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. **Nature medicine**, v. 19, n. 8, p. 1047–1053, ago. 2013.
- LEE, J. I. et al. The porcine intestinal spirochaetes: identification of new genetic groups. **Veterinary Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 273–285, 1993.
- LI, J. et al. The potential role of aquaporin 1 on aristolochic acid I induced epithelial mesenchymal transition on HK-2 cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 6, p. 4919–4925, 2018.
- LI, X. J. et al. Klotho Regulates Epithelial-to-Mesenchymal Transition In Vitro via Wnt/ β -Catenin Pathway and Attenuates Chronic Allograft Dysfunction in a Rat Renal Transplant Model. **Annals of transplantation**, v. 26, 2021.
- LIU, H. et al. High Uric Acid-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition of Renal Tubular Epithelial Cells via the TLR4/NF- κ B Signaling Pathway. **American Journal of Nephrology**, v. 46, n. 4, p. 333–342, 2017a.
- LIU, L. et al. Twist1 downregulation of PGC-1 α decreases fatty acid oxidation in tubular epithelial cells, leading to kidney fibrosis. **Theranostics**, v. 12, n. 8, p. 3758–3775, 2022.
- LIU, T. et al. NF- κ B signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, n. e17023, p. 1–9, 2017b.
- LIU, Y. Renal fibrosis: New insights into the pathogenesis and therapeutics. **Kidney International**, v. 69, n. 2, p. 213–217, 2006.
- LOVISA, S. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. **Nature medicine**, v. 21, n. 9, p. 998–1009, 8 set. 2015.
- LOVISA, S. Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Fibrosis: Concepts and Targeting Strategies. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 2239, 7 set. 2021.
- LOVISA, S.; GENOVESE, G.; DANESE, S. Role of Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Inflammatory Bowel Disease. **Journal of Crohn's & colitis**, v. 13, n. 5, p. 659–668, 1 maio 2019.
- LUIKEN, J. J. F. P.; BONEN, A.; GLATZ, J. F. C. Cellular fatty acid uptake is acutely regulated by membrane-associated fatty acid-binding proteins. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 67, n. 2–3, p. 73–78, 2002.
- LYNCH, C. C. et al. Cleavage of E-Cadherin by Matrix Metalloproteinase-7 Promotes Cellular Proliferation in Nontransformed Cell Lines via Activation of RhoA. **Journal of oncology**, v. 2010, p. 1–10, 2010.
- MARÉCHAL, L. et al. The CD36-PPAR γ Pathway in Metabolic Disorders. **International Journal of Molecular Sciences** 2018, Vol. 19, Page 1529, v. 19, n. 5, p. 1529, 21 maio 2018.

- MARTELLI, A. N. et al. Análise espacial da leptospirose no Brasil. **Saúde em Debate**, v. 44, n. 126, p. 805–817, 2020.
- MATSUI, M. et al. Cytokine and Chemokine Expression in Kidneys during Chronic Leptospirosis in Reservoir and Susceptible Animal Models. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–20, 2016.
- MELTON, E. M. et al. Overexpression of human fatty acid transport protein 2/very long chain acyl-CoA synthetase 1 (FATP2/Acsvl1) reveals distinct patterns of trafficking of exogenous fatty acids. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 440, n. 4, p. 743–748, 2013.
- MENG, X. M. et al. TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. MAR, p. 1–8, 2015.
- MIYAZAWA, K. Hepatocyte growth factor activator (HGFA): A serine protease that links tissue injury to activation of hepatocyte growth factor. **FEBS Journal**, v. 277, n. 10, p. 2208–2214, 2010.
- MIZUNO, S. et al. Reciprocal balance of hepatocyte growth factor and transforming growth factor- β 1 in renal fibrosis in mice. **Kidney International**, v. 57, n. 3, p. 937–948, 2000.
- MIZUNO, S.; MATSUMOTO, K.; NAKAMURA, T. Hepatocyte growth factor suppresses interstitial fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy. **Kidney International**, v. 59, n. 4, p. 1304–1314, 2001.
- MIZUNO, S.; NAKAMURA, T. Suppressions of chronic glomerular injuries and TGF- β 1 production by HGF in attenuation of murine diabetic nephropathy. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 286, n. 1 55-1, p. 134–143, 2004.
- MIZUSHIMA, N.; KOMATSU, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 728–741, 11 nov. 2011.
- MOLNARFI, N. et al. Hepatocyte growth factor: A regulator of inflammation and autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, v. 14, n. 4, p. 293–303, 2015.
- MONSON, E. A. et al. Lipid droplets and lipid mediators in viral infection and immunity. **FEMS microbiology reviews**, v. 45, n. 4, 1 jul. 2021.
- MURRAY, G. L. et al. Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. **Molecular Microbiology**, v. 78, n. 3, p. 701–709, 2010.
- NAIR, N. et al. Role of TLR4 in Persistent *Leptospira interrogans* Infection: A Comparative In Vivo Study in Mice. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. January, p. 1–10, 2021.
- NAKAMURA, T. et al. Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor. **Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)**, v. 26, n. SUPPL. 1, p. 188–202, 2011.
- NIETO, M. A. et al. EMT: 2016. **Cell**, v. 166, n. 1, p. 21–45, 30 jun. 2016.
- PALLASCH, F. B.; SCHUMACHER, U. Angiotensin Inhibition, TGF- β and EMT in Cancer. **Cancers**, v. 12, n. 10, p. 1–22, 1 out. 2020.
- PEPINO, M. Y. et al. Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal

- transduction in fat metabolism. **Annual review of nutrition**, v. 34, p. 281–303, 2014.
- PEREIRA-DUTRA, F. S. et al. Fat, fight, and beyond: The multiple roles of lipid droplets in infections and inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 106, n. 3, p. 563–580, 1 set. 2019.
- POMBINHO, R.; SOUSA, S.; CABANES, D. Scavenger Receptors: Promiscuous Players during Microbial Pathogenesis. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 685–700, 2 nov. 2018.
- PRADO, L. G.; BARBOSA, A. S. Understanding the renal fibrotic process in leptospirosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 19, p. 1–20, 2021.
- PYO, M. C. et al. Ochratoxin A induces epithelial-to-mesenchymal transition and renal fibrosis through TGF- β /Smad2/3 and Wnt1/ β -catenin signaling pathways in vitro and in vivo. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 9, p. 3329–3342, 2020.
- QU, Z. et al. Mycobacterial EST12 activates a RACK1-NLRP3-gasdermin D pyroptosis-IL-1 β immune pathway. **Science Advances**, v. 6, n. 43, p. 1–19, 2020.
- QUE-GEWIRTH, N. L. S. et al. A Methylated Phosphate Group and Four Amide-linked Acyl Chains in *Leptospira interrogans* Lipid A. The Membrane Anchor of an Unusual Lipopolysaccharide that Activates TLR2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 24, p. 25420–25429, 2004.
- RADOLF, J. D. et al. Of ticks, mice and men: Understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 87–99, 2012.
- REIS, R. B. et al. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 4, p. 11–18, 2008.
- ROUTLEDGE, D.; SCHOLPP, S. Mechanisms of intercellular wnt transport. **Development (Cambridge)**, v. 146, n. 10, 2019.
- SAMSA, M. M. et al. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 10, out. 2009.
- SANTECCHIA, I. et al. Live Pathogenic and Saprophytic *Leptospira* Enter and Exit Human and Mouse Macrophages With No Intracellular Replication. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 1, 11 jul. 2022.
- SATO, H.; COBURN, J. *Leptospira interrogans* causes quantitative and morphological disturbances in adherens junctions and other biological groups of proteins in human endothelial cells. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005830, 27 jul. 2017.
- SCHAALE, K. et al. Wnt signaling in macrophages: Augmenting and inhibiting mycobacteria-induced inflammatory responses. **European Journal of Cell Biology**, v. 90, n. 6–7, p. 553–559, 2011.
- SCHWENK, R. W. et al. Fatty acid transport across the cell membrane: regulation by fatty acid transporters. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 82, n. 4–6, p. 149–154, abr. 2010.
- SEGURO, A. C.; ANDRADE, L. Pathophysiology of leptospirosis. **Shock**, v. 39, n. 7

SUPPL.1, p. 17–23, 2013.

SENYÜREK, I. et al. Peptides derived from the human laminin $\alpha 4$ and $\alpha 5$ chains exhibit antimicrobial activity. **Peptides**, v. 31, n. 8, p. 1468–1472, 2010.

SENYÜREK, I. et al. Processing of laminin α chains generates peptides involved in wound healing and host defense. **Journal of Innate Immunity**, v. 6, n. 4, p. 467–484, 2014.

SILVERSTEIN, R. L.; FEBBRAIO, M. CD36, a Scavenger Receptor Involved in Immunity, Metabolism, Angiogenesis, and Behavior NIH Public Access. **Sci Signal**, v. 2, n. 72, 2010.

SINGH, R. et al. Autophagy regulates lipid metabolism. **Nature**, v. 458, n. 7242, p. 1131–1135, 30 abr. 2009.

SPICHLER, A. S. et al. Predictors of lethality in severe leptospirosis in urban Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 6, p. 911–914, 2008.

STEMMLER, M. P. et al. Non-redundant functions of EMT-TFs. **Nature Cell Biology**, v. 21, n. January, p. 102–112, 2019.

STORCH, J. Diversity of fatty acid-binding protein structure and function: studies with fluorescent ligands. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 123, n. 1–2, p. 45–53, jun. 1993.

STORCH, J.; MCDERMOTT, L. Structural and functional analysis of fatty acid-binding proteins. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. SUPPL., p. S126–S131, 1 abr. 2009.

SUPUTTAMONGKOL, Y. et al. An open, randomized, controlled trial of penicillin, doxycycline, and cefotaxime for patients with severe leptospirosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 10, p. 1417–1424, 2004.

TAKABATAKE, Y. et al. Autophagy and the kidney: Health and disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 29, n. 9, p. 1639–1647, 2014.

TAN, R. J. et al. Wnt/ β -catenin signaling and kidney fibrosis. **Kidney International Supplements**, v. 4, n. 1, p. 84–90, 2014.

TIAN, Y. C. et al. Leptospiral outer membrane protein induces extracellular matrix accumulation through a TGF- $\beta 1$ /Smad-dependent pathway. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 10, p. 2792–2798, 2006.

TIAN, Y. C. et al. Leptospira santarosai serovar shermani detergent extract induces an increase in fibronectin production through a toll-like receptor 2-mediated pathway. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 3, p. 1134–1142, 2011.

TIAN, Y.; PHILLIPS, A. O. TGF-beta 1 – Mediated Inhibition of HK-2 Cell Migration. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, p. 631–640, 2003.

TOMA, C. et al. Characteristic features of intracellular pathogenic Leptospira in infected murine macrophages. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 1783–1792, 2011.

TOMLIN, H.; PICCININI, A. M. A complex interplay between the extracellular matrix

and the innate immune response to microbial pathogens. **Immunology**, v. 155, n. 2, p. 186–201, 2018.

TORGERSON, P. R. et al. Global Burden of Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life Years. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. 1–14, 2015.

TOTH, M.; SOHAIL, A.; FRIDMAN, R. Assessment of Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by Gelatin. In: **Metastasis Research Protocols, Methods in Molecular Biology**. [s.l.: s.n.]. v. 878p. 121–135.

VEGA, S. et al. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. **Genes and Development**, v. 18, n. 10, p. 1131–1143, 2004.

VINCAN, E. **Wnt Signaling Volume 1 Pathway Methods and Mammalian Models**. [s.l.] Humana Press, 2008. v. 925

VINCENT, A. T. et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 5, 2019.

VOLLMER, T. et al. Interactions between endocarditis-derived *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* isolates and human endothelial cells. **BMC microbiology**, v. 10, 2010.

WALTHER, T. C.; FARESE, R. V. Lipid droplets and cellular lipid metabolism. **Annual review of biochemistry**, v. 81, p. 687–714, jul. 2012.

WANG, B. et al. WNT1-inducible-signaling pathway protein 1 regulates the development of kidney fibrosis through the TGF- β 1 pathway. **FASEB Journal**, v. 34, n. 11, p. 14507–14520, 2020.

WANG, D. et al. Canonical Wnt/B-catenin signaling mediates transforming growth factor-B1-driven podocyte injury and proteinuria. **Kidney International**, v. 80, n. 11, p. 1159–1169, 2011.

WANG, M. et al. Poricoic acid ZA, a novel RAS inhibitor, attenuates tubulo-interstitial fibrosis and podocyte injury by inhibiting TGF- β /Smad signaling pathway. **Phytomedicine**, v. 36, n. September, p. 243–253, 2017.

WANG, X. et al. The deposition of Notch1 in hepatitis B virus-associated nephropathy and its role in hepatitis B virus X protein-induced epithelial-mesenchymal transdifferentiation and immunity disorder in renal tubular epithelial cells. **Journal of viral hepatitis**, v. 21, n. 10, p. 734–743, 2014.

WELTE, M. A. Expanding roles for lipid droplets. **Current biology : CB**, v. 25, n. 11, p. R470, 6 jun. 2015.

WUNDER, C. et al. Cholesterol glucosylation promotes immune evasion by *Helicobacter pylori*. **Nature Medicine** 2006 12:9, v. 12, n. 9, p. 1030–1038, 3 set. 2006.

WUNDER, E. A. et al. A novel flagellar sheath protein, FcpA, determines filament coiling, translational motility and virulence for the *Leptospira* spirochete. **Molecular Microbiology**, v. 101, n. 3, p. 457–470, 2016.

XU, B. H. et al. Deletion of Smad3 prevents renal fibrosis and inflammation in type 2

diabetic nephropathy. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 103, p. 154013, 2020.

XU, Y. et al. Lipid accumulation is ahead of epithelial-to-mesenchymal transition and therapeutic intervention by acetyl-CoA carboxylase 2 silence in diabetic nephropathy. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 63, n. 5, p. 716–726, 2014.

YAN, J. et al. BMP6 reverses TGF- β 1-induced changes in HK-2 cells: implications for the treatment of renal fibrosis. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 30, p. 994–1000, 2009.

YAN, Q. et al. Autophagy activation contributes to lipid accumulation in tubular epithelial cells during kidney fibrosis. **Cell death discovery**, v. 4, n. 1, 1 dez. 2018.

YANG, C. W. Leptospirosis renal disease: Understanding the initiation by Toll-like receptors. **Kidney International**, v. 72, n. 8, p. 918–925, 2007.

YANG, C. W. Leptospirosis renal disease: Emerging culprit of chronic kidney disease unknown etiology. **Nephron**, v. 138, n. 2, p. 129–136, 2018.

YANG, H. Y. et al. Overlooked Risk for Chronic Kidney Disease after Leptospirosis Infection: A Population-Based Survey and Epidemiological Cohort Evidence. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. 1–15, 2015.

YANG, J. et al. Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 6, p. 341–352, 2020.

YANG, J.; DAI, C.; LIU, Y. A Novel Mechanism by which Hepatocyte Growth Factor Blocks Tubular Epithelial to Mesenchymal Transition. **The American Society of Nephrology**, v. 16, p. 68–78, 2005.

YANG, J.; LIU, Y. Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 13, n. 1, p. 96–107, 2002.

YANG, X. et al. CD36 in chronic kidney disease: novel insights and therapeutic opportunities. **Nature reviews. Nephrology**, v. 13, n. 12, p. 769–781, 1 dez. 2017.

ZHANG, W. et al. Doxycycline attenuates leptospira-induced IL-1 β by suppressing NLRP3 inflammasome priming. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. JUL, p. 1–11, 2017.

ZHOU, D. et al. Matrix Metalloproteinase-7 Is a Urinary Biomarker and Pathogenic Mediator of Kidney Fibrosis. **Journal of American Society of Nephrology**, v. 28, p. 598–611, 2017.

ZUO, Y.; LIU, Y. New insights into the role and mechanism of Wnt/ β -catenin signalling in kidney fibrosis. **Nephrology**, v. 23, p. 38–43, 2018.

ANEXOS

Anexo 1. PRADO, L. G.; BARBOSA, A. S. Understanding the renal fibrotic process in leptospirosis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 19, p. 1–20, 2021.



International Journal of
Molecular Sciences



Review

Understanding the Renal Fibrotic Process in Leptospirosis

Luan Gavião Prado and Angela Silva Barbosa

Special Issue

Extracellular Matrix in Development and Disease 3.0

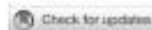
Edited by

Prof. Dr. Frank Zaucke



<https://doi.org/10.3390/ijms221910779>

Anexo 2. COURROL, D. DOS S. et al. Leptolysin, a *Leptospira* secreted metalloprotease of the pappalysin family with broad-spectrum activity. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, n. August, p. 1–20, 2022.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Jan Potempa,
University of Louisville, United States

REVIEWED BY
Sabina Kępczewska-Miszczewska,
University of Gdańsk, Poland
Jon Skare,
Texas A&M Health Science Center,
United States

*CORRESPONDENCE
Angela Silva Barbosa
angela.barbosa@butantan.gov.br

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Molecular Bacterial Pathogenesis,
a section of the journal
Frontiers in Cellular and
Infection Microbiology

RECEIVED 10 June 2022
ACCEPTED 05 August 2022
PUBLISHED 23 August 2022

CITATION
Courrol DS, Silva CCF, Prado LG,
Chura-Chambi RM, Morganti L, de
Souza GO, Heinemann MB, Isaac L,
Conte FP, Portaro KCV,
Rodrigues-da-Silva RN
and Barbosa AS (2022) Leptolysin, a
Leptospira secreted metalloprotease
of the pappalysin family with broad-
spectrum activity.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 12:966570.
doi: 10.3389/fcimb.2022.966570

COPYRIGHT
© 2022 Courrol, Silva, Prado, Chura-
Chambi, Morganti, de Souza,
Heinemann, Isaac, Conte, Portaro,
Rodrigues-da-Silva and Barbosa. This is
an open-access article distributed under
the terms of the [Creative Commons
Attribution License \(CC BY\)](#). The use,
distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright
owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use,
distribution or reproduction is
permitted which does not comply with
these terms.

Leptolysin, a *Leptospira* secreted metalloprotease of the pappalysin family with broad- spectrum activity

Daniella dos Santos Courrol¹,
Cristiane Castilho Fernandes da Silva², Luan Gavião Prado^{1,3},
Rosa Maria Chura-Chambi^{1,4}, Ligia Morganti⁴,
Gisele Oliveira de Souza⁵, Marcos Bryan Heinemann⁵,
Lourdes Isaac⁶, Fernando Paiva Conte⁷,
Fernanda Calheta Vieira Portaro³,
Rodrigo Nunes Rodrigues-da-Silva⁸
and Angela Silva Barbosa^{2*}

¹Laboratory of Bacteriology, Butantan Institute, São Paulo, Brazil, ²Laboratory of Structure and
Function of Biomolecules, Butantan Institute, São Paulo, Brazil, ³Department of Microbiology,
Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ⁴Center of
Biotechnology, Energy and Nuclear Research Institute (IPEN)-CENUSP, São Paulo, Brazil,
⁵Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, School of Veterinary Medicine
and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ⁶Department of Immunology,
Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ⁷Pilot Plant
Implementation Project, Immunobiological Technology Institute, Oswaldo Cruz Foundation,
Rio de Janeiro, Brazil, ⁸Laboratory of Immunological Technology, Immunobiological Technology
Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

Extracellular proteolytic enzymes are produced by a variety of pathogenic microorganisms, and contribute to host colonization by modulating virulence. Here, we present a first characterization of leptolysin, a *Leptospira* metalloprotease of the pappalysin family identified in a previous exoproteomic study. Comparative molecular analysis of leptolysin with two other pappalysins from prokaryotes, ulilysin and mirolysin, reveals similarities regarding calcium, zinc, and arginine-binding sites conservation within the catalytic domain, but also discloses peculiarities. Variations observed in the primary and tertiary structures may reflect differences in primary specificities. Purified recombinant leptolysin of *L. interrogans* was obtained as a ~50 kDa protein. The protease exhibited maximal activity at pH 8.0 and 37°C, and hydrolytic activity was observed in the presence of different salts with maximum efficiency in NaCl. Substrate specificity was assessed using a small number of FRET peptides, and showed a marked preference for arginine residues at the P1 position. *L. interrogans* leptolysin proteolytic activity on proteinaceous substrates such as proteoglycans and plasma fibronectin was also evaluated. All proteins tested were efficiently degraded over time, confirming the protease's broad-spectrum activity *in vitro*. In addition,