

LAZARA ELENA SANTIESTEBAN LORES

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GÊNICOS DO FATOR H DO
SISTEMA COMPLEMENTO E SUA INFLUÊNCIA NA
SUSCEPTIBILIDADE À LEPTOSPIROSE.**

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

São Paulo
2021

LAZARA ELENA SANTIESTEBAN LORES

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GÊNICOS DO FATOR H DO
SISTEMA COMPLEMENTO E SUA INFLUÊNCIA NA
SUSCEPTIBILIDADE À LEPTOSPIROSE.**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Lourdes Isaac

Versão original

São Paulo
2021

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)

Santiesteban-Lores, Lazara Elena
Análise de polimorfismos gênicos do Fator H do
Sistema Complemento e sua influência na
susceptibilidade à leptospirose / Lazara Elena
Santiesteban-Lores; orientadora Lourdes Isaac. --
São Paulo, 2021.
142 p.

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

1. Sistema Complemento. 2. Fator H. 3.
Leptospirose. 4. Polimorfismos. I. Isaac, Lourdes ,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Lazara Elena Santiesteban Lores

Titulo da Dissertação/Tese: Análise de polimorfismos gênicos do Fator H do Sistema Complemento e sua influência na susceptibilidade à leptospirose.

Orientador(a): Profa. Dra. Lourdes Isaac

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a **06/08/2021**, considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Presidente: Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 14 de dezembro de 2017.

PARECER 1370/CEPSH

CAAE nº 78969417.5.1001.5467

Protocolo CEP SH-ICB nº 1405/17

O Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "**Avaliação de polimorfismos de proteínas do Sistema Complemento em pacientes com leptospirose**", da pesquisadora Profa. Dra. **Lourdes Isaac**.

Caberá à pesquisadora elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: ww2.icb.usp.br/icb/cepsh, como também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste projeto.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria do CEP em **14/12/2018**, bem como anexado uma cópia à Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Prof. Dra. **CAMILA SQUARZONI DALE**
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP



SECRETARIA MUNICIPAL DA
SAÚDE DE SÃO PAULO -
SMS/SP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de polimorfismos de proteínas do Sistema Complemento em pacientes com leptospirose

Pesquisador: Lourdes Isaac

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 78969417.5.3001.0086

Instituição Proponente: Secretaria Municipal da Saúde de São Paulo - SMS/SP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.105.222

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa intitulado: Avaliação de polimorfismos de Proteínas do Sistema Complemento em pacientes com leptospirose tendo como Intituição Proponente o Instituto de Ciências Biomédicas (USP). Pesquisa experimental onde DNA de pacientes infectados com leptospira será extraído a partir do sangue periférico e serão sequenciadas as regiões do FH envolvidas na interação com as proteínas Lig (SCR 5-7 e SCR 18-20) com a finalidade de identificar polimorfismos.

As amostras de pacientes e os controles empregados no estudo serão provenientes da região nordeste e sudeste do Brasil (100 amostras), assim como também amostras do Biobanco do Instituto de Medicina tropical de São Paulo (100 amostras) e amostras de um Biobanco Argentino (40 amostras) cedidas pelo Laboratório Nacional de Referência de Leptospiroses del Instituto Nacional de Enfermidades Respiratórias "Dr. Emilio Coni".

As amostras provenientes da região nordeste serão coletadas no centro de Pesquisa Gonçalo Muniz CPqGM/FIOCRUZ/BA.

As amostras provenientes da região sudeste serão fornecidas pelo Centro de Vigilância em Zoonoses da Coordenação de Vigilância em Saúde do Estado de São Paulo seguindo o seguinte esquema de trabalho:
1. A equipe do setor de Leptospirose/Dengue do LabZoo enviará a planilha completa para equipe de vigilância da leptospirose da COVISA nomeada como Planilha _ Projeto Covisa01 _data

Endereço: Rua General Jardim, 36 - 8º andar

Bairro: Vila Buarque

UF: SP

Telefone: (11)3397-2464

Município: SAO PAULO

CEP: 01.223-010

E-mail: smscep@gmail.com

Continuação do Parecer: 3.105.222

Biorepositório / Biobanco	DeclaracaoBiorrepositorio.pdf	14/12/2018 10:42:47	Lourdes Isaac	Aceito
Outros	termoanuenciaCCZCOVISA.pdf	27/08/2018 18:58:29	Lourdes Isaac	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PolimorfismoProteinasdoSC.doc	27/08/2018 18:16:47	Lourdes Isaac	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Termotransferenciaresponsabilidadeentr eparticipantes.pdf	13/08/2018 12:31:56	Lourdes Isaac	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Termotransferenciamaterialbiologico.pdf	13/08/2018 12:31:23	Lourdes Isaac	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEmenor12092917.doc	12/09/2017 18:42:56	Lourdes Isaac	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEmaior12092017.doc	12/09/2017 18:42:09	Lourdes Isaac	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	cartaArgentinaBiobanco2017.jpg	08/09/2017 17:43:22	Lourdes Isaac	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 02 de Janeiro de 2019

Assinado por:
SIMONE MONGELLI DE FANTINI
(Coordenador(a))

Endereço: Rua General Jardim, 36 - 8º andar

Bairro: Vila Buarque

UF: SP

Município: SAO PAULO

CEP: 01.223-010

Telefone: (11)3397-2464

E-mail: smscep@gmail.com

*Aos meus pais pela educação,
pelo íncesante desvelo,
pelo amor e apoio incondicionais.*

AGRADECIMENTOS

Agradecer é reconhecer, retribuir com palavras, valorizar um favor imerecido. Agradecer é uma arte, a arte de atrair o bem.

Gratidão a Deus, em primeiro lugar, por ter me guiado até aqui e pelo que ainda há de vir.

À Professora Lourdes por ter me recebido em seu laboratório, pela confiança em mim depositada, pela experiência transmitida, pelo apoio oferecido nos momentos difíceis, pelos conselhos de mãe. As palavras não são suficientes para lhe expressar toda minha gratidão.

Aos meus colegas do Laboratório de Complemento: Léo, Thaís, Tiago, Milena e aos que já foram: Ana Catarina, Denise, Priscilla, Júlia, Natália e Tati. Obrigada pelo convívio diário e a troca de experiências.

Aos nossos colaboradores pelo fornecimento das amostras de pacientes: Yosena Chiani, do INER em Argentina, Dra Elizabeth Daher e Dr. Gydallon Cavalcante da Universidade Federal do Ceará, Thirsa Franco e sua equipe do Centro de Controle de Zoonose da Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo.

Às Professoras Denise e Alessandra pela ajuda na análise dos resultados, pelas discussões, pelo conhecimento transmitido, que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Shaker Chuck Farah e seu laboratório em particular ao Germán e o Edgar pela ajuda na realização dos experimentos de clonagem e purificação de proteína. Obrigada Chuck pela grande ajuda com os manuscritos e pelas ótimas sugestões.

À nossa colaboradora a Dra. Ângela Barbosa e seu laboratório pela contribuição com os nossos trabalhos e as valiosas discussões nos seminários.

Ao corpo de apoio técnico do departamento: Claudinha, Rogério, Meire, Marlice, Silvana, Sandra, Áurea que sempre nos socorrem em momentos de apuros.

Ao Laboratórios de: Imunologia Humana, Imunologia do Transplante, Imunologia das Mucosas, Interações Neuroimunes por sempre nos abrirem as portas para usar seus equipamentos.

Aos amigos do Departamento: Gretel, Isabela e Omar pelas conversas e os bons momentos que compartilhamos juntos. Obrigada Gretel pela amizade e pela companhia nos momentos bons e ruins.

Aos moços da portaria do Departamento de Imunologia que com sua gentileza e jocosidade fizeram dos dias, noites e madrugadas no prédio momentos mais alegres.

Obrigada a todos aqueles que sempre estão dispostos a nos ajudar no dia a dia do ICB.

Às agências financiadoras pela concessão de bolsas e pelo apoio financeiro ao projetos de pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88882.327978/2019-01.

RESUMO

SANTIESTEBAN-LORES, L.E. **Análise de polimorfismos gênicos do Fator H do Sistema Complemento e sua influência na susceptibilidade à leptospirose.** 2021. 142 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A leptospirose é uma zoonose causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*, constituindo um importante problema de saúde pública principalmente em países em desenvolvimento com clima ameno e tropical e com condições inadequadas de saneamento básico. O sistema imune inato constitui a primeira linha de defesa do hospedeiro na infecção causada por leptospirosas, particularmente o Sistema Complemento (SC). Sabe-se que leptospirosas não patogênicas morrem rapidamente, quando incubadas *in vitro* com soro humano normal como fonte do SC, enquanto as leptospirosas patogênicas sobrevivem por longos períodos de tempo, possibilitando a disseminação pelo hospedeiro e o estabelecimento da infecção. Este fato deve-se em parte à habilidade das espécies patogênicas de interagir com proteínas reguladoras do SC como o Fator H (FH). Com o objetivo de identificar polimorfismos gênicos no FH que possam estar associados com a leptospirose ou com as manifestações clínicas da doença, neste estudo foram analisadas 184 amostras de pacientes e 162 amostras de indivíduos controle. Foram sequenciados os éxons 7, 9, 21, 22 e 23 do gene *CFH* que codificam para os domínios SCR 5, 7, 18, 19 e 20, respectivamente; que participam da interação com proteínas da superfície da *Leptospira*. Foram identificados 22 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), incluindo quatro variantes intrônicas e quatro variantes 3'UTR. Dentre os polimorfismos identificados nenhum teve associação significativa com a leptospirose na análise caso-controle. Porém, na análise de associação com as manifestações clínicas nos pacientes com leptospirose foi observada uma associação significativa da variante rs15809 C→G com a prostração ($p=0,02032$; OR 0,21; 95%CI 0,05-0,97), enquanto a variante intrônica rs34815383 T→C teve associação significativa com a síndrome renal ($p=0,001439$; OR 5,3; 95%CI 1,8-15,57). Por outro lado, as variantes rs1061147 A→C e rs1061170 T→C tiveram associação significativa com a febre ($p=0,04611$; OR 0,23; 95%CI 0,06-0,89). Além disso, as variantes rs55679475 T→C, rs55771831 G→C e rs62625015 C→G apresentaram associação significativa com o sintoma de dor na panturrilha ($p=0,01341$; OR 0,43; 95%CI 0,22-0,85). Na análise funcional, os polimorfismos identificados nos SCRs 7 e 18 não alteraram a interação do FH com *Leptospira interrogans*, nem com a linhagem celular humana HepG2. Este constitui o primeiro estudo que analisa a distribuição de polimorfismos do gene *CFH* na população brasileira e argentina. Os resultados deste trabalho contribuem para definir marcadores genéticos de susceptibilidade à leptospirose, possibilitando a identificação de populações em risco, assim como indivíduos com maior probabilidade de desenvolver quadros mais graves dessa doença.

Palavras-chave: Sistema Complemento. Leptospirose. Fator H. Polimorfismos gênicos.

ABSTRACT

SANTIESTEBAN-LORES, L.E. **Analysis of Complement Factor H gene polymorphisms and their influence on leptospirosis susceptibility.** 2021. 142 p. Thesis (Ph.D. thesis in Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Leptospirosis is a zoonosis caused by pathogenic bacteria of the genus *Leptospira*. This disease is an important public health problem, especially in developing countries with a mild, tropical climate and inadequate basic sanitation conditions. The innate immune system constitutes the host's first line defense against leptospires, particularly the Complement System (CS). It is known that non-pathogenic leptospires are killed *in vitro* within a few minutes in the presence of normal human serum, while pathogenic leptospires survive for long periods of time, disseminating in the host and the establishing infection. This fact is due in part to the ability of pathogenic species to interact with host regulatory proteins of CS such as Factor H (FH). In order to identify genetic polymorphisms in FH associated with leptospirosis or the clinical manifestations of the disease, 184 patient and 162 control subject samples were analyzed. We sequenced *CFH* exons 7, 9, 21, 22 and 23 that code for SCR domains 5, 7, 18, 19 and 20, respectively, which interact with leptospira surface proteins. We identified twenty-two single nucleotide polymorphisms, including four intronic variants and four 3'UTR variants. Among the identified polymorphisms, none had a significant association with leptospirosis in the case-control analysis. However, in the association analysis between polymorphisms and clinical manifestations in infected patients, a significant association of the rs15809 C→G variant with prostration was observed ($p=0,02032$; OR 0,21; 95%CI 0,05-0,97), while the intronic variant rs34815383 T→C had a significant association with renal disorder ($p=0,001439$; OR 5,3; 95%CI 1,8-15,57). On the other hand, rs1061147 A→C and rs1061170 T→C variants had a significant association with fever ($p=0,04611$; OR 0,23; 95%CI 0,06-0,89). Additionally, rs55679475 T→C, rs55771831 G→C e rs62625015 C→G variants showed a significant association with calf pain ($p=0,01341$; OR 0,43; 95%CI 0,22-0,85). FH carrying polymorphisms in SCR domains 7 and 18 did not interact differentially with *Leptospira interrogans*, nor with the human cell line HepG2. This is the first study that analyzes the distribution of *CFH* gene polymorphisms in the Brazilian and Argentinian population. The results generated here are important to define genetic markers of susceptibility to leptospirosis, allowing the identification of vulnerable populations, as well as individuals with high risk to develop severe disease symptoms.

Keywords: Complement System. Leptospirose. Factor H. gene polymorphisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Natureza bifásica da leptospirose e aspectos relevantes em diferentes estágios da doença.	- 22 -
Figura 2 - Representação esquemática da ativação do Sistema Complemento	- 28 -
Figura 3 - Estrutura da proteína Fator H, reguladora da ativação do SC.....	- 36 -
Figura 4 - Eventos principais da ativação e regulação da VA.....	- 37 -
Figura 5 - Família do Fator H.	- 39 -
Figura 6 - Mutações do FH associadas com a Síndrome Hemolítica Urêmica atípica.....	- 42 -
Figura 7 - Análise representativa do ADN genômico em gel de agarose a 1%.....	- 51 -
Figura 8 - Fragmentos do gene <i>CFH</i> amplificados por PCR em gel de agarose a 2%.	- 53 -
Figura 9 - Representação esquemática da estrutura do gene <i>CFH</i> com ampliação dos éxons sequenciados neste estudo.	- 64 -
Figura 10 - Eletroferograma representativo do sequenciamento de ADN mostrando os genótipos dos SNPs encontrados nos éxons 7 e 9 do gene <i>CFH</i>	- 68 -
Figura 11 - Eletroferograma representativo do sequenciamento de ADN mostrando os genótipos dos SNPs encontrados nos éxons 21, 22 e 23 do gene <i>CFH</i>	- 69 -
Figura 12 - Análise do desequilíbrio de ligação entre os SNPs identificados no estudo, definido por <i>Haploview</i>	- 73 -
Figura 13 - Frequência alélica dos SNPs identificados no estudo.	- 82 -
Figura 14 - Cromatograma da purificação do FH por gel filtração na coluna Superdex-200.	- 85 -
Figura 15 - Análise das frações proteicas eluídas da coluna Superdex-200, por SDS-PAGE (A) e Western-Blot (B).	- 86 -
Figura 16 - Cromatograma da purificação do FH por afinidade empregando a resina Sepharose 4B-CNBr ativada, acoplada a anticorpo anti-FH humano.....	- 86 -
Figura 17 - Análise das frações eluídas da resina de afinidade, por SDS-PAGE (A) e Western-Blot (B).	- 87 -
Figura 18 - Análise por citometria de fluxo da interação do FH do soro com <i>Leptospira</i>	- 89 -
Figura 19 - Histograma representativo da interferência dos anticorpos na detecção da interação do soro com as leptospiros.....	- 90 -
Figura 20 - Análise por citometria de fluxo da interação do FH com <i>Leptospira</i>	- 91 -
Figura 21 - Análise da interação da proteína LigAC com as variantes polimórficas do FH por ELISA. .	- 92 -

Figura 22 - Análise por citometria de fluxo da interação do FH com a linhagem de células hepáticas humanas HepG2..... - 93 -

Figura 23 - Análise da atividade do FH ligado às células HepG2 como cofator de FI na clivagem proteolítica de C3b..... - 94 -

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição geográfica e classificação da coorte avaliada no estudo.	51 -
Tabela 2 - Sequências de oligonucleotídeos iniciadores (' <i>Primers</i> ') utilizados na amplificação e sequenciamento das regiões de interesse do gene <i>CFH</i>	52 -
Tabela 3 - Amplificação dos éxons 7, 9, 21, 22 e 23 do gene <i>CFH</i> por PCR.	52 -
Tabela 4 - Condições da PCR (35 ciclos).	53 -
Tabela 5 - Reação de sequenciamento.	54 -
Tabela 6 - Condições da reação de sequenciamento (25 ciclos).	54 -
Tabela 7 - Caracterização demográfica e clínica dos pacientes com leptospirose participantes do estudo.	63 -
Tabela 8 - Distribuição alélica e genotípica em pacientes e controles dos SNPs identificados nos éxons 7, 9, 21, 22 e 23 do gene <i>CFH</i>	65 -
Tabela 9 - Distribuição alélica e genotípica em pacientes e controles dos SNPs identificados nas regiões intrônicas e na região 3'UTR do gene <i>CFH</i> analisadas neste estudo.	71 -
Tabela 10 - Modelos de associação dos SNPs identificados no gene <i>CFH</i> em pacientes com leptospirose comparado com os controles.	74 -
Tabela 11 - Frequência dos haplótipos identificados no gene <i>CFH</i> em amostras de pacientes e controles analisadas no estudo.	75 -
Tabela 12 - Distribuição genotípica para cada manifestação clínica observada em pacientes com leptospirose.	79 -

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'UTR	região 3' não traduzida (do inglês - <i>3'untranslated region</i>)
ADN	ácido desoxirribonucleico
aHUS	síndrome hemolítica urêmica atípica (do inglês - <i>atypical Hemolytic Uremic Syndrome</i>)
ANOVA	análise de variâncias
ARMD	degeneração da mácula relacionada à idade (do inglês - <i>age related macular degeneration</i>)
BCA	ácido bicinconínico (do inglês - <i>bicinchoninic acid</i>)
BSA	albumina de soro bovino (do inglês - <i>bovine serum albumin</i>)
C1-INH	inibidor de C1 (do inglês - <i>C1 inhibitor</i>)
C3G	C3 glomerulopatia
C4BP	proteína ligadora de C4b (do inglês - <i>C4b binding protein</i>)
CFH	Fator H do complemento (do inglês - <i>complement Factor H</i>)
CFHR	proteínas relacionadas ao Fator H (do inglês - <i>complement Factor H related proteins</i>)
CH ₃ COONa	acetato de sódio
CI	intervalo de confiança (do inglês - <i>confidence interval</i>)
CNBr	brometo de cianogênio
CRP	proteína C reativa (do inglês - <i>C-reactive protein</i>)
DAF	fator acelerador do decaimento (do inglês - <i>decay accelerating factor</i>)
DDD	doença dos depósitos densos (do inglês - <i>dense deposit disease</i>)
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês - <i>ethylene diamine tetracetic acid</i>)
ELISA	ensaio imunoenzimático adsorbido sobre fase sólida (do inglês - <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
FB	Fator B
FD	Fator D
FH	Fator H
FHL-1	Fator H tipo 1 (do inglês - <i>Factor H-like 1</i>)
FI	Fator I
FITC	isotiocianato de fluoresceína (do inglês - <i>fluorescein isothiocyanate</i>)
FP	Fator P ou protectina
GAGs	glicosaminoglicanos
GLM	modelo geral linear (do inglês - <i>general linear model</i>)
GPI	glicofosfatidilinositol
GWAS	estudo amplo de associação genômica (do inglês - <i>genome wide association study</i>)
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
HCl	ácido clorídrico

HLA	antígeno leucocitário humano (do inglês - <i>human leukocyte antigen</i>)
HSA	albumina de soro humano (do inglês - <i>human serum albumin</i>)
LD	desequilíbrio de ligação (do inglês - <i>linkage disequilibrium</i>)
Lig	proteínas da leptospira com domínios tipo imunoglobulinas (do inglês - <i>Leptospiral immunoglobulin-like proteins</i>)
LPS	lipopolissacarídeo
MAC	complexo de ataque à membrana (do inglês - <i>membrane attack complex</i>)
MASP	serino protease associada a MBL (do inglês - <i>MBL associated serine protease</i>)
MAT	teste de microaglutinação (do inglês - <i>microagglutination test</i>)
MBL	lectina ligadora de manose (do inglês - <i>mannan-binding lectin</i>)
MCP	proteína cofatora de membrana (do inglês - <i>membrane cofactor protein</i>)
MFI	mediana da intensidade de fluorescência (do inglês - <i>median fluorescence intensity</i>)
NaCl	cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	fosfato de sódio monobásico
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
OR	razões de chance (do inglês - <i>odds ratio</i>)
PBS	tampão fosfato salino (do inglês - <i>phosphate buffer saline</i>)
PCR	reação em cadeia da polimerase (do inglês - <i>polymerase chain reaction</i>)
PMSF	fluoreto de fenilmetanosulfonila (do inglês - <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
RCA	reguladores da ativação do complemento (do inglês - <i>regulators of complement activation</i>)
SAP	proteína amiloide sérica (do inglês - <i>serum amyloid protein</i>)
SARA	Síndrome da Angústia Respiratória Aguda
SC	Sistema Complemento
SCR	do inglês- <i>short consensus repeat</i>
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (do inglês - <i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SNP	polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês - <i>single nucleotide polymorphism</i>)
TA	temperatura ambiente
TCS	sistema regulador de dois componentes (do inglês - <i>two component regulatory system</i>)
TLR	receptores do tipo Toll (do inglês - <i>toll-like receptors</i>)
TMB	tetrametilbenzidina

SUMÁRIO

1.Introdução	- 20 -
1.1 A leptospirose	- 20 -
1.2 Leptospira	- 25 -
1.3 Sistema Complemento	- 27 -
1.3.1 Regulação do SC	- 33 -
1.3.1.1 FH e a família de proteínas relacionadas	- 35 -
1.3.2 Patologias decorrentes de alterações nos genes CFH e FHR -	40 -
1.4 Polimorfismos genéticos humanos associados com a susceptibilidade à leptospirose	- 43 -
1.5 Mecanismos de evasão de leptospiros patogênicas ao SC	- 46 -
2. Objetivos	- 49 -
3. Material e métodos	- 50 -
3.1 Anticorpos e proteínas	- 50 -
3.2 População de estudo	- 50 -
3.3 Extração de ADN	- 51 -
3.4 Amplificação dos éxons 7, 9, 21, 22 e 23 do gene CFH	- 52 -
3.5 Reação de sequenciamento	- 53 -
3.6 Análise estatística	- 54 -
3.7 Purificação de FH a partir de soro humano	- 55 -
3.7.1 Preparação da resina de Sepharose 4B-CNBr acoplada a anti-FH	- 56 -
3.7.2 Eletroforese em gel de poliácridamida contendo SDS (SDS-PAGE)	- 57 -
3.7.3 Western-Blot	- 57 -
3.8 Avaliação da interação das variantes polimórficas do FH com <i>L. interrogans</i>	- 58 -

3.8.1 Citometria de fluxo	- 58 -
3.8.2 ELISA.....	- 59 -
3.9 Avaliação da interação das variantes polimórficas do FH com células HepG2 por citometria de fluxo.	- 59 -
3.10 Avaliação da atividade de cofator de FH ligado nas células HepG2 por Western-Blot	- 60 -
4. Resultados	- 62 -
4.1 Resultados do sequenciamento dos éxons 7, 9, 21, 22 e 23 do gene CFH	- 62 -
4.2 Associação entre SNPs no gene CFH e a susceptibilidade à infecção por leptospira	- 74 -
4.3 Associação entre SNPs no gene CFH e as manifestações clínicas da leptospirose.	- 75 -
4.4 Análise da distribuição alélica dos SNPs identificados no gene CFH entre a população brasileira e argentina.	- 82 -
4.5 Avaliação da atividade funcional das variantes polimórficas do FH	- 84 -
4.5.1 Purificação de FH a partir de soro de indivíduos saudáveis. -	84 -
4.5.2 Avaliação da interação do FH com a <i>L. interrogans</i>	- 87 -
4.5.3 Avaliação da interação de LigAC de <i>L. interrogans</i> com FH. -	92 -
4.5.4 Avaliação da interação das variantes polimórficas do FH com células HepG2 por citometria de fluxo.	- 93 -
4.5.4.1 Avaliação da atividade de cofator de FH ligado nas células HepG2 por Western-Blot.	- 94 -
5. Discussão	- 96 -
6. Conclusões	- 105 -
REFERÊNCIAS	- 106 -
APÊNDICES	- 123 -
APÊNDICE A - Resultados da análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg na coorte de estudo.	- 123 -

APÊNDICE B - Análise do desequilíbrio de ligação por 'Haploview' dos SNPs identificados no gene <i>CFH</i> .	- 124 -
APÊNDICE C - Modelos de associação dos SNPs identificados no gene <i>CFH</i> em pacientes e controles.	- 126 -
APÊNDICE D - Modelos de associação dos SNPs identificados no gene <i>CFH</i> em pacientes com leptospirose afetados com febre.	- 127 -
APÊNDICE E - Modelos de associação dos SNPs identificados no gene <i>CFH</i> em pacientes com leptospirose afetados com cefaleia.	- 128 -
APÊNDICE F - Modelos de associação dos SNPs identificados no gene <i>CFH</i> em pacientes com leptospirose afetados com mialgia.	- 129 -
APÊNDICE G - Modelos de associação dos SNPs identificados no gene <i>CFH</i> em pacientes com leptospirose afetados com icterícia.	- 130 -
APÊNDICE H - Modelos de associação dos SNPs identificados no gene <i>CFH</i> em pacientes com leptospirose afetados com síndrome renal.	- 131 -
APÊNDICE I - Modelos de associação dos SNPs identificados no gene <i>CFH</i> em pacientes com leptospirose afetados com síndrome respiratória.	- 132 -
APÊNDICE J - Modelos de associação dos SNPs identificados no gene <i>CFH</i> em pacientes com leptospirose afetados com síndrome hemorrágica.	- 133 -
APÊNDICE K - Modelos de associação dos SNPs identificados no gene <i>CFH</i> em pacientes com leptospirose afetados com diarreia.	- 134 -
APÊNDICE L - Modelos de associação dos SNPs identificados no gene <i>CFH</i> em pacientes com leptospirose afetados com prostração.	- 135 -
APÊNDICE M - Modelos de associação dos SNPs identificados no gene <i>CFH</i> em pacientes com leptospirose afetados com dor na panturrilha.	- 136 -
APÊNDICE N - Modelos de associação dos SNPs identificados no gene <i>CFH</i> em pacientes com leptospirose afetados com vômito.	- 137 -
APÊNDICE O - Modelos de associação dos SNPs identificados no gene <i>CFH</i> em pacientes com leptospirose afetados com sufusão conjuntival.	- 138 -
APÊNDICE P - Comparação das freqüências alélicas dos SNPs rs61822181, rs55679475, rs55771831, rs62625015 e rs409953 entre a população de estudo e populações de referência.	- 139 -
APÊNDICE Q - Região do gene <i>CFH</i> que contém as variantes rs55679475 e rs55771831 e rs62625015 comparada com diferentes espécies de primates não humanos.	- 140 -
ANEXOS	- 141 -
ANEXO A - Trabalhos apresentados em congressos.	- 141 -
ANEXO B - Artigos publicados.	- 142 -

1.Introdução

1.1 A leptospirose

A leptospirose é uma zoonose causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* e constitui um importante problema de saúde pública. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde a incidência global da leptospirose mais do que dobrou nos últimos 15 anos: de aproximadamente 500 000 casos em 1999 subiu para pouco mais de um milhão de casos em 2015 (COSTA et al., 2015). As principais regiões endêmicas incluem o Caribe, Sudeste Asiático, Oceania, América do Sul e Central (HARTSKEERL et al., 2011). A elevada incidência da doença está principalmente relacionada a comunidades onde não há condições de saneamento apropriadas e a regiões propícias a enchentes.

O Brasil é o país de maior número de casos de leptospirose notificados anualmente na América Latina (PEREIRA et al., 2018). No Brasil, a leptospirose é uma doença endêmica que pode se tornar epidêmica em períodos chuvosos, principalmente nas capitais e áreas metropolitanas, devido a enchentes associadas à aglomeração populacional de baixa renda, às condições inadequadas de saneamento e à alta infestação de roedores infectados. Alguns profissionais desenvolvem atividades que facilitam o contato com as leptospiras, como trabalhadores em limpeza e desentupimento de esgotos, garis, catadores de lixo, agricultores, veterinários, tratadores de animais, pescadores, militares e bombeiros, dentre outros. Contudo, a maior parte dos casos ainda é mais frequente em pessoas que habitam ou trabalham em locais com infraestrutura sanitária inadequada e expostas à urina contaminada de roedores.

Há registros de leptospirose em todas as unidades da federação brasileira, com um maior número de casos nas regiões Sul e Sudeste. No período entre 2010 a 2019 foram confirmados no Brasil 37.713 casos de leptospirose, representando uma média anual de 3770 casos. O número de óbitos foi 3246, representando uma média de 324 óbitos por ano. O maior número de casos da doença foi observado nas regiões Sudeste (12.319) e Sul (12.223), seguido pelas regiões Norte (7.180), Nordeste (5.396) e Centro-Oeste

(595) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). No município de São Paulo, neste mesmo período foram registrados 1957 casos, sendo que 264 foram a óbito com uma taxa de letalidade média de 13,5% (VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2021). O sorogrupo de maior prevalência em território brasileiro é o Icterohaemorrhagiae serovar Copenhageni (ROMERO; BERNARDO; YASUDA 2003; GALLOWAY; LEVETT, 2010; MIRAGLIA et al., 2013).

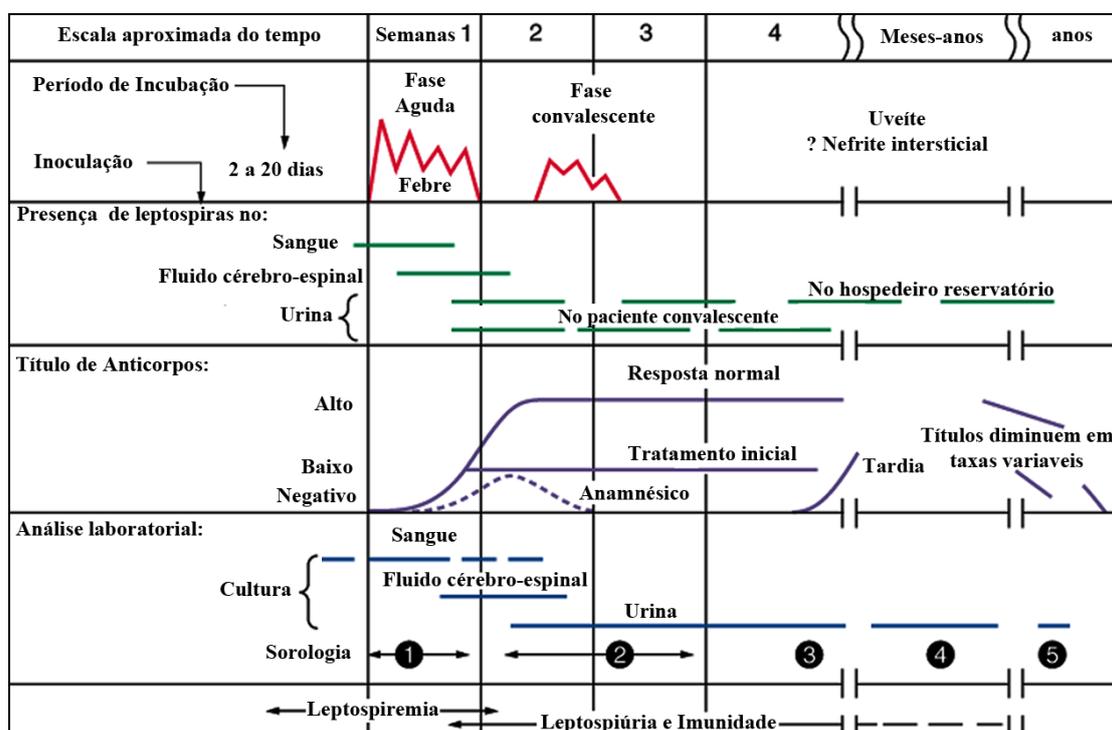
As leptospirosas causam infecções assintomáticas em seus hospedeiros de manutenção, nos quais colonizam os túbulos renais proximais, podendo ser eliminadas na urina. A infecção em humanos ocorre pela penetração das bactérias em mucosas intactas e na pele lesada. As leptospirosas se disseminam pela circulação sanguínea por todo o organismo, concentrando-se principalmente no fígado, nos rins e nos pulmões (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). A maior parte dos casos (>90%) é moderada e tem resolução espontânea.

A leptospirose é uma doença febril de início abrupto cujo espectro clínico pode variar desde quadros oligossintomáticos, leves e de evolução benigna a formas letais. A Síndrome de Weil, caracterizada por icterícia, insuficiência renal e hemorragias é a manifestação clássica da leptospirose grave (WEIL, 1886). No entanto a síndrome de hemorragia pulmonar vem sendo reconhecida como uma forma grave e emergente da doença. A letalidade de formas graves de leptospirose é aproximadamente 10% e chega a 50% quando ocorre a síndrome de hemorragia pulmonar (GOUVEIA et al., 2008). As diferentes manifestações da doença podem ser explicadas pela carga bacteriana, virulência da estirpe de leptospira infectante e pelo estado de saúde do paciente (PICARDEAU, 2013).

Desde a exposição inicial até o início dos sintomas transcorrem em média entre 7 e 12 dias, mas este período é variável, podendo ser tão curto quanto 3 dias ou tão longo quanto um mês (MORGAN et al., 2002). A doença segue um curso bifásico: de início repentino, a fase aguda ou septicêmica dura entre 4 a 7 dias e se caracteriza pela presença de febre, calafrios, mialgia e dor de cabeça não podendo ser diferenciada de outras causas de doenças febris

agudas. Neste período as leptospiros podem ser encontradas no sangue ou no líquido cefalorraquidiano. Esta fase é seguida por um período de 1 a 3 dias de defervescência (declínio ou cessão da febre). Na segunda etapa da doença chamada de fase tardia ou fase imune as leptospiros podem ser encontradas na urina e a produção de anticorpos específicos pode ser detectada por métodos sorológicos (**Figura 1**). Em 10 a 15% dos pacientes pode haver evolução para manifestações clínicas mais graves que tipicamente iniciam-se após a primeira semana da doença (HAAKE; LEVETT, 2015).

Figura 1 - Natureza bifásica da leptospirose e aspectos relevantes em diferentes estágios da doença.



De início abrupto, a leptospirose tem um período de incubação variável, sendo este, em média, entre 2 a 20 dias. Na fase aguda da doença, as leptospiros patogênicas são encontradas na corrente sanguínea e persistem no organismo do hospedeiro infectado por cerca de 3 a 10 dias. A segunda fase inicia-se com a produção de anticorpos específicos e eliminação de leptospiros na urina com duração de 10 a 30 dias. Soros 1 e 2 pertencem a indivíduos que se encontram infectados em fase aguda; soro 3 é proveniente de paciente em fase de convalescência e permite a detecção da resposta imune tardia; os soros 4 e 5 são de pacientes em acompanhamento e podem fornecer informações epidemiológicas.

Fonte: Adaptado de LEVETT (2001).

A insuficiência renal aguda é considerada uma importante complicação da fase tardia da leptospirose e ocorre em 16% a 40% desses pacientes (SITPRIJA, 2006). O rim é o principal órgão alvo na leptospirose devido ao tropismo renal intrínseco desta bactéria. A leptospirose causa uma forma peculiar de insuficiência renal aguda, caracterizada geralmente como não oligúrica e hipocalêmica devido à inibição de reabsorção de sódio nos túbulos renais proximais, aumento no aporte distal de sódio e consequente perda de potássio. Com a perda progressiva do volume intravascular, os pacientes desenvolvem insuficiência renal oligúrica devido à azotemia (alta concentração de compostos nitrogenados no sangue) pré-renal. Neste estágio, os níveis de potássio começam a aumentar para valores normais ou elevados. Devido à perda contínua de volume intravascular, os pacientes podem desenvolver necrose tubular aguda e não responderão à reposição intravascular de fluidos, necessitando de diálise para tratamento da insuficiência renal aguda (SEGURO; LOMAR; ROCHA, 1990).

O comprometimento pulmonar da leptospirose manifesta-se com tosse seca, dispneia, expectoração hemoptoica e, ocasionalmente, dor torácica e cianose. A hemoptise franca denota extrema gravidade e pode ocorrer de forma súbita, levando à insuficiência respiratória (Síndrome da Hemorragia Pulmonar Aguda e Síndrome da Angústia Respiratória Aguda – SARA) e ao óbito. Além disso, a leptospirose pode causar SARA, mesmo sem sangramento pulmonar presente (SEGURA et al., 2005). A leptospirose pode causar outros tipos de manifestações hemorrágicas, frequentemente associados à trombocitopenia. Além de sangramento nos pulmões, os fenômenos hemorrágicos podem ocorrer na pele (petéquias, equimoses e sangramento nos locais de venopunção), nas conjuntivas e em outras mucosas ou órgãos internos, inclusive no sistema nervoso central (WAGENAAR et al., 2010).

O fígado é outro órgão alvo afetado na leptospirose. Análises histopatológicas hepáticas provenientes de casos fatais demonstram congestionamento sinusoidal e distensão do espaço de Disse (AREAN, 1962). A presença de leptospiros nos hepatócitos foi observada por imunohistoquímica em modelos animais (MIYAHARA et al., 2014). O dano

hepatocelular e a ruptura das junções inter-hepatócitos causam ao vazamento dos canalículos biliares e entrada da bile nos vasos sanguíneos sinusoidais. Como consequência há aumento dos níveis de bilirrubina típico de icterícia (MIYAHARA et al., 2014). A icterícia é considerada um sinal característico e é frequentemente usada para auxiliar no diagnóstico da leptospirose, sendo um preditor de pior prognóstico associado com a Síndrome de Weil (GANCHEVA, 2016). Em certas ocasiões o aumento dos níveis de bilirrubina ocorre em consequência de anemia hemolítica, mais comum em pacientes com deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (AVDEEVA et al., 2002).

Outras manifestações frequentes na forma grave da leptospirose são: miocardite, pancreatite (SPICHLER et al., 2007) e distúrbios neurológicos como confusão, delírio, alucinações e sinais de irritação meníngea. A leptospirose é causa relativamente frequente de meningite asséptica (SILVA et al., 2002).

Na fase de convalescência a eliminação de leptospiras pela urina (leptospirúria) pode continuar por uma semana ou, mais raramente, por vários meses após o desaparecimento dos sintomas. A icterícia desaparece lentamente e os níveis de anticorpos específicos diminuem progressivamente, mas, em alguns casos, permanecem elevados por vários meses (LEVETT, 2001). Uveíte unilateral ou bilateral caracterizada por irite, iridociclite e coriorretinite podem ocorrer até 18 meses após a infecção, podendo persistir por anos (RATHINAM et al., 1997; MARTINS et al., 1998).

No tratamento contra a leptospirose o uso de antibiótico é amplamente empregado. Os casos mais severos são tratados com doses altas de penicilina endovenosa; já os casos menos graves são tratados com antibióticos orais como amoxicilina, ampicilina, doxiciclina e eritromicina (RICALDI; SWANCUTT; MATTHIAS, 2013). Atualmente, não há vacina licenciada contra a leptospirose humana. No entanto, vacinas desenvolvidas a partir da preparação de leptospiras mortas por formalina ou calor (bacterinas), já foram testadas com pouco êxito em países como Japão (KITAOKA; INOUE, 1952; KOIZUMI; WATANABE, 2005), Cuba (MARTÍNEZ et al., 2004) e China (YAN et al., 2003). A limitada eficácia deste tipo de vacinas deriva do curto período de proteção

que oferecem. A resposta imune gerada pela bacterina não estimula memória imunológica prolongada, precisando repetir as doses anualmente para manter a imunidade (FAINE et al., 1999). Além disso, a vacina é sorovar-específica e, portanto, a proteção dependerá dos sorovares empregados na sua preparação. Assim, para aumentar a eficácia da vacina em determinada localidade geográfica, deve-se agrupar os sorovares mais relevantes na região onde pretende ser aplicada.

A busca de antígenos vacinais amplamente conservados entre os sorovares e com menos efeitos adversos é uma importante frente de pesquisa em leptospirose. Diversos estudos relacionados com proteínas de membrana externa de leptospira têm sido realizados, em especial com as *Leptospiral immunoglobulin-like proteins* (Lig). As proteínas Lig são expressas em cepas virulentas, mas não em culturas atenuadas de leptospiras. Além disso, essas proteínas são capazes de induzir a produção de anticorpos específicos em pacientes e animais infectados (KOIZUMI; WATANABE, 2004), constituem até hoje os candidatos vacinais mais promissores com altos e reproduzíveis níveis de proteção em modelos animais (ADLER, 2015b). Particularmente a porção N-terminal da LigB quando inoculada com Al(OH)₃ como adjuvante conferiu proteção em 80-100% de hamsters previamente imunizados e depois desafiados com leptospiras; e ainda imunidade esterilizante foi observada em 87-100% dos animais sobreviventes (CONRAD et al., 2017).

1.2 Leptospira

O gênero *Leptospira* pertence à família *Leptospiraceae* e à ordem *Spirochaetales* (FAINE et al., 1999). As leptospiras são bactérias finas e espiraladas com extremidades em forma de gancho e elevada motilidade em virtude da presença de dois flagelos periplasmáticos, que atribuem a elas movimentos de rotação e translação (LEVETT, 2001). Estas bactérias apresentam estrutura de dupla membrana e parede celular de peptidoglicano intimamente associada à membrana citoplasmática. Diferente a outras espiroquetas como *Treponema* e *Borrelia*, as leptospiras possuem lipopolissacarídeos (LPS) em sua superfície (ADLER, 2015a).

Desde sua descrição original em 1907 por Stimson, o gênero *Leptospira* é dividido em dois grupos com base em sua virulência: saprófitas como *Leptospira biflexa* e patogênicas como *Leptospira interrogans* (STIMSON, 1907). Décadas posteriores análises filogenéticas revelaram que a *Leptospira* pode ser dividida em três grupos de acordo com o nível de patogenicidade da espécie: saprofítica, intermediária e patogênica (PEROLAT et al., 1998). Mais recentemente, uma análise genômica comparativa das espécies do gênero permitiu identificar genes ou características do genoma específicos de espécies infecciosas. Este tipo de análise possibilitou aprofundar na evolução da virulência destas bactérias atípicas, mas também proporcionou o refinamento da classificação da *Leptospira*. Foi proposto um novo esquema de classificação para substituir o anterior que depende de suposições baseadas no nível de virulência. Este esquema propõe reclassificar as espécies do gênero *Leptospira* em 4 subclados, denominados P1, P2, S1 e S2, ao invés dos grupos historicamente denominados como saprófitos (S1 e S2), intermediários (P2) e patogênicos (P1). O estudo revelou ademais que o gênero *Leptospira* agora contém 64 espécies nomeadas (VINCENT et al., 2019).

Essa classificação genética coexiste com a classificação sorológica mais antiga, na qual antisoros são usados para estabelecer a relação antigênica entre os isolados. O teste de adsorção e aglutinação cruzada define os sorovares, os quais são distinguidos pela heterogeneidade estrutural no componente carboidrato do LPS da bactéria (TERPSTRA, 1992). Atualmente mais de 300 sorovares são reconhecidos, porém esta lista é periodicamente atualizada. Os sorovares antigenicamente relacionados são organizados por conveniência em soro-grupos. Os sorogrupos são identificados pelo teste de microaglutinação (MAT, do inglês - *microagglutination test*) e têm como propósito agrupar sorovares com antígenos em comum. Nem sorovares, nem sorogrupos são indicativos da relação taxonômica entre as cepas, pois um sorovar (definido por anticorpos direcionados contra seu antígeno lipopolissacarídeo) pode pertencer a mais de uma espécie e membros do mesmo grupo genético não pertencem necessariamente ao mesmo sorogrupo. Contudo, é importante caracterizar a distribuição de sorovares em diferentes

regiões para fins epidemiológicos e vacinais (BHARTI et al., 2003; MARQUEZ et al., 2017).

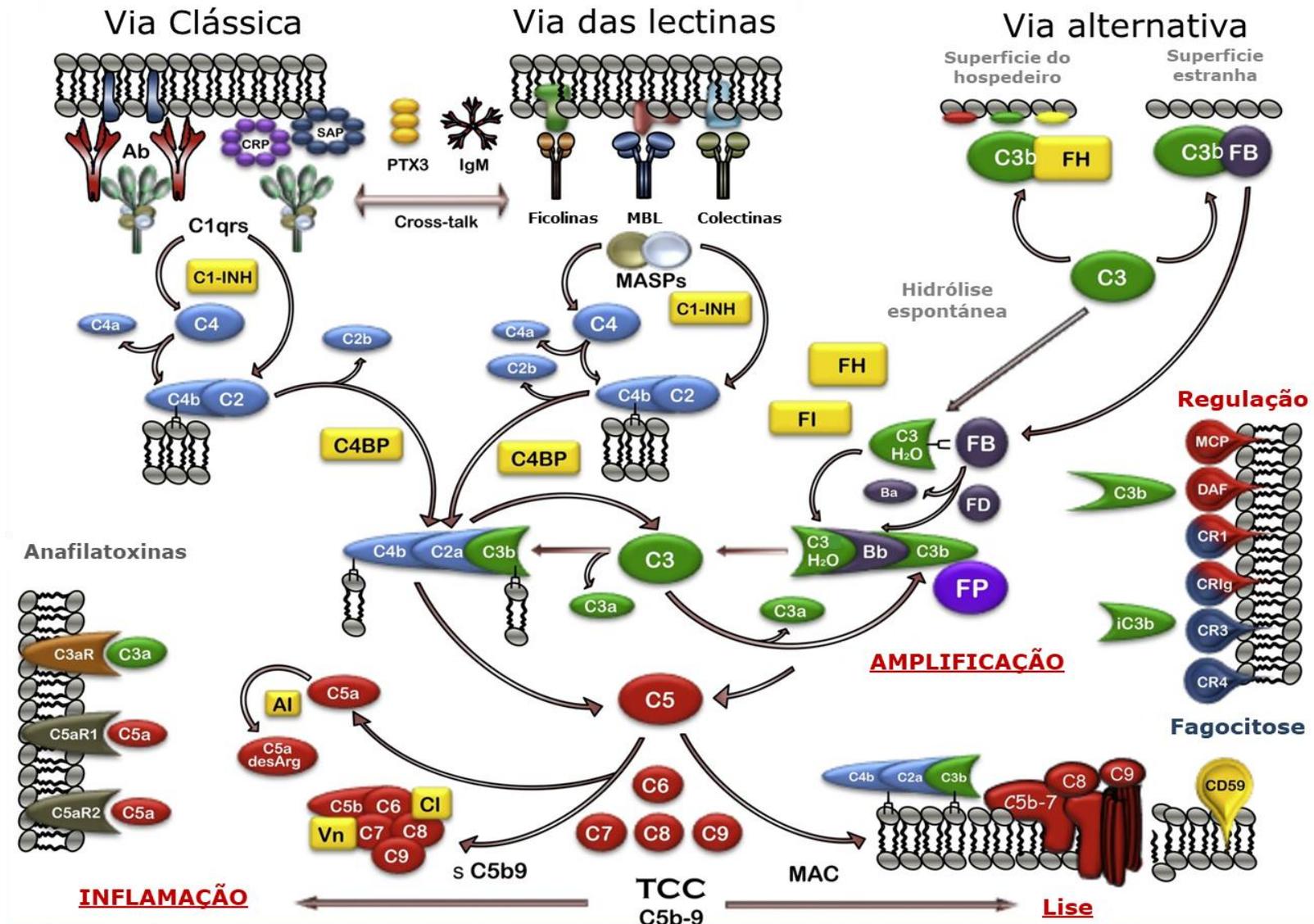
Recentemente, análises de reconstrução de ganho e perda gênica ao longo do tempo permitiram uma melhor compreensão sobre a evolução das leptospiros. A perda de genes ancestrais, a maioria dos quais codifica proteínas envolvidas no metabolismo e sistemas de transdução de sinal é uma tendência predominante na evolução de um progenitor tipo saprófito (S1 e S2) para intermediários (P2) e patogênicos (P1) (PICARDEAU, 2017). As espécies intermediárias (P2) de *Leptospira* são filogeneticamente relacionadas a espécies patogênicas (P1), mas possuem um conjunto grande e diversificado de genes *TCS* (sistema regulador de dois componentes), similar aos saprófitos (S1 e S2); um pequeno locus biossintético de LPS; não possuem genes associados à virulência como a lipoproteína LigB e várias famílias de metaloproteinases específicas de patógenos, que provavelmente são essenciais para a infecção em mamíferos (FOUTS et al., 2016).

1.3 Sistema Complemento

O Sistema Complemento (SC) é um componente do sistema imune inato e adquirido formado por um conjunto de mais de 40 proteínas produzidas principalmente no fígado, que podem estar tanto livres no fluido extracelular (ex: plasma) como associadas à superfície celular, desempenhando um papel fundamental nos processos de defesa do hospedeiro contra infecções (**Figura 2**) (RICKLIN et al., 2010; KOLEV; LE FRIEC; KEMPER, 2014).

As proteínas do SC são ativadas sequencialmente em cascata gerando vários mecanismos efetores, muitos deles relacionados com a eliminação de patógenos (O'HARA et al., 2001). As opsoninas C3b/iC3b e C4b ligadas covalentemente na superfície dos microrganismos facilitam a fagocitose ao interagirem com os receptores do SC: CR3 e CR4 presentes em neutrófilos e macrófagos (ROSS e MEDOF, 1985). A formação do complexo de ataque à membrana (MAC, do inglês- *Membrane Attack Complex*) sobre a membrana dos patógenos permite sua lise e eliminação (BUBECK, 2014).

Figura 2 - Representação esquemática da ativação do Sistema Complemento



O reconhecimento de superfícies estranhas inicia a Via das Lectinas (VL) por meio das proteínas de reconhecimento como MBL, ficolinas e colectinas; ou pela Via Clássica (VC) onde C1q além de reconhecer anticorpos se liga à proteína C-reativa (CRP) e à proteína amiloide sérica (SAP). Após o reconhecimento ocorre a formação das C3 convertases da VC e VL que clivam C3. O C3a gerado tem atividade inflamatória, enquanto o fragmento C3b se deposita nas superfícies de patógenos permitindo a formação da C3 convertase da Via alternativa (VA) que cria uma alça de amplificação das outras vias de ativação. A formação das C5 convertases pela adição do fragmento C3b aos complexos C3bBb ou C4bC2a cliva C5 gerando a anafilotoxina C5a e o fragmento C5b que inicia a montagem do complexo de ataque à membrana (MAC). As opsoninas C3b e seus produtos de degradação iC3b e C3dg se ligam aos receptores do Sistema Complemento em células do sistema imune e facilitam a aderência (C3b a CR1), fagocitose (iC3b a CR3 e CR4) ou medeiam respostas imunes adaptativas (C3dg a CR2). Os reguladores estão sinalizados em amarelo. Reguladores solúveis: inibidor de C1 (C1-INH), *C4b binding protein* (C4BP), Fator I (FI), Fator H (FH), inibidores de anafilotoxinas (carboxipeptidases), além de vitronectina e clusterina que impedem a inserção do MAC na membrana. Os reguladores de membrana incluem CR1, MCP e DAF que desestabilizam as convertases; e CD59 que previne a formação do MAC. A properdina (FP) o único regulador positivo do SC, estabiliza a C3 convertase da VA.

Fonte: Adaptado de Ricklin, Barratt-Due e Mollnes (2017).

Além de suas funções microbidas, o SC também tem grande importância nos processos inflamatórios em geral, incluindo aqueles que não decorrem de infecção (KLOS et al., 2009). Os fragmentos C3a e C5a desencadeiam a degranulação de mastócitos e basófilos com a consequente liberação de mediadores inflamatórios que incrementam a vasodilatação e a permeabilidade vascular (HAAS; van STRIJP, 2007). O SC também participa da imunidade adaptativa ao contribuir para a eliminação de complexos imunológicos e a geração de anticorpos pela célula B, assim como a indução e manutenção de células B de memória no microambiente do centro germinativo, entre outras importantes funções biológicas (CHERUKURI; CHENG; PIERCE, 2001).

A ativação do SC pode ocorrer por três vias conhecidas como Via Clássica (VC), Via das Lectinas (VL) e Via Alternativa (VA), com todas convergindo para a formação do MAC.

A VC é ativada principalmente pela ligação do componente C1q a anticorpos dos isotipos IgM e IgG devidamente complexados aos antígenos. Entretanto, esta via também pode ser ativada em ausência de anticorpos, já que C1q reconhece pentraxinas (proteína C reativa e pentraxina-3) associadas a superfícies (KISHORE et al., 2004) e padrões moleculares associados a

patógenos como o LPS (ROUMENINA et al., 2008) e porinas bacterianas (ALBERTÍ et al., 1996).

A molécula de C1q é constituída por 18 cadeias polipeptídicas de três tipos (A, B e C) que se associam em trímeros formando 6 domínios globulares idênticos ligados a regiões estruturalmente semelhantes ao colágeno. A ligação de pelo menos duas dessas porções globulares aos anticorpos dos imunocomplexos, ou diretamente a partículas ativadoras, causa uma modificação conformacional na molécula de C1q, que resulta na subsequente autoclivagem do C1r. Assim, o C1r adquire a capacidade de ativar o componente C1s, resultando em um complexo proteico com atividade de serino protease que cliva os componentes C4 e C2 (GABORIAUD et al., 2014). Cada domínio globular de C1q carrega um íon Ca^{2+} que mantém sua estabilidade e regula o campo elétrico; a associação entre o C1q e o complexo de serino-proteases C1r₂-C1s₂ também é dependente de cálcio (ROUMENINA et al., 2005).

Essas etapas de ativação levam à formação do complexo C4bC2a, denominado C3 convertase da VC que cliva o componente C3 em dois fragmentos: o C3b, uma opsonina que facilita a fagocitose do microrganismo, e o C3a, uma anafilatoxina (KRISHNAN et al., 2007). O C3b gerado pela ação da convertase pode ligar-se covalentemente nas proximidades do complexo C4bC2a dando origem à C5 convertase (C4bC2aC3b_n). Este complexo enzimático irá atuar sobre o componente C5, dando início à etapa final efetora, que resulta no complexo citolítico MAC (C5b6789n) comum a todas as vias de ativação.

A ativação da VL é iniciada por proteínas que se ligam a carboidratos como a colectina ligadora de manose (MBL, do inglês - *mannan-binding lectin*) e ficolinas que se ligam a compostos acetilados. A MBL reconhece também carboidratos possuindo grupos hidroxila nas posições 4- ou 3- localizados no plano equatorial da estrutura de anel como glicose e L-fucose (WEIS; DRICKAMER; HENDRICKSON, 1992) .

Já as ficolinas, das quais se conhecem três em humanos: ficolina-1 (antiga M), ficolina-2 (antiga L) e ficolina-3 (antiga H), reconhecem compostos acetilados sejam carboidratos ou não: por exemplo, N-acetil-glicose, N-acetil-galactose, N-acetil-glicina, N-acetil-cisteína e acetilcolina (LE et al., 1998; KRARUP et al., 2004). As ficolinas possuem um domínio tipo fibrinogênio na porção C-terminal envolvido no reconhecimento, e um domínio tipo colágeno N-terminal, presente também em C1q e MBL, que permite a sua oligomerização (ICHIJO et al., 1993).

Essas lectinas, estruturalmente semelhantes a C1q, podem complexar-se por meio de seu domínio tipo colágeno a três diferentes moléculas, denominadas, serino proteases associadas à MBL (MASP, do inglês - *MBL associated serine protease*): MASP-1, MASP-2 e MASP-3 (GABORIAUD et al., 2007). Essas enzimas têm funções semelhantes às das serino proteases C1r/C1s da VC. Em condições fisiológicas, a MASP-1 é necessária para a ativação da MASP-2 e ambas as proteases clivam C2, enquanto MASP-2 também pode clivar C4 (HÉJA et al., 2012).

Quando a MASP-2 cliva C4 são gerados dois fragmentos peptídicos, C4a e C4b, do mesmo modo que na VC. Para que a ativação do SC prossiga, o componente C2 deverá se ligar próximo ao complexo lectina-MASP para que a MASP-2 (ou a MASP-1) possa clivar o C2 em C2b e C2a. O fragmento C2a permanece ligado ao C4b gerando a C3 convertase da VL.

Da mesma forma que na VC, a ligação covalente do C3b nas proximidades do complexo C4bC2a origina a C5 convertase que, por sua vez, irá atuar sobre o componente C5, clivando-o e dando início à formação do MAC (C5b6789n).

O início da ativação da VA ocorre lenta e espontaneamente e ocorre mesmo na ausência de superfícies ativadoras. O componente C3 é constituído por duas cadeias polipeptídicas (α e β) ligadas entre si por pontes dissulfeto. Na cadeia alfa do componente C3 há uma ligação tio-éster que pode ser hidrolisada, do qual resulta um C3 conformacionalmente alterado, o C3(H₂O), e

essa molécula assim modificada é capaz de se comportar como C3b (PANGBURN; SCHREIBER; MULLER-EBERHARD, 1981).

Na presença de íons Mg^{2+} , o Fator B (FB) se associa a $C3(H_2O)$, propiciando a clivagem do FB pelo Fator D (FD), uma serino protease que circula no sangue na sua forma ativa. Após a ação desta enzima, dois fragmentos são formados, Ba, liberado para a fase fluida e Bb, que permanece ligado à molécula de $C3(H_2O)$ e contém o sítio catalítico (FORNERIS et al., 2010).

Este novo complexo $C3(H_2O)Bb$ é a primeira C3 convertase da VA, atua sobre outras moléculas de C3 e gera novos fragmentos C3a e C3b. Os fragmentos C3b associam-se ao FB, que é clivado pelo FD formando outra C3 convertase ($C3bBb$) mais estável. Este complexo é estabilizado pela proteína plasmática reguladora properdina. Os fragmentos C3b podem ligar-se à superfície de patógenos ou às células do hospedeiro. A ligação de novas moléculas de C3b nas proximidades dessa C3 convertase dá origem à C5 convertase da VA ($C3bBbC3b_n$). Nas células do hospedeiro, a deposição desses componentes é modulada por várias proteínas reguladoras presentes no fluido e na membrana das próprias células interferindo na sua atividade (PANGBURN; MULLER-EBERHARD, 1986).

As C5 convertases formadas pelas três vias de ativação do SC atuam sobre C5, clivando-o em dois fragmentos, sendo o menor denominado C5a, uma anafilotoxina, que é liberado na fase fluida, e o maior chamado de C5b que dá início à etapa efetora de ataque à membrana, comum às três vias de ativação. O C5b, fracamente associado à C5 convertase, liga-se ao componente C6 e em seguida aos componentes C7, C8 e múltiplas cópias de C9 são incorporados, formando o complexo $C5bC6C7C8C9_n$ (PODACK; TSCHOOP; MULLER-EBERHARD, 1982). Um MAC funcional contém até 18 moléculas de C9 e forma um poro de aproximadamente 100 Å que permite o influxo de água e saída de íons com consequente lise celular (BHAKDI et al., 1987).

No decorrer da ativação do SC são formados peptídeos biologicamente ativos, as anafilatoxinas C5a, C3a e C4a, oriundos da clivagem de C5, C3 e C4, respectivamente. Esses fragmentos peptídicos têm efeitos pró-inflamatórios além de induzirem a contração da musculatura lisa e aumento da permeabilidade vascular. Estes pequenos peptídeos ativam células do sistema imune e células não mieloides que expressam os receptores acoplados à Proteína G: C3aR e C5aR (KLOS et al., 2013). As anafilatoxinas induzem a explosão respiratória em macrófagos, eosinófilos e neutrófilos; induzem a desgranulação de basófilos e mastócitos com a consequente liberação de histamina que resulta em vasodilatação (RICKLIN et al., 2010). C5a também recruta células T (NATAF et al., 1999) e células mieloides supressoras (MARKIEWSKI et al., 2008). Embora a atividade funcional de C4a seja discutível já foi observado que pode modular macrófagos e monócitos (ZHAO et al., 2014).

1.3.1 Regulação do SC

Em condições fisiológicas, a ativação do SC é eficientemente controlada por ações coordenadas de proteínas reguladoras tanto solúveis como ligadas às membranas celulares.

As anafilatoxinas (C3a e C5a) são inativadas por uma enzima plasmática (carboxipeptidase N) que cliva a arginina terminal nesses peptídios, gerando C3a-desArg e C5a-desArg (MATTHEWS; MUELLER-ORTIZ; WETSEL, 2004). Sabe-se que C3a-desArg perde a afinidade por seu receptor C3aR e, portanto, suas funções inflamatórias, entretanto C5a-desArg ainda conserva aproximadamente 10% de sua atividade inflamatória sendo capaz de se ligar fracamente a seu receptor C5aR (SAYAH et al., 2003).

Outros reguladores solúveis do SC tais como o inibidor de C1 (C1-INH, do inglês - *C1 inhibitor*), a proteína de ligação a C4b (C4BP, do inglês - *C4b binding protein*), o Fator H (FH), o Fator I (FI), a clusterina e a vitronectina, restringem a ação do SC em vários pontos da cascata de ativação nos fluidos corporais.

Além disso, as membranas das células do hospedeiro são protegidas contra o ataque do SC por proteínas de superfície, tais como o receptor 1 de complemento (CR1 ou CD35); a proteína de membrana com atividade de cofator (MCP do inglês-*membrane cofactor protein*) ou CD46; as proteínas Fator de Aceleração do Decaimento ou DAF (do inglês-*decay accelerating factor*) também chamado de CD55; e a protectina ou CD59. Estas duas últimas proteínas estão associadas à superfície celular por âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (KIM; SONG, 2006).

O C1-INH é um inibidor de serino proteases que se liga covalentemente a C1r e C1s inativando estas enzimas e levando à dissociação do complexo C1 com a consequente liberação do C1q (DAVIS; LU; MEJIA, 2010). C1-INH também se associa a C1r e C1s na forma inativa no complexo C1, retardando assim sua ativação espontânea (ZICCARDI, 1982).

O FI é uma serino protease plasmática que circula na forma ativa, mas numa conformação inibida. A atividade catalítica da cadeia leve é inibida no plasma pela cadeia pesada (ROVERSI et al., 2011). Em presença de cofatores como o FH, a cadeia pesada é liberada e o FI cliva o C3b gerando um C3b inativo (iC3b) incapaz de se associar ao FB (DAVIS; HARRISON; LACHMANN, 1984). De forma similar C4b é inativado em presença do cofator C4BP. Este regulador solúvel apresenta uma conformação de octâmero composto por 7 cadeias α e uma cadeia β . Os três primeiros domínios SCRs (do inglês-*Short Consensus Repeat*) de cada cadeia α estão envolvidos nas funções de cofator e dissociação da convertase (BLOM et al., 1999, 2001), enquanto a cadeia β participa da regulação da cascata da coagulação (DAHLBÄCK; SMITH; MULLER-EBERHARD, 1983).

Outros cofatores de membrana que participam da clivagem proteolítica de C3b e C4b são MCP (ANDREWS et al., 1985), CR1 (KLICKSTEIN et al., 1988) e DAF (NICHOLSON-WELLER; WANG, 1994). MCP é composta de 4 domínios SCRs extracelulares e é expressa em todas as células nucleadas, já o CR1 contém 30 domínios extracelulares e é expresso em leucócitos e eritrócitos (BARILLA-LABARCA et al., 2002). CR1 é o único cofator do FI capaz

de continuar a clivagem proteolítica de iC3b gerando os fragmentos C3c e C3dg. O CR1 também acelera o decaimento das C3 convertases da VC e VA (SMITH et al., 2002).

A C3 convertase da VA pode ser também dissociada pela ação dos domínios SCRs 1-4 do FH com a consequente liberação do fragmento Bb, entretanto o C4BP previne a formação das C3- e C5 convertases da VC (BLOM et al., 1999, 2001). O DAF acelera o decaimento das C3 e C5 convertases da VA por meio da interação do domínio SCR 2 com o fragmento Bb com o qual tem uma alta afinidade (HARRIS et al., 2007).

A via terminal de ativação do SC é fortemente regulada. A clusterina (TSCHOFF et al., 1993) - uma proteína plasmática multifuncional de natureza anfifílica - e a vitronectina (PREISSNER; PODACK; MULLER-EBERHARD, 1989) - um componente da matrix extracelular - se ligam de forma independente aos complexos solúveis C5bC6C7, C5bC6C7C8 e previnem sua inserção na membrana. O CD59 presente em todas as células circulantes, em células endoteliais e em células epiteliais se liga ao complexo C5bC6C7C8 e uma vez inserido na membrana impede a polimerização de C9 (MERI et al., 1990) e a consequente formação do poro.

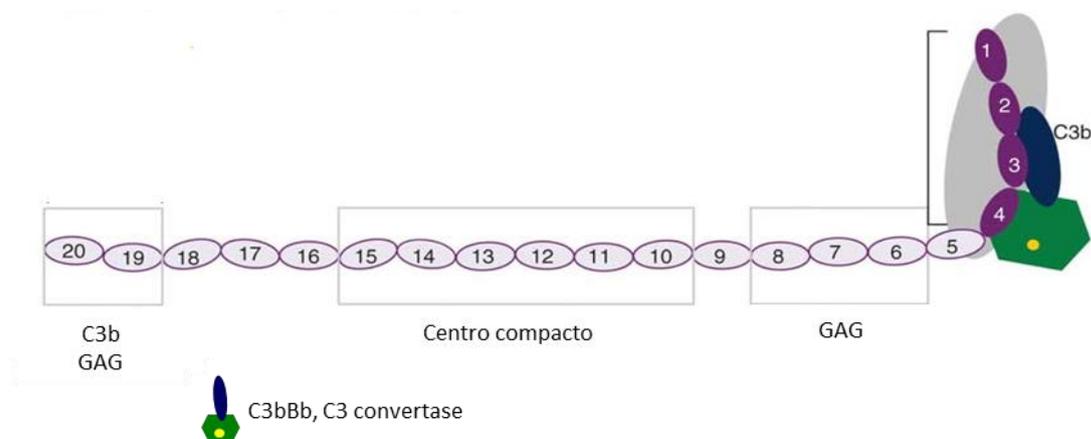
Assim, as proteínas do SC funcionam mediando uma série de reações biológicas, todas servindo diretamente para a defesa do organismo contra agentes microbianos, especialmente contra os microrganismos extracelulares e, indiretamente, contribuindo para a regulação de outros processos de defesa adaptativos.

1.3.1.1 FH e a família de proteínas relacionadas

O FH é uma das principais proteínas reguladoras da VA. Esta glicoproteína solúvel de 155 kDa é encontrada no plasma de adultos em concentrações que variam entre 242 - 759 µg/mL (FERREIRA DE PAULA et al., 2003). O FH é sintetizado como uma única cadeia polipeptídica contendo 1231 resíduos de aminoácidos, incluindo uma sequência líder de 18 aminoácidos. Estruturalmente, é composto apenas por 20 módulos, ou domínios, SCR (**Figura 3**). Cada SCR é constituído de, aproximadamente, 60

aminoácidos e contém quatro cisteínas intradomínio que se associam em pontes dissulfeto (RIPOCHE et al., 1988).

Figura 3 - Estrutura da proteína Fator H, reguladora da ativação do SC.



O FH é composto por 20 domínios SCR; estão indicadas as regiões de interação com glicosaminoglicanos da matriz extracelular. Em roxo a região reguladora composta pelos SCRs 1-4 que interage com a C3 convertase da VA.

Fonte: Adaptado de Morgan et al. (2011).

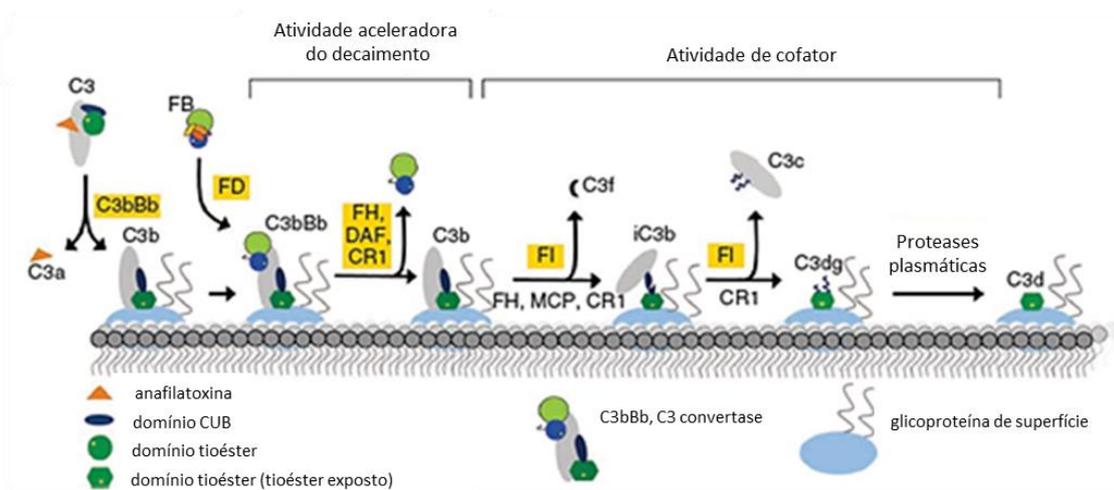
Os primeiros quatro domínios N-terminais regulam a amplificação do SC (KUNH; ZIPFEL, 1996), ao passo que os outros 16 domínios contêm diversos pontos de ligação que controlam a efetividade funcional dos domínios iniciais.

O FH exerce sua função reguladora competindo com o FB pela ligação ao C3b e deslocando o fragmento Bb da ligação com o C3b, o que se traduz, portanto, na prevenção da formação da C3-convertase da VA (PANGBURN; SCHREIBER; MULLER-EBERHARD, 1977; SUANKRATAY et al., 1999); acelerando a dissociação (decaimento) dos complexos C3-convertase (C3bBb) e C5-convertase (C3bBbC3b); ou como cofator do FI na clivagem de C3b, bloqueando a atividade deste fragmento, resultando na formação de iC3b e C3c (**Figura 4**). Assim, o FH exerce um papel chave na manutenção da integridade tecidual e dos níveis séricos de C3. Este fenômeno faz com que o FH seja considerado um fator de distinção do próprio e do não-próprio do organismo (MERI; PANGBURN, 1990).

O FH se liga a C3b e C3(H₂O), mas não ao C3 intacto. As mudanças de conformação nos domínios TED e CUB que determinam a transição de C3 a

C3b, expõem os locais de interação com o FH. Esta interação acontece por meio de duas regiões, o domínio N-terminal e o C-terminal do FH. Os primeiros 4 SCR's da região N-terminal que concentram a atividade reguladora (WU et al., 2009), interagem com o domínio MG do C3b. O SCR3 interage com o domínio CUB e o SCR4 com o domínio TED (SCHRAMM et al., 2015), enquanto que os SCR's 1-2 competem com o FB provocando sua dissociação de C3b. Os SCR's 19-20 contêm um segundo local de interação com C3b e podem interagir também com C3d (KAJANDER et al., 2011; HELLWAGE et al., 2002).

Figura 4 - Eventos principais da ativação e regulação da VA.



A regulação da VA ocorre pela dissociação da C3 convertase ou pela clivagem proteolítica de C3b mediada pelo FI. Na dissociação das convertases participam os reguladores de membrana DAF e CR1 e o regulador da fase fluída FH. Na clivagem proteolítica de C3b participam como cofatores os reguladores de membrana MCP e CR1, assim como FH.

Fonte: Adaptado de Morgan et al. (2011).

A capacidade protetora do FH quando recrutado nas superfícies celulares próprias deve-se à interação com poliânions como glicosaminoglicanos (GAGs) ou grupamentos de ácido siálico, raramente presentes em patógenos. A interação do FH com os GAGs ocorre fundamentalmente por meio dos SCR 6-8 e SCR 19-20 (CLARK et al., 2013). Estas regiões do FH permitem o reconhecimento de grupos com carga negativa na membrana como o sulfato de heparina e explicam as diferenças na afinidade de ligação do FH. A diferença na susceptibilidade à lise pelo SC humano de hemácias de coelho e de cabra, que constitui a base dos ensaios

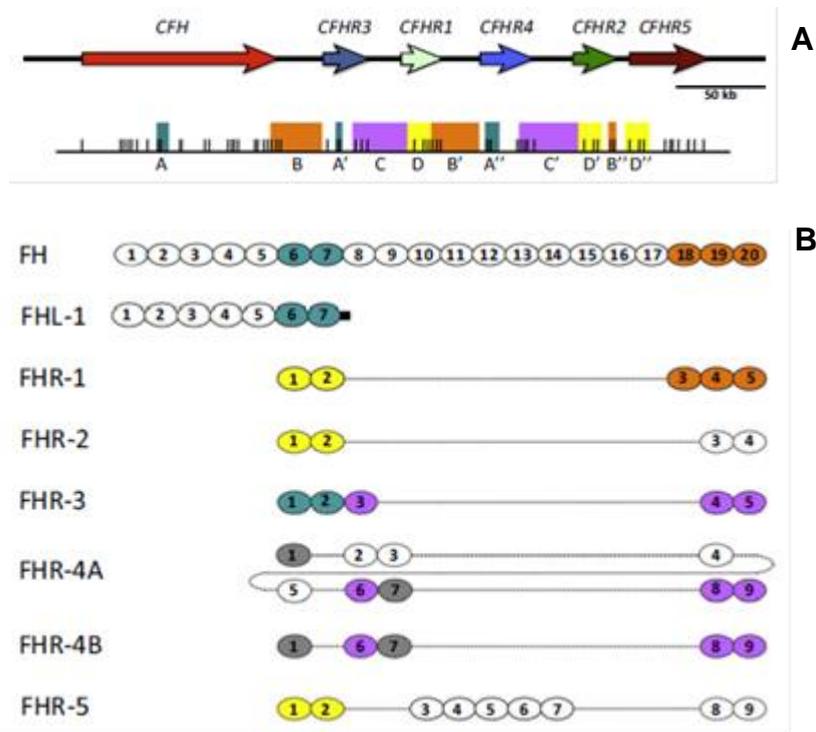
hemolíticos para avaliar a ativação do SC reside nos níveis de expressão de ácido siálico na superfície destas células. Isso permite que o FH se ligue às hemácias de cabra e não se ligue às hemácias de coelho (ROUMENINA et al., 2014; KAZATCHKINE; FEARON; AUSTEN, 1979). Quando o FH interage com a superfície de uma célula normal, as glicoproteínas ricas em ácido siálico e outros polissacarídeos neutros ou aniônicos aumentam sua ligação a C3b, o FI cliva, então, o fragmento C3b em iC3b. Como os microrganismos, em sua maioria, não apresentam ácido siálico em suas superfícies, o FH não interage com a mesma intensidade com as moléculas de C3b ali depositadas, favorecendo a ativação da cascata do SC sobre suas superfícies.

A família do FH compreende um grupo de proteínas muito relacionadas que incluem cinco proteínas relacionadas ao FH (FHR, do inglês *-Factor H related proteins*) e um produto truncado do FH (FHL-1, do inglês *-Factor H-like -1*) (**Figura 5 B**). Os genes dos membros desta família estão localizados em distintos segmentos do cromossomo 1q32 dentro do *cluster* genético de proteínas reguladoras do SC (RCA, do inglês *- regulators of complement activation*) (MALE et al., 2000) e originaram-se provavelmente a partir do gene *CFH* mediante eventos de duplicação em tandem (PÉREZ-CABALLERO et al., 2001) (**Figura 5 A**).

Cada uma das cinco proteínas FHR apresentam entre quatro a nove domínios SCR. Os dois primeiros domínios SCR da região N-terminal são similares entre as FHR e apresentam uma alta homologia com os SCR 6 - 9 do FH, no qual estão envolvidos na ligação à superfícies. Por outro lado, os SCR da região C-terminal também são homólogos entre todas as FHR e são similares aos SCR 19 e 20 do FH, também envolvidos na ligação a superfícies. Portanto, os sítios de interação com superfícies do FH estão presentes em todas as FHR com diferentes graus de conservação, isto explica a capacidade das FHR de interagirem com a maioria dos ligantes do FH. Esta homologia entre os SCR do FH e das FHR implica que há similaridades nos ligantes com os quais interagem assim como na funcionalidade, porém nenhuma das FHR contém regiões homólogas aos SCR 1-4 do FH o que questiona a conservação

da atividade reguladora das FHR (JÓZSI; ZIPFEL, 2008; SKERKA; ZIPFEL, 2008).

Figura 5 - Família do Fator H.



Organização genômica dos genes *CFH* e *CFHR1-5* (A). Setas em diferentes cores representam e nomeiam os genes. Os quadrados coloridos embaixo indicam as repetições das sequências e as linhas verticais indicam a posição dos éxons. Organização estrutural do Fator H (FH) e da família de proteínas relacionadas ao Fator H (CFHR) (B). Domínios SCR estão representados por círculos e numerados a partir da região N-terminal. SCR homólogos estão alinhados, as cores similares representam SCR com elevada identidade na sequência de aminoácidos entre as diferentes proteínas.

Fonte: Adaptado de Józsi et al. (2015).

De acordo com a conservação de seus domínios e a capacidade de formar dímeros ou tetrâmeros no plasma as FHR são divididas em dois grupos principais. O grupo I inclui FHR-1 (cinco domínios SCR), FHR-2 (quatro domínios SCR) e FHR-5 (nove domínios SCR). Este grupo caracteriza-se por uma identidade de sequência superior a 80% nos SCR 1 e 2 da região N-terminal e circulam no plasma como homodímeros, heterodímeros, homotetrâmeros ou heterotetrâmeros (TORTAJADA et al., 2013; GOICOCHEA DE JORGE et al., 2013). O grupo II inclui as proteínas FHR-3 (cinco domínios SCR) e FHR-4 (nove domínios SCR) que não formam dímeros.

O FHL-1 é derivado do *splicing* alternativo do FH sendo idênticas estas duas proteínas nos 7 primeiros SCRs da região N-terminal; sua única diferença consiste em uma pequena cauda de 4 aminoácidos na região C-terminal do FHL-1. Portanto, o FHL-1 retém os domínios necessários para a atividade reguladora do SC do FH (ZIPFEL; SKERKA, 1999).

1.3.2 Patologias decorrentes de alterações nos genes *CFH* e *FHR*

Varios estudos mostraram que alterações polimórficas e deleções no *cluster* dos genes *CFH* e *FHR*, que codificam as proteínas da família do FH, estão associadas com doenças como C3 glomerulopatias, síndrome hemolítica urêmica atípica (aHUS, do inglês – *atypical Hemolytic Uremic Syndrome*) e degeneração da mácula relacionada a idade, além de maior suscetibilidade a infecções por certos microrganismos. Estas modificações podem gerar códons de parada prematura ou alterações na estrutura protéica causando bloqueio na síntese da proteína, falha na função ou retardo da secreção de FH (AULT et al., 1997; CÓRDOBA; GOICOCHEA DE JORGE, 2008; ZIPFEL; SMITH; SKERKA, 2009). A deficiência do FH tem como consequência uma ativação descontrolada da VA, provocando baixos níveis de C3 e FB no plasma e acúmulo de produtos da degradação de C3 devido ao seu consumo excessivo. Por este motivo, pacientes com deficiência de FH são mais susceptíveis a infecções recorrentes.

As C3 glomerulopatias (C3G) abrangem um amplo espectro de distúrbios renais de origem autoimune ou genética e são consequência de uma regulação defeituosa do SC, particularmente da VA (ZHANG et al., 2012; CHEN et al., 2014) que ocorre na fase fluída e não na superfície endotelial. Os fragmentos de clivagem de C3 são liberados na corrente sanguínea e podem ser depositados no rim (D'AGATI; BOMBACK, 2012). Na análise histológica se observa um predomínio de C3 no glomérulo, ausência de imunoglobulina com ou sem glomerulonefrite proliferativa. Baseado nas diferenças histológicas e nos depósitos formados, as C3G são subdivididas em duas categorias principais: doença de depósitos densos (DDD, do inglês - *dense deposits disease*) e C3 glomerulonefrite (COOK; PICKERING, 2015).

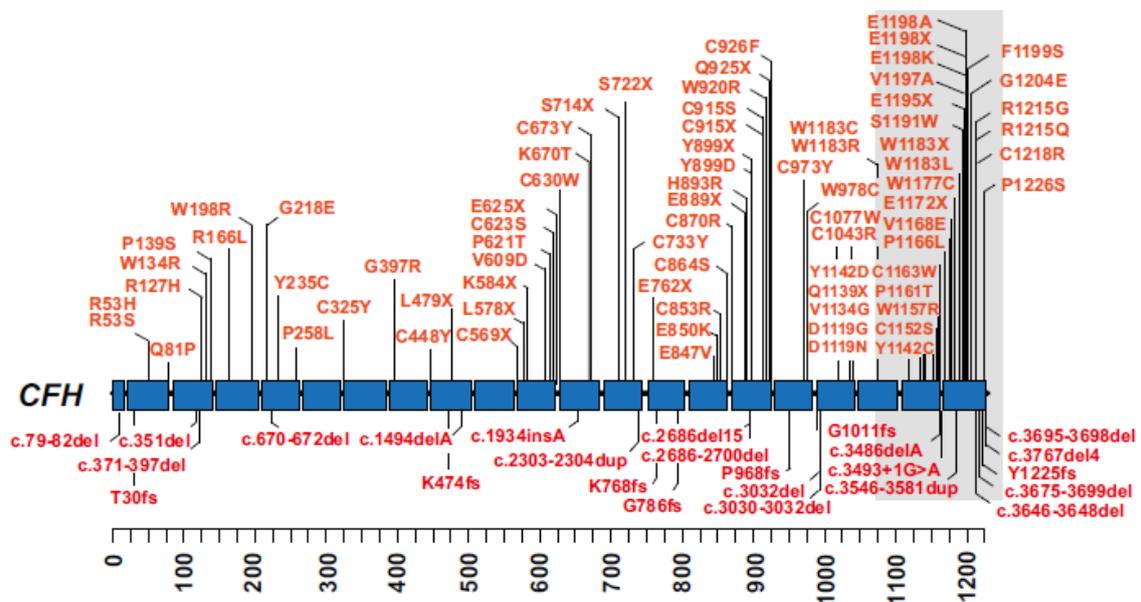
Mutações no gene do FH têm sido identificadas em pacientes com diagnóstico de C3G. A maioria destas mutações são homozigóticas e frequentemente afetam resíduos de cisteína que têm um papel fundamental na conformação estrutural de cada domínio SCR. Em alguns casos a mutação está associada com um defeito na secreção da proteína: a proteína mutante é formada no citoplasma, mas o processamento no retículo endoplasmático e a secreção são defeituosos, como consequência a proteína mutante se acumula intracelularmente. Em ausência de FH a ação da C3 convertase na fase fluída é irrestrita e sua ação pode ainda intensificar-se se considerarmos que em 10-17% dos pacientes as mutações do FH se apresentam em combinação com o fator nefrítico C3 (C3Nef) (SERVAIS et al., 2012), autoanticorpo que estabiliza a C3 convertase da VA (C3bBb) e incrementa a meia vida deste complexo (DAHA; VAN ES, 1981).

Durante a última década alterações no *cluster* genético das proteínas relacionadas ao FH têm sido identificadas em pacientes com C3G ou distúrbios relacionados (GOICOCHEA DE JORGE et al., 2013). O elevado grau de homologia entre os genes *FHR* e entre estes e o gene *CFH* faz este locus um 'hot spot' de rearranjos gênicos, eventos de recombinação homóloga não alélica e junção de extremidades por microhomologia. Estes eventos causam perdas de segmentos cromossômicos, duplicações e formação de proteínas híbridas (GOICOCHEA DE JORGE et al., 2013; TORTAJADA et al., 2013) que podem formar multímeros e competir com a atividade reguladora do FH ou em alguns casos estabilizam a C3-convertase da VA levando ao consumo contínuo de C3 e deposição dos fragmentos de clivagem (MEDJERAL-THOMAS et al., 2014a, 2014b; ZHANG et al., 2013).

A (aHUS) é definida como uma microangiopatia trombótica onde a injúria endotelial vascular provoca anemia hemolítica e trombocitopenia, com as principais complicações se manifestando em nível renal (BERGER, 2016). Considerada uma doença ultra-rara, ocorre com uma incidência de aproximadamente 0,5/milhão/ano.

Na aHUS a patologia ou distúrbio implícito é a desregulação da VA nas superfícies celulares do hospedeiro. Estima-se que 60% dos indivíduos com aHUS têm mutações em genes do SC e em aproximadamente 30% dos afetados as alterações ocorrem no FH (25% identificadas em casos esporádicos e 40% em casos familiares), principalmente na região C-terminal (NORIS et al., 2010; FREMEAUX-BACCHI et al., 2013; MAGA et al., 2010) (**Figura 6**). Por razões pouco conhecidas a penetrância do fenótipo é incompleta, alguns estudos calculam ser em torno de 50%.

Figura 6 - Mutações do FH associadas com a Síndrome Hemolítica Urêmica atípica.



Representam-se um total de 102 mutações de 152 reportadas na base de dados (www.fh-hus.org). Os domínios SCR do FH estão representados como retângulos azuis; as mutações do tipo *missense* estão representadas em laranja na parte superior e mutações do tipo *indel* e *frameshift* estão representadas em vermelho na parte inferior. Notar como as mutações *missense* se agrupam principalmente em torno dos SCR 18-20, destacado em cinza.

Fonte: Adaptado de Cantsilieris et al. (2018).

As mutações no FH observadas nos pacientes com aHUS afetam o reconhecimento de ácido siálico nas células endoteliais, eritrócitos e plaquetas; deixando estas superfícies desprotegidas que ficam, portanto, vulneráveis à ação do SC (HYVARINEN; MERI; JOKIRANTA, 2016). Entretanto na patogênese da doença a interligação entre o SC e a cascata da coagulação têm um papel fundamental. A geração de C5a pela ativação do SC induz a ativação do Fator Tissular em células endoteliais, desencadeando um estado

procoagulante no endotélio (CARSON; JOHNSON, 1990). Uma vez ativada, a trombina cliva não somente fibrinogênio, mas também pode clivar C5, potenciando a ativação do SC. A clivagem de C5 pela trombina pode ser relevante para a formação do MAC nas células endoteliais e nas plaquetas provocando dano endotelial e ativação plaquetária (ATEFI et al., 2016). A ação conjunta das proteínas da coagulação e a agregação plaquetária levam à formação de microtrombos em capilares e arteríolas.

Alterações em outros genes do SC também têm sido associadas com a aHUS: MCP (5-9% dos pacientes); FI (4-8% dos pacientes); C3 (2-8% dos pacientes) e FB (<4% dos pacientes) (NESTER et al., 2015). Em pacientes onde não foram identificadas mutações em genes do SC, uma triagem genética profunda permitiu descobrir variantes em outros genes como: trombosmodulina (DELVAEYE et al., 2009), diacil-glicerol-cinase- ϵ (LEMAIRE et al., 2013), e plasminogênio (BU et al., 2014) que participam da cascata da coagulação, assim como na proteína INF2 (CHALLIS et al., 2017) envolvida na polimerização da actina e cujas variantes sabe-se causam síndrome nefrótica (BROWN et al., 2010).

Autoanticorpos dirigidos contra o FH são responsáveis por 6-8% dos casos de aHUS em Europa e América do Norte. A presença desses anticorpos é mais frequentemente observada, quando há deficiência de CFHR-1 ou deleção homozigota de CFHR-3/CFHR-1 (NORIS et al., 2010; FREMEAUX-BACCHI et al., 2013; MAGA et al., 2010).

1.4 Polimorfismos genéticos humanos associados com a susceptibilidade à leptospirose

Os polimorfismos ocorrem quando dois ou mais fenótipos sabidamente diferentes existem na mesma população e podem ser definidos como alterações genéticas presentes em mais de 1% da população. A categoria mais básica e mais frequente de polimorfismo é uma alteração pontual no genótipo originada a partir de uma simples troca de um nucleotídeo por outro, conhecido como polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, do inglês - *single nucleotide polymorphism*). Estas variações genéticas são resultado do processo evolutivo,

são modificadas pela seleção natural e contribuem para aumentar a diversidade nas diferentes populações (DELANGHE et al., 2012). Os SNPs têm uma estreita associação com algumas patologias clínicas, embora em sua maioria o impacto na saúde humana é modesto.

O grau de severidade nas manifestações clínicas observada na leptospirose pode estar associado tanto com a virulência da bactéria como com a genética do hospedeiro. Polimorfismos em genes relacionados com a resposta imune foram encontrados associados à suscetibilidade à infecção por leptospira (LINGAPPA et al., 2004; FIALHO et al., 2009, ESTEVES et al., 2014; CÉDOLA et al., 2015).

Em relação à resposta imune inata, um estudo na população argentina sugeriu que polimorfismos de perda de função nos genes *tlr1* e *tlr2* podem aumentar o risco de doença severa (CÉDOLA et al., 2015), corroborando a importância pelo menos do TLR2 na defesa contra *Leptospira*. Porém, em um estudo na ilha Terceira em Portugal não foi observada associação de polimorfismos no gene *tlr2* e a leptospirose. (ESTEVES et al., 2014). Os receptores tipo Toll (TLR, do inglês- *toll-like receptors*) constituem uma família de receptores que desempenham um papel fundamental no reconhecimento de patógenos. Dentre os 10 TLRs identificados em humanos, os TLR2 e TLR4 têm sido os mais estudados na leptospirose. LPS de bactérias Gram-negativas é capaz de ativar o TLR4 (MILLER; ERNST; BADER, 2005). Contudo, o LPS das leptospirosas, que é menos endotóxico que o LPS de outras bactérias Gram-negativas, ativa macrófagos humanos pelo TLR2 (WERTS et al., 2001). Já em camundongos, que são resistentes à leptospirose, foi observada a ativação de ambos os TLR2 e TLR4 (NAHORI et al., 2005).

A associação de polimorfismos no gene *IL-1β* com a leptospirose apresentou resultados discordantes em dois estudos diferentes, embora tenham sido realizados em um curto período de tempo em duas coortes provenientes das ilhas Terceira e São Miguel do arquipélago Açores em Portugal (ESTEVES et al., 2014; FIALHO et al., 2009). Na população de São Miguel, a variante rs16944 da região promotora do gene *IL-1β* foi associada

com maior suscetibilidade à infecção sugerindo que os níveis de expressão desta citocina são importantes na resposta inflamatória inicial contra a leptospira (ESTEVES et al., 2014). Entretanto, esta associação não foi observada na coorte da ilha Terceira (FIALHO et al., 2009).

Em relação a genes da resposta imune adaptativa, Lingappa et al. (2004) investigaram a relevância dos alelos HLA-DQ e HLA-DR, assim como do gene *tnf-α* em um surto de leptospirose em triatletas expostos a água contaminada. Embora o gene *tnf-α* e o alelo HLA-DR não demonstraram diferenças quando correlacionados às manifestações clínicas da doença (LINGAPPA et al., 2004), HLA-DQ6 foi associado com elevado risco de desenvolver leptospirose entre os atletas que ingeriram água contaminada. Como esta associação não foi específica para um subtipo particular de alelos dentro do grupo HLA-DQ6 foi proposto que proteínas da superfície da leptospira podem agir como superantígenos, se ligando fora da fenda na molécula HLA e interagindo com regiões mais conservadas do TCR, o que resulta na ativação e expansão de uma grande população de células T (LLEWELYN; COHEN, 2002). Porém, no estudo realizado na ilha Terceira do arquipélago Açores, Fialho et al. (2009), não confirmaram associação entre HLA classe II e susceptibilidade à leptospirose. Em compensação foi observada uma alta frequência dos alelos HLA-A *24, HLA-A *31 e HLA-B *08 nos pacientes com histórico de infecção por leptospirosas, sugerindo uma menor capacidade destes alelos de apresentar antígenos específicos e induzir uma resposta contra a bactéria (FIALHO et al., 2009).

Quanto ao perfil de resposta Th1/Th2, foi observada uma associação significativa entre polimorfismos de ganho de função nos genes *IL4* e *IL4RB1* e a susceptibilidade à doença em estudos realizados na coorte de pacientes provenientes da ilha Terceira (FIALHO et al., 2009).

A identificação de fatores que conferem susceptibilidade genética a doenças infecciosas como leptospirose ainda é um tópico a ser mais bem explorado. Certamente no futuro estes achados poderão ser usados como marcadores para identificar populações em risco.

1.5 Mecanismos de evasão de leptospiras patogênicas ao SC

O sistema imune inato constitui a primeira linha de defesa do hospedeiro na infecção frente a leptospiras, particularmente o SC. Esta afirmação é baseada em evidências experimentais que demonstram a alta letalidade de leptospiras saprófitas, quando incubadas *in vitro* com soro humano normal em um curto período de tempo, enquanto as leptospiras patogênicas são capazes de sobreviver por longos períodos (JOHNSON; MUSCHEL, 1966), possibilitando a disseminação pelo organismo e o estabelecimento da infecção. Uma das estratégias adotadas por patógenos para evitar a destruição pelo SC é a aquisição de reguladores da fase fluída; no caso de leptospiras patogênicas tem sido demonstrada a aquisição das proteínas reguladoras FH e C4BP (BARBOSA et al., 2009).

Leptospiras patogênicas interagem com o FH (MERI et al., 2005) e mais dois membros desta família: FHL-1 e FHR-1 (CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012). Embora as implicações funcionais da interação com estas duas últimas proteínas sejam ainda desconhecidas, sabe-se que o FH associado à leptospira conserva sua função reguladora, sugerindo que *in vivo*, potencialmente protegeria a bactéria da ação do SC (MERI et al., 2005; CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012). A aquisição do FH por estirpes patogênicas de leptospiras parece ser um mecanismo relevante na resistência ao soro. Em presença de soro depletado de FH as leptospiras têm uma sobrevivência de 40%; porém, quando o soro é reconstituído com FH purificado até alcançar concentrações fisiológicas a sobrevivência destas bactérias atinge 100% (CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012).

Várias proteínas presentes na membrana externa das leptospiras têm sido funcionalmente caracterizadas e sabe-se que algumas podem mediar interações com proteínas do hospedeiro. As proteínas leptospirais com domínios tipo imunoglobulina (LigA e LigB) apresentam múltiplas funções, sendo capazes de interagir com componentes da matriz extracelular, células e proteínas do SC *in vitro*. Estas proteínas contêm entre 12 e 13 domínios Big (do inglês-*bacterial immunoglobulin-like*), respectivamente que são idênticos

nos primeiros 630 aminoácidos da região N-terminal, já a porção C-terminal é variável com apenas 34% de identidade entre as duas proteínas. Estão presentes unicamente nas espécies patogênicas e são expressas durante a infecção em mamíferos (MATSUNAGA et al., 2003). Constituem até hoje os candidatos vacinais mais promissores com altos e reprodutíveis níveis de proteção em modelos animais (ADLER, 2015b).

Estas proteínas se ligam ao Fator H (MERI et al., 2005) e C4BP e conservam sua função reguladora uma vez ligadas (MERI et al., 2005; BARBOSA et al., 2009, 2010). Um mapeamento dos domínios do FH que interagem com as Lig revelou que os SCRs 5 e 20 são importantes para tal interação (CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012); e presume-se que os SCR adjacentes (5-7 e 18-19) estejam também envolvidos, como observado para a maioria das proteínas bacterianas (PARENTE et al., 2017).

As leptospiros também interagem com vitronectina, regulador da via terminal de ativação do SC e esta interação é mediada pela proteína LcpA presente em leptospiros patogênicos que também é capaz de se ligar a FH e C4BP (BARBOSA et al., 2010). Com a vitronectina na superfície as leptospiros ficam protegidas da ação lítica do MAC (DA SILVA et al., 2015).

Recentemente foi demonstrado *in vitro* a capacidade de LigA e LigB interagirem com plasminogênio. A plasmina gerada em presença de ativadores específicos consegue clivar C3b e C5 prejudicando desta forma a cascata de ativação do SC (CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2016).

Outra estratégia de evasão das leptospiros é a produção de moléculas que interferem diretamente com a ativação do SC. Sobrenadantes de cultura de estirpes patogênicas inibem as três vias de ativação do SC mediante a clivagem de C3, FB, C2 e C4. A proteólise deve-se à presença de proteases no sobrenadante do tipo metaloproteases já que sua atividade é inibida por 1.10-fenantrolina (FRAGA et al., 2014). As proteases secretadas por leptospiros patogênicos clivam tanto as proteínas do SC purificadas, quanto aquelas presentes no soro humano, indicando que este mecanismo de evasão também pode ocorrer no contexto fisiológico e contribuir para a virulência da bactéria.

Considerando que o SC é um componente essencial da resposta imune inata na infecção por leptospiras e a relevância da aquisição do FH do soro como mecanismo de evasão das leptospiras patogênicas à ação do SC, pretendemos avaliar a implicação do polimorfismo do FH em pacientes na susceptibilidade à infecção por leptospiras com características clínicas e gravidade da doença.

2. Objetivos

- Avaliar a influência de polimorfismos no gene *CFH* do SC na susceptibilidade à leptospirose e na gravidade da doença.
 - Sequenciar os éxons 7, 9, 21, 22 e 23 do gene *CFH* a partir de amostras de ADN genômico de pacientes e controles.
 - Analisar a associação entre os polimorfismos identificados no gene *CFH* e a susceptibilidade à leptospirose, assim como à severidade da doença.
 - Avaliar a capacidade de formas polimórficas de FH de interagir com a *Leptospira*, assim como com proteínas da superfície da bactéria e células do hospedeiro.

3. Material e métodos

3.1 Anticorpos e proteínas

A proteína FH purificada, soro humano depletado de FH, bem como os anticorpos policlonais específicos contra FH foram obtidos comercialmente (*Complement Technology*, Texas, TX, Estados Unidos).

Como anticorpos secundários foram utilizados: anti-IgG de cabra feito em coelho conjugado à peroxidase, anti-IgG de camundongo feito em cabra conjugado à peroxidase (*KPL*, Massachusetts, MS, Estados Unidos); anti-IgG de camundongo feito em burro conjugado à Alexa Fluor 488 (*Thermo Fischer*, Massachusetts, MS, Estados Unidos).

Os anticorpos monoclonais anti-FH (OX24 e L20/3) foram adquiridos da *Santa Cruz Biotechnology* (Santa Cruz, Texas, Estados Unidos).

A proteína recombinante LigAC foi fornecida pela Dra. Angela Silva Barbosa do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan.

3.2 População de estudo

Foram analisadas 346 amostras de ADN de pacientes e controles negativos (**Tabela 1**). As amostras dos indivíduos argentinos foram cedidas em colaboração com a Dra. Yosena Chiani do National Institute of Respiratory Diseases (INER, Santa Fé, Argentina). As amostras de indivíduos brasileiros procedentes do Ceará foram cedidas em colaboração com a Profa. Dra. Elisabeth Daher e o Dr. Gdayllon Cavalcante do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará, enquanto que as amostras procedentes de São Paulo foram cedidas em colaboração com Thirsa Franco do setor de Leptospirose/Dengue do Centro de Vigilância em Zoonose da Coordenação de Vigilância em Saúde do estado de São Paulo. Foram também incluídos neste estudo amostras de ADN de doadores de sangue do Biobanco do Instituto de Medicina Tropical da USP. A confirmação da leptospirose foi feita pelo teste de microaglutinação (MAT) ou por ELISA. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do ICB da USP (Nº 1405/17), assim como o Comitê de Ética da Secretaria Municipal de Saúde do estado de São Paulo (Nº 3.105.222). Paralelamente empregamos

soros de cinco indivíduos saudáveis dos quais eram conhecidos os polimorfismos do SCR 18 e SCR7 do FH.

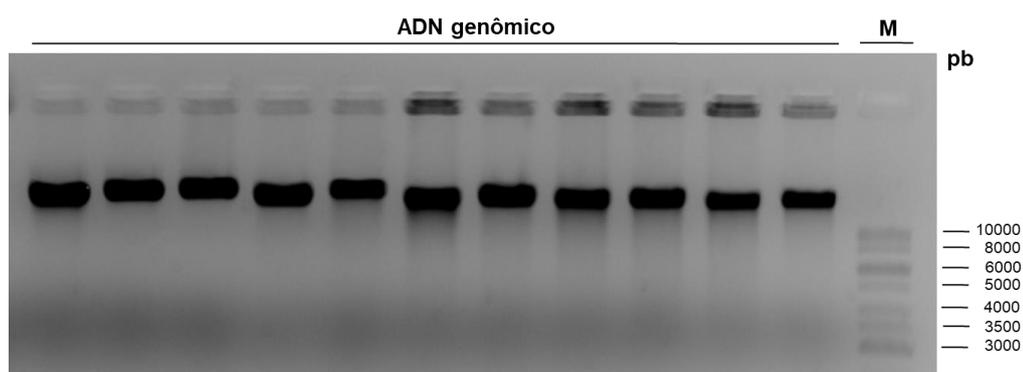
Tabela 1 - Distribuição geográfica e classificação da coorte avaliada no estudo.

Procedência/ classificação	Argentina (2007-2011)	Brasil (Ceará-2018)	Brasil (São Paulo 2019-2020)
Pacientes com sorologia positiva para leptospirose	24	22	138
Indivíduos sem sorologia positiva para leptospirose	23	9	53
Doadores de Biobanco de sangue	-		77

3.3 Extração de ADN

Em linhas gerais, recebemos as amostras da Argentina e parte das amostras do Ceará com o ADN genômico já extraído. As amostras de indivíduos procedentes do Ceará e de São Paulo e as amostras de doadores saudáveis do Biobanco foram extraídas no Laboratório de Complemento empregando um *kit* comercial para extração de ADN genômico (*Wizard, Promega Corporation, Estados Unidos*). A pureza e concentração do ADN foram avaliados em NanoDrop 2000 (*Thermo Scientific, Massachusetts, MS, Estados Unidos*) e a integridade foi analisada em gel de agarose 1% corado com SYBRSafe (**Figura 7**).

Figura 7 - Análise representativa do ADN genômico em gel de agarose a 1%.



M: marcador de tamanho em pares de base (pb) (*1kb DNA ladder, Fermentas*).

3.4 Amplificação dos éxons 7, 9, 21, 22 e 23 do gene *CFH*

Os éxons do FH codificadores dos aminoácidos que compõem os SCR 5 (264-322 aa), SCR 7 (387-446 aa), SCR 18 (1045-1104 aa), SCR 19 (1105-1165 aa) e SCR 20 (1166-1231 aa) foram amplificados por PCR a partir de ADN genômico humano, empregando oligonucleotídeos iniciadores específicos (**Tabela 2**) e condições descritas nas **Tabelas 3 e 4**.

Tabela 2- Sequências de oligonucleotídeos iniciadores ('*Primers*') utilizados na amplificação e sequenciamento das regiões de interesse do gene *CFH*.

Éxon	Domínio Proteico	' <i>Primers</i> ' (5'→3')		Tamanho do Fragmento (pb)
		' <i>Forward</i> '	' <i>Reverse</i> '	
7	SCR 5	ATGCCATTTTGTATTATGCTAAGGA	TGCTTCCAACAGCCTTACTTTG	421
9	SCR 7	GAAAATCACAGGAGAAATAA	GAAAAACCAAAAATAAATA	598 ^b
21	SCR 18	TTGCTACTCAAATGAACACTAGG	CCTGCTATACTCCCCAAAATG	274 ^a
22	SCR19	TCACCAGAAATCACAAAAC	CCCAGCCCTAAAGAGAAAAA	473 ^b
23	SCR20	GTTTATTCAAATCAATATGATGTTTC	AACCGTTAGTTTTCCAGGATTTAAT	557 ^b

a Baseado em Pérez-Caballero et al. (2001)

b Baseado em Dragon-Durey et al. (2004)

Tabela 3 - Amplificação dos éxons 7, 9, 21, 22 e 23 do gene *CFH* por PCR.

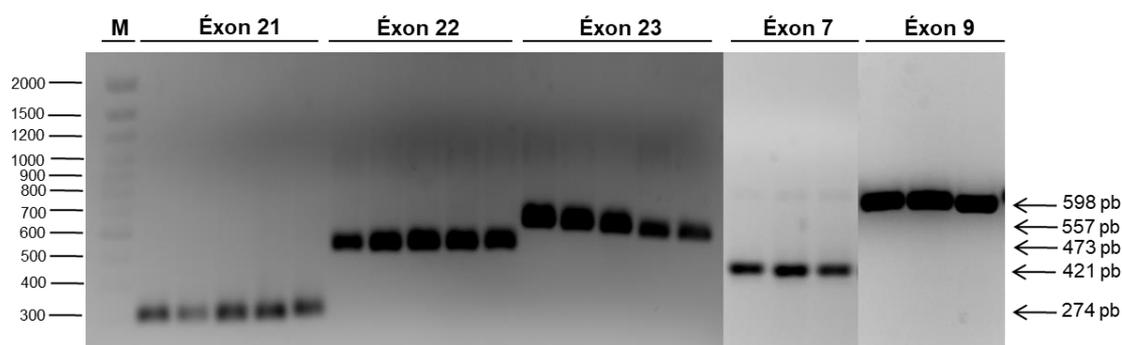
Componente	Concentração Inicial	Volume	Concentração final
ADN Genômico humano	100 ng	1,0 µL	2 ng/µL
Tampão de reação 10X	10X	5,0 µL	1X
Cloreto de magnésio	50 mM	1,5 µL	1,5 mM
<i>Primer 5'</i>	100 µM	0,5 µL	1 µM
<i>Primer 3'</i>	100 µM	0,5 µL	1 µM
dNTPs	10 mM	1,0 µL	0,2 mM
Taq ADN polimerase	5 U/µL	0,5 µL	0,05 U/µL
Água MilliQ estéril	-	40 µL	-

Consideramos 50 µL como volume final de reação.

Tabela 4 - Condições da PCR (35 ciclos).

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo
1. Desnaturação inicial	95	1 min
2. Desnaturação (35X)	95	1 min
3. Associação dos 'primers' (35X)	52-56	1 min
4. Extensão (35X)	72	1 min
5. Extensão final	72	5 min

As bandas correspondentes aos produtos amplificados foram visualizadas sob luz UV, após eletroforese em gel de agarose 2% corrido a 80 V em tampão TBE (Tris 0,45 M, ácido bórico 0,44 M, EDTA 10 mM), corado com SYBRGreen (**Figura 8**). Os produtos de PCR foram purificados com o auxílio do kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification*, (GE Healthcare, Illinois, Estados Unidos), a pureza e concentração do ADN foram avaliados em *NanoDrop 2000*.

Figura 8 - Fragmentos do gene *CFH* amplificados por PCR em gel de agarose a 2%.

Éxon 21 (tamanho total: 274 pb), éxon 22 (tamanho total: 473 pb), éxon 23 (tamanho total: 557 pb), éxon 7 (tamanho total: 421 pb) e éxon 9 (tamanho total: 598 pb). M: marcador de tamanho em pares de base (pb) (*100 bp DNA ladder*, Thermo Fischer).

3.5 Reação de sequenciamento

Os produtos de PCR purificados foram usados de molde para a reação de sequenciamento empregando o kit *BigDye Terminator v 3.1* (*Applied Biosystems*, Thermo Fischer Scientific) as condições descritas nas **Tabelas 5** e **6**. A reação de sequenciamento foi purificada com uma mistura de glicogênio (1mg/mL), acetato de sódio 3 M e etanol 96% (1: 1: 25). Foram adicionados 25

μL desta mistura em cada tubo e incubados a -20°C por 15 min. A reação foi centrifugada a 2500 g durante 20 min, o sobrenadante descartado e em seguida foram adicionados 50 μL de etanol 70%, repetindo a centrifugação durante 10 min. Após descartar o sobrenadante, os tubos foram secados a 96°C durante 5 min em termociclador. O produto da reação de sequenciamento foi enviado para análise no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, do Instituto de Biociências da USP. As sequências obtidas foram comparadas com dados depositados no *UCSC Genome Browser* e no *Ensembl Genome Browser*.

Tabela 5 - Reação de sequenciamento.

Componente	Concentração Inicial	Volume	Concentração final
Fragmento de PCR	30-40* ng	1,0 μL	3-4 ng/ μL
Tampão de reação 5X	5X	1,0 μL	1X
Primer 5' ou 3'	20 μM	1,0 μL	2 μM
BigDye Terminator v3.1	2,5 X	2,0 μL	1X
Água MilliQ estéril	-	5,0 μL	-

Consideramos 10 μL como volume final de reação

*30 ng para fragmentos < 300pb e 40 ng para fragmentos entre 300-950pb

Tabela 6 - Condições da reação de sequenciamento (25 ciclos).

Etapas	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo
1. Desnaturação inicial	96	1 min
2. Desnaturação (25X)	96	0,5 min
3. Associação do oligonucleotídeo molde (25X)	50	0,25 min
4. Extensão (25X)	60	4 min
5. Extensão final	60	4 min

3.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o *software R v3.5.3* utilizando o pacote *SNPassoc* (GONZÁLEZ et al., 2007). As frequências alélicas e genóticas foram determinadas por contagem direta do número de genótipos individuais ou alelos e logo divididas pelo número de cromossomos

para obter a frequência alélica ou pelo número de indivíduos para obter a frequência genotípica. A análise frequência dos haplótipos entre pacientes e controles foi realizada por teste Qui-quadrado. Para avaliar associações de interesse, as frequências genotípicas foram comparadas entre pacientes e controles por meio de uma análise multivariada com ajuda do pacote SNPassoc que forneceu igualmente os valores de OR e seus respectivos valores de CI (95%). O ajuste dos valores de OR com as variáveis “idade”, “gênero” e “procedência” foi realizado empregando-se o modelo de regressão logística. A identificação de haplótipos e a análise do desequilíbrio de ligação por pareamento entre SNPs foi realizada com ajuda do *software* ‘Haploview’ v4.2, determinado-se o coeficiente de desequilíbrio de ligação (D’) e o coeficiente de correlação (r^2). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. As análises foram realizadas em colaboração com a Profa. Dra. Alessandra Pontillo do Laboratório de Imunogenética do Departamento de Imunologia (ICB-USP).

3.7 Purificação de FH a partir de soro humano

(Protocolo adaptado a partir do método empregado no Lab. do Dr. Isenman, Univ. de Toronto, Canadá)

Foram extraídos 20 mL de sangue de indivíduos saudáveis portadores de polimorfismos conhecidos no SCR 7 e 18 do FH (rs1061170, rs61822181, rs55679475, rs55771831 e rs62625015). Após separação do soro, 10 mL deste foram incubados com (PMSF-*phenylmethylsulfonyl fluoride*) 1 mM por 30 min. A preparação resultante foi dialisada por 72 h a 4 °C, contra uma solução contendo 8 mM de EDTA e 10 mM de benzamidina pH=5,8; a solução foi trocada por uma nova a cada 24 h. O precipitado formado (fração de euglobulina) foi lavado duas vezes com a mesma solução de diálise por centrifugação a 6870 g / 30 min. O precipitado foi então solubilizado em 10 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 100 mM de dextrose, 100 mM de glicina e 0,01% de azida sódica, pH=8,5 (Tampão A). A preparação foi então submetida à cromatografia por filtração em gel em resina Superdex 200 (*GE Healthcare*, Illinois, Estados Unidos), equilibrada com o Tampão A. Foi usada uma coluna XK 16/100 (*Pharmacia Chemical*, Uppsala, Suécia) com 180 mL de capacidade. Sucedeu-se um fluxo de 1 mL/min, coletando-se frações de 5 mL

cada. Esta etapa de purificação foi desenvolvida no Laboratório do Prof. Dr. Shaker Chuck Farah, do Departamento de Bioquímica (IQ-USP). A presença do FH foi identificada por SDS-PAGE seguida por Western-Blot. As frações contendo FH foram misturadas e lavadas com tampão NaH_2PO_4 10 mM pH=7,2 (Tampão B) por *Centricon 30 K* (*Merck, Millipore*, Massachusetts, Estados Unidos) e logo aplicadas em coluna de afinidade (Sephacrose 4B-CNBr ativada, acoplada a anticorpo policlonal de cabra anti-FH humano). A resina foi equilibrada em tampão de ligação (Tampão B). Após adsorção da amostra, a resina foi lavada 3 vezes com Tampão B em volume equivalente a 5 vezes o volume da coluna. Em seguida o FH aderido à resina foi eluído com tampão glicina (0,1 M; pH=7,2). A concentração total de proteína das frações foi avaliada pelo método colorimétrico do Ácido Bicinconínico (BCA) (*Pierce, Thermo Scientific*, Massachusetts, MS, Estados Unidos) e as frações contendo FH foram identificadas por SDS-PAGE seguida por Western-Blot e logo concentradas por *Centricon*.

3.7.1 Preparação da resina de Sepharose 4B-CNBr acoplada a anti-FH

A resina Sepharose 4B ativada com CNBr foi hidratada com HCl 1mM. Foram usados 3 g de resina (1 g de resina em pó equivale a 3,5 mL de resina hidratada e cada mL de resina hidratada tem a capacidade de se ligar covalentemente a 5-10 mg de proteína, neste caso anticorpo anti-FH). Após três ciclos de lavagem com HCl 1 mM o anticorpo anti-FH foi misturado com a resina atingindo uma concentração de 7,5 mg/mL e a reação foi incubada a 4 °C durante 18 h. O anticorpo anti-FH foi previamente dissolvido em uma solução de NaHCO_3 0,1 M pH=8,3 com NaCl 0,5 M (Tampão C). Esgotado o tempo de incubação o excesso de sobrenadante foi removido da reação e a resina foi lavada três vezes com Tampão C por centrifugação a 180 x g durante 5 min. Após a última lavagem, 5 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH=8,0 foram adicionados à resina e o material foi deixado em repouso por 2 h à temperatura ambiente (TA). Em seguida, o excesso de tampão foi removido e a resina foi equilibrada alternando o pH com duas soluções: primeiro, tampão acetato de sódio (CH_3COONa) 0,1 M pH=4,0 com NaCl 0,5 M; e depois tampão Tris-HCl

0,1 M pH=8,0 com NaCl 0,5 M. Após três ciclos de alternância do pH, considerou-se a resina pronta para cromatografia.

3.7.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

As separações eletroforéticas foram realizadas pelo método de Laemmli (Laemmli et al., 1970) em tampão de corrida Tris/glicina/SDS (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%, pH=8,3), sob voltagem de 120 V, à TA.

A acrilamida foi utilizada na concentração de 5% no gel de empilhamento e de 10% no gel de separação, em espessura de 1 mm. As amostras foram preparadas em tampão de amostra redutor 5x (Tris-HCl 50 mM pH=6,8, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5%, SDS 2%) e aquecidas a 96 °C por 3 min antes da aplicação em gel. Para acompanhar a corrida das amostras no gel foi aplicado marcador de massa molecular PAGERuler (*Thermo Fischer*).

A presença das bandas proteicas foi detectada após imersão do gel em solução corante (azul Coomassie R250 0,25%, ácido acético glacial 10%, etanol 45%) por 1 h sob agitação. O descoramento foi feito por aquecimento do gel em solução aquosa em microondas até a visualização nítida das bandas de proteínas.

3.7.3 Western-Blot

Primeiramente as amostras de proteína foram separadas em SDS-PAGE. Finda a corrida as amostras foram transferidas do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini-Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, CA., Estados Unidos), por 1 h a 350 mA. Após a transferência, a membrana foi incubada por 16 h a 4 °C com PBS-T contendo 10% de leite desnatado pra bloquear sítios de ligação inespecíficos. Os anticorpos primários e secundários foram incubados sequencialmente a TA sob agitação e entre cada etapa de incubação foram realizadas três lavagens de 5 min cada com PBS-T. As membranas foram incubadas por 1 h com anticorpo policlonal anti-FH feito em cabra (1:5000) e seguidamente com anticorpo

secundário anti-IgG de cabra conjugado à peroxidase (1:10000) por 1 h à TA. Os anticorpos foram diluídos em solução de PBS-T contendo 5% de leite desnatado. Após as lavagens, foi feita a revelação por quimioluminescência empregando o *kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent* (Thermo Scientific, Massachusetts, MS, Estados Unidos).

3.8 Avaliação da interação das variantes polimórficas do FH com L. interrogans

A interação das variantes do FH contendo polimorfismos no SCR 18 com *L. Interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm foi analisada por citometria de fluxo e a interação com proteínas da superfície da leptospira foi avaliada por ELISA. A estirpe de leptospiros usada neste trabalho (*L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm) foi cedida pelo Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann do Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

3.8.1 Citometria de fluxo

Culturas de $2,5 \times 10^8$ bactérias de *L. interrogans* sorovar Kennewicki, estirpe Fromm, foram incubadas por 1 h a 37 °C com soro humano de indivíduos contendo variantes polimórficas no SCR 18 do FH, em diferentes concentrações (5, 10 ou 20%) ou com FH purificado do soro em duas concentrações (1 ou 5 µg) ou com PBS como controle negativo, tudo no volume final de 500 µL. Após incubação, as bactérias foram lavadas três vezes com PBS e logo ressuspensas em 50 µL de solução anti-FH [monoclonal (1:50) ou policlonal (1:200)], em PBS 1% BSA e incubadas 1 h a TA. Após duas novas lavagens, as bactérias foram incubadas por mais 1 h a 4 °C com [anti-IgG de cabra conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:200) ou anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor 488 (1:200)] em PBS contendo 1% BSA. Após três lavagens, as bactérias foram fixadas com paraformaldeído 2% por 20 min à TA e logo ressuspensas em PBS no volume final de 200 µL para análise por citometria de fluxo no FACSCanto II (BD Biosciences), *Software FACSDiva*. Os histogramas em sobreposição representam a detecção da fluorescência emitida pelo fluorocromo FITC ou A488. Como controle

negativo, as bactérias foram incubadas apenas com os anticorpos primários e secundários com a finalidade de detectar a fluorescência emitida pela ligação inespecífica destes anticorpos diretamente na bactéria, na ausência de soro; ou com um soro humano comercial depletado de FH (Complement Technology) seguido pela incubação com os anticorpos. As análises dos arquivos adquiridos foram realizadas com o software FlowJo, em colaboração com a Profa. Dra. Denise Moraes da Fonseca do Laboratório de Imunologia de Mucosas do Departamento de Imunologia (ICB-USP).

3.8.2 ELISA

A proteína recombinante de *Leptospira* LigAC (5 µg/mL), diluída em PBS foi imobilizada em placas de 96 poços (*Costar 3590 High Binding*, Corning Inc.), aplicando 100 µL/poço. Foram realizadas três lavagens com PBS-T entre cada etapa. Os sítios não específicos de ligação foram bloqueados usando BSA 3% por 2 h a 37 °C. Após bloqueio, as proteínas foram incubadas por 1 h a 37 °C com (0,75-2,5 µg) de FH contendo ou não as variantes polimórficas, purificado a partir de soro de indivíduos saudáveis. Após lavagem, se seguiu um segundo bloqueio por 1 h, logo os poços foram incubados com anticorpo monoclonal anti-FH humano (1:500) feito em camundongo diluído em PBS-T 1% BSA por 1 h a 37 °C. Após este período, o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase foi adicionado na diluição de 1:3000 em PBS-T 1% BSA e incubado por 1 h a 37 °C. A revelação foi feita com solução de revelação *OptEIA* contendo tetrametilbenzidina (TMB) (*BD Biosciences*) e interrompida com a adição de 50 µL de H₂SO₄ 4 N. A leitura da absorbância foi feita a 450 nm em leitor de microplacas (Labsystems Uniscience, Multiskan EX).

3.9 Avaliação da interação das variantes polimórficas do FH com células HepG2 por citometria de fluxo.

Uma suspensão celular da linhagem de células hepáticas humanas HepG2 contendo 1x10⁶ células foi incubada a 37 °C durante 1 h com 5 µg de FH purificado do soro indivíduos saudáveis portadores de polimorfismos conhecidos no SCR 7 e 18. Como controle negativo as células foram incubadas

com PBS, em volume final de 500 μ L. Após incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS e logo ressuspensas em 50 μ L de solução anti-FH monoclonal (1:50), em PBS 1% BSA e incubadas 1 h à TA. Após três novas lavagens, as células foram incubadas por mais 1 h a 4°C com anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor 488 (1:200) em PBS contendo 1% BSA. Após três lavagens, as células foram fixadas com paraformaldeído 2% por 20 min à TA e logo ressuspensas em PBS no volume final de 200 μ L para análise por citometria de fluxo no FACSCanto II (BD Biosciences), *Software FACSDiva*. As análises dos arquivos adquiridos foram realizadas com o software FlowJo. Três experimentos independentes foram realizados. Para determinar diferenças significativas na interação do FH (com ou sem as variantes polimórficas) e as células HepG2 foi realizada uma análise de variância (ANOVA) fator único, seguido pelo teste de Tukey, adotando-se como nível de significância $p < 0,05$. A linhagem de células hepáticas humanas (HepG2) foi cedida pela Profa. Dra. Claudimara Ferini Pacicco Lofti do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

3.10 Avaliação da atividade de cofator de FH ligado nas células HepG2 por Western-Blot

A atividade de cofator do FH ligado às células HepG2 foi avaliada pela clivagem de C3b pelo FI. Uma suspensão celular contendo 1×10^6 células foi incubada a 37 °C durante 1 h com 1 μ g de FH purificado do soro de indivíduos saudáveis portadores de polimorfismos conhecidos no SCR 7 e 18. Como controle negativo as células foram incubadas com PBS, em volume final de 500 μ L. Após seis lavagens, foram adicionados 500 ng de C3b e 250 ng de FI (Complement Technology, Inc) em um volume final de 100 μ L de PBS. A reação de clivagem foi incubada a 37 °C por 45 min. Como controle positivo da clivagem 500 ng de C3b, 500 ng de FH e 250 ng de FI foram incubados nas mesmas condições.

Após incubação, as amostras foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE 10% em condições redutoras com o objetivo de observar a clivagem de

C3b. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e sítios não específicos de ligação foram bloqueados usando 10% de leite desnatado em PBS-T por 18 h a 4 °C. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes com PBS-T e os fragmentos gerados após clivagem pelo FI foram detectados com anticorpo policlonal anti-C3 feito em cabra (Complement Technology, Inc) na diluição 1:5000. Subsequentemente, as membranas foram lavadas com PBS-T e incubadas por 60 min à TA com anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase (KPL) na diluição 1:10000. Ambos os anticorpos foram detectados por quimioluminescência empregando o *kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent* (Thermo Scientific).

4. Resultados

4.1 Resultados do sequenciamento dos éxons 7, 9, 21, 22 e 23 do gene *CFH*

O gene *CFH* localiza-se no cromossomo 1, onde os éxons 7 e 9 encontram-se entre as posições 196685064 – 196690239 do ADN genômico e codificam os SCRs 5 e 7. (**Figura 8**). Para o éxon 7 foram sequenciadas 305 amostras divididas entre: 170 amostras de pacientes com leptospirose confirmada (MAT positivo ou ELISA) e 135 amostras controle (MAT negativo), enquanto para o éxon 9 foram sequenciadas 307 amostras: 172 amostras de pacientes e 135 amostras controles. Os éxons 21, 22 e 23 estão entre as posições 196743451 – 196747504 do ADN genômico e codificam os SCRs 18, 19 e 20, respectivamente. Para o éxon 21 foram sequenciadas, no total, 342 amostras de ADN, 182 amostras de pacientes e 160 amostras controles. Em relação ao éxon 22 que codifica o SCR 19, foram analisadas 336 amostras correspondendo a 179 pacientes e 157 controles. Para o éxon 23 que codifica o SCR 20 têm sido analisadas 313 amostras, sendo 171 pacientes e 142 controles.

As características dos pacientes participantes do estudo estão descritas na **Tabela 7**. O número de pacientes do sexo masculino é quatro vezes maior que o feminino e a idade média dos pacientes é 39 anos. No momento da infecção a maioria dos pacientes apresentou sintomas similares à gripe: febre (90,7%), mialgia (87,4%) e cefaleia (65%). A icterícia também foi um sintoma bastante comum (57,4%), enquanto distúrbios mais graves, acometendo o rim e os pulmões foram menos frequentes.

Tabela 7 - Caracterização demográfica e clínica dos pacientes com leptospirose participantes do estudo.

Parâmetro	Participantes n=184 [n(%)]
Idade	
Média	38,9 (\pm 15,4)
Faixa Etária	18-84
Sexo	
Feminino	36 (19,6)
Masculino	148 (80,4)
Procedência	
Argentina	24 (13)
Brasil (Ceará)	22 (12)
Brasil (São Paulo)	138 (75)
Dados Clínicos	
Febre	166 (90,7)
Icterícia	105 (57,4)
Mialgia	160 (87,4)
Cefaleia	119 (65)
Síndrome renal ¹	63 (34,4)
Síndrome respiratória ²	8 (4,4)
Síndrome hemorrágica ³	28 (15,3)
Vômito	104 (56,5)
Diarreia	66 (35,9)
Prostração	62 (33,7)
Sufusão conjuntival	19 (10,3)
Colúria	13 (7)
Dor panturrilha	97 (52,7)

¹ Síndrome renal: oligoanúria/ oligúria, níveis elevados de creatinina, e necessidade de diálise.

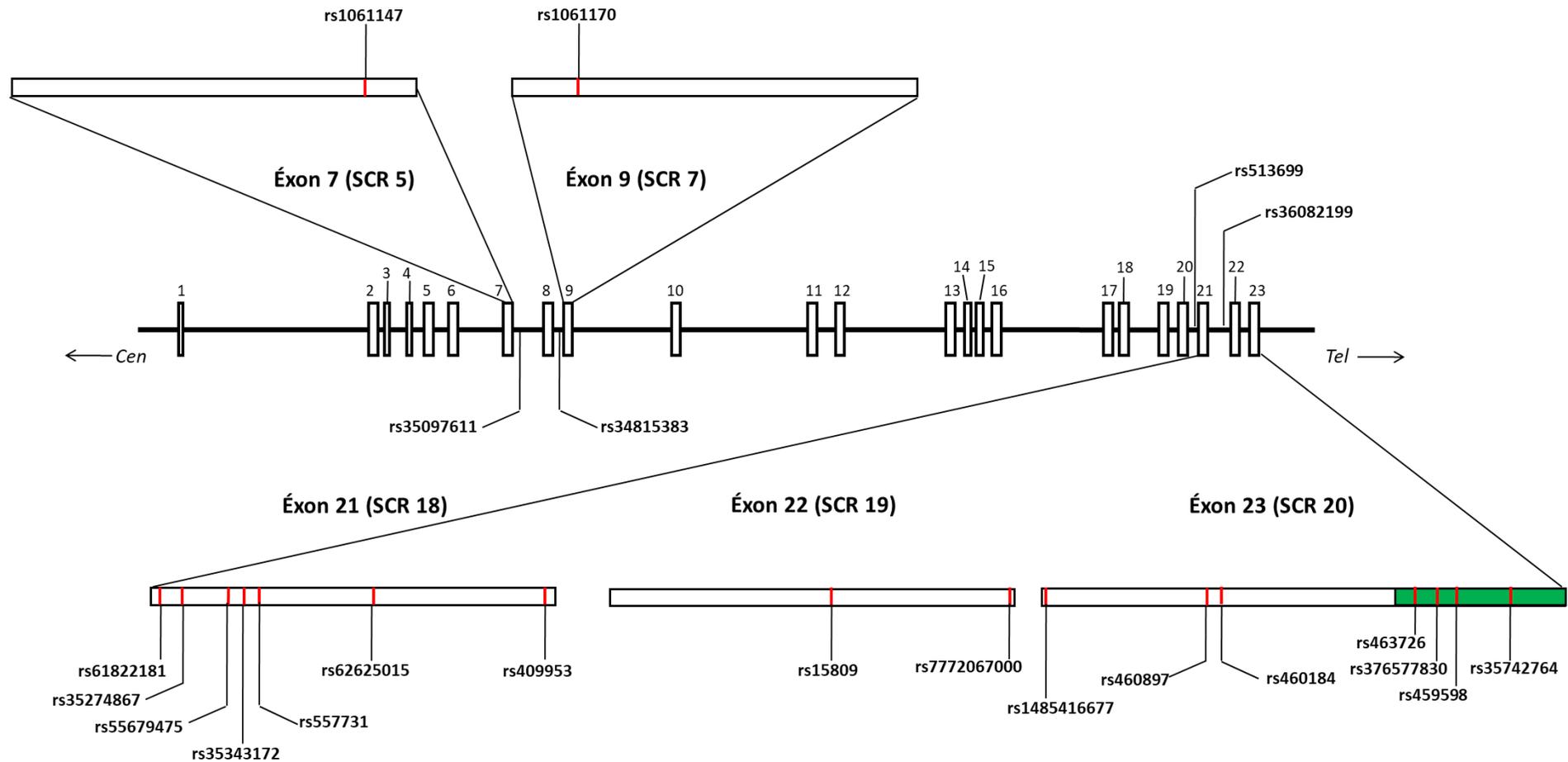
² Síndrome respiratória: tosse, dispneia, taquipneia, necessidade de ventilação mecânica.

³ Síndrome hemorrágica: plaquetopenia, hemoptise, metrorragia, melena, gengivorragia, epistaxe e hemorragia pulmonar.

Critérios definidos com ajuda da Dra. Ana Catarina Lunz Macedo, nefrologista pediátrica, e do Dr. Amaro Nunes Neto, patologista.

Na coorte, foram identificados sete polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no éxon 21; dois no éxon 22; e três no éxon 23; todos herdados em padrão de heterozigose; enquanto que nos éxons 7 e 9 foi identificado um SNP em cada, tanto em heterozigose como em homozigose (**Tabela 8, Figura 9**).

Figura 9 - Representação esquemática da estrutura do gene *CFH* com ampliação dos éxons sequenciados neste estudo.



O gene compreende 23 éxons que se estendem ao longo de 94kb. Cada domínio SCR do FH é codificado por um único éxon, exceto o SCR 2 que é codificado pelos éxons 3 e 4. O éxon 10 não contribui para o transcrito do FH, mas contribui para o transcrito alternativo da molécula FHL-1. Na ampliação dos éxons 7, 9, 21, 22 e 23 as linhas vermelhas representam as posições dos SNPs identificados. O segmento verde no éxon 23 representa a 3'UTR. Cen: centrômero, Tel: telômero, 3'UTR: região 3' não traduzida.

Tabela 8 - Distribuição alélica e genotípica em pacientes e controles dos SNPs identificados nos éxons 7, 9, 21, 22 e 23 do gene *CFH*.

SNP	Efeito funcional	Localização	Alel/Gen	Frequência		Associação com doenças
				Pacientes [% (n)] ^a	Controles [% (n)] ^b	
rs1061147	A307A	7 (SCR 5)	A	32,0 (109)	30,7 (83)	-
			C	68,0 (231)	69,3 (187)	
			AA	10,0 (17)	10,4 (14)	
			AC	44,1 (75)	40,7 (55)	
			CC	45,9 (78)	48,9 (66)	
rs1061170	Y402H	9 (SCR 7)	T	69,8 (240)	68,5 (185)	ARM D (Zarepars i et al., 2005 ; Contreras et al., 2014)
			C	30,2 (104)	31,5 (85)	
			TT	50,0 (86)	48,2 (65)	
			TC	39,5 (68)	40,7 (55)	
			CC	10,5 (18)	11,1 (15)	
rs61822181	T1046T		C	55,2 (201)	52,8 (169)	-
			T	44,8 (163)	47,2 (151)	
			CC	10,4 (19)	5,6 (9)	
			CT	89,6 (163)	94,4 (151)	
rs35274867	N1050Y		A	98,6 (359)	98,7 (316)	aHUS (Neumann et al., 2003), ARM D (Contreras et al., 2014), T2D-ESKD (Bonomo et al., 2014), MPE (McCormack et al., 2018)
			T	1,4 (5)	1,3 (4)	
			AA	97,3 (177)	97,5 (156)	
			AT	2,7 (5)	2,5 (4)	
rs55679475	Y1058H		T	74,5 (271)	74,4 (238)	-
			C	25,5 (93)	25,6 (82)	
			TT	48,9 (89)	48,7 (78)	

Continua

SNP	Efeito funcional	Localização	Alel/Gen	Frequência		Associação com doenças
				Pacientes [% (n)] ^a	Controles [% (n)] ^b	
rs35343172	I1059T	21 (SCR 18)	TC	51,1 (93)	51,3 (82)	-
			T	97,3 (354)	98,1 (314)	
			C	2,7 (10)	1,9 (6)	
			TT	94,5 (172)	96,3 (154)	
			TC	5,5 (10)	3,7 (6)	
rs55771831	V1060L		G	74,5 (271)	74,4 (238)	ARMD (Contreras et al., 2014)
			C	25,5 (93)	25,6 (82)	
			GG	48,9 (89)	48,7 (78)	
			GC	51,1 (93)	51,3 (82)	
rs62625015	Q1076E		C	75,8 (276)	76,9 (246)	aHUS (Richards et al., 2001 ; Neumann et al., 2003) , ARMD (Contreras et al., 2014)
			G	24,2 (88)	23,1 (74)	
			CC	51,6 (94)	53,8 (86)	
			CG	48,4 (88)	46,2 (74)	
rs409953	T1097T		G	78,3 (285)	78,1 (250)	-
			A	21,7 (79)	21,9 (70)	
			GG	56,6 (103)	56,2 (90)	
			GA	43,4 (79)	43,8 (70)	
rs15809	Q1143E	22 (SCR 19)	C	95,8 (343)	97,5 (306)	
			G	4,2 (15)	2,5 (8)	
			CC	91,6 (164)	95,0 (149)	
			CG	8,4 (15)	5,0 (8)	
rs777206700	H1165Y		C	100 (358)	99,7 (313)	
			T	0 (0)	0,3 (1)	

Continua

SNP	Efeito funcional	Localização	Alel/Gen	Frequência		Associação com doenças
				Pacientes [% (n)] ^a	Controles [% (n)] ^b	
			CC	100 (179)	99,4 (156)	
			CT	0 (0)	0,6 (1)	
rs1485416677	C1167R		G	99,7 (341)	100 (142)	
			C	0,3 (1)	0 (0)	
			GG	99,4 (170)	100 (142)	
			GC	0,6(1)	0 (0)	
				C	99,7 (341)	100 (142)
rs460897	S1191L	23 (SCR 20)	T	0,3 (1)	0 (0)	aHUS (Richards et al., 2001 ; Rodríguez de Córdoba et al., 2004 ; Heinen et al., 2006)
			CC	99,4 (170)	100 (142)	
			CT	0,6(1)	0 (0)	
rs460184	V1197A		T	99,7 (341)	100 (142)	aHUS (Pérez-Caballero et al., 2001; Richards et al., 2001; Rodríguez de Córdoba et al., 2004 ; Heinen et al., 2006)
			C	0,6 (1)	0 (0)	
			TT	99,4 (170)	100 (142)	
			TC	0,6(1)	0 (0)	

^a n=170 para éxon 7, n=172 para éxon 9, n=182 para éxon 21, n=179 para éxon 22, n=171 para éxon 23

^b n=135 para éxon 7, n=135 para éxon 9, n=160 para éxon 21, n=157 para éxon 22, n=142 para éxon 23

aHUS: Síndrome Hemolítica Urêmica atípica

ARMD: Degeneração da Mácula Relacionada à Idade

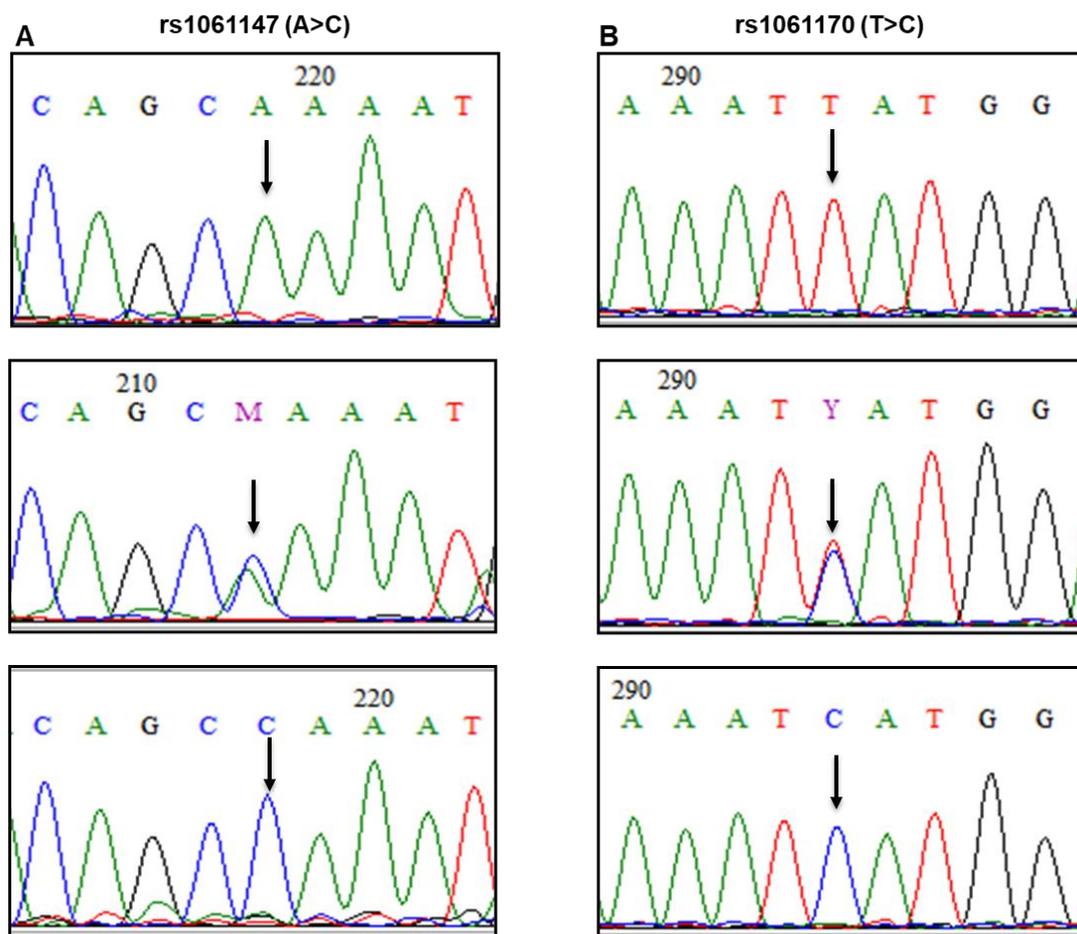
T2D-ESKD: Doença Renal em Estágio Terminal associada a Diabetes tipo 2

MPE: Exantema Maculopapular

Conclusão

Na **Tabela 8** estão listados os SNPs identificados e as consequências, assim como a distribuição dos respectivos alelos/genótipos no grupo de pacientes e controles. Com exceção das variantes rs513699, rs61822181, rs55679475, rs55771831, rs62625015 e rs409953, a distribuição dos SNPs restantes na coorte analisada resultou em equilíbrio de Hardy-Weinberg (**APÊNDICE A**).

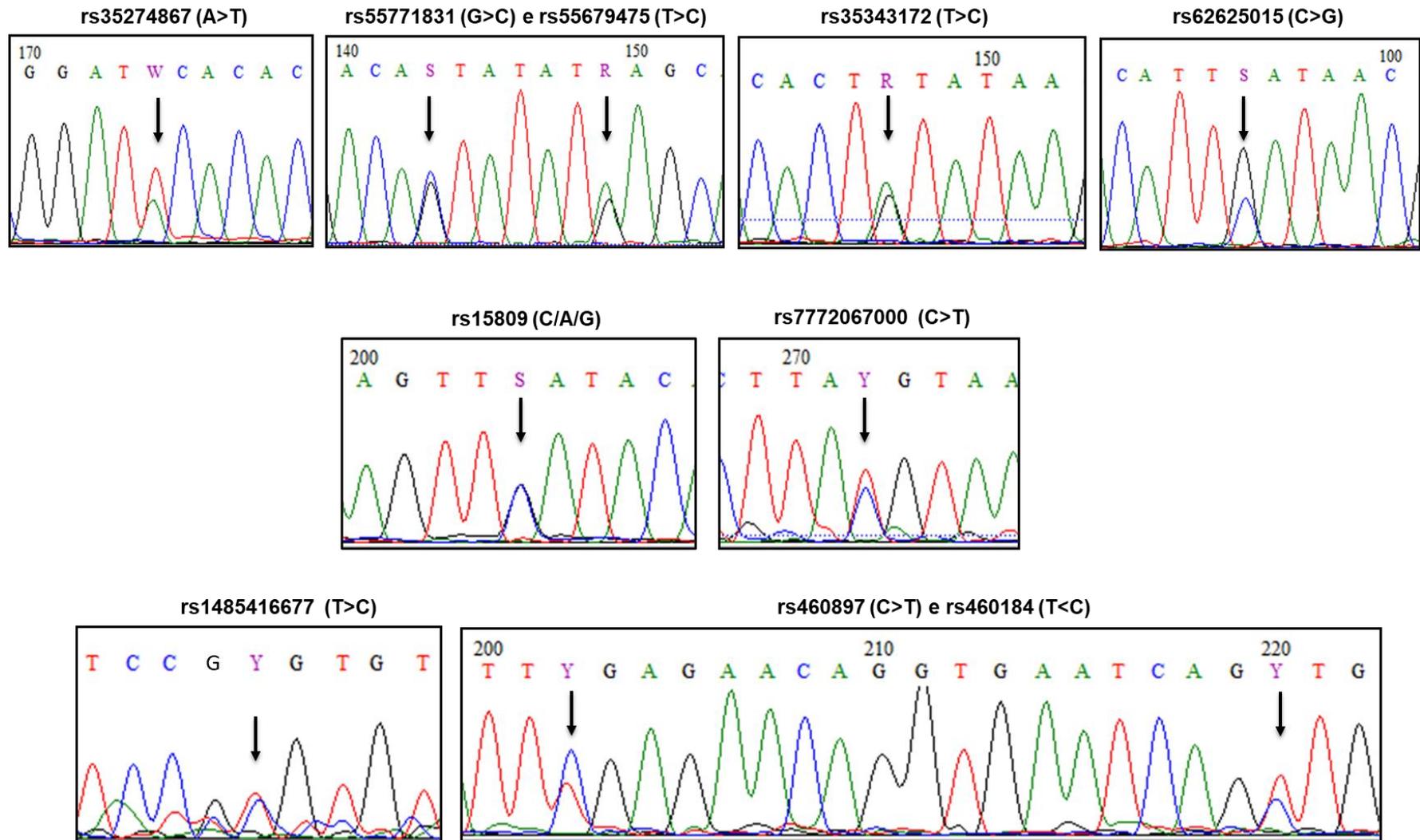
Figura 10 - Eletroferograma representativo do sequenciamento de ADN mostrando os genótipos dos SNPs encontrados nos éxons 7 e 9 do gene *CFH*.



Genótipos A/A, A/C e C/C do rs1061147 no éxon 7 (**A**) e os genótipos T/T, T/C e C/C do rs1061170 no éxon 9 (**B**).

De forma similar, a frequência dos SNPs identificados neste estudo, exceto as variantes rs61822181, rs55679475, rs55771831, rs62625015 e rs409953, está de acordo com as frequências esperadas em bancos de dados públicos (1000 Genome, Ensembl).

Figura 11 - Eletroferograma representativo do sequenciamento de ADN mostrando os genótipos dos SNPs encontrados nos éxons 21, 22 e 23 do gene *CFH*.



Estão representadas unicamente as variantes 'missense'. Painel superior: SNPs do éxon 21. Painel do meio: SNPs do éxon 22. Painel inferior: SNPs do éxon 23.

A **Figura 10** mostra o eletroferograma do sequenciamento com as variantes identificadas nos éxons 7 e 9; enquanto a **Figura 11** mostra as variantes '*missense*' identificadas nos éxons 21, 22 e 23 do FH.

O SNP identificado no exon 7 (rs1061147) e dois SNPs identificados no éxon 21 são variantes sinônimas (rs61822181 e rs409953), ou seja, não alteram a sequência de aminoácidos. O alelo polimórfico (C) do rs 1061147 apresentou maior frequência do que o alelo selvagem (A) em pacientes (67,6%) e controles (69,5%). Da mesma forma o alelo polimórfico (T) do rs61822181 apresentou maior frequência do que o alelo selvagem (C) em pacientes (89,2%) e controles (94,4%).

Nas regiões intrônicas abrangidas pelos '*primers*' foram identificados quatro SNPs, assim como na região 3'UTR onde foi possível identificar quatro variantes (**Tabela 9, Figura 8**).

As quatro variantes encontradas na 3'UTR apresentaram uma baixa frequência entre os pacientes, já as variantes intrônicas rs35097611, rs34815383 e rs513699 tiveram uma maior representatividade em pacientes e controles.

Tabela 9 - Distribuição alélica e genotípica em pacientes e controles dos SNPs identificados nas regiões intrônicas e na região 3'UTR do gene *CFH* analisadas neste estudo.

SNP	Localização	Alel/Gen	Frequência genotípica	
			Pacientes [% (n)] ^a	Controles [% (n)] ^b
rs35097611	Intron 7-8	C	97,6 (332)	98,5 (266)
		T	2,4 (8)	1,5 (4)
		CC	95,3 (162)	97,0 (131)
		CT	4,7 (8)	3,0 (4)
rs34815383	Intron 8-9	T	94,2 (324)	97,4 (263)
		C	5,8 (20)	2,6 (7)
		TT	88,4 (152)	94,8 (128)
		TC	11,6 (20)	5,2 (7)
rs513699	Intron 20-21	T	62,4 (227)	59,7 (191)
		C	37,6 (137)	40,3 (129)
		TT	24,7 (45)	19,4 (31)
		TC	75,3 (137)	80,6 (129)
rs36082199	Intron 21-22	T	100 (358)	99,7 (313)
		C	0 (0)	0,3 (1)
		TT	100 (179)	99,4 (156)
		TC	0 (0)	0,6 (1)
rs463726		G	99,7 (341)	100 (284)
		A	0,3 (1)	0 (0)
		GG	99,4 (170)	100 (142)

Continua

SNP	Localização	Alel/Gen	Frequência genotípica	
			Pacientes [% (n)] ^a	Controles [% (n)] ^b
rs376577830	3'UTR	GA	0,6(1)	0 (0)
		G	99,7 (341)	100 (142)
		C	0,3 (1)	0 (0)
		GG	99,4 (170)	100 (142)
		GC	0,6(1)	0 (0)
rs459598		C	99,7 (341)	100 (142)
		T	0,3 (1)	0 (0)
		CC	99,4 (170)	100 (142)
		CT	0,6(1)	0 (0)
rs35742764		T	99,4 (340)	99,3 (282)
		C	0,6 (2)	0,7 (2)
		TT	98,8 (169)	98,6 (140)
		TC	1,2 (2)	1,4 (2)

^a n=170 para éxon 7, n=172 para éxon 9, n=182 para éxon 21, n=179 para éxon 22, n=171 para éxon 23

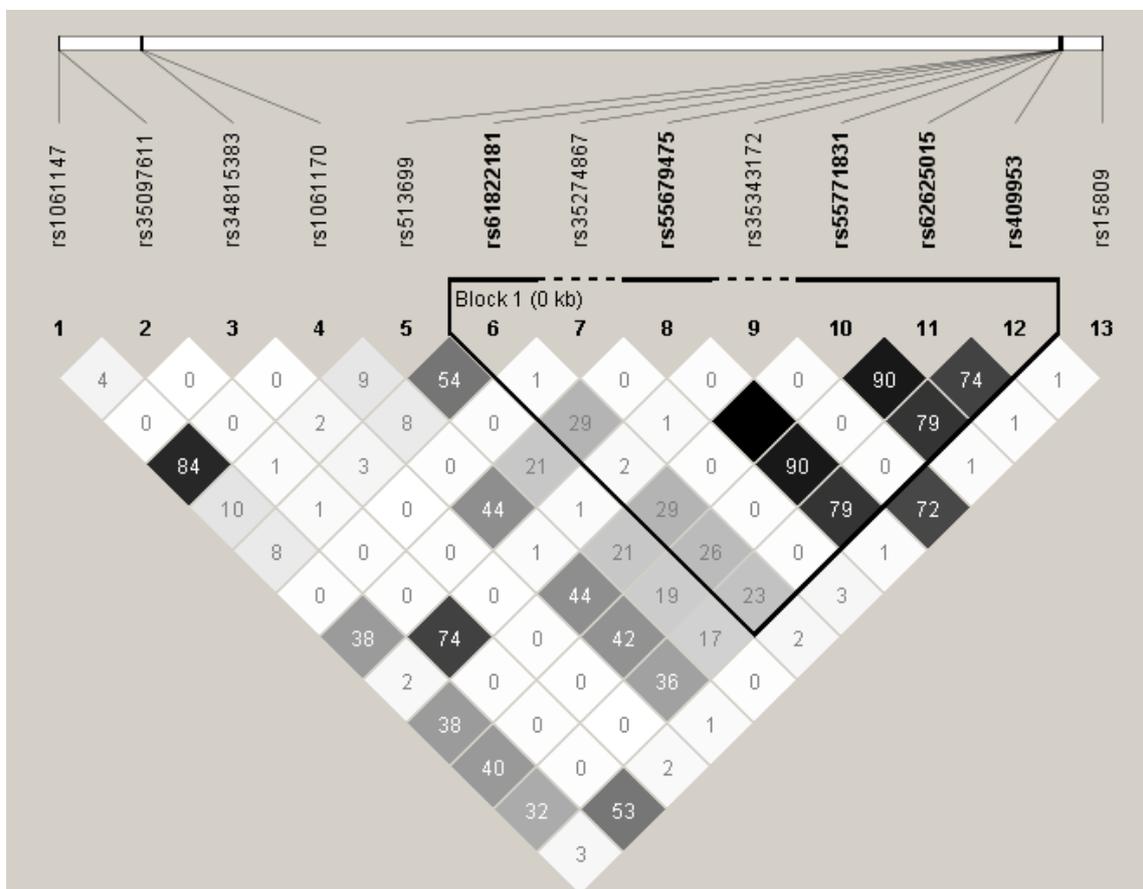
^b n=135 para éxon 7, n=135 para éxon 9, n=160 para éxon 21, n=157 para éxon 22, n=142 para éxon 23

Conclusão

A análise de desequilíbrio de ligação (LD) mostrou que os SNPs rs61822181, rs55679475 e rs55771831, rs62625015 e rs409953 estão em forte LD (**Figura 12**) (**APÊNDICE B**), e se combinam para formar cinco haplótipos principais:

- a) haplótipo 1: CTGCG;
- b) haplótipo 2: TTGCG;
- c) haplótipo 3: TCCGA;
- d) haplótipo 4: TCCGG;
- e) haplótipo 5: TCCCA.

Figura 12 - Análise do desequilíbrio de ligação entre os SNPs identificados no estudo, definido por *Haploview*.



Os números na figura indicam o valor de r^2 . Valores de $r^2 = 1$ (losango preto), indicam probabilidade mais alta de dois SNPs estarem em desequilíbrio de ligação. Tons de cinza correspondem com valores $0 < r^2 < 1$. Losango branco significa ausência de correlação ($r^2 = 0$). Os cinco SNPs que formam o haplótipo estão destacados no bloco 1.

4.2 Associação entre SNPs no gene *CFH* e a susceptibilidade à infecção por leptospira

Realizamos uma análise multivariada da distribuição dos SNPs identificados comparando casos e controles e incluindo como variáveis de correção no modelo geral linear (GLM): idade e gênero e procedência. Na **Tabela 10** são reportados os resultados da análise em forma resumida. Resultados mais detalhados em apêndices (**APÊNDICE C**).

Tabela 10 - Modelos de associação dos SNPs identificados no gene *CFH* em pacientes com leptospirose comparado com os controles.

SNP	Valor <i>p</i>	Valor <i>p</i> *	OR (95% CI)
rs1061147	0,83700	0,48284	0,70 (0,33-1,51)
rs35097611	0,43107	0,66641	1,56 (0,19-13,18)
rs34815383	0,04247	0,44179	1,62 (0,45-5,87)
rs1061170	0,94671	0,47819	0,71 (0,33-1,52)
rs513699	0,23370	0,45291	0,71 (0,29-1,77)
rs61822181	0,10072	0,14861	0,36 (0,08-1,68)
rs35274867	0,88653	0,55549	0,59 (0,11-3,2)
rs55679475	0,97775	0,83919	0,93 (0,45-1,92)
rs35343172	0,44285	0,43515	2,14 (0,26-17,55)
rs55771831	0,97775	0,83919	0,93 (0,45-1,92)
rs62625015	0,69770	0,89508	1,05 (0,51-2,17)
rs409953	0,94905	0,57708	1,24 (0,58-2,63)
rs15809	0,22978	0,44508	1,76 (0,38-8,19)

* valores *p* ajustados para as variáveis de correção "Idade", "Gênero" e "Procedência"
Estão representados os valores *p* de acordo com o modelo de associação codominante

As análises de correlação não revelaram diferenças significativas ($p > 0,05$) na frequência genotípica entre os grupos de pacientes e de controles para os SNPs identificados no gene *CFH* (**Tabela 10**). Porém, vale ressaltar que a variante rs34815383 teve uma maior frequência entre os pacientes,

tendo um valor $p < 0,05$ antes da correção pelas variáveis de ajuste ($p = 0,04247$ e $p = 0,54259$, respectivamente).

Da mesma forma os cinco haplótipos identificados tiveram uma distribuição similar entre pacientes e controles, portanto não tiveram associação significativa com a leptospirose (**Tabela 11**).

Tabela 11 - Frequência dos haplótipos identificados no gene *CFH* em amostras de pacientes e controles analisadas no estudo.

No do Haplótipo	SNPs*					Frequência (%)		valor $p^{\&}$
	6	8	10	11	12	Casos (n=184)	Controles (n=162)	
1	C	T	G	C	G	54,9	52,7	0,5774
2	T	T	G	C	G	19,3	21,6	0,4511
3	T	C	C	G	A	20,5	19,6	0,7662
4	T	C	C	G	G	3,3	3,4	0,9188
5	T	C	C	C	A	0,5	2,2	0,0607

* Em negrito e itálico está representado o alelo polimórfico de cada SNP. SNP6=rs61822181, SNP8=rs55679475, SNP10=rs55771831, SNP11=rs62625015, SNP12=rs409953 & Teste Qui-quadrado ($p < 0,05$).

Esses resultados sugerem que os polimorfismos identificados no gene *CFH* não afetam de modo significativo a susceptibilidade a infecção por leptospira, pelo menos na coorte analisada neste estudo.

4.3 Associação entre SNPs no gene *CFH* e as manifestações clínicas da leptospirose.

Em seguida, foi realizada uma análise de associação entre os SNPs encontrados e as manifestações clínicas nos pacientes com leptospirose, considerando como variáveis principais na análise multivariada: febre, icterícia, mialgia, cefaleia, síndrome renal, síndrome respiratória e síndrome hemorrágica, vômito, diarreia, prostração, sufusão conjuntival e dor na panturrilha.

Na **Tabela 12** são apresentados os principais resultados da análise multivariada realizada (detalhes em **APÊNDICES D - O**). Nesta análise também foram incluídas as variáveis de correção: idade, gênero e procedência.

A partir da análise de variáveis para múltiplos SNPs foi observada uma associação quase significativa da variante rs15809 com a icterícia, uma vez que o $p < 0,05$ antes e depois do ajuste pelas variáveis de correção, porém entre os limites do intervalo de confiança o valor 1 esteve presente ($p = 0,03002$, OR 4,44; 95%CI 0,94-20,98). Esta variante também teve associação com a prostração, constituindo um fator de proteção para o desenvolvimento deste sintoma ($p = 0,02032$; OR 0,21; 95%CI 0,05-0,97). Observou-se que 13,3 % dos pacientes que carregam o genótipo **C/G** não desenvolvem prostração contra 3,2% dos pacientes que carregam o alelo e desenvolvem o sintoma.

Por outro lado, a variante intrônica rs34815383 teve associação significativa com a síndrome renal, constituindo um fator de risco para o desenvolvimento desta síndrome ($p = 0,001439$; OR 5,3; 95%CI 1,8-15,57), onde 22 % dos pacientes que carregam o genótipo **T/C** desenvolveram icterícia contra 6,3% dos pacientes que carregam o alelo mas não desenvolveram esta síndrome.

As análises de associação também sugerem que o genótipo selvagem A/A da variante rs1061147 (SCR 5) e o genótipo **C/C** da variante rs1061170 (SCR 7) constituem um fator de proteção para o desenvolvimento de diarreia ($p = 0,01311$; OR 0,19; 95%CI 0,04-0,88) e ($p = 0,01463$; OR = 0,19; 95%CI 0,04-0,90); respectivamente, ambos de acordo com os modelos de associação recessivo. Para o rs1061147, 14,1% dos pacientes que carregam o alelo selvagem A em homozigose não apresentam este sintoma contra 3,1% que carregam o genótipo **A/A** e apresentam o sintoma. Para o rs1061170, 14% dos pacientes que carregam o alelo polimórfico C em homozigose não apresentam este sintoma contra 3,1% que carregam o genótipo **C/C** e apresentam o sintoma. Estas duas variantes também mostraram associação com a febre ao fazer o ajuste da análise para as variáveis de correção. De acordo com o modelo recessivo de associação os pacientes que carregam o alelo polimórfico A (rs1061147) e C (rs1061170) em homozigose estão menos vulneráveis a desenvolver febre ($p = 0,04611$; OR 0,23; 95%CI 0,06-0,89) e ($p = 0,04886$; OR 0,23; 95%CI 0,06-0,91), respectivamente. Observou-se que 25% dos pacientes que carregam o genótipo **A/A** ou **C/C** não desenvolvem febre contra 8,5% dos

que carregam o genótipo **A/A** e 9,1% dos que carregam o genótipo **C/C** e desenvolvem este sintoma.

Em relação ao sintoma de dor na panturrilha, as análises apontam que os SNPs: rs1061147, rs1061170 e três SNPs presentes no SCR 18 (rs55679475, rs55771831 e rs62625015) constituem também um fator de proteção para o desenvolvimento deste sintoma. Para o rs1061147, 66,1% dos pacientes que carregam os genótipos **A/C** e **A/A** não desenvolvem este sintoma, contra 44,8% dos pacientes que carregam estes genótipos e apresentam o sintoma ($p=0,01341$; OR 0,43; 95%CI 0,22-0,85). Para o rs1061170, 61,9% dos pacientes que carregam os genótipos **T/C** e **C/C** não desenvolvem este sintoma, contra 39,6% dos pacientes que portam estes genótipos e apresentam o sintoma ($p=0,008325$; OR 0,41; 95%CI 0,21-0,80). Estes resultados foram obtidos de acordo com os modelos de associação codominante, dominante e sobredominante. Já para os SNPs rs55679475 e rs55771831, de acordo com o modelo codominante de associação, 65,1% dos pacientes que carregam os genótipos **T/C** (rs55679475) e **G/C** (rs55771831) não desenvolvem o sintoma de dor na panturrilha contra 40,6% dos pacientes que carregam estes genótipos e desenvolvem o sintoma ($p=0,003749$; OR 0,38; 95%CI 0,19-0,74). Para o rs62625015, também de acordo com o modelo codominante de associação, 60,3% dos pacientes que carregam o genótipo **C/G** não desenvolvem o sintoma de dor na panturrilha contra 39,6% dos pacientes que carregam este genótipo e desenvolvem o sintoma ($p=0,01811$; OR 0,45; 95%CI 0,23-0,88).

A variante rs35343172 que teve uma frequência alélica e genotípica baixa na população mostrou ser um fator de proteção para a cefaleia ($p=0,03334$; OR 0,23; 95%CI 0,06-0,96). Observou-se que 11,1% dos pacientes que carregam o genótipo **T/C** não desenvolvem este sintoma, contra 2,6 % que carregam este genótipo e desenvolvem o sintoma.

Ao realizar a análise de associação entre os diferentes SNPs e combinações de sintomas dentro do grupo dos pacientes, observou-se que o genótipo **C/T** da variante rs61822181 constitui um fator de proteção frente ao

desenvolvimento de febre+mialgia+icterícia ($p=0,02919$; OR 0,32; 95%CI 0,11-0,95). De forma similar o genótipo **T/C** das variantes rs34815383 e rs513699 constitui um fator de risco frente ao desenvolvimento de icterícia+síndrome renal ($p=0,00526$; OR 4,32; 95%CI 1,51-12,31) e ($p=0,03625$; OR 2,52; 95%CI 1,01-6,27), respectivamente.

Tabela 12 - Distribuição genotípica para cada manifestação clínica observada em pacientes com leptospirose.

Sintomas	rs1061147						rs1061170					
	Presente			Ausente			Presente			Ausente		
	A/A	A/C	C/C	A/A	A/C	C/C	T/T	T/C	C/C	T/T	T/C	C/C
Icterícia												
<i>p</i> valor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OR (95% CI)												
Síndrome Renal												
<i>p</i> valor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OR (95% CI)												
Diarreia	3,1	96,9		14,1	85,9		96,9	3,1	86,0		14,0	
<i>p</i> valor												
OR (95% CI)												
Dor panturrilha	44,8		55,2	66,1		33,9	60,4	39,6		38,1		61,9
<i>p</i> valor												
OR (95% CI)												
Febre	8,5	91,5		25,0	75,0		90,9	9,1	75,0		25,0	
<i>p</i> valor												
OR (95% CI)												
Prostração												
<i>p</i> valor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OR (95% CI)												
Cefaleia												
<i>p</i> valor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OR (95% CI)												

Continua

Presente		Ausente		Presente		Ausente		Presente		Ausente	
rs55679475				rs55771831				rs15809			
T/C	T/T	T/C	T/T	G/C	G/G	G/C	G/G	C/G	C/C	C/G	C/C
-	-	-	-	-	-	-	-	12,5	87,5	2,7	97,3
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,03002 °	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,44 (0,94-20,98)	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65,1	34,9	40,6	59,4	40,6	59,4	65,1	34,9	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	3,2	96,8	13,3	86,7
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,02032 °	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,21 (0,05-0,97)	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Continua

rs62625015				rs34815383				rs35343172			
Presente		Ausente		Presente		Ausente		Presente		Ausente	
C/G	C/C	C/G	C/C	T/C	T/T	T/C	T/T	T/C	T/T	T/C	T/T
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				22,0	78,0	6,3	93,7				
-	-	-	-			0,001439 ^c		-	-	-	-
						5,3 (1,8-15,57)					
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39,6	60,4	60,3	39,7								
								2,6	97,4	11,1	88,9
-	-	-	-	-	-	-	-			0,03334 ^c	
										0,23 (0,06-0,96)	

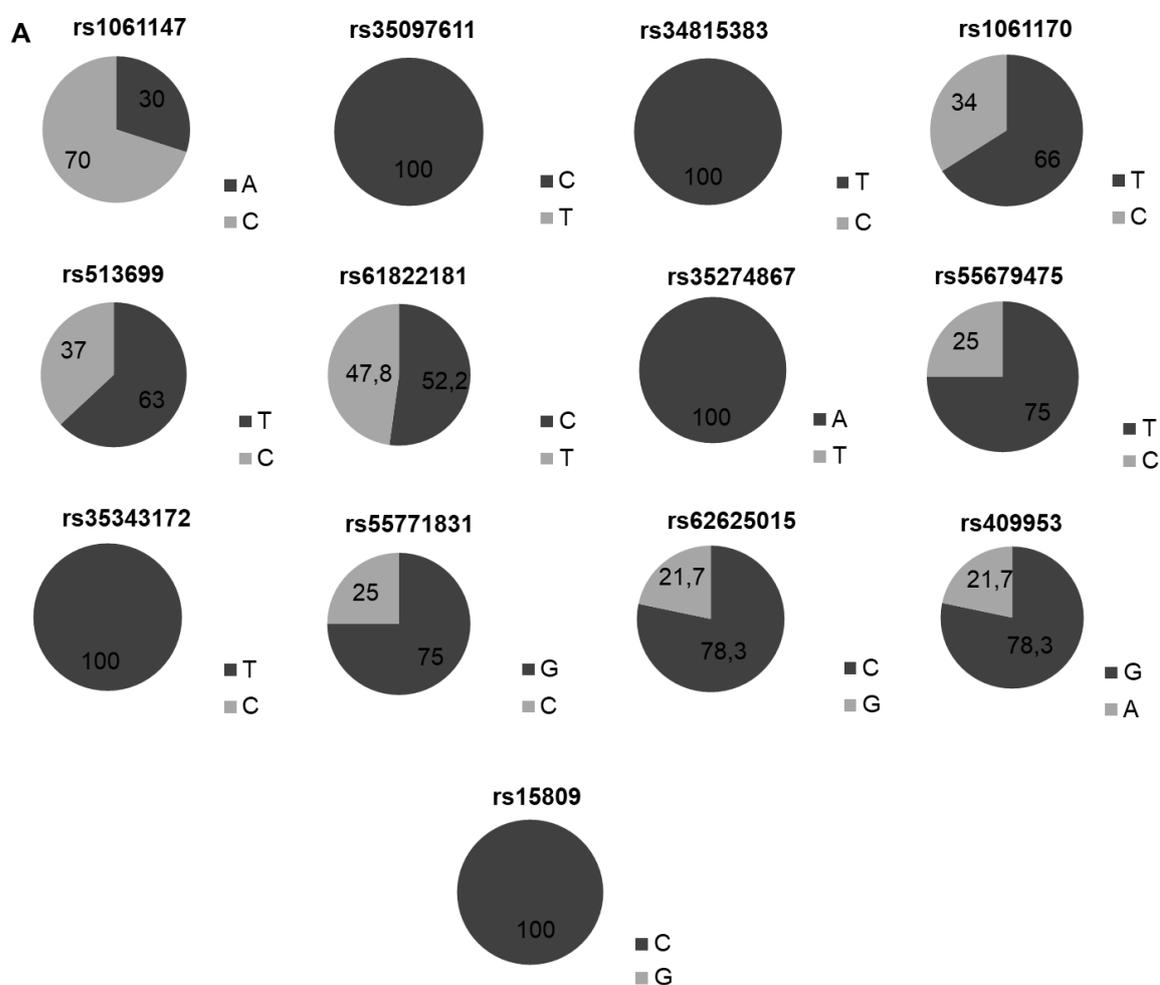
Os valores representam a porcentagem de pacientes que carregam cada genótipo em presença ou ausência do sintoma
p<0,05; OR: 'odd ratio' ou razões de chance; CI: intervalo de confiança
 c: modelo codominante
 r: modelo recessivo
 s: modelo sobredominante
 d: modelo dominante

Conclusão

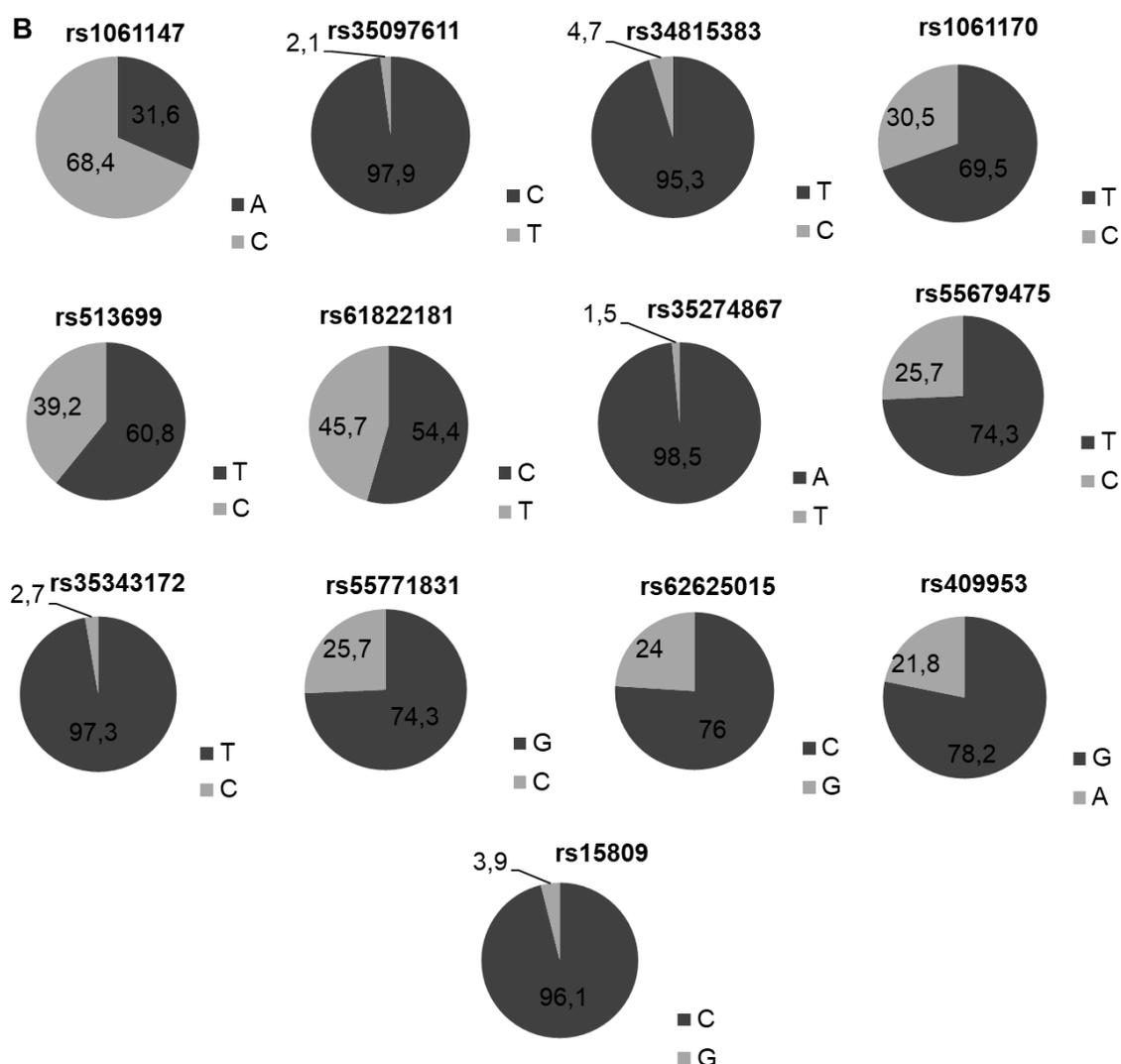
4.4 Análise da distribuição alélica dos SNPs identificados no gene CFH entre a população brasileira e argentina.

Paralelamente foram analisadas as frequências alélicas dos SNPs identificados entre os indivíduos da Argentina e os indivíduos do Brasil. Embora o número de amostras analisadas para cada grupo não fosse equivalente, a distribuição dos alelos foi similar nas duas populações (**Figura 13**). Cabe destacar que o rs35284867 e o rs35343172 do SCR 18, as variantes intrônicas rs35097611 e rs34315383, assim como o rs15809 do SCR 19 não foram encontradas dentro das amostras da população argentina, enquanto na população brasileira apresentaram uma frequência alélica baixa.

Figura 13 - Frequência alélica dos SNPs identificados no estudo.



Continua



População argentina (n=47: éxon 7 n=20; éxon 9 n=22; éxon 21 n=46; éxon 22 n=41) (A). População brasileira (n=299: éxon 7 n=285; éxon 9 n=285; éxon 21 n=296; éxon 22 n=295) (B). Para cada SNP o alelo polimórfico está representado em cinza e as frequências alélicas estão representadas em porcentagem.

Cinco dos SNPs identificados (rs61822181, rs55679475, rs55771831, rs62625015, rs409953) apresentaram uma frequência alélica elevada nas duas populações, argentina e brasileira. Este achado é discrepante com os dados observados das frequências destes alelos na população mundial. Quando consultadas as bases de dados genômicas '1000 Genome' e 'Ensembl', nas populações ameríndia, africana e europeia, os alelos polimórficos das variantes rs55679475, rs55771831, rs62625015 e rs409953 apresentam uma frequência entre 0 e 0,3% (APÊNDICE P).

O alelo G do rs15809 tem uma frequência alélica baixa (1,3%) na população ameríndia, mas na população africana tem uma frequência mais elevada (12%). De forma similar o alelo polimórfico C da variante rs35343172 apresenta uma frequência alélica baixa na população ameríndia (1,2%) e mais elevada na população africana (8,7%) (www.ensembl.org).

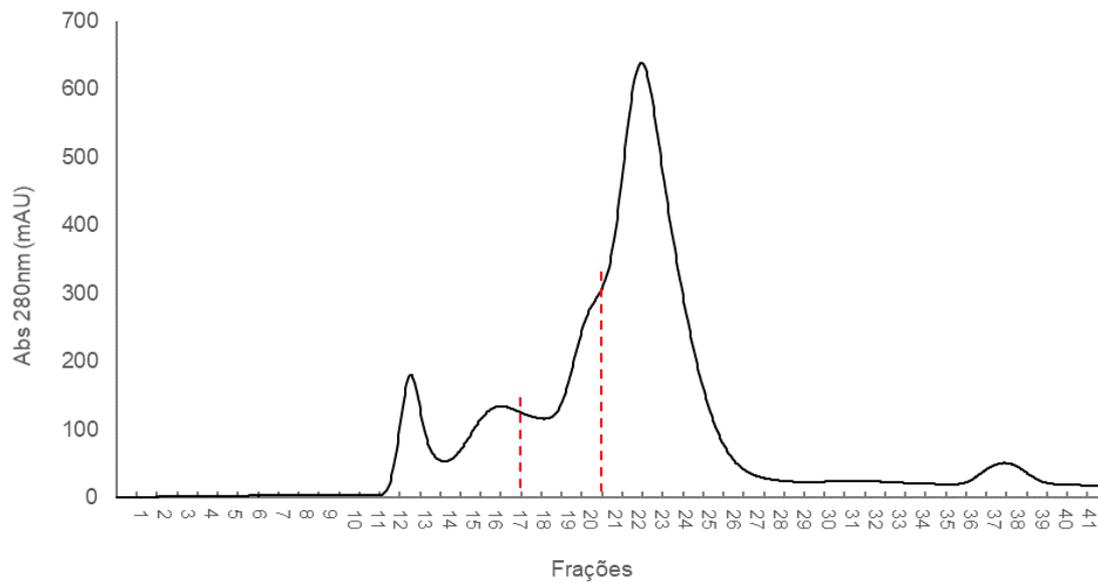
4.5 Avaliação da atividade funcional das variantes polimórficas do FH

Com a finalidade de conhecer o efeito das variantes polimórficas do SCR 7 (rs1061170) e SCR 18 (rs55679475, rs55771831 e rs62625015) na interação do FH com a *L. interrogans*, visando que o fortalecimento desta interação pudesse potencializar a evasão da bactéria ao SC, a interação do FH com a bactéria foi avaliada por citometria de fluxo. Inicialmente foi empregado soro humano normal como fonte de FH, entretanto ligações inespecíficas observadas entre o soro e os anticorpos, direcionaram nossa estratégia para purificar o FH sérico contendo as variantes polimórficas do SCR 7 e 18. Igualmente, considerando que os polimorfismos do FH pudessem afetar a sua interação com células do hospedeiro e alterar sua capacidade de controlar a ativação do complemento na superfície celular foi avaliada a interação do FH com células HepG2 por citometria de fluxo e a atividade de cofator do FH por Western-Blot.

4.5.1 Purificação de FH a partir de soro de indivíduos saudáveis.

Após a precipitação da fração de euglobulina do soro e sua ressolubilização, seguiram-se duas etapas de purificação por cromatografia em coluna. O cromatograma da primeira etapa de purificação por gel filtração em coluna Superdex-200 pode ser visualizado na **Figura 14**.

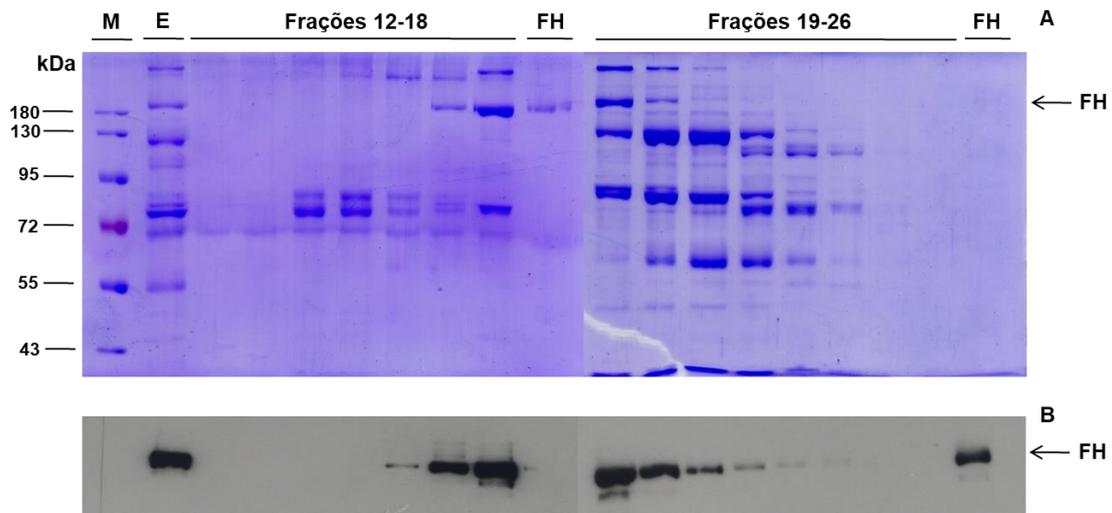
Figura 14 - Cromatograma da purificação do FH por gel filtração na coluna Superdex-200.



As linhas em vermelho abrangem as frações que contêm o FH, identificadas por SDS-PAGE seguido por Western-Blot.

Após a exclusão do volume morto da coluna foram coletadas frações de 5 mL cada que logo foram analisadas por SDS-PAGE e Western-Blot, para identificar quais delas continham a proteína de interesse. Foram selecionadas as frações 17 - 20 que, como se observa na **Figura 15**, são as mais representativas quanto à presença do FH (150 kDa).

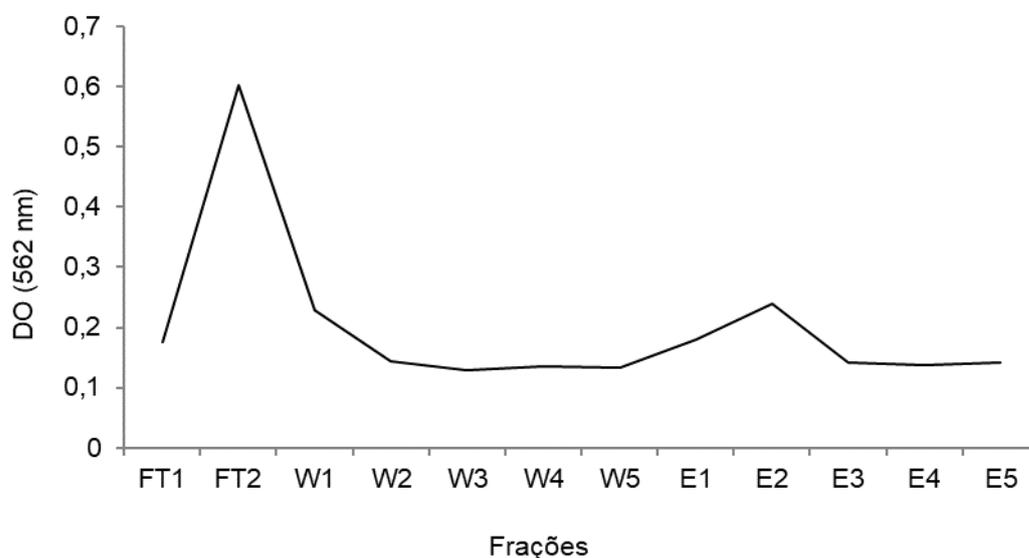
Figura 15 - Análise das frações proteicas eluídas da coluna Superdex-200, por SDS-PAGE (A) e Western-Blot (B).



(M) marcador de massa molecular (kDa) (*Page Ruler*, Thermo Fischer); (E) fração de euglobulina ressolubilizada; (FH) Fator H purificado comercial.

Estas frações foram concentradas antes de se prosseguir com a segunda etapa cromatográfica de purificação. Desta vez foi empregada uma coluna da afinidade (Sephacrose 4B-CNBr ativada, acoplada a anticorpo policlonal de cabra anti-FH humano). O FH foi eluído com uma solução de Glicina 0,1 M; pH=2,7 (**Figura 16**).

Figura 16 - Cromatograma da purificação do FH por afinidade empregando a resina Sepharose 4B-CNBr ativada, acoplada a anticorpo anti-FH humano.

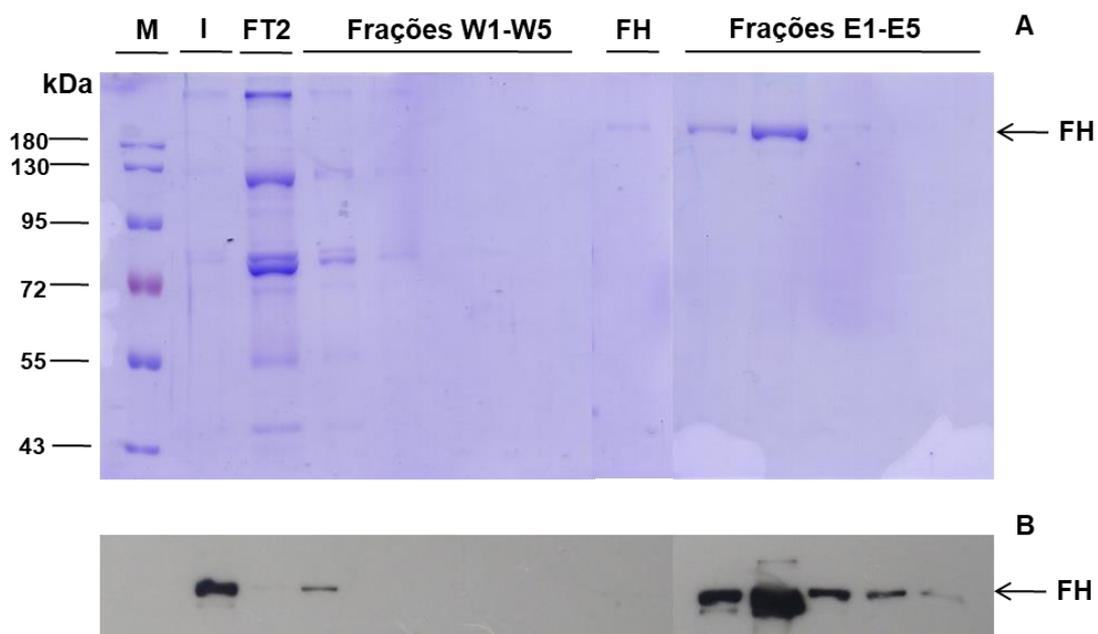


As frações FT1 e FT2 correspondem à fração de proteína não adsorvida na resina; as frações W1 a W5 correspondem a 5 lavagens cada uma realizada com tampão de equilíbrio em volume

equivalente a 3 vezes o volume da coluna; as frações E1 a E5 correspondem à eluição da proteína de interesse com tampão glicina 0,1 M; pH=2,7. Todas as frações foram analisadas por SDS-PAGE e Western-Blot.

As frações eluídas da coluna foram analisadas por Western-Blot para identificar a presença do FH. Na **Figura 17** observa-se que nem todo FH presente na amostra se adsorveu na coluna; uma pequena parte permaneceu no 'flowthrough' (fração não adsorvida), no entanto a maior parte interagiu com os anticorpos acoplados à resina e eluiu com a solução de glicina pH=2,7.

Figura 17 - Análise das frações eluídas da resina de afinidade, por SDS-PAGE (A) e Western-Blot (B).



Marcador de massa molecular (kDa) (*Page Ruler*, Thermo Fischer) (M); (I) fração concentrada proveniente da etapa anterior de purificação por gel filtração fração; (FT2) fração não adsorvida; (W1 a W5) frações correspondentes a 5 lavagens da coluna; (E1 a E5) frações correspondentes à eluição da proteína de interesse; (FH) FH purificado comercial.

4.5.2 Avaliação da interação do FH com a *L. interrogans*

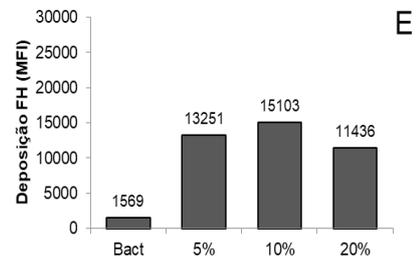
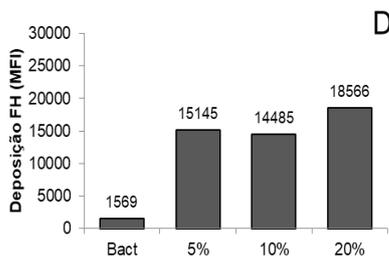
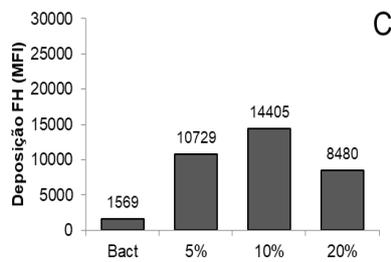
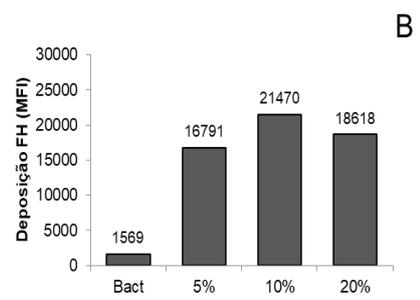
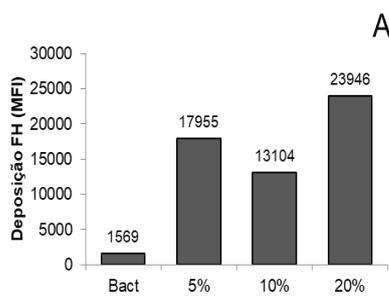
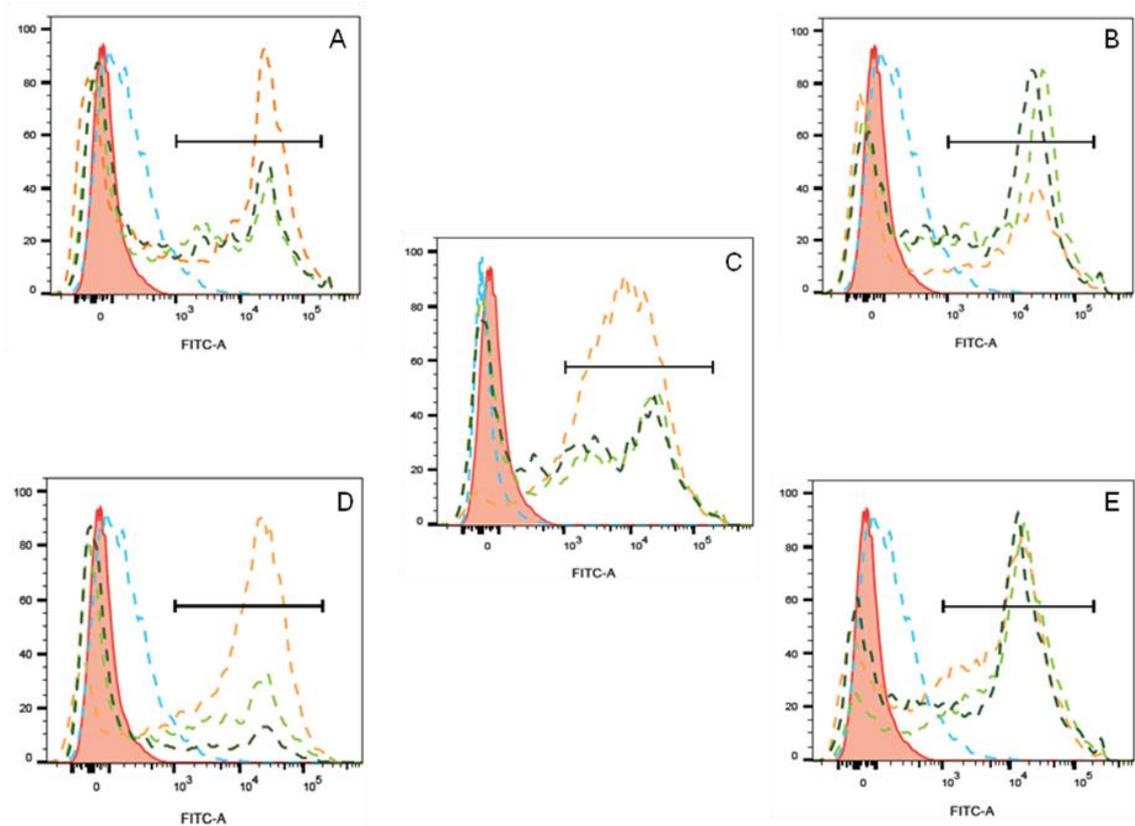
Como explicado no início da seção 4.5, o impacto das variantes polimórficas do SCR 7 (rs1061170) e SCR 18 (rs55679475, rs55772832 e rs62625015) do FH na interação com as bactérias foi avaliado por citometria de fluxo. Primeiramente serão apresentados os resultados desta interação, empregando-se soro de indivíduos saudáveis portadores destes polimorfismos como fonte de FH e depois os resultados da interação empregando FH

purificado. Soros de indivíduos que não carregam os polimorfismos foram empregados como controles.

Inicialmente foram avaliados 3 soros de indivíduos portadores dos polimorfismos e 2 de indivíduos não portadores, em três concentrações diferentes (5%, 10% e 20%). A interação dos soros com a bactéria teve um perfil heterogêneo, independentemente da presença ou não dos polimorfismos (**Figura 18**). O soro L1804 que não apresenta os polimorfismos estudados teve valores de MFI (Mediana da Intensidade de Fluorescência, do inglês - *Median Fluorescence Intensity*) muito próximos com as concentrações de 10% e 5%. Um perfil similar foi observado com o soro A1806, não houve diferenças na MFI para as concentrações de 5% e 10%. O soro T1803 que apresenta os polimorfismos não titulou, teve MFI similares em diferentes concentrações empregadas (5%, 10% e 20%). Já os soros E1802 e T1807 tiveram um perfil similar de titulação com um aumento dos valores de MFI proporcional ao aumento da concentração de soro. Entretanto, foi constatada a presença de ligações inespecíficas entre os anticorpos usados e componentes do soro, já um aumento da fluorescência foi observado em comparação ao nível basal (**Figura 19 A**), quando um soro comercial depletado de FH (*Complement Technology*) foi empregado.

Para evitar estas imprecisões e os resultados inexatos que derivam delas, o anticorpo primário policlonal anti-FH foi substituído por um anticorpo monoclonal (OX24) anti-FH; e em vez de se empregar soro, o FH foi purificado a partir do soro de indivíduos saudáveis que carregavam os polimorfismos estudados.

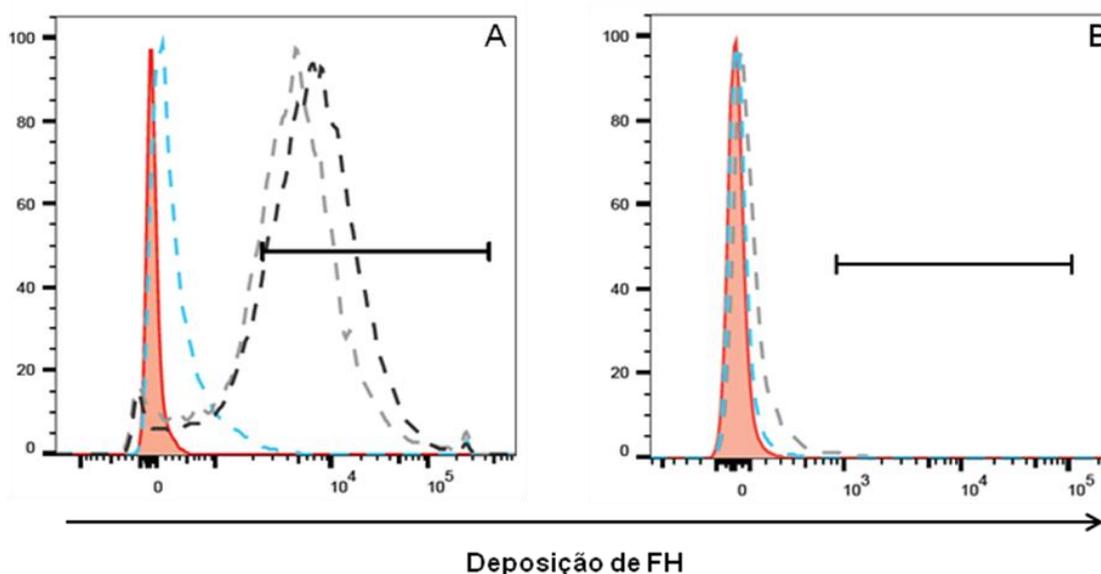
Figura 18 - Análise por citometria de fluxo da interação do FH do soro com *Leptospira*.



Culturas de $2,5 \times 10^8$ bactérias foram incubadas com soro humano normal de diferentes indivíduos 20% (---), 10% (---) e 5% (---); com o anticorpo primário policlonal anti-FH feito em cabra e secundário anti-IgG de cabra (---) ou com PBS (histograma vermelho) como controle negativo. (A) soro T1807 (polimórfico); (B) soro L1804 (não polimórfico); (C) soro A1806 (não polimórfico); (D) soro E1802 (polimórfico) e (E) soro T1803 (polimórfico). No painel inferior se representam os respectivos gráficos com os valores de MFI para cada soro.

Com os novos anticorpos não se observaram reações inespecíficas com o soro ou com a bactéria, como observado na **Figura 19 B**.

Figura 19 - Histograma representativo da interferência dos anticorpos na detecção da interação do soro com as leptospiros.

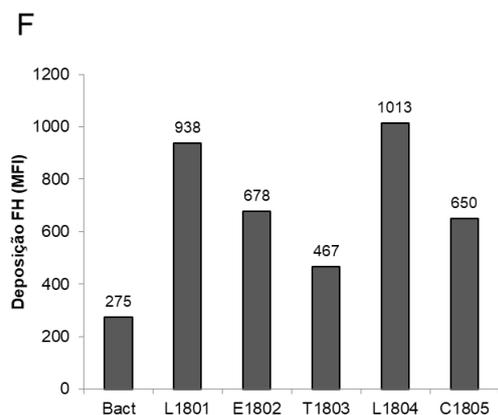
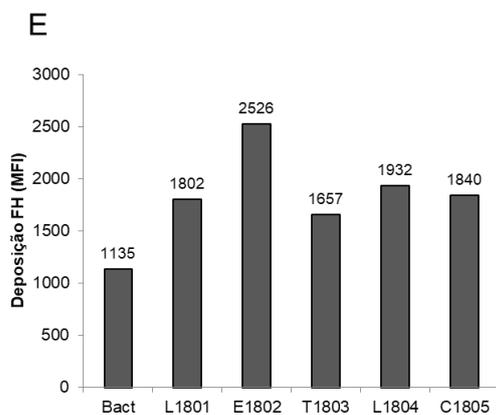
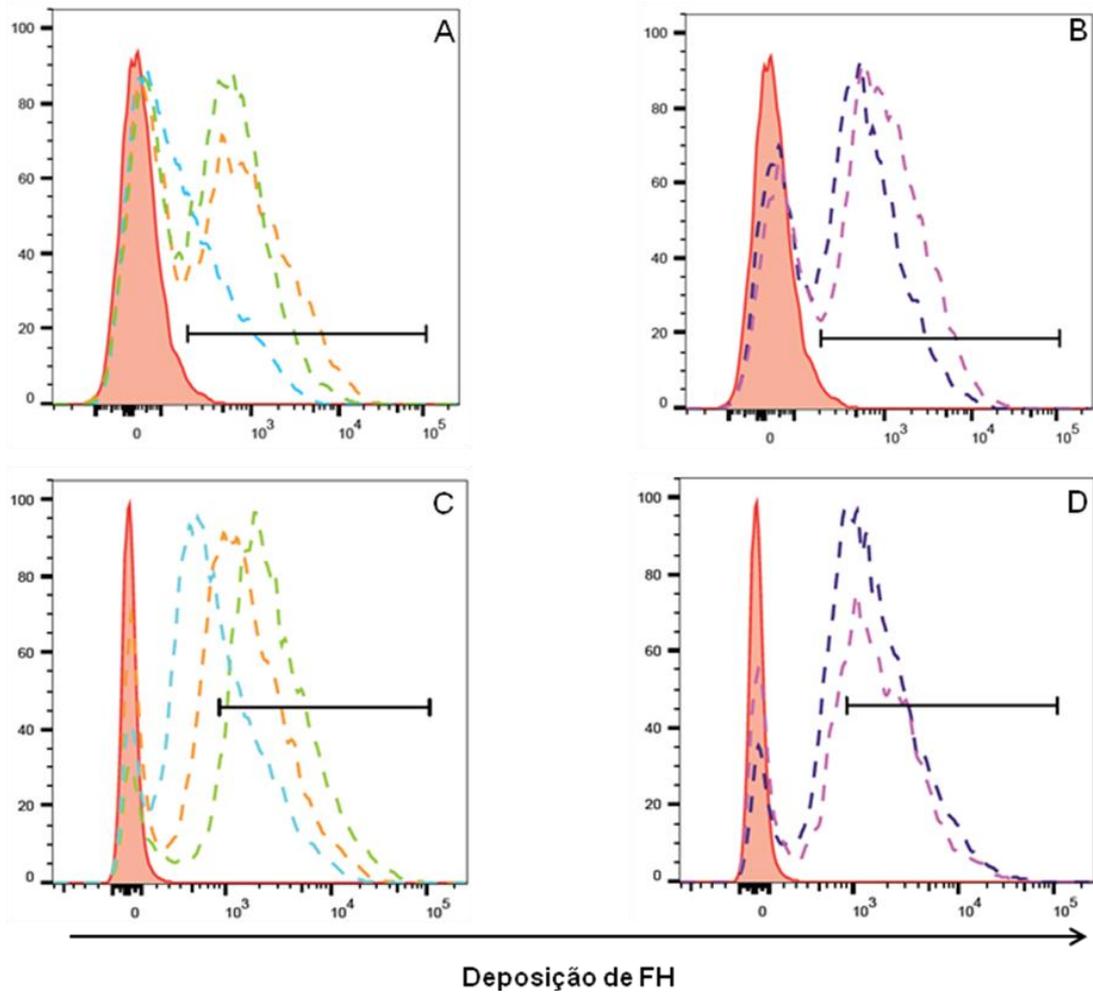


Culturas de $2,5 \times 10^8$ bactérias foram incubadas com soro humano depletado de FH: (A) 10% (---) e 5% (---) e (B) 5% (---). Como controle negativo as bactérias foram incubadas com: (A) anticorpo primário policlonal anti-FH feito em cabra e secundário anti-IgG de cabra (---); e (B) anticorpo primário monoclonal anti-FH feito em camundongo e secundário anti-IgG de camundongo (---); ou com PBS (histograma vermelho).

Prosseguiu-se então com a análise, empregando o FH purificado do soro de indivíduos que portam os polimorfismos estudados. Foram avaliadas duas concentrações de FH ($1 \mu\text{g}$ e $5 \mu\text{g}$) (**Figura 20**). Embora não foi possível realizar análises estatísticas já que não houve repetições do experimento, pode se observar que tanto com $5 \mu\text{g}$ ou $1 \mu\text{g}$ de proteína a interação das variantes polimórficas e não polimórficas com a bactéria é bastante similar. Os valores de MFI são similares entre todas as variantes. Com $1 \mu\text{g}$ de proteína as variantes polimórficas mostram um perfil mais heterogêneo na interação com a bactéria, no entanto os valores de MFI entre as variantes polimórficas e as selvagens são similares. Observa-se que a variante polimórfica T1803 (linha azul, **Figura**

20 A, C, E e F) apresenta uma tendência a se ligar menos à bactéria e este efeito é mais marcante, à medida que a concentração do FH decresce de 5 µg para 1 µg.

Figura 20 - Análise por citometria de fluxo da interação do FH com *Leptospira*.

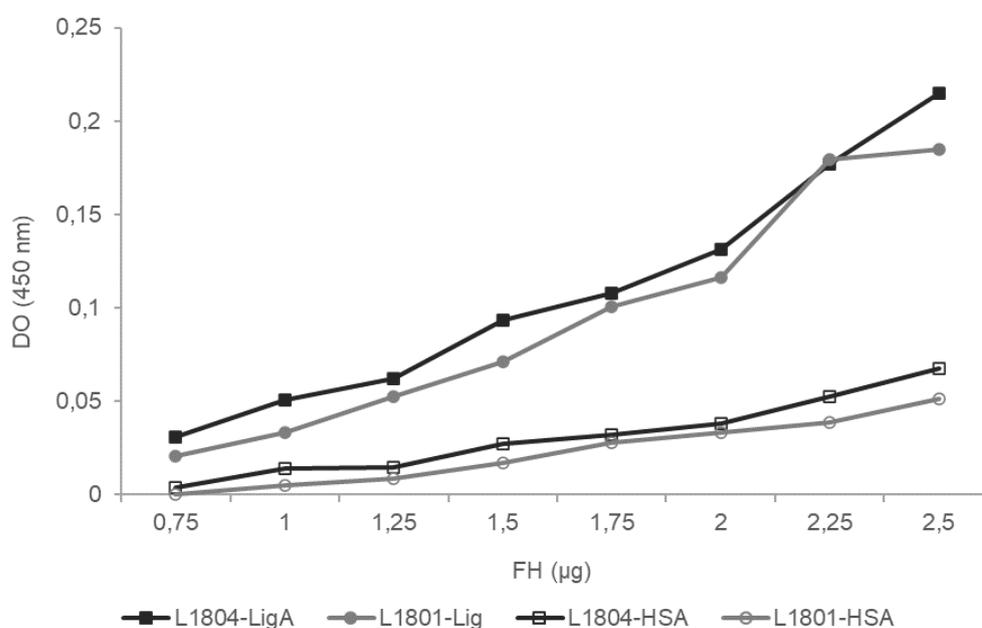


Culturas de $2,5 \times 10^8$ bactérias foram incubadas com FH 5 μ g (**A** e **B**) ou 1 μ g (**C** e **D**). A interação com as variantes polimórficas está representada em **A** e **C**: variante polimórfica L1801 (---), E1802 (---) e T1803 (---). A interação com as variantes não polimórficas está representada em **B** e **D**: variante selvagem L1804 (---) e C1805 (---). Controle negativo (histograma vermelho). No painel inferior se representam os gráficos com os valores de MFI (**E**) bactérias incubadas com FH 5 μ g (correspondente às figuras **A** e **B** do painel superior); (**F**) bactérias incubadas com FH 1 μ g (correspondente às figuras **C** e **D** do painel superior)

4.5.3 Avaliação da interação de LigAC de *L. interrogans* com FH.

É conhecido que leptospiros patogênicas interagem com FH presente no soro ¹⁴⁸. Resultados anteriores de nosso grupo demonstraram *in vitro* que as proteínas LigA e LigB, expressas na superfície das leptospiros patogênicas, participam desta interação com C4BP e FH ¹⁴⁹. Por este motivo foi avaliada também por ELISA a interação das variantes polimórficas do FH (rs1061170, rs55679475, rs55772832 e rs62625015) com um fragmento recombinante da proteína LigA. Este fragmento compreende a região C-terminal da proteína (aminoácidos 631-1225) e é chamado de LigAC. A LigAC foi imobilizada em placa e incubada com FH em diferentes concentrações (0,75 μ g – 2,5 μ g). Como controle negativo empregou-se HSA (albumina humana, do inglês - *Human Serum Albumin*).

Figura 21 - Análise da interação da proteína LigAC com as variantes polimórficas do FH por ELISA.



A proteína recombinante LigAC (0,5 μ g/mL) foi imobilizada em placa de ELISA e incubada com diferentes concentrações (0,75 a 2,5 μ g) de FH [variante polimórfica L1801 (*) ou FH variante

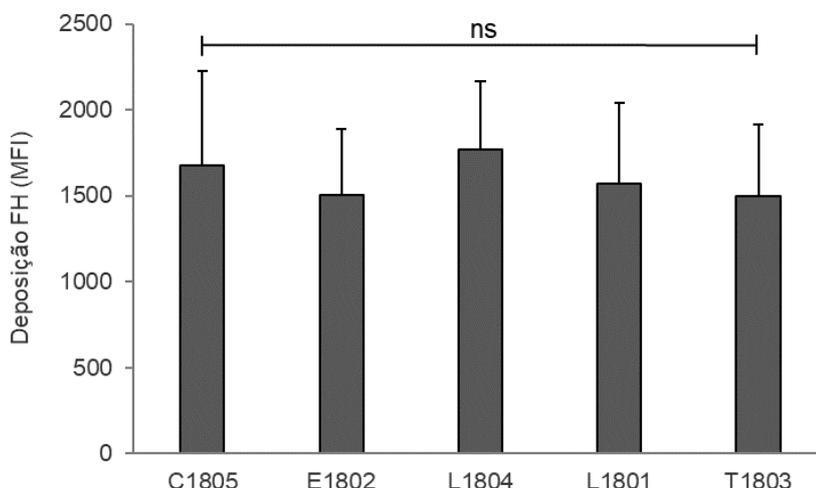
selvagem L1804 (▪)] e detectadas com anticorpos específicos. HSA foi usada como controle negativo de ligação [retângulos (L1804) e círculos (L1801) vazios]. Cada ponto representa uma média do valor de absorbância a 450 nm de 2 experimentos diferentes.

O FH interage com a LigAC de maneira dose-dependente, entretanto não há diferenças na interação com esta proteína, quando a variante polimórfica (L1801) e a variante selvagem (L1804) do FH foram usadas (**Figura 21**).

4.5.4 Avaliação da interação das variantes polimórficas do FH com células HepG2 por citometria de fluxo.

Visto que o rim e o fígado são importantes órgãos alvo na leptospirose decidimos avaliar se as variantes polimórficas presentes nos SCR 7 e 18 afetariam a interação do FH com a superfície celular e sua capacidade de controlar a ativação do complemento. Foi avaliada a interação de FH purificado do soro de indivíduos que apresentavam as variantes dos SCR 7 e 18 com a linhagem de células hepáticas humanas HepG2. A deposição do FH na superfície das células foi avaliada por citometria de fluxo.

Figura 22 - Análise por citometria de fluxo da interação do FH com a linhagem de células hepáticas humanas HepG2.



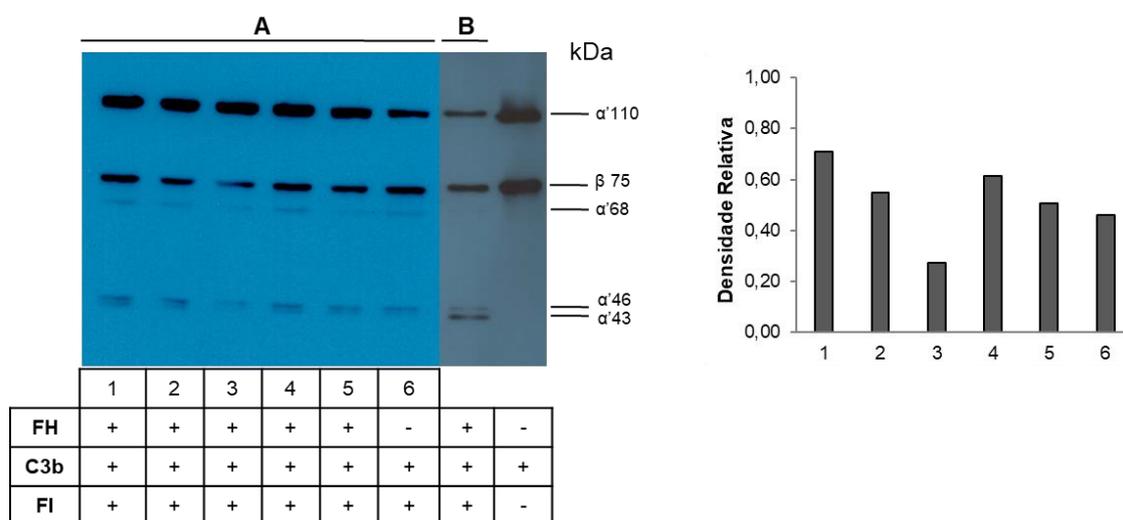
Culturas de 1×10^6 células foram incubadas com FH 5 μ g. Variantes polimórficas: E1802, L1801 e T1803. Variantes não polimórficas: C1805 e L1804. No gráfico está representada a média dos valores de mediana da intensidade de fluorescência (MFI) de três experimentos. (ns) indica diferenças não significativas, $p > 0,05$ (ANOVA fator único, teste de Tukey).

Como se observa na **Figura 22**, as variantes polimórficas L1801, E1802 e T1803 de FH têm uma tendência a interagir menos com a superfície das células do que as variantes polimórficas L1804 e C1805, no entanto não se observam diferenças significativas para as duas variantes.

4.5.4.1 Avaliação da atividade de cofator de FH ligado nas células HepG2 por Western-Blot

Após avaliar a interação do FH com a superfície das células HepG2, investigou-se se sua atividade reguladora como cofator do FI na clivagem de C3b era mantida. Para tal, as células HepG2 previamente incubadas com FH proveniente de indivíduos com ou sem as variantes polimórficas no SCR 7 e 18 foram incubadas com C3b e FI. As células HepG2 sem incubação prévia com FH foram empregadas como controle negativo, enquanto C3b incubado com FH e FI foi empregado como controle positivo da clivagem. Os fragmentos resultantes da clivagem de C3b foram analisados por *Western-Blot* com anticorpos específicos.

Figura 23 - Análise da atividade do FH ligado às células HepG2 como cofator de FI na clivagem proteolítica de C3b.



Células HepG2 foram incubadas com 5 µg de FH com ou sem as variantes polimórficas. Após várias lavagens, C3b e FI foram adicionados e incubados por 45 min. Os produtos da incubação foram submetidos à SDS-PAGE em condições redutoras, transferidos para membranas de nitrocelulose e detectados com anti-C3 policlonal. A presença de fragmentos de clivagem de C3b de 43 a 68 kDa foi observada. **(A)**: atividade de cofator de FH associado à superfície de células HepG2; **(B)**: atividade de cofator de FH em fase solúvel (controle positivo de clivagem de C3b). Variantes polimórficas de FH: L1801 (2), E1802 (3) e T1803 (5). Variantes não polimórficas de FH: L1804 (1) e C1805 (4). (6) células HepG2 em ausência de FH incubadas com C3b e FI. O gráfico à direita representa a densitometria da membrana de

Western-Blot realizada sobre as bandas α '46 e α '43. A densidade relativa foi calculada tomando como referência o controle positivo de clivagem de C3b (B).

Para as amostras correspondentes às células HepG2 incubadas com FH (linhas 1 a 5) pode-se observar a presença dos fragmentos de 68, 46 e 43 kDa gerados pela clivagem enzimática de C3b. Entretanto a intensidade da clivagem é a mesma para todas as amostras independentemente de as células terem sido incubadas ou não com as variantes '*missense*' de FH. As bandas correspondentes à clivagem de C3b foram também observadas quando as células foram incubadas com FI e C3b mesmo na ausência de FH (linha 6), o que pode ser atribuído à produção de FH pelas células HepG2 ou talvez à presença de alguma molécula produzida por HepG2 com atividade semelhante.

5. Discussão

Doenças tropicais negligenciadas, incluindo as zoonoses como a leptospirose, têm um forte impacto em países em desenvolvimento, particularmente em comunidades rurais e centros urbanos com condições de saneamento precárias. A incidência da leptospirose é subestimada devido à limitada disponibilidade de métodos diagnósticos para efetuar a vigilância epidemiológica e porque muitos dos sintomas na fase aguda são observados em outras infecções mais comuns; no entanto, sabe-se que a carga global desta doença dobrou nos últimos 15 anos (COSTA et al., 2009). Embora na maioria dos casos a infecção seja leve e autolimitada, estima-se que aproximadamente 60 000 pessoas morrem anualmente por causa da leptospirose (COSTA et al., 2009). A doença severa, também conhecida como Síndrome de Weil que acomete vários órgãos atinge entre 5 a 10% dos casos (KARPAGAM; GANESH, 2020).

Dada a natureza insidiosa da doença e seu caráter negligenciado, a identificação de populações susceptíveis, assim como pacientes em risco de desenvolver um quadro mais grave da doença constitui um grande desafio para a saúde pública.

Desde a publicação do genoma humano no início dos anos 2000 e as subsequentes avaliações da diversidade humana em nível molecular, as análises genético-epidemiológicas aumentaram de forma considerável. Sabe-se que existem aproximadamente 14 milhões de SNPs no genoma humano, dos quais 200 000 estão presentes em sequências codificadoras, demonstrando a extensa variabilidade genética e seus possíveis efeitos na susceptibilidade a doenças (PACHECO; MORAES, 2009).

O SC constitui um componente essencial do sistema imune inato e adquirido que, além de suas funções microbidas, exerce importantes funções na homeostase (depuração silenciosa das células hospedeiras após a apoptose, modulação da atividade de linfócitos T e B, eliminação de imunocomplexos, etc.). A ativação do SC pode injuriar tanto células próprias

como células alheias ao organismo. As primeiras são vulneráveis à ação do SC quando há deficiência de reguladores ou a funcionalidade destes está comprometida; já os microrganismos representam uma superfície ativadora para o SC, permitindo a deposição de seus componentes que culmina com a formação do MAC (MERLE et al., 2015). No entanto, sabe-se que microrganismos patogênicos podem evadir a ação do SC por várias estratégias, entre elas mimetizando ou interagindo com reguladores do hospedeiro como o FH, principal regulador solúvel da VA (FRAGA; ISAAC; BARBOSA, 2016).

Com este trabalho, pela primeira vez se está estudando a associação entre polimorfismos de um gene do SC e a susceptibilidade à leptospirose. Paralelamente, de forma singular, também se está avaliando a frequência, ainda desconhecida de determinados polimorfismos na região C-terminal do gene *CFH* em amostras da população argentina e brasileira.

Determinados polimorfismos no gene *CFH* têm sido associados com doenças infecciosas como a meningite. Um estudo amplo de associação genômica (GWAS, do inglês- *Genome Wide Association Study*) efetuado no Reino Unido com 475 casos e 4703 controles mostrou uma associação significativa da meningite com SNPs encontrados nos genes: *CFH* (rs1065489) e *CFHR-3* (rs426736). Estes resultados foram confirmados em duas coortes: uma do sul e oeste europeus, consistindo de 968 casos e 1376 controles (DAVILA et al., 2010); e outra da Europa Central (Alemanha, Áustria) consistindo de 248 pacientes e 835 controles (BIEBL et al., 2015). Nos três casos os autores apontam que variações genéticas nestes reguladores do SC determinam a ocorrência de doença invasiva vs colonização assintomática por *Neisseria meningitidis*.

Em um estudo na população brasileira em pacientes com dengue foi analisado o polimorfismo rs3753394 da região promotora do gene *CFH*, assim como os SNPs rs800292, rs3753396 e rs1065489 dos exon 2, 14 e 19 da região codificadora. Observou-se que pacientes que carregam o alelo polimórfico do rs3753394 (região promotora) apresentam níveis plasmáticos de

FH 20% mais elevados que aqueles que carregam o genótipo selvagem, sendo este aumento observado somente na fase de convalescência. Um haplótipo formado por este SNP e pelo rs800292 do éxon 2 confere proteção para o fenótipo grave da dengue (PASTOR et al., 2013).

No nosso estudo foram identificados sete polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no éxon 21 (rs61822181, rs35274867, rs55679475, rs35343172, rs55771831, rs62625015 e rs409953); dois no éxon 22 (rs15809 e rs777206700); e três variantes no éxon 23 (rs1485416677, rs460897 e rs460184); todos herdados em padrão de heterozigose; enquanto que nos éxons 7 e 9 foi identificado um SNP em cada (rs1061147 e 1061170, respectivamente), tanto em heterozigose como em homozigose. Igualmente foram identificados quatro polimorfismos intrônicos (rs35097611, rs34815383, rs513699 e rs36082199) e quatro variantes na região 3'UTR (rs463726, rs376577830, rs459598 e rs35742764).

O SNP identificado no SCR 5 é uma variante sinônima (rs1061147), que não altera a sequência de aminoácidos. Esta variante foi encontrada tanto em heterozigose quanto em homozigose, sendo a frequência do alelo polimórfico C maior do que o alelo selvagem A em pacientes (67,9%) e controles (69,3%).

Na literatura, este alelo selvagem A está associado com a degeneração da mácula relacionada à idade (ARMD) quando faz parte do haplótipo rs1061170, rs3753394, rs800292 e rs1329428 (TGTC), mas isoladamente não parece ter este efeito (CHEN et al., 2006). Já no SCR 7 foi identificado o rs1061170 que representa a variante Y402H onde o alelo T, de maior frequência, codifica o aminoácido Tirosina (Y); enquanto que o alelo C, mais raro na população codifica a Histidina (H). Esta variante tem sido associada com a ARMD (ZAREPARSI et al., 2005) e em menor medida com a longevidade (JYLHÄVÄ et al., 2009). Alguns autores reivindicam que os SNPs rs1061170 e rs800292, este último também no gene *CFH*, representam até 78% do risco atribuível à ARMD na população (DESPRIET et al., 2006). Em um estudo realizado na população brasileira a variante rs1061170 foi considerada um fator de risco para o desenvolvimento de ARMD (TEIXEIRA et al., 2010).

Este polimorfismo altera a especificidade e afinidade da interação do FH com GAGs e CRP na superfície celular, diminuindo a retenção do FH na superfície retinal / macular e, portanto, afetando a atividade do SC (PROSSER et al., 2007; HARRISON; MORIKIS, 2019). No nosso estudo não foi identificada nenhuma associação estatisticamente significativa dos SNPs rs1061147 e rs1061170 com a leptospirose. No entanto, estas variantes mostraram ser um fator de proteção para o desenvolvimento de manifestações clínicas como febre, dor na panturrilha e diarreia.

Cinco das variantes identificadas no SCR 18: rs61822181(T1046T), rs55679475 (Y1058H), rs55771831 (V1060L), rs62625015 (Q1076E) e rs409953 (T1097T) apresentaram uma frequência alélica maior do que a frequência alélica reportada em bases de dados genômicos. Estes resultados mostram que na população em estudo há enriquecimento dos alelos polimórficos destas variantes, mas não do genótipo polimórfico em homozigose, sugerindo que no caso das variantes '*missense*' o efeito funcional do alelo polimórfico deve ser pouco tolerado. Ao comparar a sequência do gene *CFH* contendo as variantes '*missense*': rs55679475 (Y1058H), rs55771831 (V1060L), rs62625015 (Q1076E) com outras espécies foi observado que os alelos polimórficos C e G dos rs55679475 e rs62625015, respectivamente, são mais comuns em espécies de primatos não humanos (**APÊNDICE Q**). Por outro lado, em um estudo caso-controle para avaliar a susceptibilidade à ARMD na população mexicana, a frequência alélica dos polimorfismos rs55679475, rs55771831 e rs62625015 foi similar àquela encontrada neste estudo (CONTRERAS et al., 2014). Este resultado pode estar associado com o tamanho da amostra.

A variante rs62625015 já foi observada em associação com aHUS, tendo sido identificada em dois casos esporádicos desta doença: em um deles se apresentava em heterozigose junto com uma deleção no SCR 19 que acarretava um '*frameshift*'; entretanto, os níveis de FH do paciente não foram avaliados no estudo (RICHARDS et al., 2001). Em outro paciente, esta mutação foi observada também em heterozigose, um dos progenitores era portador, e os níveis de FH eram normais (NEUMANN et al., 2003). Por outro

lado, no estudo que avaliou a susceptibilidade à ARMD na população mexicana, este SNP foi encontrado em desequilíbrio de ligação com outros 14 SNPs no gene *CFH* entre os quais as variantes rs55679475 (Y1058H), rs55771831 (V1060L), rs1061170 (Y402H), também identificadas em nosso trabalho. O haplótipo formado por estes SNPs apresentou uma maior frequência nos pacientes do que nos controles, sendo relacionado, portanto ao risco de desenvolver ARMD (CONTRERAS et al., 2014).

A variante rs35274867 (N1050Y), em um estudo em que foi associada com a aHUS, foi detectada em dois pacientes, e nos controles apresentou uma frequência alélica de 0,04 (NEUMANN et al., 2003). Em outro estudo, esta variante não foi identificada entre os pacientes, e nos controles foi encontrada em heterozigose com uma frequência genotípica de 0,06 (6/100) (RICHARDS et al., 2001). Em uma coorte pediátrica na Turquia esta variante foi detectada com uma frequência alélica de 0,01 (BESBAS et al., 2017). Este polimorfismo também foi correlacionado com doença renal em estado terminal associada à diabetes tipo 2; neste estudo o alelo polimórfico foi achado com frequência de 0,032 nos pacientes e 0,022 nos controles, com diferenças significativas entre os dois grupos ($p=0,011$) (BONOMO et al., 2014). Em outro estudo foi também encontrada em associação com o polimorfismo Y402H em um caso familiar de degeneração macular onde pai e filho eram igualmente afetados, sendo que o primeiro carregava unicamente a variante N1050Y e o segundo as duas (RAYCHAUDHURI et al., 2011). E mais recentemente foi identificado em forte desequilíbrio de ligação com outra variante no gene *CFHR4* (rs78239784) que teve uma forte associação com exantema maculopapular induzido por fármacos anti-epilépticos (McCORMACK et al., 2018).

No éxon 22 que codifica o SCR 19 foram identificados dois SNPs: o rs15809 que foi encontrado somente nos indivíduos provenientes do Brasil e o rs 777206700 encontrado apenas em um indivíduo do grupo controle. É interessante notar que o alelo G da variante rs15809 tem uma frequência de 12% na população africana e 1% na população ameríndia (www.ensembl.org). Esta observação coincide com o fato de a população brasileira ser muito heterogênea, com um alto grau de miscigenação, enquanto a população

argentina é mais homogênea com ancestralidade predominantemente europeia.

A variante rs777206700 que só foi encontrada em um indivíduo controle, altera o local de '*splicing*'. Esta alteração pode levar à síntese de uma proteína aberrante ou mesmo à sua deficiência. Como não dispúnhamos do soro deste indivíduo não foi possível avaliar o nível sérico do FH.

As três variante identificadas no SCR 20 apresentaram uma frequência genotípica de 0,6% em pacientes, não sendo detectadas nos controles. A variante rs1485416677 foi identificada em um único paciente, enquanto as variantes rs460897 e rs460184 foram detectadas simultaneamente em um mesmo paciente. As duas variantes em conjunto têm sido encontradas em pacientes com aHUS como mutações *de novo*, ou seja, não são herdadas a partir dos progenitores, indicando a conversão gênica como mecanismo provável para sua geração. Ambas diminuem a interação do FH com C3b, e também sua capacidade de controlar a ativação do SC nas superfícies celulares (HEINEN et al., 2006). Entretanto a variante rs1485416677 não tem sido associada com doenças.

Estudos prévios de nosso grupo que buscavam mapear as regiões do FH envolvidas na interação com a proteína LigA presente em leptospiros patogênicas demonstraram que os domínios SCR 5 e 20 são determinantes nesta interação (CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012), e foi sugerido que muito provavelmente os domínios SCR 6-7 e 18-19 também participam desta interação como tem sido observado para a maior parte dos ligantes bacterianos (PARENTE et al., 2017).

No intuito de saber se as variantes SNPs rs55679475, rs55772832, rs62625015 do SCR 18 e a variante rs1061170 do SCR 7 interagiriam diferentemente com suspensões de leptospiros patogênicas, experimentos de citometria de fluxo foram realizados. Não se observaram diferenças na interação com a bactéria entre as variantes carregando os polimorfismos e as variantes selvagens acima mencionados. Entretanto, deve se considerar que a molécula inteira do FH, como foi usada nestes experimentos, possui 20

domínios, sendo assim, para avaliar a contribuição da substituição de um ou três aminoácidos em um domínio particular da molécula, esta estratégia talvez não seja adequada; já que outros domínios do FH podem participar da interação, e a magnitude desta vai depender também de outras possíveis variantes presentes nesses domínios que não foram analisados neste estudo. A isto deve se somar o fato de todos os polimorfismos detectados no SCR 18 estarem em heterozigose, portanto espera-se que aproximadamente 50% dos níveis plasmáticos de FH nestes indivíduos seja do tipo selvagem e o restante do tipo polimórfico. Ao avaliar a interação do FH destes indivíduos com a bactéria, tem-se a contribuição das duas variantes, que pode estar interferindo neste resultado. A interação das variantes polimórficas do SCR 18 e SCR 7 com a proteína LigA também não mostrou diferenças em relação à variante selvagem.

O FH tem sido o regulador do SC mais extensamente estudado em associação com a aHUS. Nestes pacientes mutações encontradas no FH sabidamente afetam a interação com glicosaminoglicanos polianiônicos ou C3b, comprometendo o efeito protetor do FH sobre as células endoteliais (NESTER et al., 2015). Dado que estas mutações se concentram principalmente nos três domínios da região C-terminal que são analisados neste estudo, o impacto dos polimorfismos do FH na interação com células humanas e na atividade reguladora foi avaliado. Os polimorfismos do FH identificados neste estudo não alteraram sua interação com a linhagem de células hepáticas HepG2 nem sua atividade reguladora na superfície da célula. Em condições homeostáticas estas variantes polimórficas são inócuas, no entanto, dado que o fígado é um dos órgãos acometidos pela leptospirose, quando o hospedeiro é desafiado pela infecção, polimorfismos em proteínas reguladoras do SC como o FH podem comprometer o controle da ativação do SC e contribuir assim para a injúria tecidual.

Nosso estudo tem implícitas certas limitações. Em primeiro lugar o número de amostras de pacientes analisados pode não ser o suficientemente adequado, o que faz aumentar o risco de erro amostral e também dificulta estabelecer associações precisas com pequenos subgrupos dentro da amostra,

como por exemplo, a associação dos polimorfismos com as manifestações clínicas da doença dentro do grupo dos pacientes. Por outro lado, a seleção da população controle no contexto de doenças infecciosas não é uma tarefa simples. Estes indivíduos devem ser selecionados dentro do mesmo subgrupo populacional dos pacientes, em outras palavras eles devem ter sido expostos ao agente infeccioso em algum momento, mas não adoecem porque são menos susceptíveis. Aproximadamente, 44% das amostras de indivíduos controles analisados aqui, provêm de um banco de doadores de sangue, ou seja, são pessoas aparentemente saudáveis e das quais não se conhece o histórico de doenças e possível exposição a patógenos. Para os efeitos deste estudo, assumiu-se que os controles, especialmente aqueles com sorologia negativa, são indivíduos expostos que não se infectaram com leptospiras.

Com este estudo, pela primeira vez estão sendo identificados polimorfismos no gene *CFH* em indivíduos da população brasileira e argentina. Os resultados mostram uma distribuição similar dos SNPs identificados entre os pacientes com leptospirose e controles. No entanto, a distribuição do SNP rs34815383 teve um valor de p quase significativo antes da correção pelas variáveis de ajuste ($p=0,04247$; OR 2,41; 95% CI 0,99-5,87). Esta variante também esteve associada ao risco de desenvolver síndrome renal entre os pacientes ($p=0,001439$; OR 5,3; 95%CI 1,8-15,57). Além disso, as variantes rs1061147 A→C e rs1061170 T→C tiveram associação significativa com a febre ($p=0,04611$; OR 0,23; 95%CI 0,06-0,89); enquanto as variantes rs55679475 T→C, rs55771831 G→C e rs62625015 C→G apresentaram associação significativa com o sintoma de dor na panturrilha ($p=0,01341$; OR 0,43; 95%CI 0,22-0,85). Por outro lado, na análise funcional, não se observaram diferenças entre o FH carregando os polimorfismos nos SCRs 7 e 18 e o FH selvagem, na interação com a bactéria, nem com a linhagem celular humana HepG2.

Com os conhecimentos aqui gerados, estudos de coorte mais abrangentes permitirão confirmar fatores genéticos de susceptibilidade à leptospirose, que futuramente possibilitariam a identificação de populações susceptíveis, assim como indivíduos infectados com maior risco de desenvolver

quadros mais graves dessa doença acentuados pelo desenvolvimento de icterícia e distúrbios renais. Desta forma, tratamentos preventivos como as vacinas ou outras alternativas profiláticas poderiam ser direcionados às populações de risco. Até o momento não há qualquer estudo sobre polimorfismo gênico de FH na população brasileira e argentina em geral e este estudo poderá sanar, pelo menos em parte, esta lacuna.

6. Conclusões

Leptospiras patogênicas interagem com proteínas reguladoras do SC como o Fator H por meio dos domínios SCRs 15-20 e SCRs 5-7. Desta forma se protegem da ação do SC, conseguindo se disseminar pelo hospedeiro e estabelecer a infecção.

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar a influência de polimorfismos no gene *CFH* do SC com a susceptibilidade à leptospirose e com a gravidade da doença. Com base nos resultados obtidos podemos concluir que polimorfismos gênicos identificados no gene *CFH* nos éxons 7, 9, 21, 22, 23 e nas regiões flanqueadoras não apresentam associação estatisticamente significativa com a leptospirose.

Algumas das variantes identificadas tiveram associação com as manifestações clínicas da leptospirose. O rs34815383 apresentou associação com a síndrome renal; o rs15809 foi associado com a prostração; enquanto as variantes rs1061147 e rs1061170 tiveram associação com a febre e as variantes rs55679475, rs55771831 e rs62625015 foram associadas com dor na panturrilha.

Os polimorfismos identificados nos domínios SCR 7 e 18 do FH não alteram sua interação com a proteína LigA nem com a *Leptospira*.

Estes polimorfismos também não alteraram a interação do FH com células do hospedeiro, utilizando como modelo a linhagem celular hepática HepG2, nem sua atividade reguladora na superfície da célula.

Este estudo mostrou pela primeira vez a distribuição de polimorfismos do gene *CFH* nos éxons 7, 9, 21, 22 e 23 na população brasileira e argentina.

REFERÊNCIAS ¹

ADLER, B. History of Leptospirosis and *Leptospira*. In:_____. **Leptospira and Leptospirosis**. Current Topics in Microbiology and Immunology. (eds) Berlin, Heidelberg: Springer, 2015a. v. 387.doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_1

ADLER B. Vaccines Against Leptospirosis. In:_____. **Leptospira and Leptospirosis**. Current Topics in Microbiology and Immunology. (eds). Berlin, Heidelberg: Springer, 2015b. v. 387.doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_10

ALBERTÍ, S.; MARQUÉS, G.; HERNÁNDEZ-ALLÉS, S.; RUBIRES, X.; TOMÁS, J.M.; VIVANCO, F.; BENEDÍ, V.J. Interaction between complement subcomponent C1q and the *Klebsiella pneumoniae* porin OmpK36. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 4719–4725, 1996. 10.1128/iai.64.11.4719-4725.1996.

ANDREWS, P.W.; KNOWLES, B.B.; PARKAR, M.; PYM, B.; STANLEY, K.; GOODFELLOW, P.N. A human cell-surface antigen defined by a monoclonal antibody and controlled by a gene on human chromosome 1. **Ann. Hum. Genet.**, v. 49, n. 1, p. 31–39, 1985. doi: 10.1111/j.1469-1809.1985.tb01673.x.

AREAN, V.M. The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). **Am. J. Pathol.**, v. 40, n. 4, p. 393-423, 1962.

ATEFI, G.; AISIKU, O.; SHAPIRO N, HAUSER, C.; DALLE LUCCA, J.; FLAUMENHAFT, R.; TSOKOS, G.C. Complement activation in trauma patients alters platelet function. **Shock**, v. 46, n. 3, p. 83-88, 2016. Supplement 1. doi: 10.1097/SHK.0000000000000675.

AULT, B.H.; SCHMIDT, B.Z.; FOWLER, N.L.; KASHTAN, C.E.; AHMED, A.E.; VOGT, B.A.; COLTEN, H.R. Human factor H deficiency. Mutations in framework cysteine residues and block in H protein secretion and intracellular catabolism. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 40, p. 25168-25175, 1997. doi: 10.1074/jbc.272.40.25168.

AVDEEVA, M.G.; MOISOVA, D.L.; GORODIN, V.N.; KOSTOMAROV, A.M.; ZOTOV, S.V.; CHERNIAVSKAIA, O.V. The role glucose-6-phosphate dehydrogenase in pathogenesis of anemia in leptospirosis. (Russian in original). **Klin. Med. (Mosk.)**, v. 80, n. 6, p. 42–44, 2002.

BARBOSA, A.S.; ABREU, P. A. E.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; GONÇALES, A. P.; SILVA, A. S.; DAHA, M.R.; ISAAC. L. Immune evasion of leptospira species by acquisition of human complement regulator C4BP. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 3, p. 1137-1143, 2009. doi: 10.1128/IAI.01310-08.

BARBOSA, A.S.; MONARIS, D.; SILVA, L.B.; MORAIS, Z.M.; VASCONCELLOS, S.A.; CIANCIARULLO, A.M.; ISAAC, L.; ABREU, P.A. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. **Infect. Immun.**, v. 78, n. 7, p. 3207-3716, 2010. doi: 10.1128/IAI.00279-10.

¹ De acordo com a associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

BARILLA-LABARCA, M.L.; LISZEWSKI, M.K.; LAMBRIS, J.D.; HOURCADE, D.; ATKINSON, J.P. Role of membrane cofactor protein (CD46) in regulation of C4b and C3b deposited on cells. **J. Immunol.**, v. 168, n. 12, p. 6298–6304, 2002. doi: 10.4049/jimmunol.168.12.6298.

BERGER, B.E. The alternative pathway of complement and the evolving clinical-pathophysiological spectrum of atypical hemolytic uremic syndrome. **Am. J. Med. Sci.**, v. 352, n. 2, p. 177–190, 2016. doi: 10.1016/j.amjms.2016.05.003.

BESBAS N.; GULHAN, B.; SOYLEMEZOGLU, O.; OZCAKAR, Z. B.; KORKMAZ, E.; HAYRAN, M.; OZALTIN, F. Turkish pediatric atypical hemolytic uremic syndrome registry: initial analysis of 146 patients. **BMC Nephrol.**, v. 18, n. 1, 2017. doi: 10.1186/s12882-016-0420-6.

BHAKDI, S.; KULLER, G.; MUHLY, M.; FROMM, S.; SEIBERT, G.; PARRISIUS, J. Formation of transmural complement pores in serum-sensitive *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 55, n. 1, p. 206–210, 1987. doi: 10.1128/iai.55.1.206-210.1987.

BHARTI, A.R.; NALLY, J.E.; RICARDI, J.N.; MATTHIAS, M.A.; DIAZ, M.M.; LOVETT, M.A.; LEVETT, P.N.; GILMAN, R.H.; WILLIG, M.R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J.M.; PERU-UNITED STATES LEPTOSPIROSIS CONSORTIUM. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect. Dis.**, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003. doi: 10.1016/s1473-3099(03)00830-2.

BIEBL, A.; MUENDLEIN, A.; KINZ, E.; DREXEL, H.; KABESCH, M.; ZENZ, W.; ELLING, R.; MÜLLER, C.; KEIL, T.; LAU, S.; SIMMA, B. Confirmation of host genetic determinants in the *CFH* region and susceptibility to meningococcal disease in a Central European study sample. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 34, n. 10, p. 1115-1117, 2015. doi: 10.1097/INF.0000000000000823.

BLOM, A.M.; KASK, L.; DAHLBÄCK, B. Structural requirements for the complement regulatory activities of C4BP. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 29, p. 27136–27144, 2001. doi: 10.1074/jbc.M102445200.

BLOM, A.M.; WEBB, J.; VILLOUTREIX, B.O.; DAHLBÄCK, B. A cluster of positively charged amino acids in the C4BP alpha-chain is crucial for C4b binding and factor I cofactor function. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 27, p. 19237–19245, 1999. doi: 10.1074/jbc.274.27.19237.

BONOMO, J.A.; PALMER, N.D.; HICKS, P.J.; LEA, J.P.; OKUSA, M.D.; LANGEFELD, C.D.; BOWDEN, D.W.; FREEDMAN, B.I. Complement factor H gene associations with end-stage kidney disease in African Americans. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 29, n. 7, p. 1409-1414, 2014. doi: 10.1093/ndt/gfu036.

BROWN, E.J.; SCHLONDORFF, J.S.; BECKER, D.J.; TSUKAGUCHI, H.; TONNA, S.J.; USCINSKI, A.L.; HIGGS, H.N.; HENDERSON, J.M.; POLLAK, M.R. Mutations in the formin gene *INF2* cause focal segmental glomerulosclerosis. **Nat. Genet.**, v. 42, n. 1, p. 72-76, 2010. doi: 10.1038/ng.505.

BU, F.; MAGA, T.; MEYER, N.C.; WANG, K.; THOMAS, C.P.; NESTER, C.M.; SMITH, R.J. Comprehensive genetic analysis of complement and coagulation genes in atypical hemolytic uremic syndrome. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 25, n. 1, p. 55-64, 2014. doi: 10.1681/ASN.2013050453

BUBECK, D. The making of a macromolecular machine: assembly of the membrane attack complex. **Biochem.**, v. 53, n. 12, p. 1908-1915, 2014. doi: 10.1021/bi500157z.

CANTSILIERIS, S.; NELSON, B. J.; HUDDLESTON, J.; BAKER, CARL.; HARSHMAN, L.; PENEWIT, K.; MUNSONA, K. M.; SORENSEN, M.; WELCH, A. E.; DANG, VY.; GRASSMANN, F.; RICHARDSON, A. J.; GUYMERD, R. H.; GRAVES-LINDSAY, T. A.; WILSON, R. K.; WEBER, B. H. F.; BAIRD, P. N.; ALLIKMETSH, R.; EICHLER, E. E. Recurrent structural variation, clustered sites of selection, and disease risk for the complement factor H (*CFH*) gene family. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 115, n. 19, p. 4433-4442, 2018. doi: 10.1073/pnas.1717600115.

CARSON, S.D.; JOHNSON, D.R. Consecutive enzyme cascades: complement activation at the cell surface triggers increased tissue factor activity. **Blood**, v. 76, n. 2, p. 361-367, 1990.

CASTIBLANCO-VALENCIA, M.M.; FRAGA, T.R.; SILVA, L.B.; MONARIS, D.; ABREU, P.A.; STROBEL, S.; JÓZSI, M.; ISAAC, L.; BARBOSA, A.S. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. **J. Infect. Dis.**, v. 205, n. 6, p. 995-1004, 2012. doi: 10.1093/infdis/jir875.

CASTIBLANCO-VALENCIA. M.M.; FRAGA, T.R.; PAGOTTO, A.H.; DE TOLEDO SERRANO, S.M.; ABREU, P.A.; BARBOSA, A.S.; ISAAC, L. Plasmin cleaves fibrinogen and the human complement proteins C3b and C5 in the presence of *Leptospira interrogans* proteins: a new role of LigA and LigB in invasion and complement immune evasion. **Immunobiol.**, v. 221, n. 5, p. 679–689, 2016. doi: 10.1016/j.imbio.2016.01.001.

CÉDOLA, M.; CHIANI, Y.; PRETTE, G.; ALBERDI, L.; VANASCO, B.; GÓMEZ. R. M. Association of Toll-like receptor 2 Arg753Gln and Toll-like receptor 1 Ile602Ser single-nucleotide polymorphisms with leptospirosis in an argentine population. **Acta Trop.**, v.146, p. 73–80, 2015. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.03.007.

CHALLIS, R.C.; RING, T.; XU, Y.; WONG, E.K.; FLOSSMANN, O.; ROBERTS, I.S.; AHMED, S.; WETHERALL, M.; SALKUS, G.; BROCKLEBANK, V.; FESTER, J.; STRAIN, L.; WILSON, V.; WOOD, K.M.; MARCHBANK, K.J.; SANTIBANEZ-KOREF, M.; GOODSHIP, T.H.; KAVANAGH, D. Thrombotic microangiopathy in inverted formin 2-mediated renal disease. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 28, n. 4, p. 1084-1091, 2017. doi: 10.1681/ASN.2015101189.

CHEN, L.J.; LIU, D.T.; TAM, P.O.; CHAN, W.M.; LIU, K.; CHONG, K.K.; LAM, D.S.; PANG, C.P. Association of complement factor H polymorphisms with exudative age-related macular degeneration. **Mol. Vis.**, v. 12, p. 1536-1542, 2006.

CHEN, Q.; WIESENER, M.; EBERHARDT, H.U.; HARTMANN, A.; UZONYI, B.; KIRSCHFINK, M.; AMANN, K.; BUETTNER, M.; GOODSHIP, T.; HUGO, C.; SKERKA, C.; ZIPFEL, P.F. Complement factor H-related hybrid protein deregulates complement in dense deposit disease. **J. Clin. Invest.**, v. 124, n. 1, p. 145–155, 2014. doi: 10.1172/JCI71866.

CHERUKURI, A.; CHENG, P.C.; PIERCE, S.K. The role of the CD19/CD21 complex in B cell processing and presentation of complement-tagged antigens. **J. Immunol.**, v. 190, n. 1, p.163–172, 2001. doi: 10.4049/jimmunol.167.1.163.

CLARK, S. J.; RIDGE, L. A.; HERBERT, A. P.; HAKOBYAN, S.; MULLOY, B.; LENNON, R.; WÜRZNER, R.; MORGAN, B. P.; UHRÍN, D.; BISHOP, P. N.; DAY, A. J. Tissue-specific host recognition by complement factor H is mediated by differential activities of its glycosaminoglycan-binding regions. **J. Immunol.**, v. 190, n. 5, p. 2049–2057, 2013. doi: 10.4049/jimmunol.1201751.

CONRAD, N. L.; MCBRIDE, F. W. C.; SOUZA, J. D.; SILVEIRA, M. M.; FÉLIX S.; MENDONÇA, K. S.; SANTOS, C. S.; ATHANAZIO, D.A.; MEDEIROS, M. A.; REIS, M. G.; DELLAGOSTIN, O. A., MCBRIDE, A. J. A. LigB subunit vaccine confers sterile immunity against challenge in the hamster model of leptospirosis. **PLOS Negl. Trop. Dis.**, v. 11, n. 3, 2017. doi.org/10.1371/journal.pntd.0005441.

CONTRERAS, A.V.; ZENTENO, J.C.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.C.; RODRÍGUEZ-CORONA, U.; FALFÁN-VALENCIA, R.; SEBASTIAN, L.; MORALES, F.; OCHOA-CONTRERAS, D., CARNEVALE, A.; SILVA-ZOLEZZI, I. *CFH* haplotypes and *ARMS2*, *C2*, *C3*, and *CFB* alleles show association with susceptibility to age-related macular degeneration in Mexicans. **Mol. Vis.**, v. 20, p. 105-116, 2014.

COOK, H.T.; PICKERING, M.C. Histopathology of MPGN and C3 glomerulopathies. **Nat. Rev. Nephrol.**, v. 11, n. 1, p. 14–22, 2015. doi: 10.1038/nrneph.2014.217.

CORDOBA, S.R.; GOICOCHEA DE JORGE, E. Translational mini-review series on complement Factor H: genetics and disease associations of human complement Factor H. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 151, n. 1, p.1-13, 2008. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03552.x.

COSTA, F.; HAGAN, J.E.; CALCAGNO, J.; KANE, M.; TORGERSON, P.; MARTINEZ-SILVEIRA, M.S.; STEIN, C.; ABELA-RIDDER, B.; KO, A.I. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 9, n. 9, 2015. doi:10.1371/journal.pntd.0003898.

D'AGATI, V.D.; BOMBACK, A.S. C3 glomerulopathy: what's in a name? **Kidney Int.**, v. 82, n. 4, p. 379–381, 2012. doi: 10.1038/ki.2012.80.

DA SILVA, L.B.; MIRAGAIA, L.S.; BREDA, L.C.; ABE, C.M.; SCHMIDT, M.C.; MORO, A.M.; MONARIS, D.; CONDE, J.N.; JÓZSI, M.; ISAAC, L.; ABREU, P.A.; BARBOSA, A.S. Pathogenic *Leptospira* species acquire factor H and vitronectin via the surface protein LcpA. **Infect. Immun.**, v. 83, n. 3, p. 888–897, 2015. doi: 10.1128/IAI.02844-14.

DAHA, M.R.; VAN ES, L.A. Stabilization of homologous and heterologous cell bound amplification convertases, C3bBb, by C3 nephritic factor. **Immunol.**, v. 43, n. 1, p. 33–38, 1981.

DAHLBÄCK, B.; SMITH, C.A.; MÜLLER-EBERHARD, H.J. Visualization of human C4b-binding protein and its complexes with vitamin K-dependent protein S and complement protein C4b. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 80, n. 11, p. 3461–3465, 1983. doi: 10.1073/pnas.80.11.3461.

DAVILA, S.; WRIGHT, V.J.; KHOR, C.C.; SIM, K.S.; BINDER, A.; BREUNIS, W.B.; INWALD, D.; NADEL, S.; BETTS, H.; CARROL, E.D.; DE GROOT, R.; HERMANS, P.W.; HAZELZET, J.; EMONTS, M.; LIM, C.C.; KUIJPERS, T.W.; MARTINON-TORRES, F.; SALAS, A.; ZENZ, W.; LEVIN, M.; HIBBERD, M.L.; INTERNATIONAL MENINGOCOCCAL GENETICS CONSORTIUM. Genome-wide association study identifies variants in the *CFH* region associated with host susceptibility to meningococcal disease. **Nat. Genet.**, v. 42, n. 9, p. 772-776, 2010. doi: 10.1038/ng.640.

DAVIS, A.E.; HARRISON, R.A.; LACHMANN, P.J. Physiologic inactivation of fluid phase C3b: isolation and structural analysis of C3c, C3d,g (alpha 2D), and C3g. **J. Immunol.**, v. 132, n. 4, p.1960–1966, 1984.

DAVIS, A.E.; LU, F.; MEJIA, P. C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. **Thromb. Haemost.**, v. 104, n. 5, p. 886-893, 2010. doi: 10.1160/TH10-01-0073.

DELANGHE, J.; SPEECKAERT, M.; DE BUYZERE, M.L.; LANGLOIS, M.; TORCK, M. Human plasma protein polymorphisms and the persistence of cultural diversity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 109, n. 43, 2012; E2914. doi: 10.1073/pnas.1211000109.

DELVAEYE, M.; NORIS, M.; DE VRIESE, A.; ESMON, C.T.; ESMON, N.L.; FERRELL, G.; DEL-FAVERO, J.; PLAISANCE, S.; CLAES, B.; LAMBRECHTS, D.; ZOJA, C.; REMUZZI, G.; CONWAY, E.M. Thrombomodulin mutations in atypical hemolytic-uremic syndrome. **N. Engl. J. Med.**, v. 361, n. 4, p: 345-357, 2009. doi: 10.1056/NEJMoa0810739.

DESPRIET, D.D.; KLAVER, C.C.; WITTEMAN, J.C.; BERGEN, A.A.; KARDYS, I.; DE MAAT, M.P.; BOEKHOORN, S.S.; VINGERLING, J.R.; HOFMAN, A.; OOSTRA, B.A.; UITTERLINDEN, A.G.; STIJNEN, T.; VAN DUIJN, C.M.; DE JONG, P.T. Complement factor H polymorphism, complement activators, and risk of age-related macular degeneration. **JAMA.** v. 296, n. 3, p. 301-309, 2006. doi: 10.1001/jama.296.3.301.

DRAGON-DUREY, M.A.; FRÉMEAUX-BACCHI, V.; LOIRAT, C.; BLOUIN, J.; NIAUDET, P.; DESCHENES, G.; COPPO, P.; HERMAN FRIDMAN, W.; WEISS, L. Heterozygous and homozygous Factor H deficiencies associated with hemolytic uremic syndrome or membranoproliferative glomerulonephritis: report and genetic analysis of 16 cases. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 15, n. 3, p. 787-795, 2004. doi: 10.1097/01.asn.0000115702.28859.a7.

ENSEMBL GENOME BROWSER. Yates, A.D.; Achuthan, P.; Akanni, W.; Allen, J.; Allen, J. Alvarez-Jarreta, J.; Amode, M. R.; Armean, I.M.; Azov, A.G.; Bennett, R.; Bhai, J.; Billis, K.; Boddur, S.; Marugán, J. C.; Cummins, C.; Davidson, C.; Dodiya, K.; Fatima, R.; Gall, A.; Garcia-Girón, C.; Gil, L.; Grego, T.; Haggerty, L.; Haskell, E.; Hourlier, T.; Izuogu, O.G.; Janacek, S. H. et al., 2020. doi:10.1093/nar/gkz966. Disponível em: <www.ensembl.org>. Acesso em: 22 abr 2021.

ESTEVEZ, L.M.; BULHOES, S.M.; BRANCO, C.C.; MOTA, F.M.; PAIVA, C.; CABRAL, R.; VIEIRA, M.L.; MOTA-VIEIRA, L. Human leptospirosis: seroreactivity and genetic susceptibility in the population of Sao Miguel Island (Azores, Portugal). **PLoS One**, v. 9, n. 9: e108534, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0108534.

FAINE S., et al. (Ed.) **Leptospira and Leptospirosis**. 2nd ed. Melbourne: Medisci Press, 1999.

FERREIRA DE PAULA, P.; DE PAULA, P. F.; BARBOSA, J. E.; FERRIANI, V. P. L.; JUNIOR, P. R.; NUDELMAN, V.; LATORRE, M. R. D. O.; ISAAC, L. Ontogeny of complement regulatory proteins: concentrations of Factor H, Factor I, C4b binding protein, properdin and vitronectin in healthy children of different age and in adults. **Scand. J. Immunol.**, v. 58, n. 5, p. 572-577, 2003. doi: 10.1046/j.1365-3083.2003.01326.x.

FIALHO, R.N.; MARTINS, L.; PINHEIRO, J.P.; BETTENCOURT, B.F.; COUTO, A.R.; SANTOS, M.R.; PEIXOTO, M.J.; GARRETT, F.; LEAL, J.; TOMÁS, A.M.; BRUGES-ARMAS J. Role of human leukocyte antigen, killer-cell immunoglobulin-like receptors, and cytokine gene polymorphisms in leptospirosis. **Hum. Immunol.**, v. 70, n. 11, p. 915–920, 2009. doi: 10.1016/j.humimm.2009.08.007.

FORNERIS, F.; RICKLIN, D.; WU, J.; TZEKOU, A.; WALLACE, R.S.; LAMBRIS, J.D.; GROS, P. Structures of C3b in complex with factors B and D give insight into complement convertase formation. **Science**, v. 330, n. 6012, p. 1816-1820, 2010. doi: 10.1126/science.1195821.

FOUTS, D.E.; MATTHIAS, M.A.; ADHIKARLA, H.; ADLER, B.; AMORIM-SANTOS, L.; BERG, D.E.; BULACH, D.; BUSCHIAZZO, A.; CHANG, Y.F.; GALLOWAY, R.L.; HAAKE, D.A.; HAFT, D.H.; HARTSKEERL, R.; KO, A.I.; LEVETT, P.N.; MATSUNAGA, J.; MECHALY, A.E.; MONK, J.M.; NASCIMENTO, A.L.; NELSON, K.E.; PALSSON, B.; PEACOCK, S.J.; PICARDEAU, M.; RICARDI, J.N.; THAIPANDUNGPANIT, J.; WUNDER, E.A.; YANG, X.F.; ZHANG, J.J.; VINETZ, J.M. What makes a bacterial species pathogenic?: comparative genomic analysis of the genus *Leptospira*. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 10, n. 2: e0004403, 2016, doi: 10.1371/journal.pntd.0004403.

FRAGA, T.R.; COURROL, D.S.; CASTIBLANCO-VALENCIA, M.M.; HIRATA, I.Y.; VASCONCELLOS, S.A.; JULIANO, L.; BARBOSA, A.S.; ISAAC, L. Immune evasion by pathogenic *Leptospira* strains: the secretion of proteases that directly cleave complement proteins. **J. Infect. Dis.**, v. 209, n. 6, p. 876–886, 2014. doi: 10.1093/infdis/jit569.

FRAGA, T.R.; ISAAC, L.; BARBOSA, A.S. Complement evasion by pathogenic *Leptospira*. **Front. Immunol.**, v. 7:623, 2016. doi: 10.3389/fimmu.2016.00623.

FREMEAUX-BACCHI, V.; FAKHOURI, F.; GARNIER, A.; BIENAIMÉ, F.; DRAGON-DUREY, M.A.; NGO, S.; MOULIN, B.; SERVAIS, A.; PROVOT, F.; ROSTAING, L.; BURTEY, S.; NIAUDET, P.; DESCHÊNES, G.; LEBRANCHU, Y.; ZUBER, J.; LOIRAT, C. Genetics and outcome of atypical hemolytic uremic syndrome: a nationwide French series comparing children and adults. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 8, n. 4, p. 554-562, 2013. doi: 10.2215/CJN.04760512.

GABORIAUD, C.; TEILLET, F.; GREGORY, L. A.; THIELENS, N. M.; ARLAUD, G. J. Assembly of C1 and the MBL- and ficolin-MASP complexes: structural insights. **Immunobiol.**, v. 212, p. 279-88, 2007. doi: 10.1016/j.imbio.2006.11.007.

GABORIAUD, C.; LING, W.L.; THIELENS, N.M.; BALLY, I.; ROSSI, V. Deciphering the fine details of C1 assembly and activation mechanisms: "mission impossible"? **Front. Immunol.** v. 5, 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00565.

GALLOWAY, R. L.; LEVETT, P.N. Application and validation of PFGE for serovar identification of *Leptospira* clinical isolates. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 9:e824, 2010. doi: 10.1371/journal.pntd.0000824.

GANCHEVA, G.I. Liver involvement in leptospirosis. **Int. J. Infect. Dis. Ther.**, v. 1, n. 1, p. 6-12, 2016. doi: 10.11648/j.ijid.20160101.12.

GOICOCHEA DE JORGE, E.; CAESAR, J.J.; MALIK, T.H.; PATEL, M.; COLLEDGE, M.; JOHNSON, S.; HAKOBYAN, S.; MORGAN, B.P.; HARRIS, C.L.; PICKERING, M.C.; LEA, S.M. Dimerization of complement Factor H-related proteins modulates complement activation in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 110, n. 12, p. 4685–4690, 2013. doi: 10.1073/pnas.1219260110.

GONZÁLEZ, J.R.; ARMENGOL, L.; SOLÉ, X.; GUINÓ, E.; MERCADER, J.M.; ESTIVILL, X.; MORENO, V. SNPAssoc: an R package to perform whole genome

association studies. **Bioinformatics**, v. 23, n. 5, p. 654-655, 2007. doi: 10.1093/bioinformatics/btm025.

GOUVEIA, E.L.; METCALFE, J.; DE CARVALHO, A.L.F.; AIRES, T.S.F.; VILLALOBOS-BISNETO, J.C.; QUEIROZ, A.; SANTOS, A.C.; SALGADO, K.; REIS, M.G.; KO, A.I. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhage syndrome, Salvador, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 14, n. 3, p. 505-508, 2008. doi: 10.3201/eid1403.071064.

HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N. Leptospirosis in Humans. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 387, p. 65-97, 2015. doi: 10.1007/978-3-662-45059-8_5.

HAAS, P.J.; van STRIJP, J. Anaphylatoxins: their role in bacterial infection and inflammation. **Immunol. Res.**, v. 37, n. 3, p. 161-175, 2007. doi: 10.1007/BF02697367.

HARRIS, C.L.; PETTIGREW, D.M.; LEA, S.M.; MORGAN, B.P. Decay-accelerating factor must bind both components of the complement alternative pathway C3 convertase to mediate efficient decay. **J. Immunol.**, v. 178, n. 1, p. 352–359, 2007. doi: 10.4049/jimmunol.178.1.352.

HARRISON, R.E.S.; MORIKIS, D. Molecular mechanisms of macular degeneration associated with the complement Factor H Y402H mutation. **Biophys. J.**, v. 116, n. 2, p. 215-226, 2019. doi:10.1016/j.bpj.2018.12.007.

HARTSKEERL, R.A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W.A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 17, n. 4, p. 494-501, 2011. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03474.x.

HEINEN, S.; SANCHEZ-CORRAL, P.; JACKSON, M.S.; STRAIN, L.; GOODSHIP, J.A.; KEMP, E.J.; SKERKA, C.; JOKIRANTA, T.S.; MEYERS, K.; WAGNER, E.; ROBITAILLE, P.; ESPARZA-GORDILLO, J.; RODRIGUEZ DE CORDOBA, S.; ZIPFEL, P.F.; GOODSHIP, T.H. De novo gene conversion in the RCA gene cluster (1q32) causes mutations in complement Factor H associated with atypical hemolytic uremic syndrome. **Hum. Mutat.**, v. 27, n. 3, p. 292-293, 2006. doi: 10.1002/humu.9408.

HÉJA, D.; HARMAT, V.; FODOR, K.; WILMANN, M.; DOBÓ, J.; KÉKESI, K.A.; ZÁVODSZKY, P.; GÁL, P.; PÁL, G. Monospecific inhibitors show that both Mannan-binding lectin-associated serine protease-1 (MASP-1) and-2 are essential for lectin pathway activation and reveal structural plasticity of MASP-2. **J. Biol. Chem.**, v. 287, n. 24, p. 20290–20300, 2012. doi: 10.1074/jbc.M112.354332.

HELLWAGE, J.; JOKIRANTA, T.S.; FRIESE, M.A.; WOLK, T.U.; KAMPEN, E.; ZIPFEL, P.F.; MERI, S. Complement C3b/C3d and cell surface polyanions are recognized by overlapping binding sites on the most carboxyl-terminal domain of complement factor H. **J. Immunol.**, v. 169, n. 12, p. 6935–6944, 2002. doi: 10.4049/jimmunol.169.12.6935.

HYVARINEN, S.; MERI, S.; JOKIRANTA, T.S. Disturbed sialic acid recognition on endothelial cells and platelets in complement attack causes atypical hemolytic uremic syndrome. **Blood**, v. 127, n. 22, p. 2701–2710, 2016. doi: 10.1182/blood-2015-11-680009.

ICHIJO, H.; HELLMAN, U.; WERNSTEDT, C.; GONEZ, L.J.; CLAESSEON-WELSH, L.; HELDIN, C.H.; MIYAZONO, K. Molecular cloning and characterization of ficolin, a

multimeric protein with fibrinogen- and collagen-like domains. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 19, p. 14505–14513, 1993.

JOHNSON, R.C.; MUSCHEL, L.H. Antileptospiral activity of serum. I. Normal and immune serum. **J. Bacteriol.**, v. 91, n. 4, p. 1403-1409, 1966. doi: 10.1128/jb.91.4.1403-1409.1966.

JÓZSI, M.; TORTAJADA, A.; UZONYI, B.; GOICOECHEA DE JORGE, E.; RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA, S. Factor H-related proteins determine complement-activating surfaces. **Trends Immunol.**, v. 36, n. 6, p. 374-384, 2015. doi: 10.1016/j.it.2015.04.008.

JÓZSI, M.; ZIPFEL, P.F. Factor H family proteins and human diseases. **Trends Immunol.**, v. 29, n. 8, p. 380–387, 2008. doi: 10.1016/j.it.2008.04.008.

JYLHÄVÄ, J.; EKLUND, C.; JYLHÄ, M.; HERVONEN, A.; LEHTIMÄKI, T.; KARHUNEN, P.; HURME, M. Complement factor H 402His variant confers an increased mortality risk in Finnish nonagenarians: the Vitality 90+ study. **Exp. Gerontol.**, v. 44, n. 4, p. 297-299, 2009. doi: 10.1016/j.exger.2008.10.006.

KAJANDER, T.; LEHTINEN, M.J.; HYVARINEN, S.; BHATTACHARJEE, A.; LEUNG, E.; ISENMAN, D.E.; MERI, S.; GOLDMAN, A.; JOKIRANTA, T.S. Dual interaction of factor H with C3d and glycosaminoglycans in host-nonhost discrimination by complement. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 108, n. 7, p. 2897-2902, 2011. doi: 10.1073/pnas.1017087108.

KARPAGAM, K.B.; GANESH, B. Leptospirosis: a neglected tropical zoonotic infection of public health importance-an updated review. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 39, n. 5, p. 835-846, 2020. doi: 10.1007/s10096-019-03797-4. doi: 10.1007/s10096-019-03797-4.

KAZATCHKINE, M.D.; FEARON, D.T.; AUSTEN, K.F. Human alternative complement pathway: membrane-associated sialic acid regulates the competition between B and beta1 H for cell-bound C3b. **J. Immunol.**, v. 1220, n. 1, p. 75–81, 1979.

KIM, D.D.; SONG, W.C. Membrane complement regulatory proteins. **Clin. Immunol.**, v. 118, n. 2-3, p. 127-136, 2006. doi: 10.1016/j.clim.2005.10.014.

KISHORE, U.; GHAI, R.; GREENHOUGH, T.J.; SHRIVE, A.K.; BONIFATI, D.M.; GADJEVA, M.G.; WATERS, P.; KOJOUHAROVA, M.S.; CHAKRABORTY, T.; AGRAWAL, A. Structural and functional anatomy of the globular domain of complement protein C1q. **Immunol. Lett.**, v. 95, n. 2, p. 113–128, 2004. doi: 10.1016/j.imlet.2004.06.015.

KITAOKA, M.; INOUE S. Standard procedures of Weil's disease vaccine and Weil's disease and Akiyami combined vaccine (Japanese in original). **Jpn. Med. J.**, v. 1478, p. 2845-2847, 1952.

KLICKSTEIN, L.B.; BARTOW, T.J.; MILETIC, V.; RABSON, L.D.; SMITH, J.A.; FEARON, D.T. Identification of distinct C3b and C4b recognition sites in the human C3b/C4b receptor (CR1, CD35) by deletion mutagenesis. **J. Exp. Med.**, v. 168, n. 5, p. 1699–1717, 1988. doi: 10.1084/jem.168.5.1699.

KLOS, A. WENDE, E.; WAREHAM, K.J.; MONK, P.N. International union of basic and clinical pharmacology. [corrected] LXXXVII. Complement peptide C5a, C4a, and C3a

receptors. **Pharmacol. Rev.**, v. 65, n. 1, p. 500–543, 2013. doi: 10.1124/pr.111.005223.

KLOS, A.; TENNER, A.J.; JOHNSWICH, K.O.; AGER, R.R.; REIS, E.S.; KÖHL, J. The role of the anaphylatoxins in health and disease. **Mol. Immunol.**, v. 46, n. 14, p. 2753–2766, 2009. doi: 10.1016/j.molimm.2009.04.027.

KO, A.I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics' era for an emerging zoonotic pathogen. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 7, n. 10, p. 736-747, 2009. doi: 10.1038/nrmicro2208.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine**, v. 22, p. 1545-1552, 2004. doi: 10.1016/j.vaccine.2003.10.007.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospirosis vaccines: past, present, and future. **J. Postgrad. Med.**, v.51, n. 3, p. 210-214, 2005.

KOLEV, M.; LE FRIEC, G.; KEMPER, C. Complement – tapping into new sites and effector systems. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 14, n. 12, p. 811–820, 2014. doi: 10.1038/nri3761.

KRARUP, A.; THIEL, S.; HANSEN, A.; FUJITA, T.; JENSENIUS, J.C. L-ficolin is a pattern recognition molecule specific for acetyl groups. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 46, p. 47513–47519, 2004. doi: 10.1074/jbc.M407161200.

KRISHNAN, V.; XU, Y.; MACON, K.; VOLANAKIS, J. E.; NARAYANA, S. V. The crystal structure of C2a, the catalytic fragment of classical pathway C3 and C5 convertase of human complement. **J. Mol. Biol.**, v. 367, n. 1, p. 224-33, 2007. doi: 10.1016/j.jmb.2006.12.039.

KUHN, S.; ZIPFEL, P. F. Mapping of domains required for decay acceleration activity of the human Factor H-like protein 1 and Factor H. **Eur. J. Immunol.**, v. 26, n. 10, p. 2383- 2387, 1996. doi: 10.1002/eji.1830261017.

LE, Y.; LEE, S.H.; KON, O.L.; LU, J. Human L-ficolin: plasma levels, sugar specificity, and assignment of its lectin activity to the fibrinogen-like (FBG) domain. **FEBS Lett.**, v. 425, n. 2, p. 367–370, 1998. doi: 10.1016/s0014-5793(98)00267-1.

LEMAIRE, M.; FREMEAUX-BACCHI, V.; SCHAEFER, F.; CHOI, M.; TANG, W.H.; LE QUINTREC, M.; FAKHOURI, F.; TAQUE, S.; NOBILI, F.; MARTINEZ, F.; JI, W.; OVERTON, J.D.; MANE, S.M.; NURNBERG, G.; ALTMULLER, J.; THIELE, H.; MORIN, D.; DESCHENES, G.; BAUDOQUIN, V.; LLANAS, B.; COLLARD, L.; MAJID, M.A.; SIMKOVA, E.; NURNBERG, P.; RIOUX-LECLERC, N.; MOECKEL, G.W.; GUBLER, M.C.; HWA, J.; LOIRAT, C.; LIFTON, R.P. Recessive mutations in *DGKE* cause atypical hemolytic-uremic syndrome. **Nat. Genet.**, v. 45, n. 5, p. 531-536, 2013. doi: 10.1038/ng.2590.

LEVETT, P.N. Leptospirosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.14, n. 2, p. 296-326, 2001. doi: 10.1128/CMR.14.2.296-326.2001.

LINGAPPA, J.; KUFFNER, T.; TAPPERO, J.; WHITWORTH, W.; MIZE, A.; KAISER, R.; MCNICHOLL, J. HLA-DQ6 and ingestion of contaminated water: possible gene–environment interaction in an outbreak of leptospirosis. **Genes Immun.**, v. 5, n. 3, p. 197–202, 2004. doi: 10.1038/sj.gene.6364058.

LLEWELYN, M.; COHEN, J. Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. **Lancet Infect. Dis.**, v. 2, n. 3, p. 156–162, 2002. doi: 10.1016/s1473-3099(02)00222-0.

MAGA, T.K.; NISHIMURA, C.J.; WEAVER, A.E.; FREES, K.L.; SMITH, R.J. Mutations in alternative pathway complement proteins in American patients with atypical hemolytic uremic syndrome. **Hum. Mutat.**, v. 31, n. 6, p. 1445-1460, 2010. doi: 10.1002/humu.21256.

MALE, D.A.; ORMSBY, R.J.; RANGANATHAN, S.; GIANNAKIS, E.; GORDON, D.L. Complement factor H: sequence analysis of 221 kb of human genomic DNA containing the entire *fH*, *fHR-1* and *fHR-3* genes. **Mol. Immunol.**, v. 37, n. 1-2, p. 41–52, 2000. doi: 10.1016/s0161-5890(00)00024-9.

MARKIEWSKI, M.M.; DE ANGELIS, R.A.; BENENCIA, F.; RICKLIN-LICHTSTEINER, S.K.; KOUTOULAKI, A.; GERARD C.; COUKOS, G.; LAMBRIS, J.D. Modulation of the antitumor immune response by complement. **Nat. Immunol.**, v. 9, n. 11, p. 1225–1235, 2008. doi: 10.1038/ni.1655.

MARQUEZ, A.; DJELOUADJI, Z.; LATTARD, V.; KODJO, A. Overview of laboratory methods to diagnose Leptospirosis and to identify and to type leptospire. **Int. Microbiol.**, v. 20, n. 4, p. 184-193, 2017. doi: 10.2436/20.1501.01.302. doi: 10.2436/20.1501.01.302.

MARTÍNEZ, R.; PÉREZ, A.; QUIÑONES, M.C.; CRUZ, R.; ALVAREZ, A.; ARMESTO, M.; FERNÁNDEZ, C.; MENÉNDEZ, J.; RODRÍGUEZ, I.; BARÓ, M.; DÍAZ, M.; RODRÍGUEZ, J.; SIERRA, G.; OBREGÓN, A.M.; TOLEDO, M.E.; FERNÁNDEZ, N. Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba. **Rev. Panam. Salud Pública**, v. 15, n. 4, p. 249-255, 2004. doi: 10.1590/s1020-49892004000400005.

MARTINS, M.G.; MATOS, K.T.; SILVA, M.V.; DE ABREU, M.T. Ocular manifestations in the acute phase of leptospirosis. **Ocul. Immunol. Inflamm.**, v. 6, n. 2, p. 75–79, 1998. doi: 10.1076/ocii.6.2.75.4045.

MATSUNAGA, J.; BAROCCHI, M.A.; CRODA, J.; YOUNG, T.A.; SANCHEZ, Y.; SIQUEIRA, I.; BOLIN, C.A.; REIS, M.G.; RILEY, L.W.; HAAKE, D.A.; KO, A.I. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Mol. Microbiol.**, v. 49, n. 4, p. 929–945, 2003. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03619.x.

MATTHEWS, K.W.; MUELLER-ORTIZ, S.L.; WETSEL, R.A. Carboxypeptidase N: a pleiotropic regulator of inflammation. **Mol. Immunol.**, v. 40, n. 11, p. 785–793, 2004. doi: 10.1016/j.molimm.2003.10.002.

McCORMACK, M.; GUI, H.; INGASON, A.; SPEED, D.; WRIGHT, G.B.; ZHANG, E.J.; SECOLIN, R.; YASUDA, C.; KWOK, M.; WOLKING, S.; BECKER, F.; RAU, S.; AVBERSEK, A.; HEGGELI, K.; LEU, C.; DEPONDT, C.; SILLS, G.J.; MARSON, A.G.; AUCE, P.; BRODIE, M.J.; FRANCIS, B.; JOHNSON, M.R.; KOELEMAN, B.C.; STRIANO, P.; COPPOLA, A.; ZARA, F.; KUNZ, W.S.; SANDER, J.W.; LERCHE, H.; KLEIN, K.M.; WECKHUYSEN, S.; KRENN, M.; GUDMUNDSSON, L.J.; STEFÁNSSON, K.; KRAUSE, R.; SHEAR, N.; ROSS, C.D.; DELANTY, N.; EPIGEN CONSORTIUM; PIRMOHAMED, M.; CARLETON, B.C.; CANADIAN, PHARMACOGENOMICS NETWORK FOR DRUG SAFETY; CENDES, F.; LOPES-CENDES, I.; LIAO, W.P.; O'BRIEN, T.J.; SISODIYA, S.M.; EPIPGX CONSORTIUM; CHERNY, S.; KWAN, P.; BAUM, L.; INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY CONSORTIUM ON COMPLEX EPILEPSIES; CAVALLERI, G.L.

Genetic variation in *CFH* predicts phenytoin-induced maculopapular exanthema in European-descent patients. **Neurology**, v. 90, n. 4, 2018. doi: 10.1212/WNL.0000000000004853.

MEDJERAL-THOMAS, N.; MALIK, T.H.; PATEL, M.P.; TOTH, T.; COOK, H.T.; TOMSON, C.; PICKERING, M.C. A novel *CFHR5* fusion protein causes C3 glomerulopathy in a family without Cypriot ancestry. **Kidney Int.**, v. 85, n. 4, p. 933–937, 2014a. doi: 10.1038/ki.2013.348.

MEDJERAL-THOMAS, N.R.; O'SHAUGHNESSY, M.M.; O'REGAN, J.A.; TRAYNOR, C.; FLANAGAN, M.; WONG, L.; TEOH, C.W.; AWAN, A.; WALDRON, M.; CAIRNS, T.; O'KELLY, P.; DORMAN, A.M.; PICKERING, M.C.; CONLON, P.J.; COOK, H.T. C3 glomerulopathy: clinicopathologic features and predictors of outcome. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 9, n. 1, p. 46–53, 2014b. doi: 10.2215/CJN.04700513.

MERI, S.; MORGAN, B.P.; DAVIES, A.; DANIELS, R.H.; OLAVESSEN, M.G.; WALDMANN, H.; LACHMANN, P.J. Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. **Immunol.**, v. 71, n. 1, p. 1–9, 1990.

MERI, S.; PANGBURN, M. K. Discrimination between activators and non activators of the alternative pathway of complement: regulation via a sialic acid/polyanion binding site on factor H. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 87, n. 10, p. 3982-3986, 1990. doi: 10.1073/pnas.87.10.3982.

MERI, T.; MURGIA, R.; STEFANEL, P.; MERI, S.; CINCO, M. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospire. **Microb. Pathog.**, v. 39, n. 4, p. 139-147, 2005. doi: 10.1016/j.micpath.2005.07.003.

MERLE, N.S.; NOE, R.; HALBWACHS-MECARELLI, L.; FREMEAUX-BACCHI, V.; ROUMENINA, L.T. Complement System Part II: role in immunity. **Front. Immunol.**, v. 6, pt. 2, 2015. doi: 10.3389/fimmu.2015.00257.

MILLER, S.I.; ERNST, R.K.; BADER, M.W. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, n. 1, p. 36-46, 2005. doi: 10.1038/nrmicro1068.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação epidemiológica da leptospirose. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/l/leptospirose>> Acesso em: 22 de abril de 2021.

MIRAGLIA, F.; MATSUO, M.; MORAIS, Z.M.; DELLAGOSTIN, O.A.; SEIXAS, F.K.; FREITAS, J.C.; HARTSKEERL, R.; MORENO, L.Z.; COSTA, B.L.; SOUZA, G.O.; VASCONCELLOS, S.A.; MORENO, A.M. Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni isolates from Brazil. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 77, n. 3, p. 195-199, 2013. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.08.003.

MIYAHARA, S.; SAITO, M.; KANEMARU, T.; VILLANUEVA, S.Y.; GLORIANI, N.G.; YOSHIDA, S.I. Destruction of the hepatocyte junction by intercellular invasion of *Leptospira* causes jaundice in a hamster model of Weil's disease. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 95, n. 4, p. 272-281, 2014. doi: 10.1111/iep.12085.

MORGAN, H. P.; SCHMIDT, C. Q.; GUARIENTO, M.; BLAUM, B. S.; GILLESPIE, D.; HERBERT, A. P.; KAVANAGH, D.; MERTENS, H. D.; SVERGUN, D. I.; JOHANSSON, C. M.; UHRÍN, D. BARLOW, P. N.; HANNAN, J. P. Structural basis for engagement by

complement Factor H of C3b on a self-surface. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 18, n. 4, p. 463-470, 2011. doi: 10.1038/nsmb.2018.

MORGAN, J.; BORNSTEIN, S.L.; KARPATI, A.M.; BRUCE, M.; BOLIN, C.A.; AUSTIN, C.C.; WOODS, C.W.; LINGAPPA, J.; LANGKOP, C.; DAVIS, B.; GRAHAM, D.R.; PROCTOR, M.; ASHFORD, D.A.; BAJANI, M.; BRAGG, S.L.; SHUTT, K.; PERKINS, B.A.; TAPPERO, J.W. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, n. 1, p. 1593-1599, 2002. doi: 10.1086/340615.

NAHORI, M.A.; FOURNIE-AMAZOUZ, E.; QUE-GEWIRTH, N.S.; BALLOY, V.; CHIGNARD, M.; RAETZ, C.R.; SAINT GIRONS, I.; WERTS, C. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. **J. Immunol.**, v. 175, n. 9, p. 6022-6031, 2005. doi: 10.4049/jimmunol.175.9.6022.

NATAF, S.; DAVOUST, N.; AMES, R.S.; BARNUM, S.R. Human T cells express the C5a receptor and are chemoattracted to C5a. **J. Immunol.**, v. 162, n. 7, p. 4018-4023, 1999.

NESTER, C. M.; BARBOUR, T.; RODRIQUEZ DE CORDOBA, S.; DRAGON-DUREY, M.A.; FREMEAUX-BACCHI, V.; GOODSHIP, T. H.J.; KAVANAGH, D.; NORIS, M.; PICKERING, M.; SANCHEZ-CORRAL, P.; SKERKA, C.; ZIPFEL P.; SMITH R.J. Atypical HUS: state of the art. **Mol. Immunol.**, v. 67, n. 1, p. 31-42, 2015. doi: 10.1016/j.molimm.2015.03.246.

NEUMANN, H.P.; SALZMANN, M.; BOHNERT-IWAN, B.; MANNUELIAN, T.; SKERKA, C.; LENK, D.; BENDER, B.U.; CYBULLA, M.; RIEGLER, P.; KÖNIGSRAINER, A.; NEYER, U.; BOCK, A.; WIDMER, U.; MALE, D.A.; FRANKE, G.; ZIPFEL, P.F. Haemolytic uraemic syndrome and mutations of the Factor H gene: a registry-based study of German speaking countries. **J. Med. Genet.**, v. 40, n. 9, p. 676-681, 2003. doi: 10.1136/jmg.40.9.676.

NICHOLSON-WELLER, A.; WANG, C.E. Structure and function of decay accelerating factor CD55. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 123, n. 4, p. 485-491, 1994.

NORIS, M.; CAPRIOLI, J.; BRESIN, E.; MOSSALI, C.; PIANETTI, G.; GAMBA, S.; DAINA, E.; FENILI, C.; CASTELLETTI, F.; SOROSINA, A.; PIRAS, R.; DONADELLI, R.; MARANTA, R.; VAN DER MEER, I.; CONWAY, E.M.; ZIPFEL, P.F.; GOODSHIP, T.H.; REMUZZI, G. Relative role of genetic complement abnormalities in sporadic and familial aHUS and their impact on clinical phenotype. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 5, n. 10, p. 1844-1859, 2010. doi: 10.2215/CJN.02210310.

O'HARA, A.M.; MORAN, A.P.; WÜRZNER, R.; ORREN, A. Complement-mediated lipopolysaccharide release and outer membrane damage in *Escherichia coli* J5: requirement for C9. **Immunol.**, v. 102, n. 3, p. 365-372, 2001. doi: 10.1046/j.1365-2567.2001.01198.x.

PACHECO, A. G.; MORAES, M. O. Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. **Dis. Mark.**, v. 27, n. 3, p. 173-186, 2009. doi: 10.3233/DMA-2009-0654.

PANGBURN, M. K.; MULLER-EBERHARD, H. J. The C3 convertase of the alternative pathway of human complement. Enzymic properties of the biomolecular proteinase. **Biochem. J.**, v. 235, n. 3, p. 723-730, 1986. doi: 10.1042/bj2350723.

PANGBURN, M. K.; SCHREIBER, R. D.; MULLER-EBERHARD, H. J. Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein beta 1H for cleavage of C3b and C4b in solution. **J. Exp. Med.**, v. 146, n. 1, p. 257-270, 1977. doi: 10.1084/jem.146.1.257.

PANGBURN, M.K.; SCHREIBER, R.D.; MÜLLER-EBERHARD, H.J. Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. **J. Exp. Med.**, v. 154, n. 3, p. 856-867, 1981. doi: 10.1084/jem.154.3.856.

PARENTE, R.; CLARK, S. J.; INFORZATO, A.; DAY, A. J. Complement factor H in host defense and immune evasion. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 74, n. 9, p. 1605–1624, 2017. doi: 10.1007/s00018-016-2418-4.

PASTOR, A.F.; RODRIGUES MOURA, L.; NETO, J.W.; NASCIMENTO, E.J.; CALZAVARA-SILVA, C.E.; GOMES, A.L.; SILVA, A.M.; CORDEIRO, M.T.; BRAGA-NETO, U.; CROVELLA, S.; GIL, L.H.; MARQUES, E.T.; ACIOLI-SANTOS, B. Complement factor H gene (*CFH*) polymorphisms C-257T, G257A and haplotypes are associated with protection against severe dengue phenotype, possible related with high *CFH* expression. **Hum. Immunol.**, v. 74, n. 9, p. 1225-1230, 2013. doi: 10.1016/j.humimm.2013.05.005.

PEREIRA, M.M.; SCHNEIDER, M.C.; MUNOZ-ZANZI, C.; COSTA, F.; BENSCHOP, J.; HARTSKEERL, R.; MARTINEZ, J.; JANCLOES, M.; BERTHERAT, E. A road map for leptospirosis research and health policies based on country needs in Latin America. **Rev. Panam. Salud Publica.**, v. 41: e131, 2018. doi: 10.26633/RPSP.

PÉREZ-CABALLERO, D. GONZÁLEZ-RUBIO, C.; GALLARDO, M. E.; VERA, M.; LÓPEZ-TRASCASA, M.; RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA, S.; SÁNCHEZ-CORRAL, P. Clustering of missense mutations in the C-terminal region of Factor H in atypical hemolytic uremic syndrome. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 68, n. 2, p. 478–484, 2001. doi: 10.1086/318201.

PEROLAT, P.; CHAPPEL, R.J.; ADLER, B.; BARANTON, G.; BULACH, D.M.; BILLINGHURST, M.L.; LETOCART, M.; MERIEN, F.; SERRANO, M.S. *Leptospira fainei* sp. nov., isolated from pigs in Australia. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 48, pt. 3, p. 851-858, 1998. doi: 10.1099/00207713-48-3-851.

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Med. Mal. Infect.**, v. 43, n. 1, p. 1-9, 2013. doi: 10.1016/j.medmal.2012.11.005.

PICARDEAU, M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 15, n. 5, p. 297-307, 2017. doi: 10.1038/nrmicro.2017.5.

PODACK, E. R.; TSCHOOP, J.; MULLER-EBERHARD, H. J. Molecular organization of C9 within the membrane attack complex of complement. Induction of circular C9 polymerization by the C5b-8 assembly **J. Exp. Med.**, v. 156, n. 1, p. 268–282, 1982. doi: 10.1084/jem.156.1.268.

PREISSNER, K.P.; PODACK, E.R.; MÜLLER-EBERHARD, H.J. SC5b-7, SC5b-8 and SC5b-9 complexes of complement: ultrastructure and localization of the S-protein (vitronectin) within the macromolecules. **Eur. J. Immunol.**, v. 19, n. 1, p. 69–75, 1989. doi: 10.1002/eji.1830190112.

PROSSER, B.E.; JOHNSON, S.; ROVERSI, P.; HERBERT, A.P.; BLAUM, B.S.; TYRRELL, J.; JOWITT, T.A.; CLARK, S.J.; TARELLI, E.; UHRÍN, D.; BARLOW, P.N.;

SIM, R.B.; DAY, A.J.; LEA, S.M. Structural basis for complement factor H linked age-related macular degeneration. **J. Exp. Med.**, v. 204, n. 10, p. 2277-2283, 2007. doi:10.1084/jem.20071069.

RATHINAM, S.R.; RATNAM, S.; SELVARAJ, S.; DEAN, D.; NOZIK, R.A.; NAMPERUMALSAMY, P. Uveitis associated with an epidemic outbreak of leptospirosis. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 124, n. 1, p. 71–79, 1997. doi: 10.1016/s0002-9394(14)71646-0.

RAYCHAUDHURI, S.; IARTCHOUK, O.; CHIN, K.; TAN, P.L.; TAI, A.K.; RIPKE, S.; GOWRISANKAR, S.; VEMURI, S.; MONTGOMERY, K.; YU, Y.; REYNOLDS, R.; ZACK, D.J.; CAMPOCHIARO, B.; CAMPOCHIARO, P.; KATSANIS, N.; DALY, M.J.; SEDDON, J.M. A rare penetrant mutation in *CFH* confers high risk of age-related macular degeneration. **Nat. Genet.**, v. 43, n. 12, p. 1232-1236, 2011. doi: 10.1038/ng.976.

RICALDI, J.; SWANCUTT, M.A.; MATTHIAS, M.A. Current trends in translational research in leptospirosis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 26, n. 5, p. 399-403, 2013. doi: 10.1097/QCO.0000000000000001.

RICHARDS, A.; BUDDLES, M.R.; DONNE, R.L.; KAPLAN, B.S.; KIRK, E.; VENNING, M.C.; TIELEMANS, C.L.; GOODSHIP, J.A.; GOODSHIP, T.H. Factor H mutations in hemolytic uremic syndrome cluster in exons 18-20, a domain important for host cell recognition. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 68, n. 2, p. 485-490, 2001. doi: 10.1086/318203.

RICKLIN, D.; HAJISHENGALLIS, G.; YANG, K.; LAMBRIS, J.D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nat. Immunol.**, v. 11, n. 9, p. 785–797, 2010. doi: 10.1038/ni.1923.

RICKLIN, D.; BARRATT-DUE, A.; MOLLNES, T.E. Complement in clinical medicine: Clinical trials, case reports and therapy monitoring. **Mol. Immunol.**, v. 89, p. 10-21, 2017. doi: 10.1016/j.molimm.2017.05.013.

RIPOCHE, J.; DAY, A. J.; HARRIS, T. J. R.; SIM, R. B. The complete amino acid sequence of human complement Factor H. **Biochem. J.**, v. 249, n. 2, p. 593-602, 1988. doi: 10.1042/bj2490593.

ROMERO, E.C.; BERNARDO, C.C.M.; YASUDA, P.H. Human leptospirosis: a twenty-nine-year serological study in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 45, n. 5, p. 245-248, 2003. doi: 10.1590/s0036-46652003000500002.

ROSS, G.D.; MEDOF, M.E. Membrane complement receptors specific for bound fragments of C3. **Adv. Immunol.**, v. 37, p. 217-267, 1985. doi: 10.1016/s0065-2776(08)60341-7.

ROUMENINA, L.T.; KANTARDJIEV, A.A.; ATANASOV, B.P.; WATERS, P.; GADJEVA, M.; REID, K.B.M.; MANTOVANI, A.; KISHORE, U.; KOJOUHAROVA, M.S. Role of Ca²⁺ in the electrostatic stability and the functional activity of the globular domain of human C1q. **Biochem.**, v. 44, n. 43, p. 14097–14109, 2005. doi: 10.1021/bi051186n.

ROUMENINA, L.T.; POPOV, K.T.; BUREEVA, S.V.; KOJOUHAROVA, M.; GADJEVA, M.; RABHERU, S.; THAKRAR, R.; KAPLUN, A.; KISHORE, U. Interaction of the globular domain of human C1q with *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1784, n. 9, p. 1271–1276, 2008. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.04.029.

ROUMENINA, L.T.; ROQUIGNY, R.; BLANC, C.; POULAIN, N.; NGO, S.; DRAGON-DUREY, M.A.; FRÉMEAUX-BACCHI, V. Functional evaluation of Factor H genetic and acquired abnormalities: application for atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS). **Methods Mol. Biol.**, v. 1100, p. 237–247, 2014. doi: 10.1007/978-1-62703-724-2_19.

ROVERSI, P.; JOHNSON, S.; CAESAR, J.J.; MCLEAN, F.; LEATH, K.J.; TSIFTSOGLU, S.A.; MORGAN, B.P.; HARRIS, C.L.; SIM, R.B.; LEA, S.M. Structural basis for complement Factor I control and its disease-associated sequence polymorphisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 108, n. 31, p. 12839-12844, 2011. doi: 10.1073/pnas.1102167108.

SAYAH, S.; JAUNEAU, A.C.; PATTE, C.; TONON, M.C.; VAUDRY, H.; FONTAINE, M. Two different transduction pathways are activated by C3a and C5a anaphylatoxins on astrocytes. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, v. 112, n. 1-2, p. 53-60, 2003. doi: 10.1016/s0169-328x(03)00046-9.

SCHRAMM, E.C.; ROUMENINA, L.T.; RYBKINE, T.; CHAUVET, S.; VIEIRA-MARTINS, P.; HUE, C.; HUE, C.; MAGA, T.; VALOTI, E.; WILSON, V.; JOKIRANTA, S.; SMITH, R.J.; NORIS, M.; GOODSHIP, T.; ATKINSON, J.P.; FREMEAUX-BACCHI, V. Functional mapping of the interactions between complement C3 and regulatory proteins using atypical hemolytic uremic syndrome-associated mutations. **Blood**, v. 125, n. 15, p. 2359–2369, 2015. doi: 10.1182/blood-2014-10-609073.

SEGURA, E.R.; GANOZA, C.A.; CAMPOS, K.; RICALDI, J.N.; TORRES, S.; SILVA, H.; CESPEDES, M.J.; MATTHIAS, M.A.; SWANCUTT, M.A.; LOPEZ, L.R.; GOTUZZO, E.; GUERRA, H.; GILMAN, R.H.; VINETZ, J.M. Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. **Clin. Infect. Dis.**, v. 40, n. 3, p. 343-351, 2005. doi: 10.1086/427110.

SEGURO, A.C.; LOMAR, A.V.; ROCHA, A.S. Acute renal failure of leptospirosis: nonoliguric and hypokalemic forms. **Nephron**, v. 55, n. 2, p. 146-151, 1990. doi: 10.1159/000185943.

SERVAIS, A.; NOËL, L. H.; ROUMENINA, L. T.; LE QUINTREC, M.; NGO, S.; DRAGON-DUREY, M. A.; MACHER, M. A.; ZUBER, J.; KARRAS, A.; PROVOT, F.; MOULIN, B.; GRÜNFELD, J.P.; NIAUDET, P.; LESAVRE, P.; FRÉMEAUX-BACCHI, V. Acquired and genetic complement abnormalities play a critical role in dense deposit disease and other C3 glomerulopathies. **Kidney Int.**, v. 82, n. 4, p. 454–464, 2012. doi: 10.1038/ki.2012.63.

SILVA, H.R.; TANAJURA, G.M.; TAVARES-NETO, J.; GOMES, M.L.C.; LINHARES, A.C.; VASCONCELOS, P.F.; KO, A.I. Aseptic meningitis syndrome due to enterovirus and *Leptospira* sp in children of Salvador, Bahia. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, n. 2, p. 159–165, 2002. doi: 10.1590/s0037-86822002000200006.

SITPRIJA, V. Renal dysfunction in leptospirosis: a view from the tropics. **Nat. Clin. Pract. Nephrol.**, v. 2, n. 12, p. 658–659, 2006. doi: 10.1038/ncpneph0326.

SKERKA, C.; ZIPFEL, P.F. Complement Factor H related proteins in immune diseases. **Vaccine**, v. 26, p. I9–I14, 2008. Supplement 8. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.11.021.

SMITH, B.O.; MALLIN, R.L.; KRYCH-GOLDBERG, M.; WANG, X.; HAUHART, E.; BROMEK, K.; UHRIN, D.; ATKINSON, J. P.; BARLOW, P. N. Structure of the C3b binding site of CR1 (CD35), the immune adherence receptor. **Cell**, v. 108, n. 6, p. 769–780, 2002. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00672-4.

SPICHLER, A.; SPICHLER, E.; MOOCK, M.; VINETZ, J.M.; LEAKE, J.A. Acute pancreatitis in fatal anicteric leptospirosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 76, n. 5, p. 886–887, 2007.

STIMSON, A.M. Note on an organism found in yellow-fever tissue. **Public Health Reports**, v. 22, n. 18, p. 541, 1907. doi.org/10.2307/4559008.

SUANKRATAY, C.; MOLD, C.; ZHANG, Y.; LINT, T. F.; GEWURZ, H. Mechanism of complement-dependent haemolysis via the lectin pathway: role of the complement regulatory proteins. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 117, n. 3, p. 442-448, 1999. doi: 10.1046/j.1365-2249.1999.00998.x.

TEIXEIRA, A.G.; SILVA, A.S.; LIN, F.L.; VELLETRI, R.; BAVIA, L.; BELFORT, R. JR; ISAAC, L. Association of complement factor H Y402H polymorphism and age-related macular degeneration in Brazilian patients. **Acta Ophthalmol.**, v. 88, n. 5: e165-9, 2010. doi: 10.1111/j.1755-3768.2010.01932.x.

TERPSTRA WJ. Typing leptospira from the perspective of a reference laboratory. **Acta Leiden.**, v. 90, n. 2, p. 79-87, 1992.

TORTAJADA, A.; YÉBENES, H.; ABARRATEGUI-GARRIDO, C.; ANTER, J.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, J.M.; MARTÍNEZ-BARRICARTE, R.; ALBA-DOMÍNGUEZ, M.; MALIK, T.H.; BEDOYA, R.; PÉREZ, R.C.; TRASCASA, M.L.; PICKERING, M.C.; HARRIS, C.L.; SÁNCHEZ-CORRAL, P.; LLORCA, O.; RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA, S. C3 glomerulopathy-associated CFHR1 mutation alters FHR oligomerization and complement regulation. **J. Clin. Invest.**, v. 123, n. 6, p. 2434-2446, 2013. doi: 10.1172/JCI68280.

TSCHOPP, J.; CHONN, A.; HERTIG, S.; FRENCH, L.E. Clusterin, the human apolipoprotein and complement inhibitor, binds to complement C7, C8 beta, and the b domain of C9. **J. Immunol.**, v. 151, n. 4, p. 2159–2165, 1993.

UCSC GENOME BROWSER. Kent, W.J.; Sugnet, C.W.; Furey, T.S.; Roskin, K.M.; Pringle, T.H.; Zahler, A.M.; Haussler, D. The human genome browser at UCSC. **Genome Res.**, v. 12, n. 6, p. 996-1006, 2002. Disponível em: <genome.ucsc.edu.>. Acesso em: 22 abr 2021.

VIGILÂNCIA EM SAÚDE-PREFEITURA DE SÃO PAULO. Leptospirose. Disponível em:<https://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/saude/vigilancia_em_saude/in dex.php?p=245602> Acesso em: 22 abr. 2021.

VINCENT, A.T.; SCHIETTEKATTE, O.; GOARANT, C.; NEELA, V.K.; BERNET, E.; THIBEAUX, R.; ISMAIL, N.; MOHD KHALID, M.K.N.; AMRAN, F.; MASUZAWA, T.; NAKAO, R.; KORBA, A.A.; BOURHY, P.; VEYRIER, F.J.; PICARDEAU, M. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 13, n. 5: e0007270, 2019. doi: 10.1371/journal.pntd.0007270.

WAGENAAR, J.F.; GORIS, M.G.; PARTININGRUM, D.L.; ISBANDRIO, B.; HARTSKEERL, R.A.; BRANDJES, D.P.; MEIJERS, J.C.; GASEM, M.H.; VAN GORP, E.C. Coagulation disorders in patients with severe leptospirosis are associated with severe bleeding and mortality. **Trop. Med. Int. Health**, v. 15, n. 2, p. 152-159, 2010. doi: 10.1111/j.1365-3156.2009.02434.x.

WEIL, A. Ueber eine eigenthümliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende, acute Infektionskrankheit. **Dtsch Arch. Klin. Med.**, v. 39, p. 209, 1886.

WEIS, W.I.; DRICKAMER, K.; HENDRICKSON, W.A. Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. **Nature**, v. 360, n. 6400, p. 127–134, 1992. doi: 10.1038/360127a0.

WERTS, C.; TAPPING, R.I.; MATHISON, J.C.; CHUANG, T.H.; KRAVCHENKO, V.; SAINT GIRONS, I.; HAAKE, D.; GODOWSKI, P.J.; HAYASHI, F.; OZINSKY, A.; UNDERHILL, D.; ADEREM, A.; TOBIAS, P.S.; ULEVITCH, R.J. Leptospiral endotoxin activates cells via a TLR2-dependent mechanism. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 4, p. 346–352, 2001. doi: 10.1038/86354.

WU, J.; WU, Y. Q.; RICKLIN, D.; JANSSEN, B.J.; LAMBRIS, J.D.; GROS P. Structure of C3b-factor H and implications for host protection by complement regulators. **Nat. Immunol.**, v. 10, n. 7, p. 728–733, 2009. doi: 10.1038/ni.1755

YAN, Y.; CHEN, Y.; LIOU, W.; DING, J.; CHEN, J.; ZHANG, J.; ZHANG, A.; ZHOU, W.; GAO, Z.; YE, X.; XIAO, Y. An evaluation of the serological and epidemiological effects of the outer envelope vaccine to leptospira. **J. Chin. Med. Assoc.**, v. 66, n. 4, p. 224–230, 2003.

ZAREPARSI, S.; BRANHAM, K.E.; LI, M.; SHAH, S.; KLEIN, R.J.; OTT, J.; HOH, J.; ABECASIS, G.R.; SWAROOP, A. Strong association of the Y402H variant in complement Factor H at 1q32 with susceptibility to age-related macular degeneration. **Am. J. Hum. Gen.**, v. 77, n. 1, p. 149–153, 2005. doi: 10.1086/431426.

ZHANG, Y.; MEYER, N.C.; WANG, K.; NISHIMURA, C.; FREES, K.; JONES, M.; KATZ, L.M.; SETHI, S.; SMITH, R.J. Causes of alternative pathway dysregulation in dense deposit disease. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 7, n. 2, p. 265–274, 2012. doi: 10.2215/CJN.07900811.

ZHANG, Y.; XIAO, X.; GARCIA-FERNANDEZ, J.; DE CORDOBA, S.R.; ZIPFEL, P.F.; MEYER, N.; SETHI, S.; NESTER, C.; GHOSSEIN, C.; SMITH, R. A novel fusion gene *CHFR5-CFHR2* causes C3 Glomerulonephritis. **Mol. Immunol.**, v. 56, n. 3, p. 297. 2013. doi:10.1016/j.molimm.2013.05.161.

ZHAO, Y.; XU, H.; YU, W.; XIE, B.D. Complement anaphylatoxin C4a inhibits C5a induced neointima formation following arterial injury. **Mol. Med. Rep.**, v. 10, n. 1, p. 10:45, 2014. doi: 10.3892/mmr.2014.2176.

ZICCARDI, R.J. A new role for C-1-inhibitor in homeostasis: control of activation of the first component of human complement. **J. Immunol.**, v. 128, n. 6, p. 2505–2508, 1982.

ZIPFEL, P.F.; SKERKA, C. FHL-1/reconnectin: a human complement and immune regulator with cell-adhesive function. **Immunol. Today**, v. 20, n. 3, p. 135–140, 1999. doi: 10.1016/s0167-5699(98)01432-7.

ZIPFEL, P.F.; SMITH, R.J.; SKERKA, C. Factor I and Factor H deficiency in renal diseases: similar defects in the fluid phase have a different outcome at the surface of the glomerular basement membrane. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 24, n. 2, p. 385–387, 2009. doi: 10.1093/ndt/gfn652.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Resultados da análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg na coorte de estudo.

No	SNPs	Posição	HWE p	MAF	Alelos
1	rs1061147	196685194	0,8628	0,316	C:A
2	rs35097611	196685274	1,0	0,02	C:T
3	rs34815383	196690048	1,0	0,044	T:C
4	rs1061170	196690107	0,2896	0,303	T:C
5	rs513699	196743447	5,7909E-40	0,389	T:C
6	rs61822181	196743456	2,5473E-68	0,459	C:T
7	rs35274867	196743466	1,0	0,013	A:T
8	rs55679475	196743490	1,1401E-13	0,256	T:C
9	rs35343172	196743494	1,0	0,023	T:C
10	rs55771831	196743496	1,1401E-13	0,256	G:C
11	rs62625015	196743544	1,9143E-11	0,237	C:G
12	rs409953	196743609	1,7401E-9	0,218	G:A
13	rs15809	196745933	1,0	0,033	C:G

APÊNDICE B - Análise do desequilíbrio de ligação por 'Haploview' dos SNPs identificados no gene *CFH*.

SNP 1	SNP 2	D'	LOD	R ²	Distância
rs1061147	rs35097611	1,0	2,51	0,044	80
rs1061147	rs34815383	0,263	0,07	0,001	4854
rs1061147	rs1061170	0,942	87,82	0,845	4913
rs1061147	rs513699	0,374	4,19	0,104	58253
rs1061147	rs61822181	0,38	1,89	0,08	58262
rs1061147	rs35274867	1,0	0,73	0,006	58272
rs1061147	rs55679475	0,719	27,2	0,389	58296
rs1061147	rs35343172	0,677	1,14	0,027	58300
rs1061147	rs55771831	0,719	27,2	0,389	58302
rs1061147	rs62625015	0,766	28,72	0,4	58350
rs1061147	rs409953	0,728	22,96	0,326	58415
rs1061147	rs15809	0,633	1,28	0,031	60739
rs35097611	rs34815383	0,159	0,0	0,0	4774
rs35097611	rs1061170	1,0	1,92	0,009	4833
rs35097611	rs513699	1,0	0,44	0,013	58173
rs35097611	rs61822181	1,0	0,8	0,017	58182
rs35097611	rs35274867	0,076	0,19	0,004	58192
rs35097611	rs55679475	1,0	1,26	0,007	58216
rs35097611	rs35343172	1,0	18,1	0,745	58220
rs35097611	rs55771831	1,0	1,26	0,007	58222
rs35097611	rs62625015	1,0	1,14	0,006	58270
rs35097611	rs409953	1,0	1,01	0,006	58335
rs35097611	rs15809	1,0	15,4	0,536	60659
rs34815383	rs1061170	0,223	0,05	0,001	59
rs34815383	rs513699	1,0	0,76	0,029	53399
rs34815383	rs61822181	1,0	0,74	0,039	53408
rs34815383	rs35274867	0,025	0,01	0,0	53418
rs34815383	rs55679475	0,493	0,15	0,004	53442
rs34815383	rs35343172	0,636	0,03	0,001	53446
rs34815383	rs55771831	0,493	0,15	0,004	53448
rs34815383	rs62625015	0,253	0,04	0,001	53496
rs34815383	rs409953	0,004	0,0	0,0	53561
rs34815383	rs15809	0,157	0,92	0,03	55885
rs1061170	rs513699	0,377	4,19	0,098	53340
rs1061170	rs61822181	0,396	2,25	0,082	53349
rs1061170	rs35274867	1,0	1,12	0,007	53359
rs1061170	rs55679475	0,743	32,59	0,442	53383
rs1061170	rs35343172	1,0	1,95	0,012	53387
rs1061170	rs55771831	0,743	32,59	0,442	53389
rs1061170	rs62625015	0,765	31,48	0,425	53437
rs1061170	rs409953	0,752	26,98	0,367	53502

Continua

SNP 1	SNP 2	D'	LOD	R ²	Distância
rs1061170	rs15809	1,0	1,73	0,017	55826
rs513699	rs61822181	1,0	23,29	0,54	9
rs513699	rs35274867	1,0	0,74	0,008	19
rs513699	rs55679475	1,0	-2,05	0,219	43
rs513699	rs35343172	1,0	0,46	0,015	47
rs513699	rs55771831	1,0	-2,05	0,219	49
rs513699	rs62625015	1,0	-2,54	0,197	97
rs513699	rs409953	1,0	-3,48	0,177	162
rs513699	rs15809	0,439	0,08	0,004	2486
rs61822181	rs35274867	1,0	0,62	0,011	10
rs61822181	rs55679475	1,0	5,4	0,292	34
rs61822181	rs35343172	1,0	1,03	0,02	38
rs61822181	rs55771831	1,0	5,4	0,292	40
rs61822181	rs62625015	1,0	4,01	0,263	88
rs61822181	rs409953	1,0	2,83	0,236	153
rs61822181	rs15809	1,0	0,87	0,029	2477
rs35274867	rs55679475	1,0	0,56	0,005	24
rs35274867	rs35343172	0,186	0,77	0,019	28
rs35274867	rs55771831	1,0	0,56	0,005	30
rs35274867	rs62625015	1,0	0,46	0,004	78
rs35274867	rs409953	1,0	0,67	0,004	143
rs35274867	rs15809	0,289	1,29	0,033	2467
rs55679475	rs35343172	1,0	1,18	0,008	4
rs55679475	rs55771831	1,0	116,25	1,0	6
rs55679475	rs62625015	1,0	93,74	0,903	54
rs55679475	rs409953	0,99	73,35	0,795	119
rs55679475	rs15809	1,0	1,08	0,012	2443
rs35343172	rs55771831	1,0	1,18	0,008	2
rs35343172	rs62625015	1,0	1,0	0,007	50
rs35343172	rs409953	1,0	0,83	0,007	115
rs35343172	rs15809	1,0	22,34	0,721	2439
rs55771831	rs62625015	1,0	93,74	0,903	48
rs55771831	rs409953	0,99	73,35	0,795	113
rs55771831	rs15809	1,0	1,08	0,012	2437
rs62625015	rs409953	0,908	63,84	0,74	65
rs62625015	rs15809	1,0	1,12	0,011	2389
rs409953	rs15809	1,0	0,59	0,01	2324

Conclusão

A tabela mostra os valores de D', LOD, R² e a distância entre os SNPs. Se dois SNPs não possuem qualquer correlação, os valores de D', LOD e R² serão 0. Se eles estiverem em desequilíbrio, os valores de D' e R² serão próximos de 1 e o LOD será maior que 2. Caso o alelo seja muito raro, R² e o LOD terão valores próximos a 0, não podendo se tirar uma conclusão. Em negrito estão destacados os SNPs em LD.

APÊNDICE C - Modelos de associação dos SNPs identificados no gene *CFH* em pacientes e controles.

Modelo de associação &	SNPs	Pacientes n (%)	Controles n (%)	<i>p</i> *	OR (95% CI)	SNPs	Pacientes n (%)	Controles n (%)	<i>p</i> *	OR (95% CI)	
		rs1061147					rs1061170				
Codominante	AA	17 (10,1)	2 (5,6)	0,4828	1,50 (0,1-7,38)	TT	86 (50,3)	17 (45,9)	0,4782	1	
	AC	74 (43,8)	19 (52,8)		0,70 (0,33-1,51)	TC	67 (39,2)	18 (48,6)		0,71 (0,33-15,52)	
	CC	78 (46,2)	15 (41,7)		1	CC	18 (10,5)	2 (5,4)		1,59 (0,33-7,71)	
Dominante	AA - AC	91 (53,8)	21 (58,3)	0,5107	0,78 (0,37-1,64)	TT	86 (50,3)	17 (45,9)	0,5543	1	
	CC	78 (46,2)	15 (41,7)	1		TC - CC	85 (49,7)	20 (54,1)		0,80 (0,39-1,66)	
Recessivo	AA	17 (10,1)	2 (5,6)	0,4287	1,79 (0,39-8,35)	TC - TT	153 (89,5)	35 (94,6)	0,4039	1	
	AC - CC	152 (89,9)	34 (94,4)	1		CC	18 (10,5)	2 (5,4)		1,85 (0,40-8,61)	
Sobredominante	AA - CC	95 (56,2)	17 (47,2)	0,2763	1	TT - CC	104 (60,8)	19 (51,4)	0,2903	1	
	AC	74 (43,8)	19 (52,8)		0,66 (0,32-1,39)		TC	67 (39,2)	18 (48,6)		0,67 (0,32-1,40)
		rs35097611					rs35274867				
Codominante	CC	161 (95,3)	35 (97,2)	0,6664	1	AA	175 (97,2)	35 (94,6)	0,55555	1	
	CT	8 (4,7)	1 (2,8)		1,56 (0,19-13,18)	AT	5 (2,8)	2 (5,4)		0,59 (0,11-3,2)	
		rs34815383					rs55679475				
Codominante	TT	151 (88,3)	34 (91,9)	0,4418	1	TT	87 (48,3)	18 (48,6)	0,8392	1	
	TC	20 (11,7)	3 (8,1)		1,62 (0,45-5,87)	TC	93 (51,7)	19 (51,4)		0,93 (0,45-1,92)	
		rs513699					rs35343172				
Codominante	TT	44 (24,4)	7 (18,9)	0,4529	1	TT	170 (94,4)	36 (97,3)	0,4351	1	
	TC	136 (75,6)	30 (81,1)		0,71 (0,29-1,77)	TC	10 (5,6)	1 (2,7)		2,14 (0,26-17,55)	
		rs61822181					rs55771831				
Codominante	CC	19 (10,6)	2 (5,4)	0,1486	1	GG	87 (48,3)	18 (48,6)	0,8392	1	
	CT	161 (89,4)	35 (94,6)		0,36 (0,08-1,68)	GC	93 (51,7)	19 (51,4)		0,93 (0,45-1,92)	
		rs62625015					rs15809				
Codominante	CC	92 (51,1)	20 (54,1)	0,8951	1	CC	162 (61,5)	35 (94,6)	0,4451	1	
	CG	88 (48,9)	17 (45,9)		1,05 (0,51-2,17)	CG	15 (8,5)	2 (5,4)		1,76 (0,38-8,19)	
		rs409953									
Codominante	GG	101 (56,1)	245 (64,9)	0,5771	1	* valores <i>p</i> ajustados para as variáveis de correção "Idade", "Gênero" e "Procedência" & Modelos genotípicos de herança de acordo com Critério de Informação de Akaike <i>p</i> <0,05; OR: "odd ratio" ou razões de chance; CI: intervalo de confiança					
	GA	79 (43,9)	13 (35,1)		1,24 (0,58-2,63)						

APÊNDICE D - Modelos de associação dos SNPs identificados no gene *CFH* em pacientes com leptospirose afetados com febre.

SNP	Valor <i>p</i>				Valor <i>p</i> *				OR (95% CI)
	Codominante	Dominante	Recessivo	Sobredominante	Codominante	Dominante	Recessivo	Sobredominante	
rs1061147	0,11681	0,36733	0,03931	0,59945	0,13497	0,41088	0,04611	0,56664	0,23 (0,06 - 0,89)^r
rs35097611	0,18783				0,21689				nd
rs34815383	0,61530				0,69546				0,74 (0,17 – 3,21)
rs1061170	0,12755	0,44141	0,04242	0,52695	0,14257	0,54445	0,04886	0,43639	0,23 (0,06 - 0,91)^r
rs513699	0,21218				0,22648				0,41 (0,09 – 1,97)
rs61822181	0,06947				0,07509				nd
rs35274867	0,38642				0,35482				nd
rs55679475	0,93250				0,92954				1,05 (0,35 – 3,18)
rs35343172	0,16822				0,18860				nd
rs55771831	0,93250				0,92954				1,05 (0,35 – 3,18)
rs62625015	0,83025				0,97443				0,98 (0,32 – 2,99)
rs409953	0,39238				0,44809				0,66 (0,22 – 1,95)
rs15809	0,68699				0,69242				1,51 (0,18 – 12,95)

* valores *p* ajustados para as variáveis de correção “Idade”, “Gênero” e “Procedência”
p<0,05; OR: “*odd ratio*” ou razões de chance; CI: intervalo de confiança
r: modelo recessivo

APÊNDICE E - Modelos de associação dos SNPs identificados no gene *CFH* em pacientes com leptospirose afetados com cefaleia.

SNP	Valor <i>p</i>				Valor <i>p</i> *				OR (95% CI)
	Codominante	Dominante	Recessivo	Sobredominante	Codominante	Dominante	Recessivo	Sobredominante	
rs1061147	0,48051	0,43332	0,51792	0,24237	0,59226	0,47424	0,62838	0,31525	0,72 (0,38 – 1,37) ^s
rs35097611	0,12611				0,16396				0,35 (0,08 – 1,58)
rs34815383	0,42598				0,48654				0,71 (0,27 – 1,88)
rs1061170	0,92400	0,92024	0,74266	0,75913	0,95951	0,83253	0,90967	0,77533	0,91 (0,47 – 1,75) ^s
rs513699	0,45516				0,35241				1,41 (0,69 – 2,89)
rs61822181	0,10338				0,11472				2,22 (0,82 – 5,97)
rs35274867	0,82726				0,84218				0,83 (0,13 – 5,16)
rs55679475	0,97121				0,80516				0,92 (0,49 – 1,74)
rs35343172	0,02176				0,03334				0,23 (0,06 – 0,96)
rs55771831	0,97121				0,80516				0,92 (0,49 – 1,74)
rs62625015	0,78335				0,68740				0,88 (0,49 – 1,66)
rs409953	0,51755				0,33228				0,73 (0,38 – 1,38)
rs15809	0,15129				0,16737				0,46 (0,16 – 1,38)

* valores *p* ajustados para as variáveis de correção “Idade”, “Gênero” e “Procedência”
p<0,05; OR: “*odd ratio*” ou razões de chance; CI: intervalo de confiança
s: modelo sobredominante

APÊNDICE F - Modelos de associação dos SNPs identificados no gene *CFH* em pacientes com leptospirose afetados com mialgia.

SNP	Valor <i>p</i>				Valor <i>p</i> *				OR (95% CI)
	Codominante	Dominante	Recessivo	Sobredominante	Codominante	Dominante	Recessivo	Sobredominante	
rs1061147	0,08053	0,02789	0,86983	0,04164	0,33119	0,13747	0,73433	0,22183	0,41 (0,12 – 1,40) ^d
rs35097611	0,86044				0,72062				0,65 (0,07 – 6,22)
rs34815383	0,93453				0,49416				1,79 (0,31 – 10,17)
rs1061170	0,30777	0,13834	0,93237	0,15270	0,77645	0,48226	0,74867	0,62079	0,67 (0,22 – 2,06) ^d
rs513699	0,35881				0,14199				0,4 (0,1 – 1,51)
rs61822181	0,13749				0,05850				nd
rs35274867	1,00000				0,33735				nd
rs55679475	0,59696				0,83234				0,9 (0,34 – 2,36)
rs35343172	0,78499				0,89720				0,86 (0,1 – 7,62)
rs55771831	0,59696				0,83234				0,9 (0,34 – 2,36)
rs62625015	0,71508				0,93015				1,04 (0,4 – 2,74)
rs409953	0,18464				0,31611				0,61 (0,24 – 1,6)
rs15809	0,84966				0,57701				0,61 (0,12 – 3,21)

* valores *p* ajustados para as variáveis de correção "Idade", "Gênero" e "Procedência"
p<0,05; OR: "odd ratio" ou razões de chance; CI: intervalo de confiança
d: modelo dominante

APÊNDICE G - Modelos de associação dos SNPs identificados no gene *CFH* em pacientes com leptospirose afetados com icterícia.

SNP	Valor <i>p</i>				Valor <i>p</i> *				OR (95% CI)
	Codominante	Dominante	Recessivo	Sobredominante	Codominante	Dominante	Recessivo	Sobredominante	
rs1061147	0,48434	0,40413	0,27876	0,86049	0,62564	0,50945	0,37836	0,89652	0,62 (0,21 – 1,80) ^r
rs35097611	0,34351				0,52351				1,68 (0,32 – 8,8)
rs34815383	0,03969				0,06378				2,83 (0,87 – 9,2)
rs1061170	0,17514	0,09803	0,16898	0,41522	0,43875	0,25619	0,34150	0,56711	0,69 (0,36 – 1,32) ^d
rs513699	0,89158				0,76834				0,89 (0,42 – 1,88)
rs61822181	0,10976				0,25440				0,54 (0,18 – 1,62)
rs35274867	0,26925				0,38979				2,47 (0,27 – 22,81)
rs55679475	0,13878				0,19657				0,65 (0,34 – 1,25)
rs35343172	0,11339				0,27119				2,31 (0,47 – 11,42)
rs55771831	0,13878				0,19657				0,65 (0,34 – 1,25)
rs62625015	0,22054				0,27348				0,7 (0,37 – 1,33)
rs409953	0,13371				0,28925				0,7 (0,37 – 1,35)
rs15809	0,01311				0,03002				4,44 (0,94 – 20,98)

* valores *p* ajustados para as variáveis de correção “Idade”, “Gênero” e “Procedência”

p<0,05; OR: “*odd ratio*” ou razões de chance; CI: intervalo de confiança

d: modelo dominante

r: modelo recessivo

APÊNDICE H - Modelos de associação dos SNPs identificados no gene *CFH* em pacientes com leptospirose afetados com síndrome renal.

SNP	Valor <i>p</i>				Valor <i>p</i> *				OR (95% CI)
	Codominante	Dominante	Recessivo	Sobredominante	Codominante	Dominante	Recessivo	Sobredominante	
rs1061147	0,98040	0,89972	0,91432	0,84795	0,94133	0,96350	0,75401	0,81457	1,19 (0,40 – 3,57) ^r
rs35097611	0,56788				0,40357				0,5 (0,09 – 2,69)
rs34815383	0,00300				0,00144				5,3 (1,8 – 15,57)
rs1061170	0,98250	0,91609	0,91192	0,85972	0,89437	0,63684	0,88780	0,69310	1,17 (0,61 – 2,26) ^d
rs513699	0,24298				0,29052				1,51 (0,7 – 3,25)
rs61822181	0,76099				0,86151				0,91 (0,33 – 2,53)
rs35274867	0,76554				0,78772				1,29 (0,2 – 8,15)
rs55679475	0,67277				0,97051				0,99 (0,52 – 1,88)
rs35343172	0,79709				0,58851				0,68 (0,17 (2,8)
rs55771831	0,67277				0,97051				0,99 (0,52 – 1,88)
rs62625015	0,40270				0,61391				0,85 (0,44 – 1,62)
rs409953	0,60607				0,91069				0,96 (0,5 – 1,85)
rs15809	0,32366				0,35809				1,68 (0,56 – 5,05)

* valores *p* ajustados para as variáveis de correção “Idade”, “Gênero” e “Procedência”

p<0,05; OR: “*odd ratio*” ou razões de chance; CI: intervalo de confiança

d: modelo dominante

r: modelo recessivo

APÊNDICE I - Modelos de associação dos SNPs identificados no gene *CFH* em pacientes com leptospirose afetados com síndrome respiratória.

SNP	Valor <i>p</i>				Valor <i>p</i> *				OR (95% CI)
	Codominante	Dominante	Recessivo	Sobredominante	Codominante	Dominante	Recessivo	Sobredominante	
rs1061147	1,00000	0,81108	1,00000	0,73226	0,43192	0,74492	0,19505	0,8062	0,78 (0,17 – 3,49) ^d
rs35097611	1,00000				0,45876				nd
rs34815383	0,59832				0,25468				nd
rs1061170	0,77552	0,47704	0,85575	0,54875	0,89492	0,72192	0,85713	0,6376	1,44 (0,32 – 6,61) ^s
rs513699	0,37493				0,45692				2,14 (0,25 – 18,61)
rs61822181	1,00000				0,24282				nd
rs35274867	1,00000				0,51002				nd
rs55679475	0,16145				0,21308				2,73 (0,51 – 14,46)
rs35343172	1,00000				0,36153				nd
rs55771831	0,16145				0,21308				2,73 (0,51 – 14,46)
rs62625015	0,11954				0,12276				3,38 (0,65 – 17,7)
rs409953	0,27329				0,41153				1,89 (0,41 – 8,74)
rs15809	1,00000				0,28635				nd

* valores *p* ajustados para as variáveis de correção "Idade", "Gênero" e "Procedência"

p<0,05; OR: "odd ratio" ou razões de chance; CI: intervalo de confiança

d: modelo dominante

s: modelo sobredominante

APÊNDICE J - Modelos de associação dos SNPs identificados no gene *CFH* em pacientes com leptospirose afetados com síndrome hemorrágica.

SNP	Valor <i>p</i>				Valor <i>p</i> *				OR (95% CI)
	Codominante	Dominante	Recessivo	Sobredominante	Codominante	Dominante	Recessivo	Sobredominante	
rs1061147	0,20638	0,12863	0,18628	0,41629	0,23082	0,14175	0,20154	0,42794	0,53 (0,23 – 1,25) ^d
rs35097611	0,35839				0,07971				nd
rs34815383	0,59319				0,40721				1,71 (0,5 – 5,85)
rs1061170	0,74092	0,50746	0,54901	0,75138	0,78739	0,60287	0,54617	0,86946	0,63 (0,13 – 2,99) ^r
rs513699	0,33647				0,35276				1,61 (0,57 – 4,58)
rs61822181	0,51024				0,49879				1,66 (0,35 – 7,76)
rs35274867	0,78382				0,78922				1,37 (0,14 – 13,24)
rs55679475	0,87365				0,95725				0,98 (0,43-2,22)
rs35343172	0,36510				0,04885				nd
rs55771831	0,87365				0,95725				0,98 (0,43-2,22)
rs62625015	0,50626				0,60775				0,81 (0,35 – 1,84)
rs409953	0,74722				0,69859				1,18 (0,51 – 2,7)
rs15809	0,78574				0,79855				0,82 (0,17 – 3,92)

* valores *p* ajustados para as variáveis de correção “Idade”, “Gênero” e “Procedência”
 $p < 0,05$; OR: “*odd ratio*” ou razões de chance; CI: intervalo de confiança

d: modelo dominante

r: modelo recessivo

APÊNDICE K - Modelos de associação dos SNPs identificados no gene *CFH* em pacientes com leptospirose afetados com diarreia.

SNP	Valor <i>p</i>				Valor <i>p</i> ^{&}				OR (95% CI)
	Codominante	Dominante	Recessivo	Sobredominante	Codominante	Dominante	Recessivo	Sobredominante	
rs1061147	0,03805	0,90619	0,01311	0,20865	0,03914	0,86729	0,01331	0,22193	0,21 (0,04 – 1,01) ^c 0,19 (0,04 – 0,88)^r
rs35097611	0,81724				0,90108				0,91 (0,2 – 4,05)
rs34815383	0,91168				0,74899				0,85 (0,32 – 2,28)
rs1061170	0,04508	0,68203	0,01389	0,33542	0,04985	0,54111	0,01463	0,44410	0,20 (0,04 – 0,95)^c 0,19 (0,04 – 0,90)^r
rs513699	0,69468				0,66484				1,18 (0,56 – 2,5)
rs61822181	0,36019				0,30633				1,71 (0,6 – 4,89)
rs35274867	0,95799				0,93040				0,92 (0,15 – 5,77)
rs55679475	0,87156				0,75668				0,9 (0,47 – 1,72)
rs35343172	0,45167				0,51694				0,63 (0,16 – 2,59)
rs55771831	0,87156				0,75668				0,9 (0,47 – 1,72)
rs62625015	0,78203				0,65403				0,86 (0,45 – 1,65)
rs409953	0,36692				0,32374				0,72 (0,37 – 1,39)
rs15809	0,49479				0,47007				0,66 (0,21 – 2,07)

[&] valores *p* ajustados para as variáveis de correção "Idade", "Gênero"
p<0,05; OR: "odd ratio" ou razões de chance; CI: intervalo de confiança
r: modelo recessivo
c: modelo codominante

APÊNDICE L - Modelos de associação dos SNPs identificados no gene *CFH* em pacientes com leptospirose afetados com prostração.

SNP	Valor <i>p</i>				Valor <i>p</i> ^{&}				OR (95% CI)
	Codominante	Dominante	Recessivo	Sobredominante	Codominante	Dominante	Recessivo	Sobredominante	
rs1061147	0,58742	0,53290	0,33191	0,94663	0,57674	0,57843	0,30853	0,97453	0,55 (0,16 – 1,82) ^r
rs35097611	0,02458				0,00542				nd
rs34815383	0,25806				0,24944				1,76 (0,67 – 4,61)
rs1061170	0,53392	0,88091	0,31647	0,45991	0,50408	0,88354	0,29665	0,44117	0,54 (0,16 – 1,79) ^r
rs513699	0,98859				0,99087				1
rs61822181	0,88409				0,81317				1,13 (0,41 – 3,07)
rs35274867	0,93925				0,97105				1,03 (0,17 – 6,39)
rs55679475	0,08273				0,07583				1,8 (0,94 – 3,47)
rs35343172	0,01397				0,00157				nd
rs55771831	0,08273				0,07583				1,8 (0,94 – 3,47)
rs62625015	0,11358				0,09869				1,73 (0,9 - 3,34)
rs409953	0,57872				0,54248				1,23 (0,64 – 2,36)
rs15809	0,02290				0,02032				0,21 (0,05 – 0,97)

[&] valores *p* ajustados para as variáveis de correção “Idade”, “Gênero”
 $p < 0,05$; OR: “*odd ratio*” ou razões de chance; CI: intervalo de confiança
^r: modelo recessivo

APÊNDICE M - Modelos de associação dos SNPs identificados no gene *CFH* em pacientes com leptospirose afetados com dor na panturrilha.

SNP	Valor <i>p</i>				Valor <i>p</i> ^{&}				OR (95% CI)
	Codominante	Dominante	Recessivo	Sobredominante	Codominante	Dominante	Recessivo	Sobredominante	
rs1061147	0,02294	0,00825	0,94956	0,00920	0,03939	0,01341	0,85489	0,01760	0,41 (0,20 – 0,82)^c 0,43 (0,22 – 0,85)^d 0,45 (0,23 – 0,87)^s
rs35097611	0,38344				0,35773				2,09 (0,4 – 10,85)
rs34815383	0,04562				0,02233				3,59 (1,09 – 11,84)
rs1061170	0,01430	0,00569	0,97496	0,00512	0,02267	0,00833	0,88072	0,00898	0,38 (0,19 – 0,76)^c 0,41 (0,21 – 0,8)^d 0,41 (0,21 – 0,8)^s
rs513699	0,18819				0,19435				0,6 (0,28 – 1,31)
rs61822181	0,79096				0,88853				0,93 (0,34 – 2,53)
rs35274867	0,34010				0,37120				2,56 (0,28 – 23,71)
rs55679475	0,00241				0,00375				0,38 (0,19 – 0,74)
rs35343172	0,51344				0,53546				1,54 (0,38 – 6,28)
rs55771831	0,00241				0,00375				0,38 (0,19 – 0,74)
rs62625015	0,01025				0,01811				0,45 (0,23 – 0,88)
rs409953	0,05457				0,07675				0,55 (0,29 – 1,07)
rs15809	0,09229				0,09800				2,8 (0,75 – 10,47)

[&] valores *p* ajustados para as variáveis de correção “Idade”, “Gênero”
p<0,05; OR: “*odd ratio*” ou razões de chance; CI: intervalo de confiança

c: modelo codominante

d: modelo dominante

s: modelo sobredominante

APÊNDICE N - Modelos de associação dos SNPs identificados no gene *CFH* em pacientes com leptospirose afetados com vômito.

SNP	Valor <i>p</i>				Valor <i>p</i> ^{&}				OR (95% CI)
	Codominante	Dominante	Recessivo	Sobredominante	Codominante	Dominante	Recessivo	Sobredominante	
rs1061147	0,79909	0,55560	0,89926	0,50521	0,88114	0,63792	0,98003	0,62478	0,85 (0,43 – 1,68) ^d
rs35097611	0,87049				0,97822				0,98 (0,22 – 4,45)
rs34815383	0,96724				0,96965				0,98 (0,35 – 2,75)
rs1061170	0,67941	0,43014	0,91407	0,38403	0,63926	0,37662	0,98690	0,35833	0,73 (0,37 – 1,46) ^d
rs513699	0,33489				0,30518				1,5 (0,69 – 3,23)
rs61822181	0,76720				0,87667				0,92 (0,32 – 2,67)
rs35274867	0,16472				0,04787				nd
rs55679475	0,91316				0,89735				0,96 (0,48 – 1,89)
rs35343172	0,74995				0,67891				1,35 (0,32 – 5,65)
rs55771831	0,91316				0,89735				0,96 (0,48 – 1,89)
rs62625015	0,81252				0,83676				0,93 (0,47 – 1,84)
rs409953	0,95419				0,99643				1
rs15809	0,67249				0,62524				0,75 (0,24 – 2,33)

[&] valores *p* ajustados para as variáveis de correção "Idade", "Gênero"
 $p < 0,05$; OR: "odd ratio" ou razões de chance; CI: intervalo de confiança
d: modelo dominante

APÊNDICE O - Modelos de associação dos SNPs identificados no gene *CFH* em pacientes com leptospirose afetados com sufusão conjuntival.

SNP	Valor <i>p</i>				Valor <i>p</i> ^{&}				OR (95% CI)
	Codominante	Dominante	Recessivo	Sobredominante	Codominante	Dominante	Recessivo	Sobredominante	
rs1061147	0,34352	0,96042	0,21892	0,40310	0,10508	0,96747	0,04013	0,33445	nd ^r
rs35097611	0,29830				0,34322				2,41 (0,44 – 13,24)
rs34815383	0,25915				0,35032				0,41 (0,05 – 3,32)
rs1061170	0,41526	0,55582	0,21917	0,76782	0,12007	0,70679	0,04028	0,57611	nd ^r
rs513699	0,84800				0,83952				0,89 (0,3 – 2,69)
rs61822181	0,22594				0,21448				0,43 (0,12 – 1,52)
rs35274867	1,00000				0,26318				nd
rs55679475	0,78428				0,93395				0,96 (0,36 – 2,54)
rs35343172	0,45110				0,52500				1,75 (0,34 – 9,08)
rs55771831	0,78428				0,93395				0,96 (0,36 – 2,54)
rs62625015	0,59559				0,74895				0,85 (0,32 – 2,28)
rs409953	0,65819				0,74094				0,85 (0,31 – 2,3)
rs15809	0,85665				0,85148				1,17 (0,24 – 5,72)

[&] valores *p* ajustados para as variáveis de correção “Idade”, “Gênero”
p<0,05; OR: “*odd ratio*” ou razões de chance; CI: intervalo de confiança
^r: modelo recessivo

APÊNDICE P - Comparação das freqüências alélicas dos SNPs rs61822181, rs55679475, rs55771831, rs62625015 e rs409953 entre a população de estudo e populações de referência.

SNP/Alelo	Populações de referência (Bases de dados públicas)*				População de estudo	
	Geral	Africana	Ameríndia	Europeia	Argentina	Brasil
rs61822181						
C	87,2	89,5	81,0	88,7	52,2	54,4
T	12,8	10,5	19,0	11,3	47,8	45,7
rs55679475						
T	99,9	100	99,7	100	75,0	74,3
C	0,1	0	0,3	0	25,0	25,7
rs55771831						
G	99,9	100	99,9	100	75,0	74,3
C	0,1	0	0,1	0	25,0	25,7
rs62625015						
C	100	100	99,9	100	78,3	76,0
G	0	0	0,1	0	21,7	24,0
rs409953						
G	100	100	100	100	78,3	78,2
A	0	0	0	0	21,7	21,8

* Bases de dados públicas '1000 Genome' e 'Ensembl'
 Freqüências alélicas representadas em porcentagem

APÊNDICE Q - Região do gene *CFH* que contém as variantes rs55679475 e rs55771831 e rs62625015 comparada com diferentes espécies de primatas não humanos.

	-Q-	-N-	-A-	Y	-I-	V	-V-	-R-	-Y-	Q	-C-	-R-
Human	CAA	AA T	GCT	T AT	ATA	G TG	GTA	CGT	TAT	CAA	TGT	A GG
Orangutan	CAA	AAT	GCT	C AT	AGA	GTG	GTA	CGT	TAC	GAA	TGT	AGG
Sooty mangabey	CAA	AAC	GCT	C AT	ATA	GTG	GTA	CGT	TAT	GAA	TGT	AGG
Drill	AAA	AAT	GCT	C AT	ATA	GTG	GTA	CGT	TAT	GAA	TGT	AGG
Crab-eating macaque	AAA	AAT	GCT	C AT	ATA	GTG	GTA	CGT	TAT	GAA	TGT	AGG
		<u>Y</u>	<u>R</u>										
Macaque	AAA	AA T	GCT	C AT	ATA	GTG	GTA	CGT	TAT	GAA	TGT	AGG
Pig-tailed macaque	AAA	AAT	GCT	C AT	ATA	GTG	GTA	CGT	TAT	GAA	TGT	AGG
Black snub-nosed monkey	CAA	AAT	GCT	C AT	ATA	GTG	GTA	CGT	TAT	GAA	TGT	AGG
Golden snub-nosed monkey	CAA	AAT	GCT	C AT	ATA	GTG	GTA	CGT	TAT	GAA	TGT	AGG
Ma's night monkey	CAA	AAT	G GT	T AT	ACA	G-G	GTA	TAT	TAT	GAA	TGT	AGG
Capuchin	CAA	AAT	GCT	T AT	AT-	- - -	GTA	CAT	TAT	GAA	TGT	AGG
Bolivian squirrel monkey	CAA	AAT	GCT	T AT	ATG	AGG	GTA	TAT	TAT	GAA	TGT	AGG
Tarsier	AGA	AAT	GCT	A AT	ATC	ATA	GTA	CAT	TTT	G AG	TGT	ATA
Bushbaby	GAA	AAT	GCT	A AG	ATA	ACA	GTG	CAT	TAT	GAA	TGT	AAT
Greater bamboo lemur	AAA	AAT	GCT	A AT	ATA	ATA	GTA	CGC	TAT	GAA	TGT	G AG
Coquerel's sifaka	AAA	AAT	GCT	A AT	ATA	ATA	GTA	CGC	TAT	GAA	TGT	AAG
Upper Galilee mountains rat	AAA	AAT	GCT	A CT	ATA	TTA	GTG	CGT	TAT	GAA	TGC	AAT

Os alelos polimórficos de cada variante assim como os aminoácidos codificados pelos códons correspondentes estão representados em vermelho e negrito. Destacados em verde os nucleotídeos cuja troca representa uma variante sinônima e em amarelo as variantes 'missense'.

ANEXOS

ANEXO A - Trabalhos apresentados em congressos.

- Santiesteban-Lores, L.E.; Midon, L.M.; Chiani Y.; Isaac L. Complement factor H genetic polymorphisms in leptospirosis infected patients. *XLIII Congress of the Brazilian Society of Immunology and XI Extra Section of Clinical Immunology*. Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil, 2018.
- Santiesteban-Lores, L.E.; Midon, L.M.; Morais Da Fonseca, D.; Pontillo, A.; Chiani, Y.; Heneiman, M.B.; Cavalvante, G.; Daher, E.; Isaac, L. Complement Factor H polymorphisms in leptospirosis patients. *11th International Leptospirosis Conference*. Vancouver, Canadá, 2019.
- Santiesteban-Lores, L.E.; Midon, L.M.; Morais Da Fonseca, D.; Pontillo, A.; Chiani, Y.; Heneiman, M.B.; Cavalcante, G.; Daher, E.; Isaac, L. Complement Factor H polymorphisms in leptospirosis patients. *17th European Meeting on Complement in Human Diseases*. Madrid, Espanha, 2019.
- Santiesteban-Lores, L.E.; Midon, L.M.; Chiani, Y.; Cavalvante, G.; Daher, E.; Heneiman, M.B.; Pontillo, A.; Morais Da Fonseca, D.; Isaac, L. Influence of Complement Factor H gene polymorphisms in leptospirosis susceptibility. *XLIV Congress of the Brazilian Society of Immunology. Immunotherapy: recent advances and future for therapeutic interventions*. Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, 2019.

ANEXO B - Artigos publicados.

- Santiesteban-Lores, L.E.; Amamura, T.A.; Da Silva, T.F.; Midon, L.M.; Carneiro, M.C.; Isaac, L.; Bavia, L. A double edged-sword - the Complement System during SARS-CoV-2 infection. ***Life Sciences***. 272:119245, 2021. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119245.
- Santiesteban-Lores, L.E.; Carneiro, M.C.; Isaac, L.; Bavia, L. Complement System in Alcoholic Liver Disease. ***Immunology Letters***. v. 236, p. 37-50, 2021