

THAIS AKEMI AMAMURA

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE PROTEASES SECRETADAS
POR LEPTOSPIRAS PATOGÊNICAS NA FAGOCITOSE POR
MACRÓFAGOS HUMANOS E MURINOS**

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

2022

THAIS AKEMI AMAMURA

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE PROTEASES SECRETADAS
POR LEPTOSPIRAS PATOGÊNICAS NA FAGOCITOSE POR
MACRÓFAGOS HUMANOS E MURINOS**

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

2022

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Amamura, Thais Akemi

Atividade Proteolítica de Proteases Secretadas
por Leptospiras Patogênicas na Fagocitose por
Macrófagos Humanos e Murinos / Thais Akemi Amamura;
orientador Profa. Dra. Lourdes Isaac. -- São
Paulo, 2022.

124 p.

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

1. Sistema Complemento. 2. Leptospirose. 3.
Mecanismo de Evasão. 4. Protease. I. Isaac, Profa.
Dra. Lourdes , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Thais Akemi Amamura

Título da Dissertação/Tese:

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 _____, 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:.....

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Avaliação da atividade proteolítica de proteases secretadas por leptospiros patogênicos na fagocitose por fagócitos humanos e murinos*", registrado sob o protocolo nº **48/2017**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **25/04/2017** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Lourdes Isaac**

- Departamento: *Imunologia*

- Membros da Equipe: *Thais Akemi Amamura (Pós-graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Evaluation of the proteolytic activity of proteases secreted by pathogenic leptospires in phagocytosis by human and murine phagocytes*", protocol nº **48/2017**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **4/25/2017** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

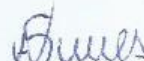
- Principal Investigator: **Dr.(a.) Lourdes Isaac**


- Team members: *Thais Akemi Amamura (Graduate Student)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	C57BL/6	Fêmea/female	4-8 semanas/weeks	120

São Paulo, 26 de abril de 2017.


Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP


Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretário CEUA-ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Sales 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@ich.usp.br

São Paulo, 19 de maio de 2017.

PARECER 1337/CEPSH

CAAE nº 68319517.2.0000.5467


Protocolo CEPSH-ICB nº 1381/17

O Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Avaliação da atividade proteolítica de proteases secretadas por leptospira patogênicas na fagocitose por fagócitos humanos e murinos*", da pesquisadora Profa. Dra. **Lourdes Isaac** e da aluna Thaís Akemi Amamura.

Cabe às pesquisadoras 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: www.ich.usp.br, 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 **19/05/2018**, 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

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Complemento do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, em São Paulo, SP, Brasil. Recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Processo: 2017/10208-9

“As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP”.

Aos meus pais com amor e gratidão pelo incansável apoio e incentivo durante todo o período deste trabalho.

A minha filha amada, a quem dedico todas as minhas conquistas!! Você é a parte mais bonita da minha história, a minha fortaleza, o meu amor inesgotável!!

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Lourdes Isaac pela grande amizade de todos esses anos, pelos conselhos de mãe, por ter me transmitido sábias palavras em momentos de angústia que me fortaleceram e me ajudaram a enxergar o horizonte, pela generosidade e pela confiança em meu trabalho. Sou muito grata por todo o conhecimento pessoal e profissional que obtive com seus ensinamentos e que vou levar por toda a minha vida.

Aos meus pais, irmãs e familiares por terem sempre me incentivado nessa minha caminhada, pelo amor incondicional por toda a força e o apoio que vocês sempre me deram!!

Ao meu amado Evandro e à minha doce filha Yukari por estarem ao meu lado sempre, me trazendo revigorantes xícaras de café, e por entenderem a minha ausência em diversos momentos. Todo o meu esforço e dedicação é exclusivamente por vocês!!

Aos meus queridos colegas e amigos do Laboratório de Complemento: Elena, Tiago, Leo, Milena, Isabela, Anielle e também todos aqueles que passaram por ele, pela amizade, pelo apoio constante, pelas risadas e cafés que compartilhamos e por todos os momentos especiais que passamos juntos.

À Dra Angela Barbosa e Dani Courrol e ao Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan: Dani, Luan, Cassia pela amizade, pela grande ajuda com a papalisina, pelas contribuições com os nossos trabalhos e as valiosas discussões nos seminários.

Aos pesquisadores e funcionários do Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária da USP: Marcos B. Heinemann e Gisele O. Souza que nos forneceram as culturas de leptospiros para a realização desse trabalho.

Ao Ildefonso A. Silva-Junior pela paciência e pelo auxílio nos experimentos realizados na citometria de fluxo.

À Dra Rosa M. Chura-Chambi do IPEN que fez as purificações das proteases para a realização deste estudo.

À Rosana Prisco pelo auxílio com todas as análises estatísticas e pelo café durante as nossas reuniões e discussões.

Ao Mario Costa Cruz pelas análises e imagens belíssimas que capturou no confocal. Suas imagens embelezaram este trabalho.

Às nossas queridas técnicas de laboratório: Marlene, Claudinha, Sandra, Áurea por todo o suporte técnico, pela amizade e por toda a ajuda fornecida na realização deste projeto.

Ao querido Niels Olsen por toda a ajuda que me deu durante todo o período da minha Pós-graduação. Você tem um coração enorme Niels e eu sou profundamente grata a você por tudo o que fez por mim. Você sempre estará em meu coração.

Aos Professores do Departamento de Imunologia por todo o conhecimento transmitido durante as aulas e palestras.

Aos amáveis funcionários do Departamento de Imunologia: Eni, João, Milton, Moisés, Otacílio, pela ajuda, pela disponibilidade, pelo carinho e amizade! Vocês são demais!!

Aos amigos do Departamento de Imunologia pela amizade, pelas palavras de carinho, pelas risadas, pelo apoio nos momentos difíceis.

Ao CNPq e à FAPESP pelo suporte financeiro para a execução deste projeto.

À todas as pessoas que eu encontrei pelo caminho ou estiveram comigo durante esta jornada, muuuuito obrigada de coração!! Cada um de vocês fazem parte da minha história.

Quando não houver saída
Quando não houver mais solução
Ainda há de haver saída
Nenhuma ideia vale uma vida
Quando não houver esperança
Quando não restar nem ilusão
Ainda há de haver esperança
Em cada um de nós, algo de uma criança

Sérgio Britto (Titãs)

RESUMO

Amamura, Thais Akemi. **Atividade proteolítica de proteases secretadas por leptospiros patogênicas na fagocitose por macrófagos humanos e murinos.** 2021. 123 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A leptospirose é uma zoonose causada por bactérias espiroquetas que pertencem ao gênero *Leptospira*. Muito frequente em áreas tropicais e subtropicais, a doença representa um grave problema de saúde pública. Leptospiros patogênicos possuem a habilidade de escapar do Sistema Complemento, sendo capazes de sobreviver *in vitro* quando em contato com soro humano normal (SHN). Em um estudo anterior realizado por nosso grupo, observou-se que o sobrenadante de cultura de várias espécies de leptospiros patogênicos (SLP) contem proteases que clivam várias proteínas do Complemento como a molécula central C3, assim como seus fragmentos, C3b e iC3b. Nossa hipótese de trabalho é que tais proteases, incluindo termolisina e papalisina, poderiam diminuir a internalização e morte de leptospiros por fagócitos. Empregando citometria de fluxo, nós observamos menor presença de LFA-1, CR3 e CR4 em macrófagos peritoneais murinos tratados por 24 h com SLP. Por microscopia confocal, observou-se menor presença de TLR2, CD11b e CD206 quando essas células foram tratadas com SLP por 24 h. Macrófagos da linhagem humana THP-1, após tratamento com SLP e termolisina, apresentam menor presença de TLR2, TLR4, CD206 e CR1 em sua superfície. Além disso, opsoninas como C3b/iC3b depositadas na superfície de leptospiros patogênicos também podem ser completamente degradadas na presença de SLP ou termolisina recombinante. E por fim, a fagocitose de leptospiros patogênicos por THP-1 diminuiu significativamente, quando essas células foram tratadas com SLP, termolisina e papalisina recombinantes e comparadas com células tratadas apenas com PBS. Desta forma, os resultados obtidos neste estudo sugerem que proteases secretadas por leptospiros patogênicos poderiam ser capazes de interferir no seu reconhecimento e na sua internalização pelos macrófagos murinos ou humanos, por meio da degradação de opsoninas presentes no soro humano normal ou depositadas na membrana da bactéria bem como na clivagem ou inibição de moléculas de superfície de macrófagos favorecendo assim a disseminação de leptospiros no organismo.

Palavra-chave: Leptospira, Sistema Complemento, Evasão imune, Protease

ABSTRACT

Amamura, T.A. **Proteolytic Activity of Secreted Proteases from Pathogenic *Leptospira* on Phagocytosis by Murine and Human Macrophages.** 2021. 123p. Thesis (Ph.D. thesis in Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Leptospirosis is a zoonosis caused by spirochete bacteria that belong to the genus *Leptospira*. This disease represents a serious public health problem, especially in developing countries with tropical and sub-tropical temperatures. Pathogenic leptospires escape from the Complement System, being able to survive *in vitro* when in contact with normal human serum (NHS). In a previous study carried out by our group, it was observed that culture supernatants from several pathogenic species of leptospires (SPL) contain proteases that cleave many Complement proteins, such as, the central molecule C3, as well as its fragments C3b and iC3b. Our hypothesis is that such proteases, including thermolysin and pappalysin, could decrease the uptake and death of leptospires by phagocytes. Using flow cytometry, we observed lower presence of LFA-1, CR3 and CR4 in murine peritoneal macrophages treated with SPL for 24 h. By confocal microscopy, we observed less presence of TLR2, CD11b and CD206 when these cells were treated with SPL for 24 h. Human macrophages (THP-1) showed lower presence of TLR2, TLR4, CD206 and CR1 on their surface, after treatment with SPL and thermolysin. Furthermore, opsonins such as C3b/iC3b deposited on the surface of pathogenic leptospires can also be completely degraded in the presence of SPL or recombinant thermolysin. Finally, the phagocytosis of pathogenic leptospires by THP-1 significantly decreased when these cells were treated with recombinant SPL, thermolysin or pappalysin compared with cells treated only with PBS. Thus, this study suggests that proteases secreted by pathogenic leptospires could interfere with their own recognition and internalization by murine or human macrophages, by degrading opsonins present in NHS or deposited in the bacterial membrane as well as in the cleavage or inhibition of macrophage surface molecules, thus favoring the spread of leptospires in the organism.

Keywords: Leptospira, Complement System, Immune Evasion, Protease

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - O ciclo de transmissão da leptospirose.....	24
Figura 2 - Microscopia eletrônica de varredura da <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Icterohaemorrhagiae.....	27
Figura 3 - Ativação do Sistema Complemento.....	30
Figura 4 - Representação esquemática da clivagem de C3 e seus fragmentos.....	32
Figura 5 - Representação esquemática da termolisina codificada pelo gene <i>Lic13322</i> de <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni.....	46
Figura 6 - Análise da atividade proteolítica dos SLP, SLNP e termolisina recombinante.....	59
Figura 7 - Viabilidade dos macrófagos murinos na presença de proteases de leptospiros.....	61
Figura 8 - Fagocitose de zimosan por macrófagos peritoneais estimulados com tioglicolato.....	63
Figura 9 - Fagocitose de zimosan por macrófagos murinos tratados com SLP e SLNP.....	65
Figura 10 - Fagocitose de zimosan por macrófagos murinos tratados com termolisina recombinante.....	66
Figura 11 - As proteases secretadas pelas leptospiros interferem na fagocitose de zimosan por macrófagos murino.....	70
Figura 12 - As proteases secretadas pelas leptospiros interferem na fagocitose de zimosan por macrófagos murinos.....	71
Figura 13 - Comparação entre a fagocitose de zimosan por macrófagos incubados com SLP e termolisina recombinante.....	72
Figura 14 - Seleção de macrófagos peritoneais murinos. As células de camundongos C57BL/6 previamente estimulados com tioglicolato foram coletadas e marcadas com anticorpo anti-F4/80.....	74
Figura 15 - As proteases secretadas pelas leptospiros interferem na fagocitose de zimosan-FITC por macrófagos murinos.....	75
Figura 16 - Seleção de macrófagos peritoneais murinos. As células de camundongos C57BL/6 previamente estimulados com tioglicolato foram coletadas e marcadas com anticorpo anti-F4/80.....	76
Figura 17 - Presença de FcγRI e CR1 em macrófagos tratados com SLP ou termolisina recombinante tempo-dependente.....	78
Figuras 18 - Presença de LFA-1 e CR4 em macrófagos tratados com SLP ou termolisina recombinante tempo-dependente.....	79

Figura 19 - Presença de CR3 em macrófagos tratados com SLP ou termolisina recombinante tempo-dependente.....	80
Figura 20 - Efeito da ação enzimática de proteases de leptospiras patogênicas sobre TLR2 de macrófagos.....	82
Figura 21 – Análise estatística sobre o efeito da ação enzimática de proteases de leptospiras patogênicas sobre TLR2 de macrófagos.....	83
Figura 22 - Efeito da ação enzimática de proteases de leptospiras patogênicas sobre CD11b de macrófagos.....	84
Figura 23 - Análise estatística sobre o efeito da ação enzimática de proteases de leptospiras patogênicas sobre CD11b de macrófagos.....	85
Figura 24 - Efeito da ação enzimática de proteases de leptospiras patogênicas sobre CD206 de macrófagos.....	86
Figura 25 - Análise estatística sobre o efeito da ação enzimática de proteases de leptospiras patogênicas sobre CD206 de macrófagos.....	87
Figura 26 - Tratamento de leptospiras não patogênicas opsonizadas.....	89
Figura 27 - Clivagem de opsoninas depositadas na membrana de leptospiras não patogênicas.	90
Figura 28 - Análise da atividade proteolítica da papalisina recombinante sobre C3.....	91
Figura 29 - A papalisina recombinante afeta a viabilidade dos macrófagos murinos.....	92
Figura 30 - Clivagem de opsoninas depositadas na superfície de leptospiras.....	94
Figura 31 - Degradação de opsoninas por proteases de leptospiras patogênicas.....	95
Figura 32 - Presença de TLR2 e TLR4 em macrófagos tratados com SLP, termolisina ou papalisina recombinantes tempo-dependente.....	98
Figura 33 - Presença de CD206 e FcγRI em macrófagos tratados com SLP, termolisina ou papalisina recombinantes tempo-dependente.....	99
Figura 34 - Presença de CR1 e CR3 em macrófagos tratados com SLP, termolisina ou papalisina recombinantes tempo-dependente.....	100
Figura 35 - Presença de CR4 em macrófagos tratados com SLP, termolisina ou papalisina recombinantes tempo-dependente.....	101
Figura 36 - Fagocitose de leptospiras patogênicas por macrófagos THP-1 na presença de SLP ou termolisina recombinante.....	103
Figura 37 - Fagocitose de leptospiras patogênicas por macrófagos THP-1 na presença de papalisina recombinante.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Alp1** - *alkaline serine protease 1*
- AP-1** - Activator protein 1
- AprA** - protease alcalina A
- Aur** - aureolisina
- C4BP** - *C4b Binding Protein*
- CR** - *Receptores de Complemento*
- DC** - células dendríticas
- DMEM** - Dulbecco's Modified Eagle Medium
- E. coli** - *Escherichia coli*
- EDTA** - *ethylene diamine tetracetic acid*
- ELISA** - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- EMJH** - *Ellinghausen–McCullough/Johnson–Harris*
- FB** - Fator B
- FcγR** - Fc-gamma receptors
- FD** - Fator D
- FI** - Fator I
- FP** – Properdina
- GeI** - gelatinase E
- IFN-γ** – Interferon-gama
- Ig** - imunoglobulinas
- IL-4, 6, 10, 13** – Interleucina 4, 6, 10, 13
- kDa** – kilodalton
- LBP** - *LPS-binding protein*
- LcpA** - *Leptospiral complement regulator-acquiring protein A*
- Len** - *eptospiral endostatin-like*
- LFA-1** - *Leukocyte function associated antigen-1*
- Lig** - *Leptospiral immunoglobulin-like protein*

LigA - *Leptospiral immunoglobulin-like protein A*

LigB - *Leptospiral immunoglobulin-like protein B*

L. biflexa - *Leptospira biflexa*

L. interrogans - *Leptospira interrogans*

LipL32 - *Leptospiral Lipoprotein 32*

LPS – Lipopolissacarídeo

Lsa 24 - *leptospiral surface adhesin*

MAC - Complexo de Ataque à Membrana

MASP – Serino protease associado à MBL

MAT - Teste de Aglutinação Microscópica

MBL - Lectina ligadora de manose

MCP - *membrane cofactor protein*

MD-2 - Myeloid Differentiation factor 2

Mg⁺⁺ - Magnésio

MHC - *Major Histocompatibility Complex*

Nalp - *serine protease neisserial autotransporter P*

NETs - *Neutrophil Extracellular Traps*

NF-κB - factor nuclear kappa B

PAMP - *Pathogen-Associated Molecular Pattern*

PBS - *phosphate buffer saline*

PG - peptideoglicano

PgtE - *outer membrane protein E*

PMA - *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*

PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonilo

PRRs - *Pattern Recognition Receptors*

PVDF - Difluoreto de polivinilideno

ROS - Reactive oxygen species

Saps - *secreted aspartic proteinases*

SR-AI/II – *scavenger-AI/II*

ScpA - *staphopain A*

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

SHN - Soro humano normal

SLP - sobrenadante de leptospiras patogênicas

SLNP - sobrenadante de leptospiras não patogênicas

SpeB - *streptococcal pyrogenic exotoxin B*

SspB - *staphopain B*

TGF- β - *transforming growth factor beta*

TLF - *Toll-Like Receptors*

TNF- α - Fatores de Necrose Tumoral Alfa

uPA - *urokinase-type plasminogen activator*

VEGF - Vascular endothelial growth factor

WT – Wild type

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 Leptospirose.....	23
1.2 As leptospiras.....	25
1.3 O Sistema Complemento e suas funções biológicas.....	28
1.4 A proteína C3.....	31
1.5 Mecanismos de evasão de leptospiras ao Sistema Complemento.....	33
1.6 Macrófagos.....	37
1.7 Fagocitose.....	38
1.8 Leptospiras e Fagócitos.....	41
1.9 Termolisina e Papalisina.....	45
2 OBJETIVOS.....	48
2.1 Objetivo geral.....	48
2.2 Objetivos específicos.....	48
3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL ATÉ O PRESENTE MOMENTO.....	49
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.1 Espécies de leptospiras e condições de cultivo.....	50
4.2 Obtenção dos sobrenadantes de cultura de leptospiras.....	50
4.3 Análise da atividade proteolítica dos sobrenadantes das leptospiras patogênicas, não patogênicas e termolisina recombinante.....	51
4.4 Modelo animal.....	51
4.5 Obtenção de macrófagos murinos.....	52
4.6 Obtenção dos soros de camundongos B6.C3 ^{+/+} e B6.C3 ^{-/-}	52
4.7 Ensaio de viabilidade celular.....	53
4.8 Preparação das partículas de zimosan.....	53

4.9 Ensaio de fagocitose na presença de proteases de leptospiras.....	53
4.10 Análise da presença de moléculas de superfície em macrófagos por citometria de fluxo.....	54
4.11 Análise da presença de receptores celulares por microscopia confocal.....	55
4.12 Deposição de opsoninas na membrana de leptospiras patogênicas na presença de SLP, termolisina e papalisina recombinantes.....	55
4.13 Fagocitose de leptospiras patogênicas por macrófagos na presença de proteases.....	56
4.14 Análises estatísticas.....	56
4.15 Soluções e reagentes.....	56
5 RESULTADOS.....	51
5.1 Análise da atividade proteolítica de diferentes sobrenadantes de leptospiras sobre a molécula C3.....	51
5.2 Avaliação da viabilidade dos macrófagos peritoneais na presença de sobrenadantes de leptospiras e termolisina recombinante.....	60
5.3 Fagocitose de partículas de zimosan por macrófagos murinos na presença de soro B6.C3 ^{+/+} e B6.C3 ^{-/-}	62
5.4 Fagocitose de partículas de zimosan por macrófagos murinos tratados com sobrenadantes de <i>Leptospira</i> e termolisina recombinante.....	64
5.5 Fagocitose de partículas de zimosan por macrófagos murinos na presença de sobrenadantes de <i>Leptospira</i> e termolisina recombinante.....	67
5.6 Avaliação da fagocitose de partículas de zimosan-FITC por macrófagos peritoneais na presença de SLP e termolisina recombinante.....	73
5.7 Análise da presença de moléculas na superfície de macrófagos peritoneais tratados com SLP e termolisina recombinante.....	76
5.8 Análise da presença de receptores de macrófagos por microscopia confocal.....	81
5.9 Avaliação da atividade proteolítica das proteases presentes nos SLP e SLNP e da termolisina recombinante na opsonofagocitose.....	88
5.10 Avaliação da atividade proteolítica da papalisina recombinante sobre a proteína C3 do Sistema Complemento de forma dose dependente.....	91

5.11 Avaliação da viabilidade dos macrófagos peritoneais na presença de papalisina recombinante.....	92
5.12 Degradação de opsoninas depositadas na membrana de leptospiras patogênicas por SLP, termolisina e papalisina recombinantes.....	93
5.13 Análise da presença de moléculas na superfície de macrófagos THP-1 tratados com SLP, termolisina ou papalisina recombinantes.....	96
5.14 Fagocitose de leptospiras patogênicas por macrófagos THP-1 na presença de proteases.....	102
6 DISCUSSÃO.....	105
7 CONCLUSÕES.....	112
8 REFERÊNCIAS.....	114
9 ANEXOS.....	123
ANEXO A - Trabalho apresentado em congresso.....	123
ANEXO B - Artigo publicado.....	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fagocitose de zimosan tratados com soro B6.C3 ^{+/+} , B6.C3 ^{-/-} e macrófagos tratados com SLP e termolisina recombinante.....	68
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

1.Introdução

1.1 Leptospirose

A leptospirose é uma das principais zoonoses de origem bacteriana disseminadas mundialmente e o número de novos casos desta doença é estimado em aproximadamente um milhão a cada ano e 60.000 mortes, sendo reconhecida como um grave problema de saúde pública (Costa et al., 2015; Vincent et al., 2019). Fatores associados à alta prevalência da doença incluem locais de clima tropical e ameno devido a maior sobrevivência dessas bactérias em regiões quentes e úmidas. A expansão populacional em centros urbanos favorece a disseminação da doença e, dentre os grupos mais afetados, estão muitas vezes aqueles expostos às condições de saneamento básico inadequado. Estas situações agravam-se onde há enchentes frequentes, propiciando a disseminação das leptospiras no ambiente. Profissionais que desempenham funções ocupacionais associadas a trabalhos como coletores de lixo, agricultores, militares do exército e veterinários, que estão expostos ao contato direto com animais infectados, são potenciais alvos para contraírem a leptospirose (Levett, 2001, Bharti et al., 2003, Costa et al., 2015). Além disso, nas últimas décadas surtos de leptospirose em atividades recreativas aquáticas também estão sendo consideradas fator de risco (Haake et al., 2002).

A transmissão da doença ocorre principalmente após contato direto com a urina de animais infectados ou indiretamente por água e solo contaminados com leptospiras (**Figura 1**). Animais selvagens, de interesse econômico e domésticos podem ser considerados reservatórios, sendo os roedores os principais transmissores, especialmente em centros urbanos (Ko et al, 2009, Adler, de la Peña Moctezuma, 2009).

Seres humanos são considerados hospedeiros acidentais, infectando-se após penetração de leptospiras em cortes e lesões na pele ou através de mucosas. Uma vez no hospedeiro, as leptospiras disseminam-se pela circulação sanguínea alojando-se principalmente em órgãos como fígado, rins e pulmões, estabelecendo assim uma infecção sistêmica (Levett, 2001, Adler, de la Peña Moctezuma, 2009).

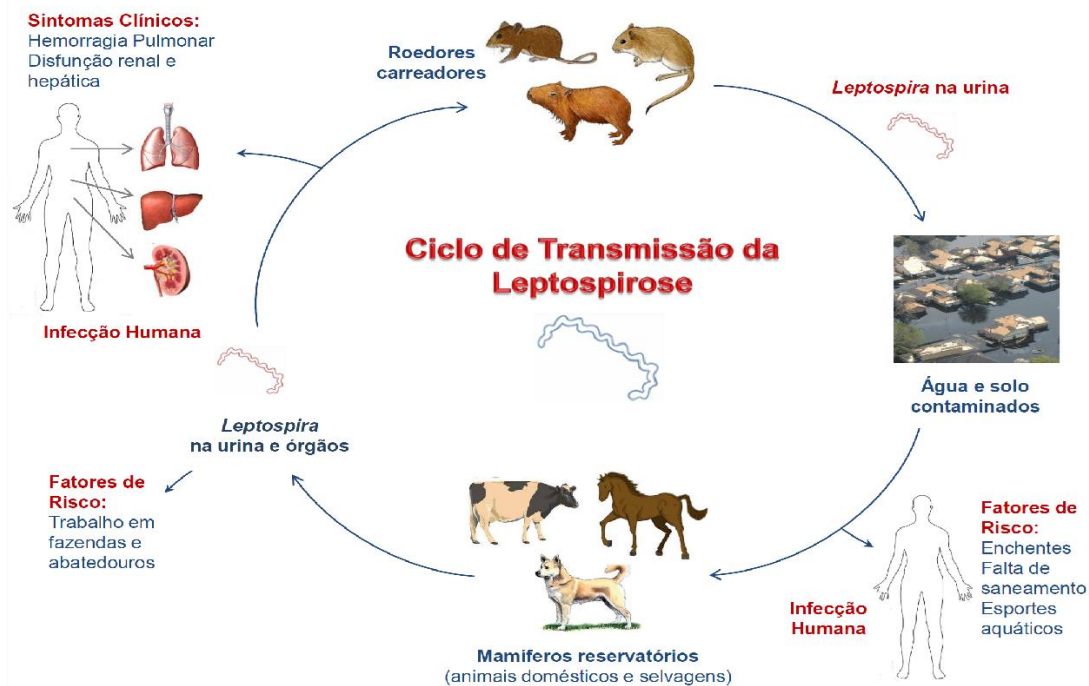


Figura 1 - O ciclo de transmissão da leptospirose. Os principais reservatórios das leptospiiras patogênicas são os roedores, os mamíferos domésticos e selvagens. As bactérias são eliminadas na urina destes animais e contaminam a água e o solo. Os humanos são hospedeiros acidentais e podem ser infectados pelo contato direto com animais ou com a água e solo contaminados. As principais manifestações clínicas da forma grave da doença incluem icterícia, hepatite, nefrite e hemorragia pulmonar (Fraga et al., 2014).

A leptospirose pode ser caracterizada como uma doença bifásica com manifestações clínicas muito variáveis. A gravidade da doença varia de acordo com o sorovar infectante, tamanho do inóculo, a idade e o estado de saúde do paciente (Evangelista, Coburn, 2010). Na fase aguda da doença, as leptospiiras 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 leptospiiras na urina com duração de 10 a 30 dias (Levett, 2001).

O quadro clínico é semelhante ao da gripe com sintomas como febre, cefaleia, mialgia, náuseas e vômitos. Contudo, a doença pode evoluir para formas sistêmicas graves como a Síndrome de Weil, caracterizada por icterícia, insuficiência renal, comprometimento hepático e pulmonar. A síndrome hemorrágica pulmonar vem sendo reconhecida como uma manifestação distinta que pode ocorrer na fase tardia da leptospirose. Os pacientes expressam sintomas como tosse, dispneia e hemoptise, os quais são associados a anormalidades radiográficas que sugerem a presença de infiltrado intersticial e até densa hemorragia pulmonar, responsável por mortalidade superior a 50% dos casos relatados (Levett, 2001; Bharti et al., 2003; Spichler et al., 2008).

A realização de exames laboratoriais para a leptospirose é de grande importância, uma vez que, o diagnóstico da leptospirose pode ser confundido com outras doenças que apresentam sintomas semelhantes. O teste de aglutinação microscópica (MAT) é considerado padrão-ouro de diagnóstico e de alta complexidade (Palaniappan et al., 2007). Entretanto, este método apresenta algumas limitações, pois é demorado e exige um conhecimento laboratorial especializado. O MAT é realizado a partir de duas amostras de soro de pacientes, coletadas com duas semanas de intervalos entre elas (Kitashoji et al., 2015). O teste é sensível e específico para a detecção de anticorpos anti-leptospiras em humanos. Neste teste, soros de pacientes reagem com suspensões de leptospiras vivas ou inativadas representantes de sorovares de uma determinada localidade. Após a incubação, a suspensão é analisada por microscopia óptica de campo escuro para determinação do título de aglutinação de leptospiras (Levett, 2001; Picardeau, 2013).

O tratamento da leptospirose depende da persistência dos sintomas e seriedade da doença. Para casos leves e moderados a doxiciclina é o antibiótico mais recomendado. Já a penicilina, ampicilina ou cefalosporina são indicadas para os quadros mais graves da doença (Bharti et al., 2003; Ricaldi et al., 2013).

A utilização de animais modelos é imprescindível para uma melhor compreensão da biologia e dos processos de transmissão, colonização e patogênese da *Leptospira* no hospedeiro. Hamsters Golden Syrian são preferencialmente os animais mais empregados devido a sua suscetibilidade à infecção, exibindo características clínicas de leptospirose aguda semelhantes às aquelas que ocorrem em humanos (Haake, 2006). Cobaias também são consideradas animais suscetíveis à leptospirose, uma vez que podem desenvolver hemorragia pulmonar e no peritônio levando à morte deste animal (Nally et al., 2004).

1.2 As leptospiras

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, responsáveis por movimentos de rotação e translação (**Figura 2**). Estruturalmente, estas bactérias apresentam dupla membrana e parede celular de peptidoglicanos intimamente associada à membrana interna (Levett, 2001; Adler, de la Peña Moctezuma, 2010).

A estrutura do lipopolissacarídeo (LPS) das leptospiros é semelhante àquela encontrada em outras bactérias Gram-negativas. Em espécies patogênicas como *L. interrogans*, o LPS estende-se 9,2 nm a partir do folheto externo, enquanto que na saprófita *L. biflexa* ele se encontra presente em uma camada mais fina de 6,0 nm. Fosfolipídeos, proteínas da membrana externa e LPS são os principais componentes da membrana externa que permitem a troca de solutos entre o espaço periplasmático e o meio ambiente (Evangelista, Coburn, 2010; Raddi, 2012).

As leptospiros patogênicas e saprófitas são semelhantes em relação à morfologia, mas diferem em vários aspectos biológicos. A bactéria patogênica *L. interrogans* sobrevive em diferentes ambientes como na água e em hospedeiros mamíferos. Esta espiroqueta é capaz de manter a motilidade em condições de osmolaridade fisiológica (cerca de 150 mM de NaCl), enquanto a saprófita *L. biflexa* perde sua motilidade nestas condições. O fato de leptospiros patogênicas suportarem alterações osmóticas preservando a sua motilidade sugere que esta espécie possui uma vantagem durante a migração no hospedeiro em comparação com as espécies saprófitas, ressaltando a importância da relação entre motilidade e virulência destas bactérias, que podem ser associadas ao LPS e adesinas (Takabe et al., 2013). Leptospiros patogênicas expressam em sua superfície proteínas como LigA (*leptospiral immunoglobulin-like*), LigB, LigC, Len (*leptospiral endostatin-like*) e Lsa 24 (*leptospiral surface adhesin*) com potencial função em sua adesão na matriz extracelular, possibilitando a sua penetração e disseminação no tecido do hospedeiro (Matsunaga et al., 2003; Barbosa et al., 2006; Gonçalves-de-Albuquerque et al., 2012).

As leptospiros são bactérias aeróbicas obrigatórias com temperatura ótima para crescimento entre 28 °C e 30 °C. Em contraste com as espécies patogênicas, as leptospiros saprófitas também são capazes de se multiplicar em temperaturas mais baixas (11-13°C). A faixa de pH ideal para o crescimento das leptospiros é 7,2 a 7,6. O tempo de crescimento de leptospiros patogênicas é estimado entre 14 e 18 h. Já as leptospiros saprófitas se multiplicam mais rapidamente, com tempo de crescimento aproximado de 4 a 5 h (Faine et al., 1999). O meio mais utilizado para o cultivo de leptospiros é o *Ellinghausen–McCullough Johnson–Harris* (EMJH), que é composto por ácido oleico, albumina de soro bovino e polissorbato (Tween) (Adler, de la Peña Moctezuma, 2010).

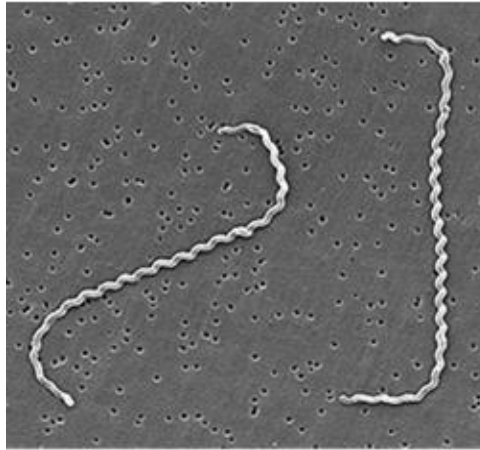


Figura 2 - Microscopia eletrônica de varredura da *Leptospira interrogans* sorovar *Icterohaemorrhagiae*. As leptospiras possuem aproximadamente 0,1 μm de largura e 6 μm a 20 μm de comprimento. Os flagelos localizados em extremidades opostas da bactéria contribuem para que estas possuam o formato espiralado, conferindo movimentos de rotação e translação (Levett, 2001).

A estrutura filogenética determinada a partir da sequência do gene *rRNA 16S* está em concordância com a taxonomia clássica aceita para espiroquetas, na qual a ordem *Spirochaetales* está dividida em duas famílias: *Spirochaetaceae* e *Leptospiraceae*. O sequenciamento do *rRNA 16S* é considerado o método mais preciso para determinar as relações filogenéticas, que identificaram os grupos de leptospiras anteriormente denominadas de patogênicas, intermediárias e saprófitas, de acordo com a sua patogenicidade. Além do *rRNA 16S*, outros genes foram utilizados para diferenciar as espécies que fazem parte do gênero *Leptospira* tais como *rpoB*, *gyrB* e *ligB* (Cerqueira, Picardeau, 2009; Levett, 2015).

Atualmente são descritas 64 espécies de leptospiras, incluindo espécies de um novo subclado que apresenta parentesco com a espécie saprófita. O estudo realizado por Picardeau e colaboradores identificou dois cladogramas principais, patogênicos (P) e saprófitas (S), sendo estes subdivididos em dois subclados cada: subclado P1, descrito anteriormente como patogênica, P2 descrito anteriormente como intermediária, S1 descrito anteriormente como saprófita e S2 o novo subclado (Vicent et al., 2019).

O teste de aglutinação cruzada permitiu a definição de sorovares os quais são distinguidos pela heterogeneidade estrutural das moléculas de LPS da bactéria fornecendo um importante instrumento para sua classificação. Os sorogrupos são identificados pelo MAT e têm como propósito agrupar sorovares com antígenos em comum. Contudo, os sorogrupos não possuem classificação taxonômica oficial (Levett, 2001; Cerqueira e Picardeau, 2009).

Um fator importante para o estabelecimento da infecção por *Leptospira* é a capacidade de aderir a células do hospedeiro. Muitos trabalhos realizados *in vitro* têm sugerido que a infecção de culturas de células teciduais com *L. interrogans* parece ser principalmente extracelular e a sua adesão em superfícies celulares foi descrita como uma propriedade importante de leptospiros patogênicos (Tsuchimoto et al., 1984, Vinh et al., 1984). Leptospiros associadas às células epiteliais do túbulo proximal nos rins foram observadas durante leptospirose crônica em hamsters e ovelhas (Marshall, 1974; Ballard et al., 1986).

A capacidade de *L. interrogans* de causar uma rápida disseminação sistêmica após a penetração na pele, sugere que leptospiros patogênicos são altamente invasivos. Em 1986, Ballard e colaboradores mostraram que estirpes virulentas de *Leptospira* aderiram às células epiteliais dentro de 3 h. Entretanto, estirpes não virulentas não foram capazes de aderirem às células no período de 24 h (Ballard et al., 1986). Além disso, Merien e colaboradores observaram que somente leptospiros patogênicos foram internalizadas pelas linhagens celulares Vero e J774, enquanto espécies não patogênicas permaneceram no espaço extracelular. O grupo inferiu ainda que a invasão de células epiteliais e a indução de apoptose de macrófagos por estirpes patogênicas de leptospiros podem estar relacionadas com a patogenicidade da doença, conferindo um mecanismo de escape da resposta imune do hospedeiro (Merien et al., 1997).

O sistema imune inato consiste na primeira linha de defesa do organismo e desempenha um papel essencial no reconhecimento e eliminação de leptospiros. A ativação do Sistema Complemento destaca-se como um importante mecanismo efetor nas primeiras horas de infecção, uma vez que leptospiros não patogênicos em contato com soro humano normal são rapidamente eliminados da circulação. Entretanto, leptospiros patogênicos desenvolveram estratégias de evasão ao Sistema Complemento, possibilitando a sua sobrevivência e disseminação no hospedeiro (Meri et al., 2005; Barbosa et al., 2009).

1.3 O Sistema Complemento e suas funções biológicas

O Sistema Complemento é composto por mais de 50 proteínas plasmáticas ou associadas a membranas celulares e participa tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa. Esse complexo sistema contribui com importantes mecanismos efetores na

defesa contra infecções, além de promover a remoção de células apoptóticas e de complexos imunes circulantes (**Figura 3**). Este sistema pode ser ativado por três vias distintas: Alternativa, Clássica e das Lectinas, que envolvem uma série de reações em cascata, culminando com a formação do Complexo de Ataque à Membrana (MAC), responsável pela lise celular (Revisado em Walport, 2001; Ekdahl et al., 2018).

O Sistema Complemento participa de vários mecanismos efetores gerados durante a resposta imune inata e adaptativa (revisado em Walport, 2001; Ricklin et al., 2010). A opsonização é uma das funções biológicas mais importantes sendo os fragmentos C3b e iC3b capazes de se ligarem covalentemente na superfície de diferentes patógenos e assim facilitarem a internalização dos mesmos por células fagocitárias. Esse processo de fagocitose pode ser facilitado mediante a interação dessas opsoninas com certos receptores de Complemento (CR) CR1, CR3 e CR4 presentes na superfície de células fagocitárias como neutrófilos e macrófagos (revisado em Bohlson et al., 2014; Takizawa et al., 1996).

O Sistema Complemento é responsável pela remoção de imunocomplexos mediante a interação dos complexos fixados aos fragmentos C3b e C4b que se ligam a CR1 presente nos eritrócitos e demais células sanguíneas, sendo transportados posteriormente por essas células para o fígado (principalmente) e baço para remoção desses complexos. Além disso, a eliminação de células apoptóticas por macrófagos ocorre principalmente após a ligação de C1q em auto antígenos. Além de C1q, outras proteínas como os fragmentos de C3 e de C4 facilitam a internalização de auto-antígenos por macrófagos (Revisado em Ricklin et al., 2010; Takizawa et al., 1996).

A regulação da resposta imune humoral também é uma importante função do Complemento. O CR2 expresso em linfócitos B e em células foliculares dendríticas interage com as moléculas C3d e iC3b presentes na superfície dos antígenos, desencadeando um aumento na sinalização da resposta celular. A interação entre CR2:C3d nas células foliculares dendríticas permite uma retenção mais prolongada de antígenos cobertos por C3d, ativa linfócitos B, contribuindo para a geração de maior número de células efetoras e de memória. O fragmento C3d é considerado um adjuvante molecular da resposta imune inata que influencia intensamente a produção de anticorpos (Dempsey et al., 1996; Fang et al., 1998; revisado em Carrol & Isenman, 2012).

Os fragmentos C3a e C5a são gerados localmente nos tecidos e na circulação, onde desempenham diferentes funções entre elas: a) recrutamento de células inflamatórias (fatores quimiotáticos); b) ativação de mastócitos e basófilos provocando

sua desgranulação (anafilotoxinas) e liberação de mediadores inflamatórios (Dias da Silva, Lepow, 1967; Daffern et al., 1995); d) aumento da vasodilatação; e e) ativação de complexos inflamassomas e secreção de citocinas (Laudisi et al., 2013; Manthey et al., 2009). Finalmente, uma das funções mais conhecidas do Sistema Complemento é a lise decorrente da formação do MAC. Uma vez formado na superfície da membrana da célula alvo ou de patógenos, este complexo citolítico promove um desbalanço iônico que resulta em entradas de moléculas de água, causando aumento do volume interno e destruição celular (Müller Eberhard, 1986).

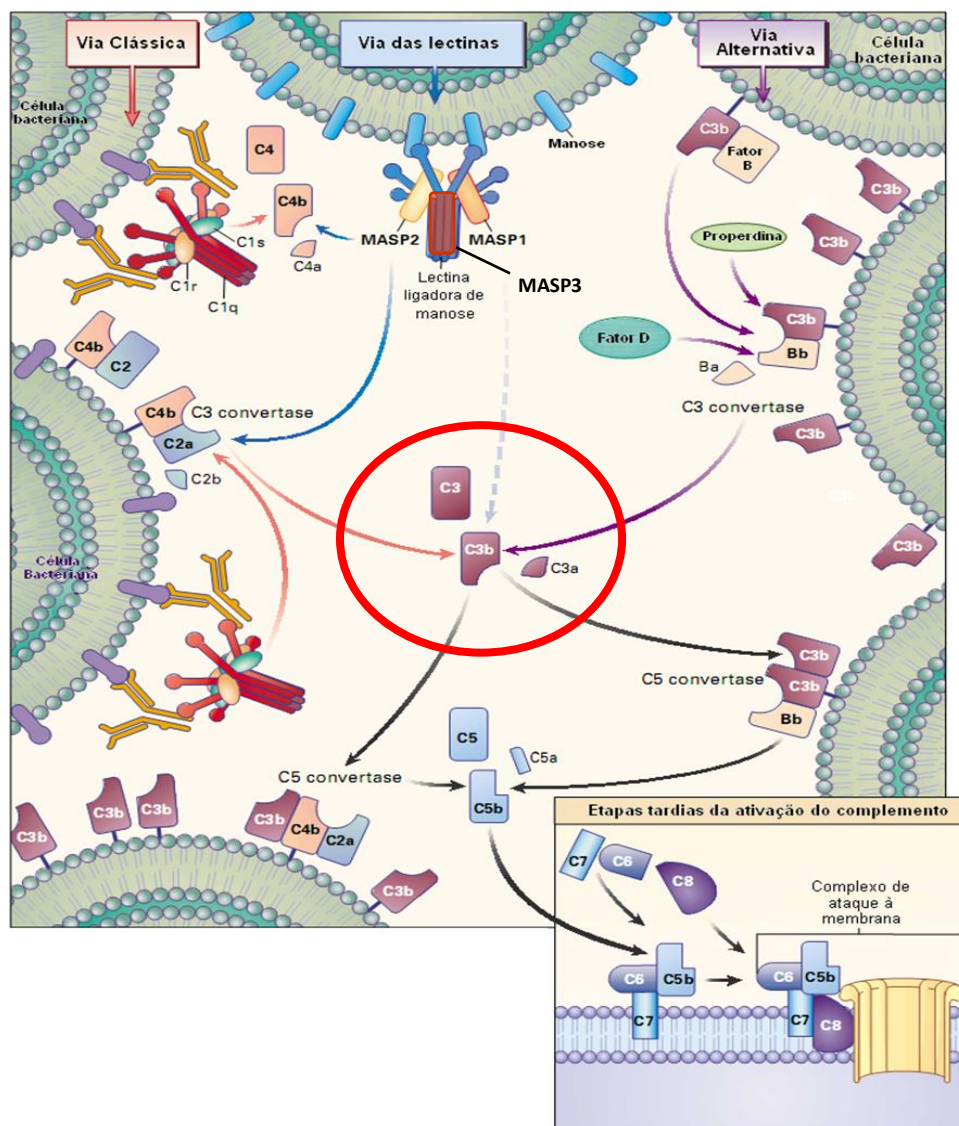


Figura 3: Ativação do Sistema Complemento. O Sistema Complemento pode ser ativado por três vias distintas (Clássica, Alternativa e das Lectinas). A Via Clássica é iniciada pela ligação do complexo C1 aos anticorpos ligados a antígenos presentes na superfície bacteriana. A Via das Lectinas é ativada por meio da ligação de uma lectina plasmática (MBL ou ficolinas) a carboidratos na superfície de patógenos. A Via Alternativa é ativada após a ligação covalente de C3b à superfície de antígenos. As três vias do Complemento levam à formação de C5-convertases, capazes de clivar C5 em C5a e C5b, iniciando a Via Terminal do Sistema Complemento (Fonte: modificado de Walport, 2001).

1.4 A proteína C3

A molécula C3 é considerada central, participa das três vias de ativação, sendo a proteína do Complemento mais abundante no soro (1-2 mg/ml). Além dos hepatócitos, monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas também produzem C3. Esta proteína possui peso molecular de 185 kDa e é composta por duas cadeias α (115 kDa) e β (75 kDa), ligadas por pontes dissulfeto (Sahu et al., 1998, Erdei et al., 2016).

O complexo enzimático C3 convertase cliva a cadeia α de C3, liberando a anafilotoxina C3a (9 kDa) e gerando o fragmento maior C3b (177 kDa), permitindo uma rápida amplificação da Via Alternativa (**Figura 4**). A clivagem da cadeia α de C3b mediada pelo Fator I (FI) na presença de um cofator *membrane cofactor protein* (MCP), CR1 ou Fator H (H) gera os fragmentos iC3b (C3b inativado) e C3f (2 kDa). O fragmento iC3b é clivado também por FI, formando C3c (135 kDa) e C3dg (40 kDa). Outros fragmentos são gerados como C3d (35 kDa) e C3g (5 kDa) pela ação de outras proteases, tais como plasmina, tripsina e elastase (Lachmann et al., 1982, Janssen et al., 2005).

Os fragmentos de C3 gerados após ativação associam-se a várias outras moléculas participando da ativação e amplificação do Sistema Complemento (Erdei et al., 1991). A deposição de C3b é fortemente controlada em células hospedeiras que expressam moléculas reguladoras em sua superfície (MCP ou CR1) ou recrutam do plasma como FH, as quais se ligam ao C3b. Essas proteínas atuam como cofatores permitindo a sua interação com o FI causando a clivagem de C3b em iC3b. Estes fragmentos atuam na remoção de células apoptóticas por meio da interação com CR3 presente em monócitos, macrófagos e células dendríticas (Lambris et al., 2008, Merle et al., 2015).

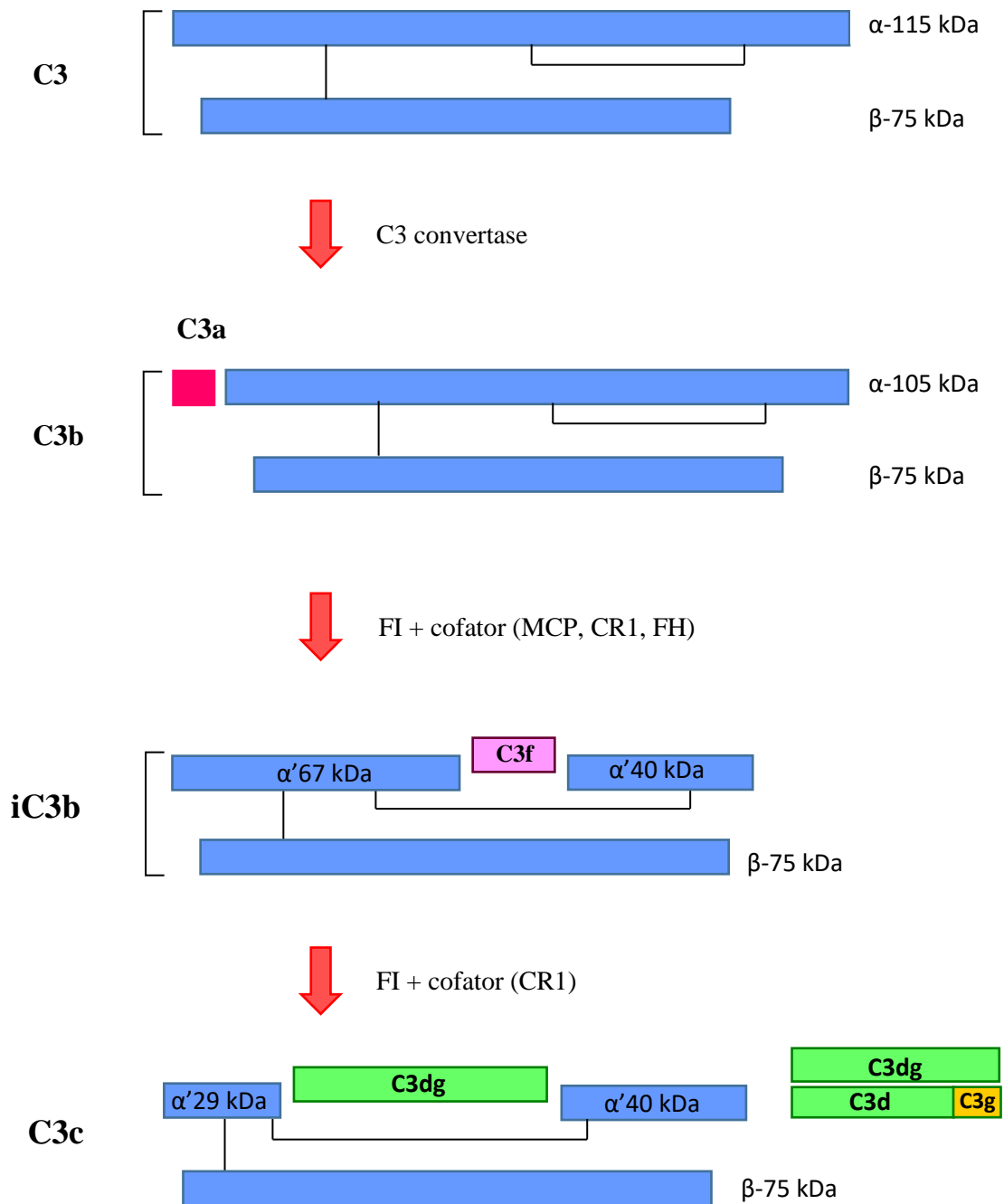


Figura 4. Representação esquemática da clivagem de C3 e seus fragmentos. A clivagem do C3 pelas C3 convertases resulta na formação do fragmento C3b e na liberação da anafilotoxina C3a. Em paralelo à ativação do complemento, ocorre o processo de regulação, no qual o fragmento C3b é clivado pelo Fator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

1.5 Mecanismos de evasão de leptospiras patogênicas ao Sistema Complemento

Considerando que o Sistema Complemento desempenha um papel fundamental na eliminação de patógenos, alguns agentes infecciosos desenvolveram estratégias de evasão, possibilitando o estabelecimento da infecção (Lambris et al., 2008; Rooijackers, van Strijp, 2007; Zipfel et al., 2007; Fraga et al., 2016).

Estudos anteriores demonstraram que estirpes não patogênicas de leptospiras ao serem incubadas com soro humano normal são rapidamente eliminadas, revelando notadamente a participação do Sistema Complemento. Ao contrário, as estirpes patogênicas são resistentes ao soro sendo, portanto, capazes de sobreviver à ação do Complemento, o que possibilita a sua disseminação no organismo e o estabelecimento da infecção (Meri et al., 2005; Barbosa et al., 2009; Fraga et al., 2016).

Um dos mecanismos de escape das leptospiras patogênicas é a aquisição de reguladores negativos do Sistema Complemento tais como o FH e o *C4b Binding Protein* (C4BP) promovendo a sua inativação na superfície da bactéria. O FH inibe a ativação da Via Alternativa ao se associar à molécula C3b depositada na superfície do patógeno, e pode atuar como cofator para a ação proteolítica do FI, capaz de clivar C3b e inativá-lo (Castiblanco-Valencia et al., 2012). Estirpes patogênicas também são capazes de interagir com C4BP, que ao se ligar à membrana da bactéria retém atividade de cofator de FI, enzima responsável pela clivagem de C4b, inibindo a Via Clássica e Via das Lectinas (Barbosa et al., 2009).

Leptospiras patogênicas são também capazes de adquirir moléculas precursoras de proteases do hospedeiro, como o plasminogênio. Uma vez ligado à superfície da leptospira, o plasminogênio pode ser convertido em plasmina na presença de ativadores como o *urokinase-type plasminogen activator* (uPA). A plasmina é uma protease capaz de clivar moléculas da matriz extracelular como o fibrinogênio e proteínas do Sistema Complemento como os fragmentos C3b e C5 (Castiblanco-Valencia et al., 2016). A plasmina também degrada macromoléculas da matriz extracelular tais como fibronectina, laminina, elastina e proteoglicanos (Vieira et al., 2009; Wolff et al., 2013).

Diversos microrganismos patogênicos tais como bactérias, fungos, parasitas e virus secretam proteases capazes de clivar diferentes componentes do Complemento, possuindo, desta forma, uma estratégia de evasão ao sistema imune do hospedeiro. As principais classes de proteases envolvidas na clivagem de moléculas do Complemento são as serino, aspartil, cisteíno e metalo proteases (Potempa et al., 2012).

Enzimas proteolíticas da classe das serino proteases são produzidas por fungos (*Aspergillus fumigatus*), parasitas (*Schistosoma mansoni*) e bactérias (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Neisseria meningitidis*) (Marikovsky et al., 1990, Orth et al., 2010, Jusko et al., 2014). A proteína central do Complemento C3 constitui um substrato comum às serino proteases produzidas por estes microrganismos. Além de C3, o sobrenadante de cultura de *Aspergillus fumigatus* também possui atividade proteolítica sobre C4 e C5. Esta atividade foi atribuída à serino protease *alkaline serine protease 1* (Alp1), principal protease secretada pelo patógeno (Behnsen et al., 2010). Pacientes deficientes de moléculas do Sistema Complemento possuem uma maior susceptibilidade a infecções invasivas por *Neisseria*. A atividade proteolítica da *serine protease neisserial autotransporter P* (NalP) sobre a molécula de C3 também foi estudada. NalP é uma protease auto-transportadora que sofre auto-clivagem durante seu processo de secreção. Além da forma secretada, NalP também pode ser encontrada na membrana externa da bactéria (Roussel-Jazédé et al., 2013).

Dentre as aspartil-proteases que degradam proteínas do Complemento, há proteases de membrana como a *outer membrane protein E* (PgtE) de *Salmonella enterica* e também secretadas como as *secreted aspartic proteinases* (Saps) de *Candida albicans*. A protease PgtE degrada C3, C3b, C4b e C5 e sua expressão aumenta a resistência da bactéria ao soro humano, contribuindo para a disseminação da *Salmonella enterica* durante a infecção sistêmica (Ramu et al., 2007). Riva e colaboradores mostraram que PgtE também é capaz de degradar FB e FH visando tanto a ativação como a inibição do Complemento, uma vez que a clivagem de FH pode anular a atividade regulatória do Complemento levando a um aumento da formação de C3b, ao passo que a clivagem de FB pode levar à redução da quantidade de C3 convertases ativas diminuindo a geração de C3b (Riva et al., 2015).

Proteases aspárticas secretadas pela bactéria *Candida albicans* denominadas *Secreted Aspartic Proteinases* (Saps) representam uma família de dez proteínas com múltiplas funções na patogenicidade do microrganismo, tais como adesão, invasão e danos às células do hospedeiro. As clivagens de C3b, C4b, e C5 pelas Saps 1, 2, e 3 resultam em redução na fagocitose da levedura, sendo observada uma diminuição da inflamação, a qual pode estar relacionada aos baixos níveis da anafilotoxina C5a detectados na presença das proteases (Gropp et al., 2009).

A bactéria *Streptococcus pyogenes* secreta a cisteínoprotease *streptococcal pyrogenic exotoxin B* (SpeB) que apresenta atividade proteolítica sobre as proteínas do

Complemento C3b e a Properdina, que é um regulador positivo da Via Alternativa. Além disso, a SpeB possui também a capacidade de degradar moléculas que compõem o MAC (Honda-Ogawa et al., 2013).

As cisteíno-proteases têm sido relatadas na periodontite, uma doença caracterizada pela inflamação crônica nas estruturas subgengivais dos dentes causada por um conjunto de bactérias incluindo *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*, que secretam as proteases gingipaína e interpaína A, respectivamente. O efeito protetor da protease interpaína A contra a atividade bactericida do soro foi atribuída à sua capacidade de degradar a cadeia α de C3, inibindo as três vias de ativação do Complemento. Além disso, gingipaína e interpaína A atuam sinergicamente na degradação da molécula C3b do Complemento, favorecendo a sobrevivência das bactérias e o estabelecimento da infecção (Popadiak et al., 2007, Potempa et al., 2009).

As metaloproteases que degradam proteínas do Complemento foram descritas em bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Tannerella forsythia* (Laarman et al., 2011, Hong et al., 1992, Park et al., 2007, 2008, Jusko et al., 2012). A bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa* secreta toxinas e fatores de virulência tais como a protease alcalina A (AprA) e a elastase que clivam uma variedade de proteínas e componentes do Complemento. AprA é uma metalo protease que cliva C3b e impede a sua deposição na superfície da bactéria, dificultando importantes funções do Complemento como a fagocitose por neutrófilos humanos, além de clivar a molécula C2 bloqueando as Vias Clássicas e das Lectinas (Laarman et al., 2012).

Staphylococcus aureus secreta diversas proteases que podem fornecer à bactéria resistência ao Sistema Complemento de forma semelhante àquela observada com os agentes patogênicos periodontais tais como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Tannerella forsythia* (Popadiak et al., 2007, Potempa et al., 2009, Jusko et al., 2012). As principais proteases secretadas por *S. aureus* incluem duas cisteíno proteases, *staphopain A* (ScpA) e *staphopain B* (SspB) que degradam elastina, colágeno e fibrinogênio levando à destruição do tecido; uma serino protease (V8) que degrada imunoglobulinas humanas, e uma metalo-protease, a aureolisina (Aur), que cliva a molécula C3 em C3b, sendo rapidamente degradado pelo FI e FH presentes no soro, ocasionando assim uma redução na opsonização por C3b e atenuação da fagocitose da bactéria por neutrófilos (Jusko et al., 2014).

A metaloprotease gelatinase E (GelE) de *E. faecalis* tem a capacidade de

hidrolisar o fibrinogênio e o colágeno. GelE, além de exercer atividade proteolítica sobre a cadeia α de C3 na presença de FI e FH, também é capaz de degradar os fragmentos C3b, C3a e iC3b, reduzindo a fagocitose do patógeno por leucócitos polimorfonucleares humanos. GelE inativa a molécula C3 que resulta na inibição das três vias de ativação do Sistema Complemento, promovendo um aumento da sobrevivência de *E. faecalis* no hospedeiro (Park et al., 2008).

Em estudo anterior realizado por nosso grupo, observou-se que várias espécies de leptospiras patogênicas foram capazes de secretar proteases que clivam proteínas do Sistema Complemento, enquanto o sobrenadante de culturas de leptospiras não patogênicas não apresentou atividade proteolítica significativa sobre tais moléculas. As proteases secretadas por leptospiras patogênicas apresentaram a capacidade de degradar a molécula central C3, assim como seus fragmentos C3b e iC3b com função de opsonina, e também proteínas da Via Alternativa (Fator B), Clássica e das Lectinas (C4b e C2), constituindo um mecanismo de evasão ao Sistema Complemento (Fraga et al., 2014).

Os estudos acima foram continuados como tema de meu mestrado a fim de explorar a ação dessas proteases sobre as proteínas da Via Terminal do Sistema Complemento. Nos estudos realizados, verificamos que proteases presentes nos sobrenadantes de cultura de espécies patogênicas de leptospiras foram capazes de clivar as proteínas purificadas C6, C7, C8 e C9 do MAC, ao passo que as não patogênicas não apresentaram atividade proteolítica significativa sobre estes substratos. Tais clivagens ocorreram de forma tempo-dependente e de modo seletivo, uma vez que, mesmo utilizando quantidades reduzidas de sobrenadantes, ainda foi possível observar a geração de produtos de clivagem das proteínas do Complemento. Observamos também que as proteases secretadas pelas leptospiras patogênicas foram capazes de clivar o complexo solúvel SC5b-9, o qual possui atividade pró-inflamatória e pode atuar diretamente no endotélio (Amamura et al., 2017).

A termolisina recombinante LIC13322 foi capaz de clivar o componente C6, tanto isolado quanto como parte integrante do complexo SC5b-9. Além disso, verificamos que as proteínas do MAC são capazes de interagir com a Termolisina recombinante, indicando que esta protease pode exercer um efeito inibitório adicional sobre estas moléculas por um possível mecanismo de inibição por interação direta. Por fim, um ensaio funcional comprovou o efeito inibitório da Termolisina recombinante, a qual foi capaz de inibir a formação do MAC sobre eritrócitos de carneiro. Deste modo, podemos concluir que proteases secretadas por leptospiras patogênicas podem ser capazes de inibir

a ação do Sistema Complemento, através da degradação de suas moléculas, representando um possível mecanismo de evasão.

1.6 Macrófagos

O sistema fagocítico mononuclear representa um subgrupo de leucócitos que circula na corrente sanguínea como monócitos e migram para os tecidos diferenciando-se em macrófagos. Entre as principais células fagocitárias, encontram-se os macrófagos e neutrófilos. Estas células desempenham funções centrais tanto na imunidade inata quanto na adquirida (Cohn, Furth., 1968, Strauss-Ayali et al., 2007, Wynn et al., 2013). A morfologia de monócitos na circulação periférica mostra-se heterogênea em seu tamanho, granulosidade e morfologia nuclear. Os monócitos foram em princípio identificados pela alta expressão de CD14. No entanto, outros marcadores antigênicos foram observados devido à sua heterogeneidade, sugerindo que os subgrupos destas células poderiam talvez apresentar atividades fisiológicas distintas (Passlick et al., 1989, Gordon, Taylor, 2005).

Macrófagos reconhecem uma ampla gama de ligantes exógenos e endógenos e desempenham funções na homeostasia do organismo, bem como na defesa do hospedeiro. Em resposta a uma estimulação inflamatória, há recrutamento de monócitos do sangue periférico para o local de inflamação nos quais estas células exibem distintos fenótipos comparados aos macrófagos residentes. Estudos baseados na diferenciação de receptores de superfície demonstraram que macrófagos teciduais se tornam altamente heterogêneos refletindo a especialização da função dentro de cada microambiente. Macrófagos são encontrados em diferentes tecidos sendo nomeados de diferentes formas tais como células de Kupffer no fígado, macrófagos alveolares nos pulmões, microglia no sistema nervoso e células de Langerhans na epiderme (Taylor et al., 2005, Wynn et al., 2013).

A exposição de macrófagos a citocinas tais como IFN- γ e IL-4, além de certos produtos microbianos, pode induzir diferentes estados de ativação celular, aumentando ainda mais a sua heterogeneidade. Esses estímulos são capazes de modular a expressão de receptores de superfícies que atuam no reconhecimento e apresentação de antígenos, diferenciação, adesão, migração, atividades antimicrobianas e fagocitose (Gordon, 2003, Mantovani et al., 2004).

A classificação de macrófagos em duas subpopulações M1 e M2 tem sido proposta nos últimos anos. Entende-se que macrófagos M1 medeiam a defesa do hospedeiro contra agentes patogênicos por meio de sua intensa atividade citotóxica resultante de sua elevada

capacidade de produzir metabólitos oxidativos e citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6). O perfil M2 ocorre pela indução das citocinas IL-4, IL-13 e IL-10 e está envolvido com a resolução da inflamação, remodelamento e reparo tecidual. As células M2 secretam grandes quantidades de moléculas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β , além de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), promovendo a angiogênese (Mills et al., 2000, Mantovani et al., 2004, revisado por Martinez, Gordon, 2014).

A linhagem celular THP-1 proveniente do sangue de pacientes com leucemia monocítica humana foi definida por Tsuchiya e colaboradores em 1980. Estudos iniciais indicaram que as células THP-1 assemelham-se a monócitos e macrófagos primários na morfologia, diferenciação e função celular (Tsuchiya et al., 1980, Qin, 2012). Quando estas células são tratadas com *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate* (PMA), elas adquirem um fenótipo mais maduro semelhante aos de macrófagos primários humanos com menor taxa de proliferação, aumento da expressão de CD11b e CD14 em sua superfície, maior taxa de fagocitose e secreção de mediadores pró-inflamatórios. A molécula CD14 é considerada um marcador comum para mostrar a diferenciação de monócitos em macrófagos (Aldo et al., 2013, Lund et al., 2016).

As células THP-1 apresentam algumas vantagens técnicas em relação aos macrófagos humanos primários. O fundo genético de THP-1 é homogêneo reduzindo o grau de variabilidade no fenótipo celular, diferentemente de células primárias provenientes de diferentes doadores, além de possível contaminação com outros componentes do sangue (Qin, 2012). Assim, decidimos utilizar as células THP-1 para analisar o efeito das proteases secretadas por leptospiros patogênicos sobre os receptores de superfície de macrófagos humanos e sua função fagocítica.

1.7 Fagocitose

A fagocitose desempenha um importante papel no controle da infecção por microrganismos. Embora a maioria dos patógenos necessite de opsonização para que ocorra uma fagocitose mais rápida e eficiente, determinadas bactérias, fungos e parasitas podem ser reconhecidos diretamente por macrófagos e neutrófilos, mesmo na ausência de Complemento ou imunoglobulinas (Ig) específicas (Gantner et al., 2003, Underhill, Goodridge 2012, Lim et al., 2017). Na presença de estímulos como microrganismos, essas células emitem prolongamentos citoplasmáticos conhecidos por pseudópodes que envolvem os microrganismos, endocitando-os, formando o fagossomo. Posteriormente, ocorre a fusão do fagossomo com o lisossomo gerando o fagolisossomo, nos quais as

enzimas lisossomais e espécies reativas de oxigênio são liberadas podendo causar a destruição dos microrganismos (Stuart et al., 2005, Gordon et al., 2016).

A invasão de microrganismos no hospedeiro desencadeia uma série de eventos projetados para controlar e eventualmente eliminar a infecção. O reconhecimento de patógenos pelos fagócitos depende de vários tipos de receptores, entre eles os Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs, *Pattern Recognition Receptors*) que, por sua vez, reconhecem os Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMP, *Pathogen-Associated Molecular Pattern*). Dentre os PRRs, destacam-se os *Toll-Like Receptors* (TLRs) que se encontram tanto na membrana plasmática como na parte endossomal. Após a interação PRR-PAMP, inicia-se a cascata de sinalização intracelular, culminando na ativação de fatores de transcrição de moléculas efetoras da imunidade inata tais como citocinas pró-inflamatórias, peptídeos antimicrobianos, moléculas co-estimulatórias, necessárias para a apresentação de antígenos e quimiocinas que atraem os leucócitos para o local de infecção (Janeway, Medzhitov, 2002, Akira et al., 2006, Medzhitov, 2007).

Os TLR estão entre os PRRs mais bem caracterizados até o momento. Hoje, conhecemos 13 membros da família dos *Toll Like* que reconhecem diferentes classes de moléculas biológicas tais como LPS, peptídeo glicano, flagelinas, lipoproteínas, DNA, entre outras. O reconhecimento de patógenos pelos TLR desencadeia a sinalização intracelular por meio da ativação dos fatores de transcrição NF κ B ou AP-1 que culmina na produção de citocinas pró-inflamatórias. Os TLR 1, 2, 4, 5 e 6 estão presentes na membrana plasmática onde reconhecem patógenos extracelulares. Por sua vez, os TLR 3, 7, 8 e 9 estão localizados dentro de vesículas no espaço intracelular (Takeda, Akira 2004, Song et al., 2019, Fitzgerald, Kagan, 2020).

Alguns dos mais potentes estímulos microbianos são moléculas que se ligam aos TLR presentes na superfície celular como o LPS de bactérias Gram-negativas reconhecido por TLR4 e peptídeo glicano de bactérias Gram-positivas reconhecido por TLR2 (Poltorak et al., 1998, Hoshino et al., 1999). O reconhecimento do LPS por TLR4 envolve a participação das moléculas acessórias MD2, CD14 e *LPS-binding protein* (LBP). A molécula MD2 se liga ao componente lipídico A do LPS, formando então um complexo que interage com TLR4 iniciando-se assim a sinalização. A molécula CD14 se mostra também necessária para que haja uma sinalização eficiente induzida por LPS (Wright et al., 1990, Shimazu et al., 1999, Akashi et al., 2003). O TLR2 reconhece uma variedade de moléculas presentes na superfície de patógenos tais como *Treponema pallidum*, *Mycoplasma fermentans* e *Borrelia burgdorferi*, além de lipopeptídeos,

peptideoglicanos e o ácido lipoteicoico. A união de TLR2-TLR6 é responsável pelo reconhecimento ácido lipoteicoico da parede de bactérias Gram-positivas e do zimosan (parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*) (Akira et al., 2001, Akira et al., 2006).

Além dos TLRs, outros receptores também participam do reconhecimento de PAMPs, tais como o receptor de manose (CD206), expresso principalmente em macrófagos teciduais, células dendríticas (DC) e células hepáticas. Este receptor reconhece certos açúcares terminais presentes nas superfícies de vários microrganismos incluindo bactérias, fungos, vírus e parasitas (Allavena et al., 2004, Taylor et al., 2005); e o grupo de receptores *scavenger* SR-AI/II e CD36 expressos em macrófagos reconhecem uma variedade de produtos microbianos como o LPS, ácido lipoteicoico β -glucanas e proteínas, sua importância na imunidade inata foi observada em um estudo realizado por Thomas e colaboradores no qual camundongos deficientes desses receptores foram mais suscetíveis à infecção por *Staphylococcus aureus* (Dunne et al., 1994, Thomas et al., 2000).

A fagocitose é facilitada quando partículas são recobertas por opsoninas. As mais importantes opsoninas são IgG e fragmentos gerados com a ativação do Sistema Complemento (iC3b e C3b). O processo de fagocitose pode ser facilitado mediante a interação dessas opsoninas com receptores específicos como Fc γ RI, II e III (para IgG) e CR1, CR3 e CR4, presentes nas superfícies de células fagocitárias como neutrófilos e macrófagos (Anderson et al., 1990, Ravetch, Kinet, 1991, Takizawa et al., 1996, revisado por Bohlson et al., 2014). Essa ligação desencadeia a internalização pela membrana celular do microrganismo em um fagossomo por meio de rearranjos do citoesqueleto da actina. Durante a fagocitose, os macrófagos produzem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio tais como ROS e NO, além de peptídeos antimicrobianos com atividade microbicida. O fagossomo amadurece em um compartimento enriquecido com proteases que são capazes de hidrolisar o patógeno gerando peptídeos que posteriormente será associado à moléculas de Classe II do MHC para posterior apresentação a linfócitos T, dando início à resposta imune adaptativa (Gordon, 2016, Underhill, Ozinsky, 2002).

O CR1 (CD35) é uma glicoproteína de aproximadamente 200 kDa encontrada em várias células sanguíneas como eritrócitos, monócitos, neutrófilos e em linfócitos B. Este receptor liga-se a C4b, iC3b, C1q, MBL e com maior afinidade em C3b. Uma das funções do CR1 é promover a remoção de complexos imunes da circulação. Além disso, CR1 é um potente inibidor das vias Clássica e Alternativa do Sistema Complemento, por meio da interação com as respectivas convertases (Fearon, 1985, Liu, Niu, 2009).

O CR3 (CD11b/CD18, também conhecido como Mac-1; $\alpha M\beta 2$) e CR4 (CD11c/CD18, também conhecido como p150,95; $\alpha X\beta 2$) são heterodímeros transmembranares que pertencem à família das β_2 -integrinas contendo uma cadeia β em comum. Esses receptores se ligam ao fibrinogênio e ICAM-1 facilitando a adesão celular, bem como o reconhecimento do fragmento iC3b. As funções mais bem caracterizadas desses receptores incluem adesão celular, remoção de patógenos e de células apoptóticas e tumorais por meio da fagocitose. A ligação de CR3 e CR4 ao fibrinogênio aumenta certas propriedades antimicrobianas como produção de citocinas, incluindo quimiocinas (Ehlers, 2000, Lukácsi et al., 2017, Vorup-Jensen, Jensen, 2018). A integrina *Leukocyte function associated antigen-1* (LFA-1, CD11a/CD18 ou $\alpha_L\beta_2$) é expressa em todos os leucócitos e desempenha um papel importante na adesão e extravasamento de leucócitos bem como na apresentação de antígenos e na proliferação de linfócitos T induzida por aloantígenos, participando de processos inflamatórios e fisiopatológicos (Springer et al., 1987, Lub et al., 1995, Tan et al., 2000).

Os receptores para Fc de IgG (Fc γ R) pertence à superfamília das imunoglobulinas e estão presentes nas superfícies de células linfóides e mieloides. A heterogeneidade funcional e estrutural de Fc γ R podem gerar sinais opostos quanto à resposta imune destas células. Os receptores de ativação (Fc γ RI, III, IV em camundongos e Fc γ RIA, IIA, IIIA em humanos) podem desencadear respostas inflamatórias, fagocíticas, citotóxicas e de hipersensibilidade. A fagocitose por macrófagos e células dendríticas mediada por Fc γ R, pode levar a apresentação de antígenos, ampliando assim a resposta imune. Já o receptor Fc γ RIIb (CD32b) pode inibir a ativação celular dependente do receptor de antígenos de linfócitos B (BCR), limitando a sua expansão. Deste modo, os Fc γ R desempenham um papel importante na interação entre as respostas imunes celular e humoral Fc γ R e têm sido explorados como potenciais alvos para o desenvolvimento de novas terapias contra o câncer, doenças infecciosas e auto-imunes. (Ravetch, Kinet, 1991, Daeron, 1997, Nimmerjahn, Ravetch, 2006, Roghanian et al., 2018).

1.8 Leptospiras e fagócitos

Pouco se conhece sobre a fagocitose de leptospiras tanto por macrófagos como por neutrófilos. Embora a internalização de leptospiras por macrófagos tenha sido confirmada em diversos estudos utilizando células humanas ou de camundongos e cobaias, a morte ou sobrevivência intracelular de leptospiras ainda não são bem compreendidas. Esse mecanismo pode ser dependente do tipo de macrófago estudado

como macrófagos peritoneais, microglia, células de Kupffer ou monócitos do sangue periférico humano, do hospedeiro e do sorovar infectante (Cinco et al., 1981; Marangoni et al., 2000; Li et al., 2010; Toma et al., 2011).

Linhagens imortalizadas de macrófagos humanos (THP-1) e murinos (J774 e RAW264.7) têm sido amplamente utilizadas como substitutas para estudar as funções de fagocitose e secreção de citocinas realizadas pelos macrófagos, além de definir quais os receptores envolvidos na detecção de *Leptospira* (Revisado por Werts, 2017). A estimulação de macrófagos peritoneais de camundongos (Nahori et al., 2005; Xue et al., 2013), macrófagos derivados da medula óssea (Lacroix-Lamande et al., 2012) e monócitos humanos do sangue periférico (PBMC) (Goris et al. 2011; Nahori et al. 2005; Xue et al. 2013) com a espécie patogênica *L. interrogans* induziu claramente a reatividade dos macrófagos contra essa bactéria ou seus componentes, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias (Xue et al., 2013).

O LPS presente em bactérias Gram-negativas é capaz de ativar o TLR4 resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias (Miller et al., 2005). Contudo, o LPS de leptospiras - considerado menos endotóxico que o LPS das bactérias Gram-negativas - ativa macrófagos humanos pelo TLR2 (Werts et al., 2001).

O reconhecimento das leptospiras por macrófagos humanos ocorre mediante a interação do LPS das leptospiras apenas por TLR2. Em um estudo realizado por Werts e colaboradores, foi observado que o LPS e a proteína de membrana externa LipL32 de leptospiras são capazes de ativar a linhagem de macrófagos humanos THP-1 e estimular a produção de TNF, através dos receptores CD14 e TLR2, mas não por TLR4. Esses dados fornecem uma base para compreendermos a importância do receptor TLR2 e a geração da resposta imune inata causada pela infecção por *Leptospiras* (Werts, 2001).

Já em camundongos, o LPS dessas bactérias é reconhecido tanto por TLR2 como TLR4. Estudos anteriores demonstraram que camundongos C3H/HeJ, portadores de uma mutação que inativa o gene *tlr4* são susceptíveis à leptospirose (Pereira et al., 1998, Chassin et al., 2009). Além disso, Chassin e colaboradores (2009) constataram que camundongos deficientes de TLR2 e TLR4 (*tlr2*^{-/-} e *tlr4*^{-/-}) morrem rapidamente por insuficiência renal e hepática graves, sendo portando altamente susceptíveis à *Leptospira* patogênica. A imunização com LPS purificado de leptospiras gera uma deficiência na produção de anticorpos IgM anti-leptospira em camundongos *tlr4*^{-/-} e duplo nocaute, indicando que TLR4 é necessário para a produção de anticorpos IgM específicos contra LPS de *Leptospiras*. A expressão de RNA mensageiro de IFN- γ e INOS após a infecção

por *L. interrogans* em camundongos depende da ativação de TLR2 e TLR4 e essas respostas também mostraram ser dependentes de Myd88, desempenhando um papel fundamental no controle da infecção inicial da leptospirose (Chassin et al., 2009).

Em um estudo realizado por Viriyakosol e colaboradores utilizando camundongos selvagens (WT) e deficientes de TLR4 (C3H/HeJ) foi observada a presença de leptospiras patogênicas no coração, pulmão, fígado, baço e rins nos dois grupos. No entanto, a carga bacteriana foi maior nos rins e pulmões dos camundongos C3H/HeJ. Esses dados sugerem que TLR4 está envolvido no controle da carga de leptospiras em órgãos de camundongos infectados. Além disso, o grupo constatou também que citocinas pró-inflamatórias estimuladas por leptospiras são dependentes de TLR4 e MD-2, mas independente de CD14. A partir destas observações, o grupo concluiu que TLR4 desempenha um papel crucial na proteção contra a infecção aguda letal e no controle da carga bacteriana durante a fase crônica da leptospirose (Viriyakosol et al., 2005).

Espécies patogênicas e intermediárias, vivas ou mortas pelo calor estimulam a produção de citocinas (Goris et al., 2011, Werts et al., 2017). Em um estudo comparativo de expressão de citocinas realizado para identificar os genes mais ativados neste modelo de infecção celular, observou-se que *L. interrogans* sorovar Lai estirpe Lai provocou um aumento de IL-10, RANTES, e IL-12-p40 em macrófagos peritoneais murinos e IL-6, IL-10, TNF e RANTES em PBMC humanos do que *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I (Xue et al., 2013).

Myd88 é o adaptador de todos os TLR, com exceção de TLR3, que tem como seu adaptador, o TRIF. A sinalização de Myd88 causa ativação de NFκB e MAP-kinases, desencadeando a produção de citocinas pró-inflamatórias, enquanto o TRIF leva a produção de IFN tipo I (revisado por Werts et al., 2006). Werts e colaboradores mostraram que camundongos deficientes de Myd88 apresentaram grave infecção com produção de IL-6, TNF e RANTES, sugerindo que além de TLR, outros receptores estão envolvidos na infecção por leptospiras. Deste modo, os estudos realizados até o momento sugerem que essa diferença de reconhecimento de leptospiras por células humanas e murinas pode estar relacionada com a susceptibilidade ou resistência à infecção por leptospirose observada nessas duas espécies (Werts et al., 2010).

Leptospiras são consideradas bactérias extracelulares, mas também capazes de entrar nas células e, serem reconhecidas pelos receptores NOD. De fato, peptídeo glicano (PG) purificado de *L. interrogans* sorovar Copenhageni mostrou ser capaz de induzir a produção de TNF por macrófagos humanos derivados de monócitos sanguíneos,

sugerindo que a inflamação gerada pelo reconhecimento de PG seria por meio dos receptores NOD. Entretanto, este mecanismo ainda não foi estabelecido (Cinco et al., 1996, revisado por Werts, 2018).

O processo de internalização de leptospiras em macrófagos ainda não está claro. Estudos relacionados à fagocitose de leptospiras demonstraram que macrófagos humanos não foram capazes de internalizar e matar leptospira patogênica, mesmo na presença de 10% de soro como fonte de Complemento, a menos que essas bactérias tenham sido incubadas com anticorpos específicos contra a bactéria. Isto sugere que leptospiras patogênicas são resistentes ao efeito bactericida do soro não imune (Faine et al., 1964, Cinco et al., 1981, Wang et al., 1984).

Em 2011, Toma e colaboradores realizaram experimentos na tentativa de distinguir os mecanismos intracelulares após a fagocitose de leptospiras patogênicas por macrófagos murinos. Com os resultados obtidos por esses autores, foi demonstrado que a espécie patogênica *Leptospira interrogans* serovar Manilae cepa UP-MMC-NIID foi capaz de limitar a fusão dos fagossomos com os lisossomos o que ocasionou, portanto, a sobrevivência destas bactérias (Toma et al., 2011).

Leptospiras possuem várias adesinas em sua superfície que são importantes no curso da infecção. Entretanto, apenas algumas das proteínas de leptospiras estão envolvidas na ligação e internalização pelos macrófagos. Em 2014, o grupo de Toma analisou o perfil transcricional de *Leptospira interrogans* serovar Manilae estirpe UP-MMC-NIID (virulenta e atenuada) para identificar fatores bacterianos que podem estar envolvidos na patogenicidade. Duas proteínas de membrana externa, LMB216 e LigB apresentaram 10 vezes menos na sua expressão em culturas atenuadas de *Leptospira*. O grupo demonstrou que ambas as proteínas desempenham um papel na captação de leptospiras por macrófagos e na interação do patógeno com o hospedeiro, contribuindo para a patogênese da doença (Toma et al., 2014).

Neutrófilos polimorfonucleares são os leucócitos mais abundantes no sangue e por quimiotaxia estas células migram para o local de infecção, atraídos por quimiocinas como IL-8 para combater a infecção com eficiência principalmente por fagocitose e liberação de ROS. Além disso, estudos demonstraram que neutrófilos produzem uma rede constituída por cromatina e proteases chamada *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) que capturam e matam os patógenos (Segal, 2005).

Neutrofilia é observada em casos graves de leptospirose em pacientes (Raffray et al. 2016). A internalização de leptospiras patogênicas foi mais eficiente após opsonização

com anticorpos específicos. Entretanto, espécies não patogênicas foram facilmente fagocitadas e mortas por neutrófilos (Faine, 1964). Em um estudo realizado por Gomez e colaboradores mostrou que a infecção de neutrófilos humanos por *L. interrogans* induz a morte dessas bactérias pelas NETs (Scharrig et al., 2015).

A importância de opsoninas geradas pela ativação do Complemento para a eliminação de leptospiros não foi ainda descrita na literatura. Em nosso laboratório, durante o seu mestrado, Denise Harumi Yamashita investigou a importância da proteína C3 do Sistema Complemento murino para a opsonização e fagocitose de leptospiros, tendo observado que as espécies patogênicas são menos fagocitadas do que as não patogênicas, sugerindo a existência de algum possível mecanismo de evasão aos macrófagos, corroborando com os resultados obtidos com o grupo de Toma et al., 2011.

Como mencionamos anteriormente, nosso grupo demonstrou que metaloproteases secretadas pelas estirpes patogênicas de leptospira (SLP) foram capazes de clivar C3, bem como os fragmentos C3b e iC3b (Fraga et al., 2014). Conforme comentado acima, estes dois fragmentos são importantes opsoninas, facilitando a fagocitose pela ligação aos receptores CR1 e CR3, respectivamente. A clivagem destes fragmentos pode diminuir a fagocitose mediada pelo Complemento, favorecendo a sobrevivência dessas leptospiros (Fraga et al., 2014). De fato, o efeito proteolítico observado pela metaloprotease GelE secretada por *Enterococcus faecalis* sobre C3b e iC3b resultou em uma redução substancial da fagocitose por leucócitos polimorfonucleares humanos (Park et al., 2008).

Os ensaios de inibição proteolítica mostraram que metaloproteases são uma das principais classes de enzimas secretadas por leptospiros patogênicos, responsáveis pelas clivagens das proteínas do Complemento (Fraga et al., 2014; Amamura et al., 2017). Entretanto, não se exclui completamente a contribuição de outras classes de proteases. Nosso grupo realizou uma pesquisa detalhada nos genomas da *Leptospira*, no qual observamos que a maioria dos genes das proteases presentes em leptospiros patogênicos e saprófitas apresentam certo grau de similaridade. Uma das poucas exceções encontradas diz respeito às termolisinas, consideradas metaloproteases, presentes exclusivamente em espécies patogênicas (Fraga et al., 2014).

1.9 Termolisina e Papalisina

A espécie patogênica *L. interrogans* sorovar Copenhageni possui quatro genes que codificam para metaloproteases da família das termolisinas (*LIC10715*, *LIC13320*, *LIC13321* e *LIC1332*). A análise detalhada das proteínas codificadas por estes genes

revelou que todas possuem o domínio catalítico M4, mesmo com certas variações na composição de aminoácidos (Letunic et al., 2012). Dentre as quatro termolisinas de leptospira, a protease codificada pelo gene *LIC13322* possui domínio catalítico com maior grau de identidade e similaridade com proteases produzidas por outros patógenos tais como aureolisina de *Staphylococcus aureus*, a toxina lambda de *Clostridium perfringens*, a elastase de *Pseudomonas aeruginosa* e a gelatinase de *Enterococcus faecalis* as quais apresentam atividade proteolítica sobre proteínas do Complemento (Hong et al., 1992, Jin et al., 1996, Park et al., 2007; 2008, Laarman et al., 2011, Fraga et al., 2014).

Para estudar a atividade dessa protease, nosso grupo expressou e purificou dois fragmentos recombinantes da termolisina codificada pelo gene *LIC13322*. O fragmento PepSY-M4 (**Figura 5**) foi capaz de clivar C3 em soro humano, sugerindo que a termolisina poderia ser uma das proteases responsáveis pelos efeitos nos sobrenadantes de leptospira analisados anteriormente (Fraga et al., 2014). Desse modo, consideramos que seria relevante testar a atividade desta protease sobre os receptores e opsoninas que fazem parte do processo de fagocitose.

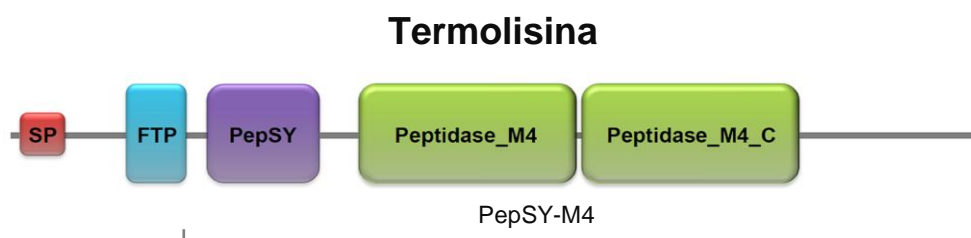


Figura 5. Representação esquemática da Termolisina codificada pelo gene *LIC13322* de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. A análise da sequência primária da termolisina pelos programas *SMART* e *PSORTb* (Letunic et al., 2012; Yu et al., 2010) revelou que esta proteína possui peptídeo sinal para secreção (SP), pró-domínios FTP e PepSY, e domínios catalíticos Peptidase_M4 e M4_C. A termolisina recombinante compreende a região delimitada PeSY-M4 (Fraga et al., 2014)

A papalisina humana é uma metaloprotease de múltiplos domínios e foi inicialmente descrita como uma proteína presente no plasma de mulheres grávidas, desempenhando funções importantes como desenvolvimento folicular, miogênese, implantação de embriões humanos e cicatrização de feridas (Tallant et al., 2007). Outros estudos demonstraram que a papalisina é encontrada em vários tecidos e participa de

processos fisiológicos tais como a formação de ossos, fertilidade feminina, cicatrização e inflamação (Oxvig, 2015).

Até o momento, pouco se conhece sobre papalisina de bactérias. Um dos estudos refere-se a protease ulilisina, da bactéria *Methanosarcina acetivorans*, que contém o domínio catalítico da papalisina e um pró-domínio envolvido na manutenção do estado inativo do zimogênio prouilisina. Estes estudos mostraram que a ulilisina apresenta atividade contra vários substratos como a caseína, azoalbumina e componentes da matriz extracelular. Além disso, possui atividade gelatinolítica sendo capaz de degradar elastina, actina e fibrinogênio (Tallant et al., 2007).

Por meio do alinhamento de sequências realizado com o programa *Analysis Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) foi observado um alto grau de conservação da papalisina entre as espécies patogênicas de *Leptospira*. No estudo realizado pelo grupo da Dra Angela Barbosa (Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan), a metaloprotease papalisina (*pappalysin-1 domain protein*) foi identificada por meio de análises exoproteômicas no sobrenadante de leptospiros patogênicos (SLP). A papalisina secretada por *Leptospira* é uma protease da família M23 dependente de zinco, que possui aproximadamente 52 kDa (Silva et al., 2018). Uma vez que metaloproteases secretadas por leptospiros patogênicos estão envolvidas na degradação de proteínas do Sistema Complemento, decidimos investigar também a ação da papalisina na evasão dessas bactérias por macrófagos, possibilitando a sua disseminação pelo organismo.

Nosso objetivo foi avaliar se proteases secretadas por leptospiros patogênicos poderiam interferir na sua internalização e morte dentro dos fagócitos. Neste projeto, investigamos se tais enzimas seriam capazes de clivar moléculas de superfície de macrófagos humanos e murinos e de remover opsoninas presentes na superfície de leptospiros patogênicos afetando, portanto, a internalização desse patógeno por células do hospedeiro.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de enzimas secretadas por leptospiros patogênicas no processo de fagocitose seja na remoção de determinadas moléculas da superfície de macrófagos e/ou pela clivagem de opsoninas.

Entre as proteases secretadas, avaliaremos em maior detalhe a termolisina codificada pelo gene *LIC13322* e a papalisina codificada pelo gene *LIC13434* de *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a atividade proteolítica de sobrenadante de culturas de leptospira patogênica (SLP), da termolisina e da papalisina recombinantes sobre os receptores TLR2, TLR4, CR1, CR3, CR4, LFA-1 e FcγRI presentes em macrófagos humanos (THP-1) e em macrófagos peritoneais de camundongos estimulados com tioglicolato;
2. Analisar a ação das proteases na internalização de leptospiros por macrófagos. Investigar se este possível efeito é tempo-dependente. Será inicialmente investigado este possível efeito inibitório da fagocitose de partículas inertes como zimozan opsonizadas ou não com C3b/iC3b;
3. Avaliar se SLP, termolisina e papalisina recombinantes clivam as opsoninas C3b e iC3b depositadas na membrana bacteriana externa.

3. Delineamento experimental

1. Cultivo de leptospiros patogênicas

2. Obtenção de SLP, termolisina e papalisina recombinantes.

3. Cultivo de macrófagos humanos (THP-1) e murinos.

4. Análise da viabilidade celular dos macrófagos na presença de SLP, termolisina e papalisina recombinantes.

5. Análise da fagocitose de partículas de zimosan por macrófagos murinos tratados com SLP e termolisina recombinante por microscopia óptica e citometria de fluxo.

6. Análise da presença de moléculas na superfície de macrófagos tratados com proteases de leptospiros patogênicas por citometria de fluxo.

7. Análise da presença receptores de macrófagos por microscopia confocal.

8. Avaliação da fagocitose de leptospiros patogênicas por macrófagos humanos e murinos na presença de SLP, termolisina e papalisina recombinantes por citometria de fluxo.

9. Análise da degradação de opsoninas depositadas na membrana de leptospiros patogênicas na presença de SLP, termolisina e papalisina recombinantes.

4 Material e Métodos

4.1 Espécies de leptospiras e condições de cultivo

Para a realização dos experimentos, até o momento foram utilizadas duas espécies de leptospiras: *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm considerada patogênica e *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I considerada não patogênica. Essas estirpes são regularmente mantidas no Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, e foram cedidas pelo Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann.

4.2 Obtenção dos sobrenadantes de cultura de leptospiras

As leptospiras foram cultivadas por sete dias em meio EMJH (BD Difco™, Franklin Lakes, New Jersey, Estados Unidos) modificado, a 29 °C. Após esse período, as bactérias foram lavadas duas vezes com PBS 1x pH 7,4 e a concentração de bactérias foi determinada por contagem em câmara de Petroff-Hausser em microscópio óptico Olympus BX51 (Olympus, Shinjuku, Tóquio, Japão) empregando condensador de campo escuro Olympus U-DCD (Olympus). Em seguida, as leptospiras foram ressuspensas em PBS na concentração de $1,0 \times 10^9$ bactérias. Para permitir a secreção de proteases, as suspensões bacterianas foram incubadas a 37 °C por 4 h. Após centrifugação, os sobrenadantes de leptospiras patogênicas (SLP) e não patogênicas (SLNP) foram coletados, filtrados em membrana de 0,22 µm, aliqüotados em tubos e estocados a -80 °C, sendo utilizados nos ensaios funcionais.

Para avaliar a atividade da termolisina recombinante sobre os receptores de membrana presentes em fagócitos e opsoninas depositadas na superfície de leptospiras, utilizamos a termolisina produzida em nosso laboratório, codificada pelo gene *LIC13322* de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, expressada em *E. coli* e purificada de acordo com Fraga et al (2014). A papalisina utilizada neste estudo foi produzida pela doutoranda Daniella Courrol no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, sob orientação da Dra Angela Silva Barbosa e purificada pela Dra Rosa Maria Chura-Chambi no Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-USP).

4.3 Análise da atividade proteolítica dos sobrenadantes das leptospiras patogênicas, não patogênicas e termolisina recombinante

Para análise da atividade proteolítica dos sobrenadantes de culturas de leptospiras patogênicas (SLP), não patogênicas (SLNP), termolisina e papalisina recombinantes (concentrações estão indicadas nas legendas das figuras), as preparações foram incubadas com C3 humano purificado (0,5 µg/µl) (Fraga et al., 2014) adquirido comercialmente da empresa *Complement Technology* (Texas, TX., Estados Unidos) por 1h a 37°C e submetidos à SDS-PAGE. A incubação da papalisina recombinante com a proteína C3 foi estendida até 24h. Foram utilizados géis de 1 mm de espessura na concentração de 5% no gel de empilhamento e 12% no gel de separação. Uma vez adicionado o tampão de amostra 5x, as amostras foram aquecidas a 96 °C por 3 min. As corridas eletroforéticas foram efetuadas a 120 V, em tampão de corrida à temperatura ambiente. Foi utilizado o marcador de massa molecular *Page Ruller* (Fermentas, Vilnius, Lituânia).

Em seguida, 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. O anticorpo primário anti-C3 humano feito em cabra Sigma-Aldrich (Missouri, MO., Estados Unidos) foi utilizado na diluição de 1:5.000 e o anticorpo secundário anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase Sigma-Aldrich (Missouri, MO., Estados Unidos) na diluição 1:5000 foram incubados sequencialmente à temperatura ambiente com agitação. A membrana foi lavada com PBS-T por 5 min entre cada uma das etapas anteriores.

Finalmente, adicionamos solução de revelação à membrana *kit Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce, Illinois, IL., Estados Unidos), a qual foi então exposta a um filme fotográfico que foi sensibilizado pela quimioluminescência emitida. A concentração de proteína total presente nos sobrenadantes das leptospiras foi medida utilizando o *kit* de ensaio Bicinchoninic Acid (BCA), de acordo com as instruções do fabricante.

4.4 Modelo animal

Neste estudo foram utilizados camundongos da linhagem C57Black/6 129S4-C3tm/Crr/J (deficientes de C3; B6.C3^{-/-}) provenientes do The Jackson Laboratory para a obtenção do soro desses animais. Camundongos C57BL/6 (selvagens B6.C3^{+/+}) foram

fornecidos pelo Biotério de Camundongos do Instituto de Ciências Biomédicas do Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo – USP para a obtenção de células. Esses animais foram utilizados com idade entre 6 a 8 semanas. O andamento deste projeto é realizado em concordância com o Comitê de Ética no Uso de Animais, conforme o certificado 48/2017 (CEUA-ICB- USP).

4.5 Obtenção de macrófagos murinos

Os camundongos C57BL/6 foram injetados com 1 ml de tioglicolato (Sigma-Aldrich) a 4% na cavidade peritoneal. O tioglicolato é um meio de cultura bacteriológico usado aqui para aumentar o influxo de células inflamatórias *in vivo* para a cavidade peritoneal, capaz de estimular a fagocitose. Depois de 3 dias de estimulação, os animais foram anestesiados e eutanasiados. Após a exposição do peritônio, os animais receberam 5 ml de PBS 1x (gelado) para aspiração do exsudato celular peritoneal.

As células em suspensão foram coletadas e centrifugadas a 600x g por 10 min a 4 °C. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 1 ml de DMEM completo, contendo 10% de soro bovino fetal inativado pelo calor. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer e ajustada para a concentração de 2×10^5 células/ml. Alíquotas de 1ml/poço da suspensão foram adicionadas em placas de cultura celular (Costar) e mantidas sobre as condições de 5% de CO₂ por 2 h a 37 °C. Após este período, os poços foram lavados três vezes com PBS 1x para remoção das células não aderentes e, após o término das lavagens foi adicionado o meio DMEM completo (suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado pelo calor, 2mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina e 100 µg de estreptomicina) nas placas contendo majoritariamente macrófagos.

4.6 Obtenção dos soros dos camundongos B6.C3^{+/+} e B6.C3^{-/-}

Para a realização do ensaio de fagocitose foram utilizados soros de camundongos B6.C3^{+/+} e B6.C3^{-/-}. Os camundongos foram anestesiados, via i/p, com 200 µl de 125 mg/kg de ketamina e 12,5 mg/kg de xilazina. Em seguida, o sangue dos animais foi coletado pelo plexo orbital e, após 15-30 min à temperatura ambiente, o coágulo foi despregado e os tubos centrifugados a 1700 x g por 15 min a 4 °C para a separação dos soros. Os soros obtidos foram alíquotados e armazenados a -80 °C até o momento do uso. Para os experimentos envolvendo opsonização, partículas de zimosan foram previamente incubadas com 10% de soro de B6.C3^{+/+} como fonte de opsoninas dependentes da ativação do Sistema Complemento. Como controle negativo, foi utilizado o soro de camundongos

B6.C3^{-/-} e PBS.

4.7 Ensaio de viabilidade celular

Após exposição às proteases de leptospiros patogênicas por 24 h de forma dose-dependente, os macrófagos foram lavados com PBS 1x e desprendidos da placa com PBS/EDTA (5mM) a 4 °C. O número total de células foi determinado por contagem em câmara de Neubauer, diluídas 20x em diluente *Turk* (Sigma-Aldrich). A viabilidade celular foi avaliada utilizando o corante *Trypan Blue* (Biolegend, San Diego, CA). As células viáveis são impermeáveis ao corante, ao passo que as células não viáveis, devido à formação de poros na membrana, permitem a penetração do corante para o interior da célula e o núcleo adquire coloração azul.

4.8 Preparação das partículas de zimosan

As partículas de zimosan (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) foram fervidas por 15 min e lavadas 3 x com PBS 1x. Em seguida, 2 x 10⁶ partículas foram ressuspensas em 1 ml de tampão GVB-EGTA-Mg⁺⁺. Esta concentração foi determinada de acordo com a descrição do fabricante (1 mg de zimosan contém aproximadamente 3 x 10⁷ partículas). Em seguida, para opsonização, os soros de camundongos B6.C3^{+/+} e B6.C3^{-/-} (10%) foram adicionados ao zimosan por 1 h a 37 °C ou apenas com PBS. Após incubação, as partículas de zimosan foram novamente lavadas 3 x com PBS 1x e ressuspensas com DMEM para serem usadas nos experimentos.

4.9 Fagocitose de partículas de zimosan por macrófagos murinos na presença de proteases de leptospiros

Macrófagos de camundongos injetados previamente com tioglicolato foram cultivados em lamínulas de vidro de 20 x 20 mm como mencionado anteriormente. Em seguida, as culturas de células foram tratadas com SLP, SLNP ou termolisina recombinante (20 µg/ml) individualmente por 1 h a 37 °C com 5% de CO₂. As preparações de zimosan foram adicionadas às culturas de macrófagos e incubadas por 1 h sendo mantidas nas mesmas condições. Após esse período, as lamínulas foram lavadas 3 x com PBS 1x para remover o excesso de partículas não fagocitadas. Ao final, as lamínulas foram lavadas com PBS 1x, fixadas e coradas com *kit* Panótico Rápido (Laborclin) de acordo com as instruções do fabricante. As análises de fagocitose foram realizadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse E200). Inicialmente, foram contadas

200 células totais que fagocitaram ou não partículas de zimosan. Em seguida, dentre a população de células que fagocitaram zimosan, foram quantificadas quantas internalizaram uma, duas, três ou mais de três partículas de zimosan.

4.10 Análise da presença de moléculas de superfície em macrófagos por citometria de fluxo

Para analisar o efeito da termolisina recombinante bem como das proteases presentes nos SLP sobre os receptores de superfície de macrófagos peritoneais, 2×10^6 macrófagos murinos foram incubados com sobrenadantes ou PBS (controle negativo) por 1 h, 3 h, 6 h e 24 h. Ao término das incubações, foi adicionado tampão gelado composto por PBS + EDTA (5mM) para desprender as células das placas de cultura. As células foram incubadas por 30 min a 4 °C em tampão de marcação com anticorpos monoclonais específicos contra cada receptor: anti-CD21/CD35 Alexa Fluor 647 (CR2/CR1), anti-CD11b FITC (CR3), anti-CD11c Pe/Cy7 (CR4), anti-CD64 Brilliant Violet 421 (FcγRI) e anti-CD11a PerCP/Cy5.5 (LFA-1) e 7AAD para viabilidade celular que apresenta as mesmas características funcionais semelhantes às do *Trypan Blue* (Biolegend, San Diego, CA) na ausência de luz.

As células THP-1 também foram incubadas com o SLP, termolisina e papalisina recombinantes e o mesmo procedimento foi realizado utilizando anticorpos específicos: anti-CD282 Alexa Fluor 647 (TLR-2), anti-284 Pe (TLR-4), anti-CD64 Brilliant Violet 421 (FcγRI), anti-CD35 FITC (CR1), anti-CD206 APC (Receptor de Manose), anti-CD11a Pe (LFA-1), anti-CD11b APC/Cy7 (CR3) e anti-CD11c Pe/Cy7 (CR4) (Biolegend, San Diego, CA).

Após o período de incubação, as células foram lavadas com 1ml de tampão de marcação (PBS + 2% soro bovino fetal). Para a leitura das amostras, as células foram ressuspendidas em um volume de 200 µl e analisadas em citômetro de fluxo FACSCanto ou FACS Aria II (Becton Dickinson, Mountain View, CA), 10.000 eventos foram adquiridos por amostra. A análise dos dados foi realizada com o *software FlowJo* (Tree Star) com base na população de macrófagos considerando-se o tamanho (FSC) e a granulosidade celular (SSC).

4.11 Análise da presença de moléculas de superfície em macrófagos por microscopia confocal

Alternativamente, para examinar o efeito da termolisina e dos SLP sobre os receptores, macrófagos peritoneais foram cultivados em lamínulas de vidro de 20 x 20 mm depositadas em placas de 6 poços (Costar) a uma concentração de 2×10^5 por poço. Em seguida, as culturas de células foram tratadas com SLP ou termolisina recombinante (20 µg/ml) individualmente por 1 h e 24 h a 37 °C com 5% de CO₂.

Após três lavagens com PBS 1x, os fagócitos foram incubados com anticorpos contra anti-CD11b FITC (CR3), anti-CD206 APC (receptor de manose) e anti-CD282 Pe (TLR2) (Biolegend, San Diego, CA) na ausência de luz. Após 1 h de incubação, as células foram lavadas com PBS 1x novamente e analisadas por microscopia confocal. As imagens foram capturadas no microscópio Confocal Zeiss LSM-780-NLO pelo Dr Mario Cruz (CEFAP – ICB/USP).

4.12 Deposição de opsoninas na membrana de leptospiras patogênicas na presença de SLP, termolisina e papalisina recombinantes

Para analisarmos se as proteases secretadas por leptospiras patogênicas poderiam interferir na opsonização e consecutivamente na fagocitose dessas bactérias, *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm foram incubadas com soro humano normal (SHN) como fonte de Complemento por 20 min a 37 °C e após cinco lavagens a 3600 x g, 20°C por 20 min, as suspensões de bactérias opsonizadas foram tratadas com 10 µg/ml de SLP, termolisina ou papalisina recombinantes por 1 h e 24 h a 37 °C. Em seguida, as amostras foram lavadas com PBS e fervida por 5 min em tampão de amostra SDS para separar as proteínas anexadas às leptospiras sendo posteriormente submetido a SDS-PAGE e analisados por *Western blot*.

Paralelamente, o SHN foi incubado com SLP, termolisina ou papalisina recombinantes por 1h e 24 h a 37 °C. Em seguida, estes soros foram adicionados às culturas de leptospiras patogênicas e incubados por 20 min a 37 °C. Após cinco lavagens, as amostras foram igualmente submetidas a SDS-PAGE e analisados por *Western blot*.

4.13 Fagocitose de leptospiros patogênicos por macrófagos na presença de proteases.

Com o intuito de analisar se as proteases secretadas por leptospiros patogênicos seriam capazes de prejudicar o processo de fagocitose dessas bactérias, macrófagos peritoneais previamente estimulados com tioglicolato e macrófagos da linhagem de macrófagos humanos THP-1 (2×10^5) foram tratados com SLP, termolisina ou papalisina recombinantes (20 $\mu\text{g/ml}$) por 1 h e 24 h a 37 °C 5% de CO_2 .

Concomitantemente, *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm foram incubadas com 10% de SHN por 20 min a 37 °C. Após três lavagens, as bactérias opsonizadas foram tratadas com as proteases por 1h e 24 h a 37 °C. Em seguida, as bactérias foram adicionadas às culturas de macrófagos humanos e murinos por 1 h a 37°C, sob tensão de 5% de CO_2 . Como controle, macrófagos e *Leptospira* foram incubados por 1 h e 24 h na ausência de proteases.

4.14 Análise estatística

A análise estatística realizada com o auxílio da Sra. Rosana Duarte Prisco do Setor de Estatística, ICB-USP. Os dados dos ensaios referentes à viabilidade dos macrófagos frente ao SLP, termolisina ou papalisina recombinante foram transformados em arco seno da raiz quadrada da proporção e avaliadas por ANOVA um fator. A viabilidade dos macrófagos na presença de SLNP foi avaliada por Kruskal-Wallis. Os dados dos ensaios de fagocitose foram transformados em raiz quadrada e avaliados empregando-se ANOVA dois fatores para os ensaios realizados apenas com os soros (B6.C3^{+/+}) e (B6.C3^{-/-}) e ANOVA três fatores para os ensaios de fagocitose com os sobrenadantes das leptospiros. Os dados dos ensaios de clivagem dos receptores foram transformados em raiz quadrada e avaliados por ANOVA um fator. Os dados dos ensaios de fagocitose na presença de SLP e termolisina foram transformados em raiz quadrada e avaliados por ANOVA 4 fatores. Quando necessário, prosseguiu-se com comparações múltiplas pelo método de Tukey. A homogeneidade de variâncias foi verificada em todas as análises e atendida, exceto para o ensaio de viabilidade com SLNP. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o *software Statgraphics Centurion XVI*.

4.15 Soluções e reagentes

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE):

- **acrilamida 30%:** acrilamida 29% e N,N'-metilenobisacrilamida 1%
- **tampão Tris-HCl pH 8,8:** Tris-HCl 1,5 M e SDS 0,1%, pH 8,8
- **tampão Tris-HCl pH 6,8:** Tris-HCl 0,5 M e SDS 0,1%, pH 6,8
- **solução de persulfato de amônio:** persulfato de amônio 10%
- **TEMED:** N,N,N',N'-tetrametilenodiamina
- **tampão de amostra 5X:** Tris-HCl 50 mM pH 6,8, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 100 mM e SDS 2%
- **tampão de corrida:** Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%, pH 8,3
- **solução corante:** ácido acético glacial 10%, etanol 45% e azul *Coomassie* R250 0,25%
- **solução descorante:** ácido acético glacial 10% e etanol 30%.
- **Western blot:**
- **tampão de transferência:** Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, SDS 0,02% e etanol 20%
- **PBS:** cloreto de potássio 2,7 mM, cloreto de sódio 137 mM, fosfato dibásico de sódio 10 mM e fosfato monobásico de potássio 1,7 mM, pH 7,4
- **PBS-T:** PBS contendo *Tween* 20 0,05%
- **tampão de bloqueio:** leite desnatado 10% em PBS-T
- **solução de revelação:** *kitSuper Signal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce, Illinois, IL., Estados Unidos)
- **filme fotográfico:** *Hyperfilm* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido)
- **EMJH** modificado: meio EMJH com 10% de soro de coelho previamente inativado a 56 °C por 1 h (Bio Nutrientes, Barueri, SP, Brasil) enriquecido de L-asparagina (0,015% - Inlab, Diadema, São Paulo, Brasil), piruvato de sódio (0,001% - Inlab), cloreto de magnésio (0,001% - Merck, Whitehouse Station, New Jersey, Estados Unidos), cloreto de cálcio (0,001% - Sigma, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos), peptona (0,03% - BD Difco TM) e extrato de carne (0,02% - BD Difco TM).

5. Resultados

5.1 Análise da atividade proteolítica de diferentes sobrenadantes e termolisina de leptospiras sobre a molécula C3.

Para este projeto, já tínhamos disponíveis amostras de SLP, SLNP e termolisina mantidas a -80°C . Mesmo assim, sobrenadantes de novas culturas de leptospiras foram obtidas e seus sobrenadantes armazenados. Todas as amostras foram avaliadas quanto à capacidade proteolítica de clivar C3 humano. Os resultados encontram-se na **Figura 6 A-H**.

Nós confirmamos que quase todos os sobrenadantes, mesmo tendo sido produzidos e armazenados a -80°C há mais de três anos, ainda foram capazes de clivar a molécula C3, mantendo a sua atividade proteolítica, permitindo assim o seu uso nos experimentos. Algumas amostras que foram produzidas recentemente apresentaram baixa concentração e atividade de proteases, sendo então descartadas.

Além disso, a termolisina recombinante utilizada neste estudo (anteriormente produzida em nosso laboratório) também exibiu atividade proteolítica sobre C3 (**Figura 6H**). Desta forma, para a execução dos experimentos a seguir, dispomos de uma ampla gama de sobrenadantes com potencial atividade proteolítica. As amostras de SLNP, conforme esperado, não foram capazes de clivar C3.

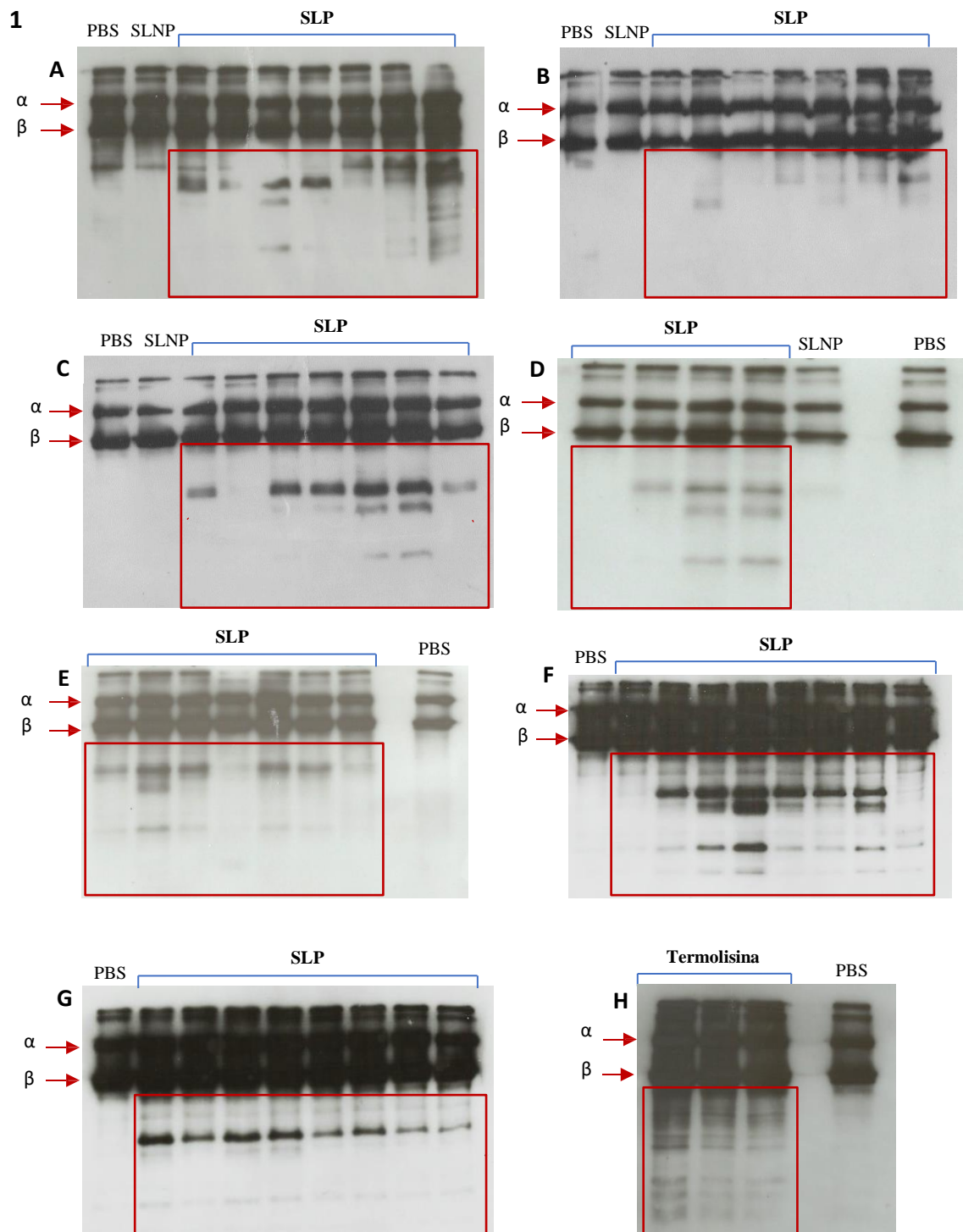


Figura 6: Análise da atividade proteolítica dos SLP, SLNP e termolisina recombinante. (A- H). Os sobrenadantes de *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm (patogênica; SLP), de *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I (não patogênica; SLNP) de diferentes datas de obtenção e termolisina recombinante (5 μ g/ml) foram incubados com a proteína C3 por 1 h a 37 °C. Como controle negativo, C3 foi incubado apenas com PBS. Os produtos das clivagens foram analisados por *Western blot*, utilizando anticorpo policlonal anti-C3. No retângulo vermelho estão destacados os produtos de clivagem gerados a partir da incubação de SLP e termolisina recombinante com a molécula C3. As setas indicam a cadeia alfa (110 kDa) e beta (75 kDa) de C3 nativo purificado.

5.2 Avaliação da viabilidade dos macrófagos peritoneais na presença de sobrenadantes de leptospiras e termolisina recombinante

Como desejamos investigar a ação de proteases de leptospiras sobre culturas de macrófagos, em contato direto com as culturas de macrófagos, a nossa próxima etapa foi avaliar se tais preparações poderiam ser tóxicas para macrófagos. Para isto, as células aderentes foram incubadas com concentrações variadas de SLP, SLNP e termolisina. Nós observamos que, mesmo utilizando elevadas concentrações de proteases (50 µg), as células continuam viáveis em sua grande maioria. Não houve diferença estatística significativa quando a termolisina recombinante e o SLNP foram empregados. Entretanto, foi observada uma leve diferença significativa (10%) quando as células foram incubadas com SLP comparadas ao controle.

Esta diminuição de viabilidade celular apresentada não impediu a execução dos experimentos posteriores, uma vez que acima de 90% dos macrófagos permaneceram viáveis. Sendo assim, decidimos utilizar concentrações até 20 µg/ml de proteases para os próximos experimentos (**Figura 7 A-C**).

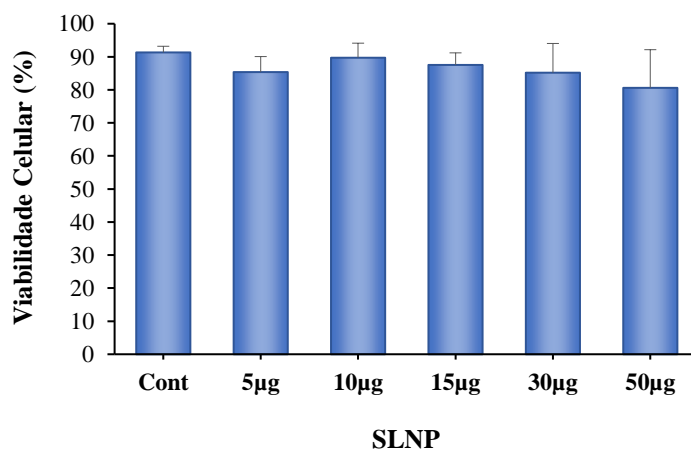
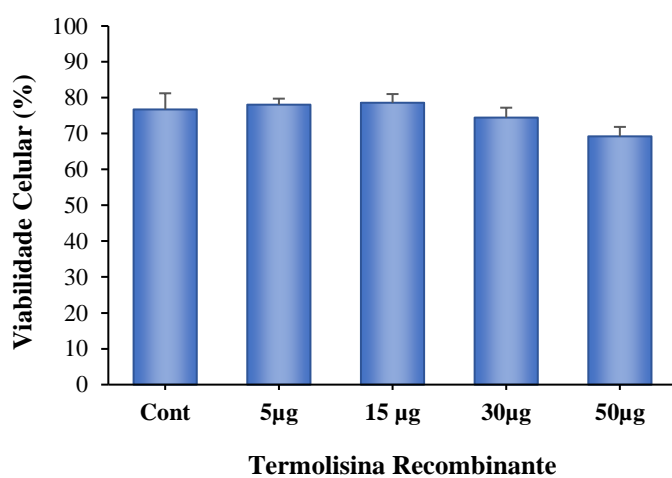
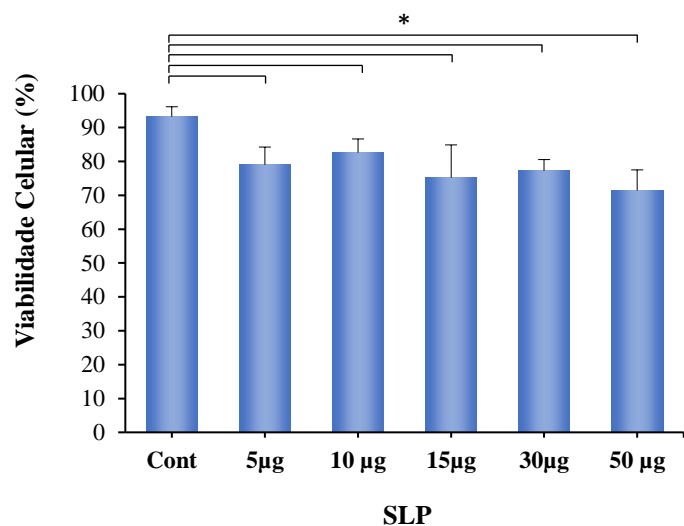


Figura 7: Viabilidade dos macrófagos murinos na presença de proteases de leptospiras. Os macrófagos peritoneais foram incubados com as proteases de leptospiras em diferentes concentrações por 24 h. Como controle, as células foram incubadas por 1 h com PBS. As culturas foram incubadas com (A) SLP de 5 – 50 µg. Com 5 µg, já foi observada diferença estatística comparada ao controle. (ANOVA, $p < 0,05$). (B) termolisina recombinante de 5 – 50 µg. (C) SLNP de 5 – 50 µg. Este ensaio foi repetido cinco vezes.

5.3 Fagocitose de partículas de zimosan por macrófagos murinos na presença de soro (B6.C3^{+/+}) e (B6.C3^{-/-})

Os macrófagos peritoneais de camundongos estimulados anteriormente com tioglicolato foram incubados com partículas de zimosan previamente tratadas com soro normal de camundongo (B6.C3^{+/+}), soro deficiente de C3 (B6.C3^{-/-}) ou apenas com PBS usado como controle negativo, por 1 h a 37 °C, sob tensão de 5 % de CO₂. Em seguida, as culturas de macrófagos foram lavadas com PBS 1x para eliminar as partículas não internalizadas.

O zimosan é uma preparação obtida da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* que tem sido usado em protocolos de fagocitose e como estímulo inflamatório *in vivo* e *in vitro*. Nos primeiros ensaios realizados utilizamos concentrações elevadas de zimosan (10-14 mg/ml), o que dificultava a avaliação do número de partículas internalizadas por célula no microscópio óptico. Nós realizamos diversos ensaios para padronizar a melhor concentração de zimosan a ser utilizada nos ensaios de fagocitose. Observando a fagocitose destas partículas pelos macrófagos peritoneais em microscópio óptico, decidimos usar a concentração de dez partículas de zimosan por macrófago, ou seja, 2 x 10⁶ partículas de zimosan foram incubadas com 2 x 10⁵ células peritoneais, uma vez que esta concentração de células foi a mais satisfatória para ser visualizada na lâmina.

Conforme esperado, nós observamos que a fagocitose de partículas de zimosan por macrófagos peritoneais foi mais pronunciada na presença de soro de camundongos B6.C3^{+/+} (**Figura 8A**), devido à ação das opsoninas derivadas de C3, facilitando o processo de fagocitose (Cinco et al., 1980; Bohlson et al., 2014). Muitos macrófagos continham mais de três partículas de zimosan como mostra a **Figura 8B**. Quando as células foram tratadas com o soro de B6.C3^{-/-}, observamos uma taxa inferior de internalização de zimosan pelos macrófagos, semelhante ao obtido com o controle apenas com PBS, confirmando a importância de C3 para a fagocitose desta partícula. A diferença observada foi estatisticamente significativa, considerando o tipo de tratamento e número de partículas internalizadas por célula.

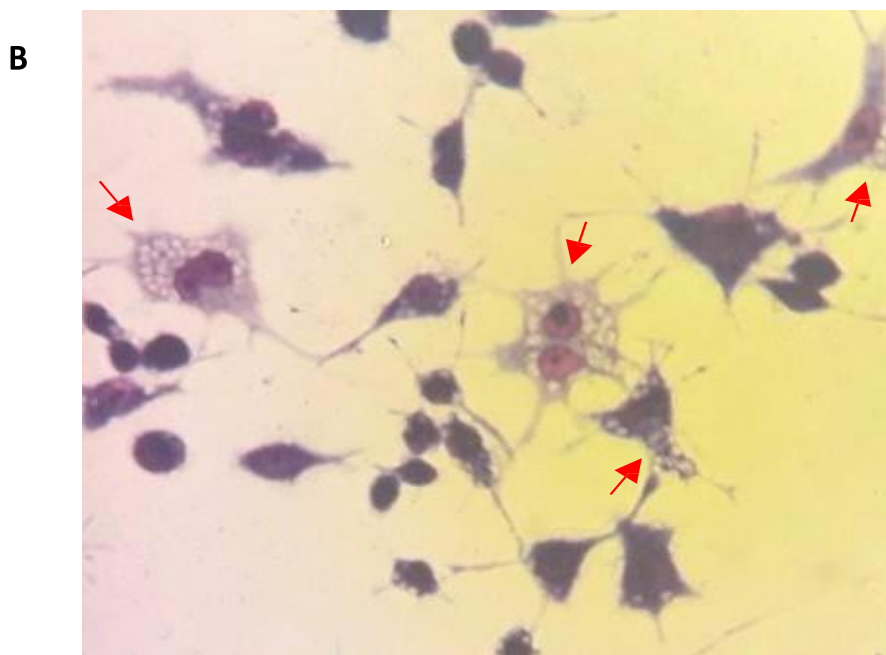
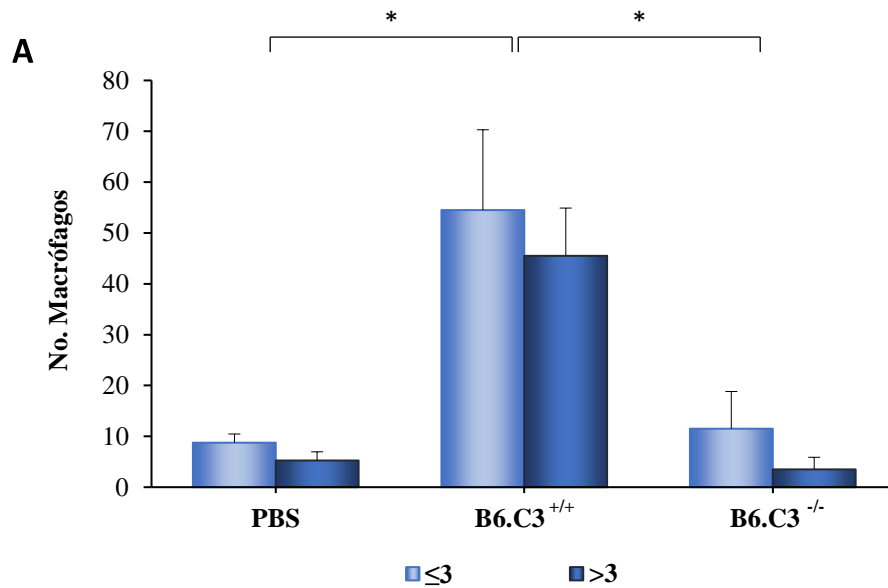


Figura 8: Fagocitose de zimosan por macrófagos peritoneais estimulados com tioglicolato. (A) A fagocitose foi determinada pela contagem de partículas internalizadas por 200 macrófagos empregando microscopia óptica. A figura A corresponde ao número de macrófagos que fagocitaram até 3 (≤ 3) ou mais que 3 (> 3) partículas de zimosan por célula. Foi detectada diferença significativa entre ≤ 3 e > 3 partículas de zimosan, independente do tratamento. A fagocitose de zimosan tratados com soro de B6.C3^{+/+} difere quando as partículas foram tratadas apenas com PBS ou soro de B6.C3^{-/-} independentemente do número de zimosan fagocitados (ANOVA $p < 0,05$). (B) As setas indicam macrófagos peritoneais que fagocitaram zimosan na presença de soro de B6.C3^{+/+}. As lâminas foram coradas com *kit* Panótico; aumento de 1000X. Este experimento foi analisado em triplicata em cinco repetições distintas.

5.4 Fagocitose de partículas de zimosan por macrófagos murinos tratados com sobrenadantes de *Leptospira* e termolisina recombinante

Pouco se conhece sobre a fagocitose de leptospiros. Alguns trabalhos têm sugerido que leptospiros patogênicos são capazes de sobreviver em células do hospedeiro tais como macrófagos peritoneais, microglia, células de Kupffer e monócitos do sangue periférico humano (Li et al., 2010, Toma et al., 2011). No entanto, esse mecanismo ainda não é bem compreendido

O zimosan contém PAMPs em sua superfície que são reconhecidos por receptores da imunidade inata envolvidos no reconhecimento imunológico e na fagocitose, usado para estudar as interações entre receptores de sinalização fagocítica e inflamatória (Underhill, 2002). Portanto, decidimos investigar em princípio, o processo de fagocitose de partículas de zimosan por macrófagos murinos na presença de proteases de leptospiros, antes de empregarmos estas bactérias para a fagocitose propriamente dita.

Para tanto, as células foram incubadas separadamente com (20 µg/ml) de SLP, SLNP ou termolisina recombinante, por 1 h a 37 °C em 5% de CO₂. As partículas de zimosan foram previamente tratadas com soro de B6.C3^{+/+}, de B6.C3^{-/-} ou apenas com PBS por 1 h a 37 °C. Após o período de incubação, estas partículas foram lavadas 3x com PBS e, em seguida, foram adicionadas às culturas de macrófagos e incubadas por 1h a 37 °C em 5% de CO₂. Ao final da reação, as culturas foram lavadas 3x com PBS para a remoção das partículas não internalizadas e as lamínulas foram coradas com o *Kit* Panótico e examinadas em microscópio óptico. Foram contadas 200 células totais que fagocitaram ou não partículas de zimosan. Em seguida, dentre a população de células que fagocitaram zimosan, o número de células que internalizaram uma, duas, três ou mais de três partículas de zimosan foi quantificada.

A fagocitose de zimosan pelos macrófagos murinos não foi afetada quando as células foram previamente incubadas com SLNP (**Figura 9A**). Nós observamos que a fagocitose dessas partículas pode ser aparentemente afetada na presença de SLP (**Figura 9B**), porém esta diferença não foi estatisticamente significativa. Entretanto, quando os macrófagos foram incubados com a termolisina recombinante, houve uma diminuição relevante na fagocitose de zimosan independentemente do tratamento (soros B6.C3^{+/+}, B6.C3^{-/-} ou PBS) e número de zimosan (até três ou acima de três partículas) (**Figura 10**), demonstrando que a ação desta protease interfere de alguma forma na internalização destas partículas de zimosan pelos macrófagos.

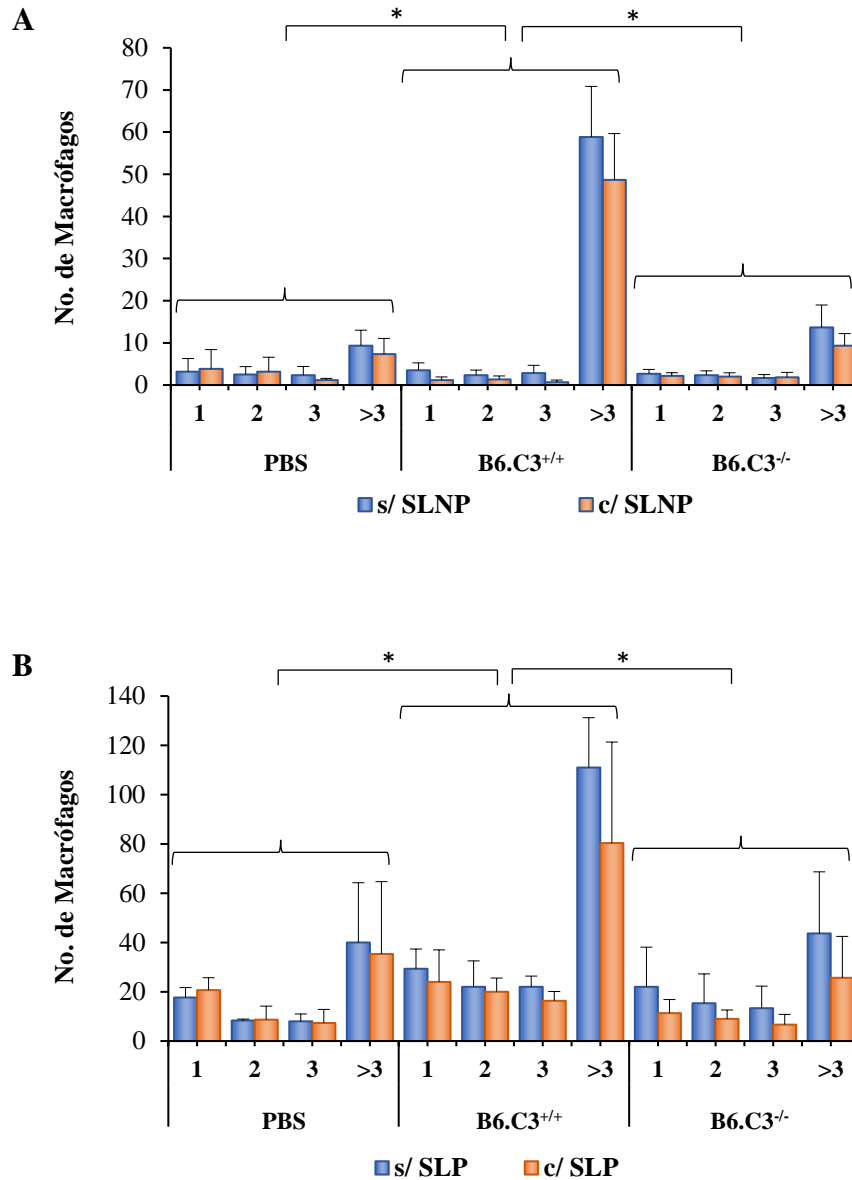


Figura 9: Fagocitose de zimosan por macrófagos murinos tratados com SLP e SLNP. As células obtidas de camundongos previamente estimulados com tioglicolato foram incubadas com SLNP (A) ou SLP (B) por 1 h 37 °C. Como controle, as células foram incubadas com PBS. Em seguida, as partículas de zimosan tratadas com PBS, B6.C3^{+/+} ou B6.C3^{-/-} foram adicionadas as culturas celulares e incubadas por 1 h 37 °C, 5% de CO₂. Um total de 200 células aderentes foi contado. Entre as células que fagocitaram, foi quantificado o número de macrófagos que fagocitou 1, 2, 3 ou mais que 3 partículas de zimosan. A fagocitose das partículas de zimosan tratadas com B6.C3^{+/+} difere dos grupos tratados com PBS e B6.C3^{-/-} independente da presença de protease e número de zimosan; >3 de zimosan difere de 1 zimosan, 2 zimosan, 3 zimosan, independente do tratamento (p<0,05). Dados obtidos de 5 experimentos, cada um realizado em triplicata. SLNP: sobrenadante de cultura de leptospiras não patogênicas. SLP: sobrenadante de cultura de leptospiras patogênicas.

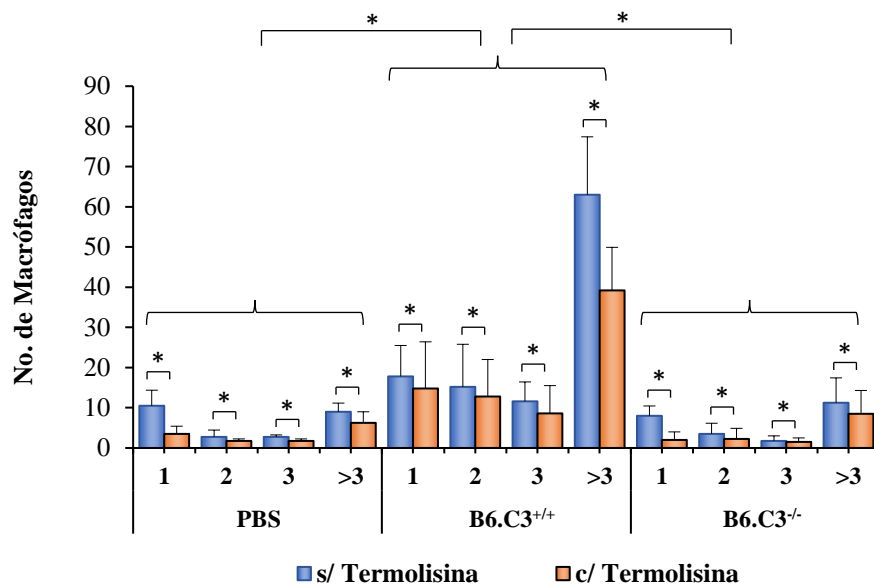


Figura 10: Fagocitose de zimosan por macrófagos murinos tratados com termolisina recombinante. As células obtidas de camundongos previamente estimulados com tioglicolato foram incubadas com a termolisina recombinante por 1 h 37 °C. Como controle, as células foram incubadas com PBS. Em seguida, as partículas de zimosan tratadas com PBS, B6.C3^{+/+} ou B6.C3^{-/-} foram adicionadas as culturas celulares e incubadas por 1 h 37 °C, 5% de CO₂. Um total de 200 células aderentes foi contado. Entre as células que fagocitaram, foi quantificado o número de macrófagos que fagocitou 1, 2, 3 ou mais que 3 partículas de zimosan. A fagocitose de partículas de zimosan na presença de termolisina difere das amostras sem termolisina, independente do tratamento e do número de zimosan ($p < 0,05$). Dados obtidos de 5 experimentos realizados cada um em triplicata.

5.5 Fagocitose de partículas de zimosan por macrófagos murinos na presença de sobrenadantes de *Leptospira* e termolisina recombinante

Como dito anteriormente, o soro normal exerce a sua atividade bactericida apenas contra espécies não patogênicas, eliminando-as rapidamente, ao passo que as leptospiras patogênicas são resistentes à ação do Complemento presente no soro (Meri et al., 2005; Barbosa et al., 2009). A fagocitose de microrganismos envolve uma série de eventos coordenados, iniciando-se pelo reconhecimento pelas células fagocíticas seguido da ativação das vias de sinalização que levam à resposta imune e eliminação do patógeno (Wynn et al., 2013). Entretanto, leptospiras patogênicas são capazes de sobreviver e replicar no interior de macrófagos, permitindo posteriormente sua disseminação para órgãos-alvo (Toma et al., 2011 e Silva et al., 2019).

Com o propósito de averiguar se ação das proteases seria capaz de alterar a fagocitose, nós realizamos o próximo experimento em diferentes condições (**Tabela 1**). Em princípio, o zimosan foi incubado apenas com PBS ou com soros de B6.C3^{+/+} ou de B6.C3^{-/-} como no experimento anterior. Em seguida, o zimosan foi incubado com SLP (**Figura 11**) ou termolisina recombinante (**Figura 12**), para investigarmos se tais proteases poderiam degradar as opsoninas presentes em sua superfície, prejudicando assim a fagocitose.

Além disso, também empregamos os macrófagos previamente tratados com as proteases por 1h a 37 °C, antes de adicionarmos o zimosan tratado ou não com SLP ou termolisina recombinante para analisarmos se a fagocitose pode ser mais afetada quando as células são expostas às proteases dessas espiroquetas.

Tabela 1: Fagocitose de zimosan tratados com soros B6.C3^{+/+}, de B6.C3^{-/-} e macrófagos tratados com SLP e termolisina recombinante.

Macrófagos	1ª incubação	2ª incubação
Sem Tratamento	Zimosan + PBS	PBS
		Proteases
	Zimosan + C3 ^{+/+}	PBS
		Proteases
	Zimosan + C3 ^{-/-}	PBS
		Proteases
Tratados com Proteases	Zimosan + PBS	PBS
		Proteases
	Zimosan + C3 ^{+/+}	PBS
		Proteases
	Zimosan + C3 ^{-/-}	PBS
		Proteases

Tabela 1: Esquema experimental da fagocitose de zimosan por macrófagos peritoneais na presença de SLP e termolisina recombinante. Partículas de zimosan foram tratadas com o soro de B6.C3^{+/+}, de B6.C3^{-/-} ou apenas com PBS como controle negativo, antes de serem incubadas com SLP ou termolisina recombinante por 1 h 37 °C, 5% de CO₂. Ao término das incubações, as partículas de zimosan foram lavadas, ressuspensas em meio DMEM e adicionadas às culturas de macrófagos tratados previamente ou não com as proteases. O quadrante em rosa indica incubação do zimosan com PBS; em verde indica incubação com soro B6.C3^{+/+}; em amarelo indica incubação com soro B6.C3^{-/-} e em azul indica incubação dos macrófagos e zimosan com SLP ou termolisina recombinante.

Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 11**, quando incubamos SLP com o zimosan e macrófagos peritoneais e resumidos abaixo:

- A ingestão de zimosan tratado com SLP poderia talvez expor novos ligantes que aumentaram a sua ingestão por macrófagos tratados ou não previamente com SLP;
- O tratamento de SLP sobre zimosan opsonizados por fragmentos de C3 não afetou a sua ingestão por macrófagos tratados ou não previamente com SLP;
- O tratamento de zimosan com soro deficiente de C3 provocou menor ingestão do que quando tratado na presença de C3 por macrófagos tratados ou não com SLP;

- O tratamento de zimosan com SLP previamente tratado com soro deficiente de C3 provocou maior ingestão dessas partículas por macrófagos em comparação ao controle PBS. Entretanto, quando as células também foram tratadas com SLP, esta diferença não foi observada.

Nós constatamos que quando o zimosan é tratado com PBS e SLP, há uma elevada taxa de fagocitose por macrófagos peritoneais tratados ou não com SLP. Além disso, a fagocitose de partículas de zimosan previamente opsonizadas com C3 e tratadas com SLP, não foi afetada. A fagocitose de zimosan tratados com soro deficiente de C3 na presença de SLP por macrófagos foi aumentada em comparação com o controle PBS, sugerindo que existem outros componentes no soro que podem estar auxiliando a fagocitose. Entretanto, quando os macrófagos também foram incubados com SLP, este aumento não foi observado, indicando que estas proteases podem estar afetando receptores de fagocitose presentes nas superfícies dos macrófagos. Diante desses resultados, podemos inferir que em apenas 1 h de incubação, o SLP não é capaz de prejudicar a fagocitose e pode estar atuando na geração de opsoninas pela clivagem de C3 e conseqüentemente melhorando a fagocitose pelos macrófagos. Este fato pode ser crucial para a sua sobrevivência dentro do macrófago, corroborando com outros estudos que mostraram que a leptospira patogênica é capaz de induzir apoptose, possibilitando a disseminação da bactéria no organismo (Jin et al., 2009).

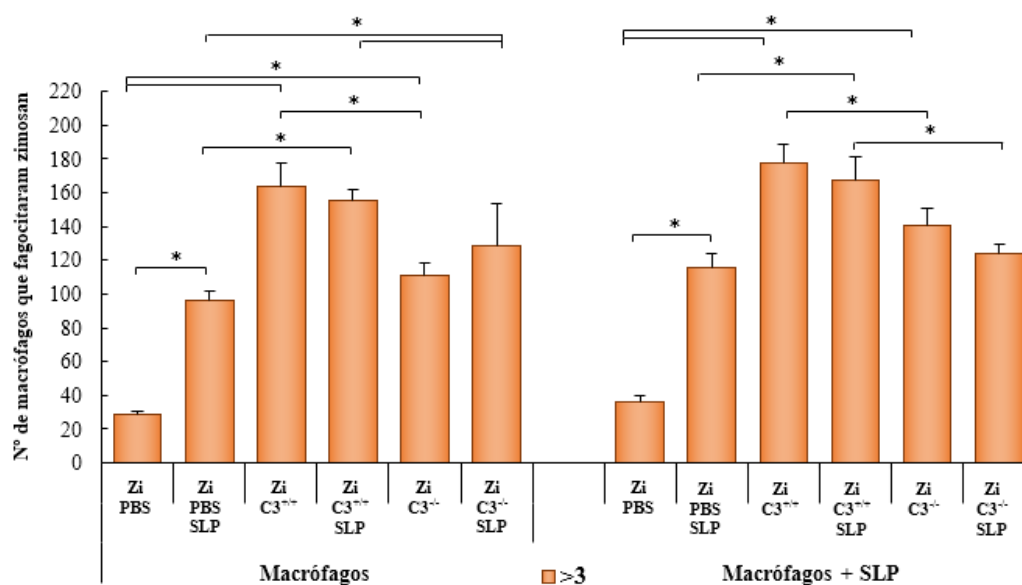


Figura 11: Proteases secretadas por leptospiros patogênicas interferem na fagocitose de zimosan por macrófagos murinos. As células peritoneais obtidas de camundongos previamente estimulados com tioglicolato foram incubadas com 20 µg/ml de sobrenadante de leptospiros patogênicas (SLP) por 1 h 37 °C. Como controle, as células foram incubadas apenas com PBS. Em seguida, as partículas de zimosan tratadas com PBS, soro de B6.C3^{+/+} ou de B6.C3^{-/-} foram incubadas com SLP. Posteriormente o zimosan foi adicionado às culturas celulares tratadas ou não com os mesmos sobrenadantes e incubados por 1 h 37 °C, 5% de CO₂. A fagocitose foi determinada por contagem de partículas internalizadas por 200 macrófagos em microscopia óptica. Estes resultados foram obtidos de cinco experimentos diferentes. ANOVA $p=0,05$.

Os principais resultados obtidos após o tratamento do zimosan e macrófagos com a termolisina recombinante (**Figura 12**) estão descritos a seguir:

- O tratamento de partículas de zimosan com termolisina aumenta a sua ingestão por macrófagos tratados ou não previamente com a mesma protease;
- O tratamento de termolisina sobre zimosan opsonizados por fragmentos de C3 aumentou a sua ingestão por macrófagos não tratados com termolisina;
- O tratamento de zimosan com termolisina previamente tratado com soro deficiente de C3 provocou maior ingestão dessas partículas por macrófagos em comparação ao controle PBS. Entretanto, quando as células também foram tratadas com termolisina, esta diferença não foi observada.
- Houve uma diminuição acentuada do número de macrófagos que fagocitaram zimosan incubados com soro deficientes de C3 em comparação com soro normal de camundongos quando zimosan e macrófagos foram tratados com termolisina

Como observamos com o SLP, o zimosan tratado com PBS apresentou uma elevada taxa de fagocitose por macrófagos peritoneais tratados ou não com termolisina. Nós constatamos que a termolisina, de alguma forma, aumenta a capacidade dos macrófagos de fagocitar as partículas de zimosan opsonizadas ou não por fragmentos de C3. Contudo, houve uma redução do número de macrófagos que fagocitaram acima de três partículas de zimosan, quando estes foram tratados com soro deficiente de C3. Deste modo, acreditamos que estas proteases podem estar degradando moléculas de superfície presentes em macrófagos, importantes para a fagocitose.

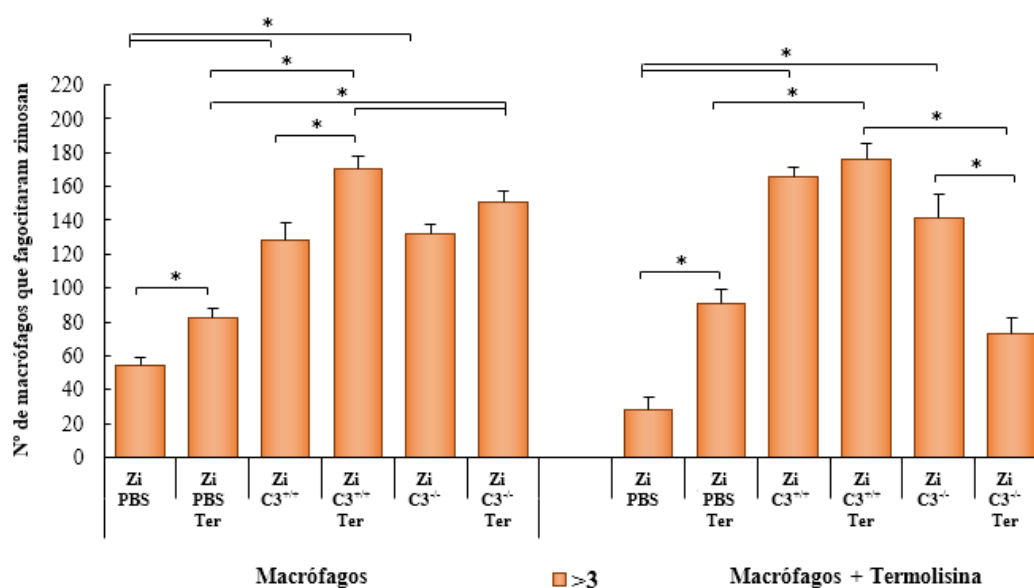


Figura 12: As proteases secretadas pelas leptospiras interferem na fagocitose de zimosan por macrófagos murinos. As células obtidas de camundongos previamente estimulados com tioglicolato foram incubadas 20 µg/ml termolisina (Ter) recombinante por 1 h 37 °C. Como controle, as células foram incubadas com PBS. Em seguida, as partículas de zimosan tratadas com PBS, B6.C3^{+/+} ou B6.C3^{-/-} foram incubadas com a termolisina recombinante. Posteriormente o zimosan foi adicionado às culturas celulares tratadas ou não com a protease e incubados por 1 h 37 °C, 5% de CO₂. A fagocitose foi determinada por contagem de partículas internalizadas por 200 macrófagos em microscopia óptica. Estes resultados foram obtidos de cinco experimentos diferentes. ANOVA $p=0,05$

Diante dos resultados obtidos, nós então decidimos comparar a fagocitose de partículas de zimosan incubadas com PBS, soros de B6.C3^{+/+} ou B6.C3^{-/-} pelos macrófagos peritoneais tratados previamente com SLP ou termolisina recombinante. Com o tratamento prévio com termolisina, menor número de macrófagos internalizou partículas de zimosan, quando comparados com macrófagos tratados apenas com PBS (**Figura 13**). E, como visto anteriormente, ao incubarmos os macrófagos com SLP, ocorreu uma maior

taxa de fagocitose pelas células que fagocitaram partículas de zimosan opsonizados com C3 presentes no soro. A diferença observada na fagocitose de zimosan entre essas duas proteases se deve pelo fato de haver vários outros componentes no sobrenadante total de leptospiros patogênicas que pode estar participando de alguma forma na internalização destas bactérias.

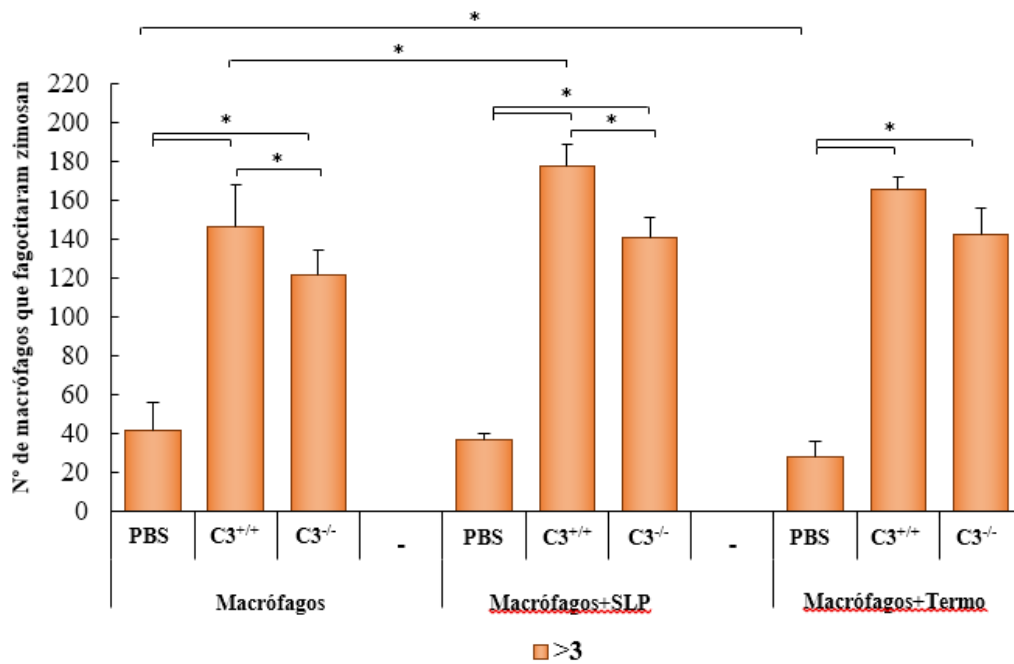


Figura 13: Comparação entre a fagocitose de zimosan por macrófagos incubados com proteases de leptospiros patogênicas. As células peritoneais obtidas de camundongos previamente estimulados com tioglicolato foram incubadas com 20 µg/ml de SLP ou termolisina recombinante por 1 h 37 °C. Como controle, as células foram incubadas apenas com PBS. Em seguida, as partículas de zimosan tratadas com PBS, soro de B6.C3^{+/+} ou de B6.C3^{-/-} foram incubadas com a termolisina recombinante. ANOVA $p < 0,05$. SLP: sobrenadante de cultura de leptospiros patogênicas. Termo: termolisina recombinante

5.6 Avaliação da fagocitose de partículas de zimosan-FITC por macrófagos peritoneais na presença de SLP e termolisina recombinante

Para aprimorar o nosso estudo em relação à fagocitose de zimosan-FITC por macrófagos murinos, decidimos expandir o tempo de incubação dos macrófagos com as proteases presentes nos sobrenadantes de leptospiras, além da termolisina recombinante. As células foram previamente incubadas com SLP ou termolisina recombinante por 1 h, 3 h, 6 h e 24 h. Em seguida, as partículas de zimosan-FITC foram adicionadas à cultura de células e incubadas por 1 h a 37 °C.

Após o término da incubação, os macrófagos foram marcados com anticorpo específico anti-F4/80 (antígeno presente em macrófagos murinos) para serem analisados por citometria de fluxo. A análise dos dados foi inicialmente baseada no tamanho e granulosidade celulares (**Figura 14A**). Posteriormente, foi realizada uma avaliação mais criteriosa para a separação de células que estavam aderidas entre si. As células foram selecionadas pelos parâmetros área e altura (**Figura 14B**). A população de células F4/80⁺ foi representada por aproximadamente 84% das células remanescentes (**Figura 14C**). Ao final, foi identificada a população de macrófagos que fagocitaram as partículas de zimosan-FITC (**Figura 14D**).

Nós observamos um aumento significativo da fagocitose ao tratar as células THP-1 com SLP durante todo período de 24 h. Contudo, a fagocitose por macrófagos murinos apresentou um decaimento acentuado na presença de termolisina recombinante em relação aos demais tratamentos (**Figura 15**). Este fato se deve por se tratar de uma proteína purificada apresentando em seu conteúdo apenas a termolisina, diferentemente dos sobrenadantes de leptospiras, os quais são compostos por um conjunto de proteína total, uma parte delas sem ação enzimática.

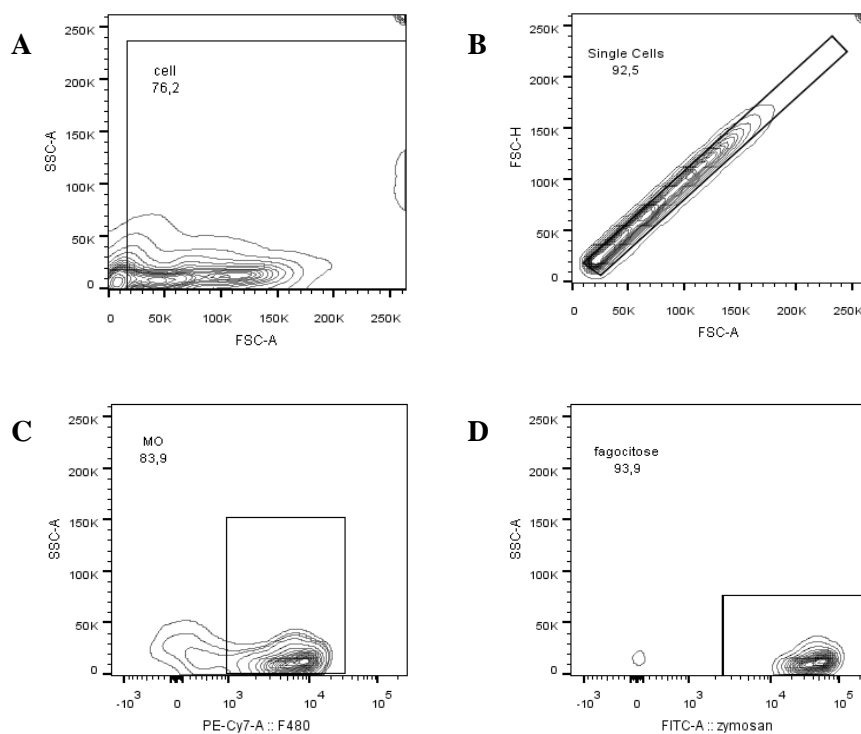


Figura 14: Seleção de macrófagos peritoneais murinos. As células de camundongos C57BL/6 previamente estimulados com tioglicolato foram coletadas e marcadas com anticorpo anti-F4/80. Os macrófagos foram analisados empregando o citômetro de fluxo FACSCanto e 10.000 eventos foram adquiridos por amostra. **(A)** Para a análise dos dados, as células foram selecionadas em um *gate* pelo seu tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A). **(B)** Em seguida, as células foram selecionadas pelos parâmetros (FSC-A) área e (FSC-H) altura para a exclusão dos *doublets* (agregados celulares). **(C)** Por sua vez, foi selecionada a população F4/80⁺ que representou cerca de 84% das células remanescentes. **(D)** O último parâmetro corresponde à porcentagem de partículas de zimosan-FITC que foram fagocitadas por macrófagos.

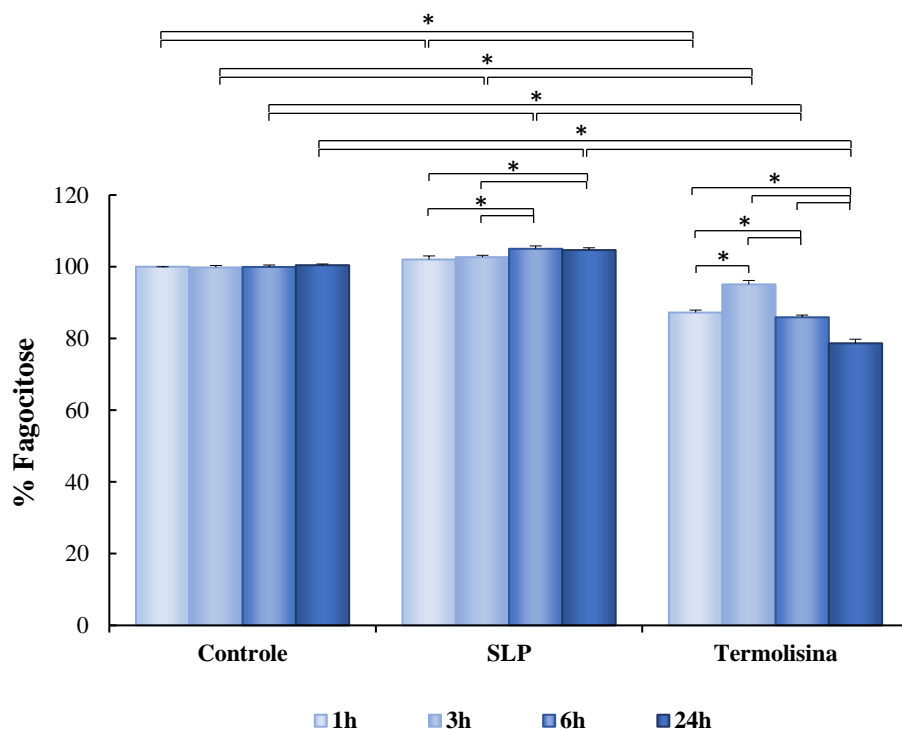


Figura 15: Atividade proteolítica de proteases de leptospiros patogênicos na fagocitose de zimosan-FITC por macrófagos peritoneais. As células obtidas de camundongos previamente estimulados com tioglicolato foram incubadas em diferentes tempos com sobrenadante de cultura de leptospiros patogênicos (SLP) ou com termolisina. Como controle, as células foram incubadas apenas com PBS. Posteriormente, partículas de zimosan-FITC foram adicionadas às culturas celulares tratadas com SLP ou termolisina e incubadas por 1 h 37 °C. ANOVA $p < 0,05$.

5.7 Análise da presença de moléculas na superfície de macrófagos peritoneais após tratamento com SLP ou termolisina recombinante.

O processo de fagocitose pode ser facilitado mediante a interação de opsoninas com receptores específicos como Fc γ RI (para IgG) e CR1, CR3 e CR4. Desta forma, decidimos investigar se as proteases de leptospiras poderiam de alguma forma prejudicar a fagocitose e/ou resposta imune dos macrófagos por meio da remoção ou inibição de seus receptores. Os macrófagos de camundongos tratados com tioglicolato foram obtidos do lavado peritoneal e marcados com anticorpo específico anti-F4/80 (antígeno presente em macrófagos murinos) para serem analisadas por citometria de fluxo. A análise dos dados foi inicialmente baseada no seu tamanho e granulosidade (**Figura 16A**). Posteriormente, foi realizada uma avaliação mais criteriosa para a separação de células que estavam aderidas entre si. As células foram selecionadas pelos parâmetros área e altura (**Figura 16B**). A população de células F4/80⁺ foi representada por aproximadamente 87% das células remanescentes (**Figura 16C**).

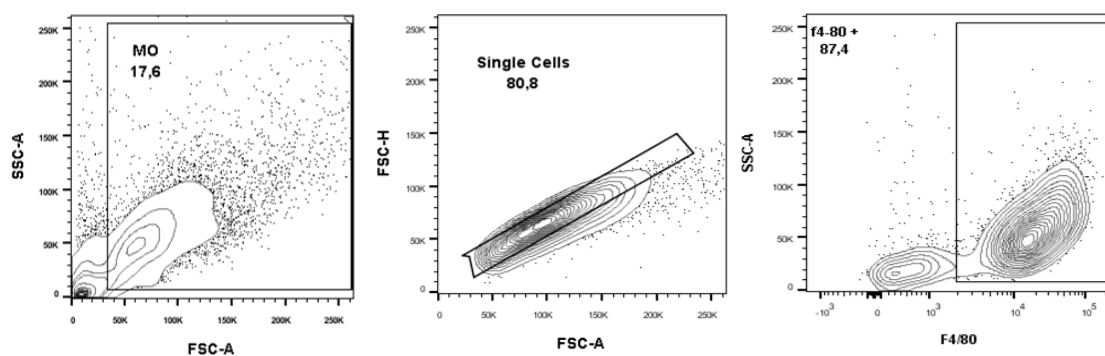


Figura 16: Seleção de macrófagos peritoneais murinos. As células de camundongos previamente estimuladas com tioglicolato foram coletadas e marcadas com anticorpo anti-F4/80. Os macrófagos foram analisados empregando o citômetro de fluxo FACSCanto e 10.000 eventos foram adquiridos por amostra. (A) Para a análise dos dados, as células foram selecionadas em um *gate* pelo seu tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A). (B) Em seguida, as células foram selecionadas pelos parâmetros (FSC-A) área e (FSC-H) altura para a exclusão dos *doublets* (agregados celulares). (C) Por sua vez, foi selecionada a população F4/80⁺ que representou cerca de 87% das células remanescentes.

Culturas de macrófagos peritoneais murinos foram incubadas por 1 h, 3 h, 6 h e 24 h com SLP ou termolisina recombinante (20 µg/ml). Em seguida, estas células foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos contra cada molécula de interesse: FcγRI, LFA-1, CR1, CR3 e CR4.

Nós observamos que a presença dos receptores FcγRI e CR1 não se alterou, mesmo quando as células foram incubadas com SLP por 24 h (**Figura 17 A e B**). No entanto, a presença de LFA-1 e CR4 foi significativamente menor quando as células foram incubadas por 24 h comparadas ao tempo de 1 h. A presença de LFA-1 apresentou um suave decaimento dependente do tempo de incubação especialmente quando incubamos com SLP (**Figura 18A**). Além disso, a presença dessa molécula pelos macrófagos murinos foi maior ao serem incubados com a termolisina recombinante diferindo dos macrófagos incubados com o SLP. A presença de CR4 foi menor quando as células foram incubadas com SLP e termolisina recombinante, quando comparadas ao controle. E em cada tratamento, houve uma diminuição na presença desse receptor já após 1 h de incubação (**Figura 18B**). Quando macrófagos foram incubados com SLP por 24 h, foi observado uma diminuição significativa de CR3 na superfície dessas células (**Figura 19**). Este resultado mostra que, apesar de atuar em diferentes moléculas presentes na superfície do macrófago, as proteases liberadas por leptospiros patogênicos apresentam um certo grau de especificidade dependendo do substrato.

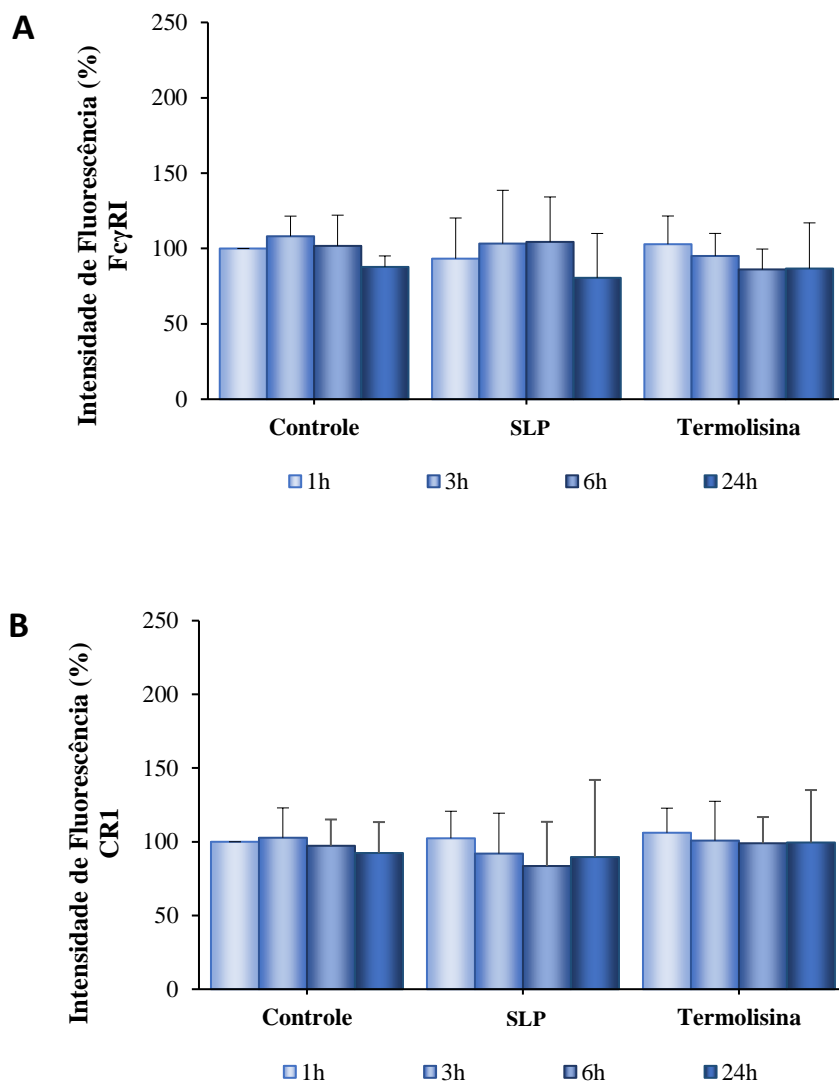


Figura 17: Presença de FcγRI e CR1 em macrófagos tratados com proteases de leptospiros patogênicas. Os macrófagos peritoneais murinos foram incubados com sobrenadante de cultura de leptospiros patogênicos (SLP) ou termolisina recombinante por 1 h, 3 h, 6 h e 24 h. **(A)** FcγRI, **(B)** CR1 Para a leitura das amostras, as células foram ressuspendidas em um volume de 200 μl na presença de anticorpos monoclonais específicos e analisadas por citometria de fluxo, empregando-se FACSCanto, 10.000 eventos foram adquiridos por amostra. A análise dos dados foi realizada pelo teste ANOVA com o *software* FlowJo (Tree Star).

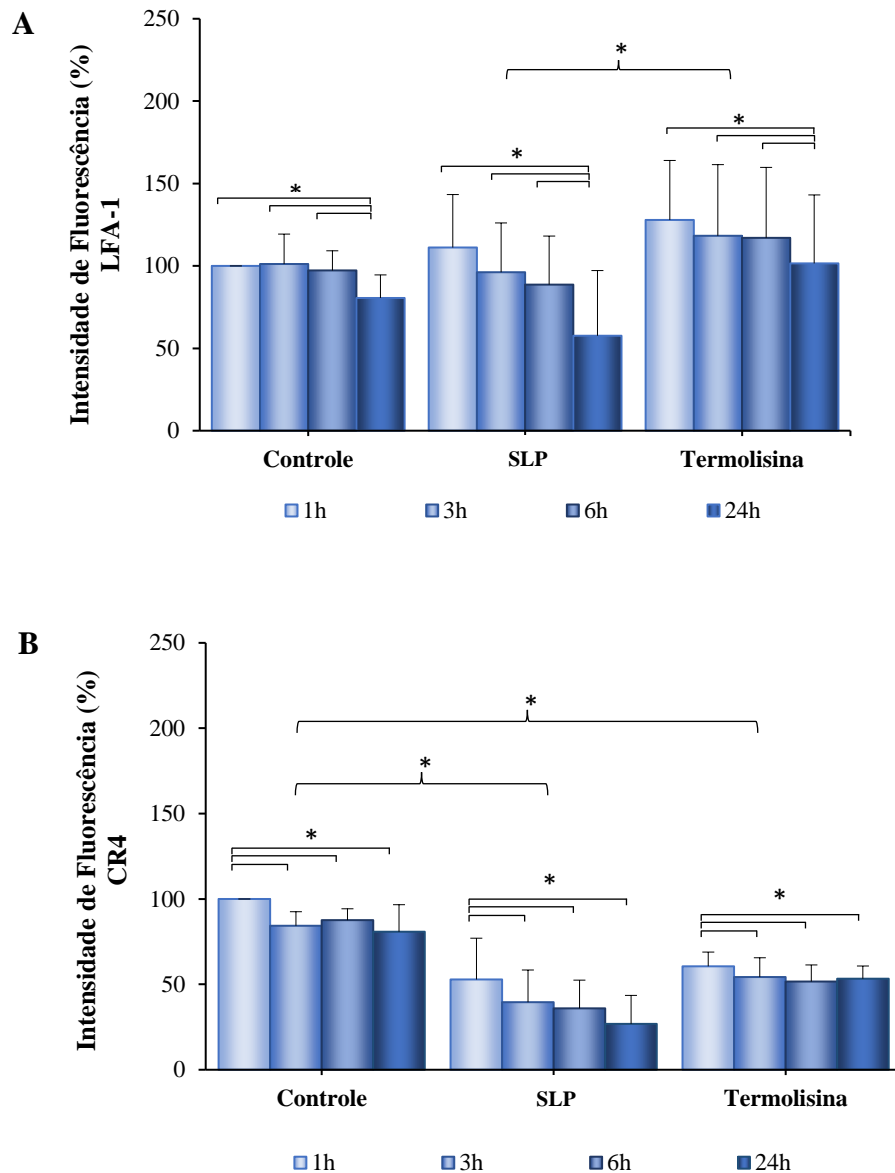


Figura 18: Presença de LFA-1 e CR4 em macrófagos peritoneais murinos tratados com proteases de leptospiras patogênicas. Os macrófagos foram incubados com sobrenadante de cultura de leptospiras patogênicas (SLP) ou termolisina recombinante por 1 h, 3 h, 6 h e 24 h. A presença dos receptores (A) LFA-1 (B) CR4 foi determinada por citometria de fluxo, empregando-se anticorpos monoclonais específico. As células foram analisadas em um FACSCanto e 10.000 eventos foram adquiridos por amostra. A análise dos dados foi realizada pelo teste ANOVA com o *software* FlowJo (Tree Star). * $p < 0,05$.

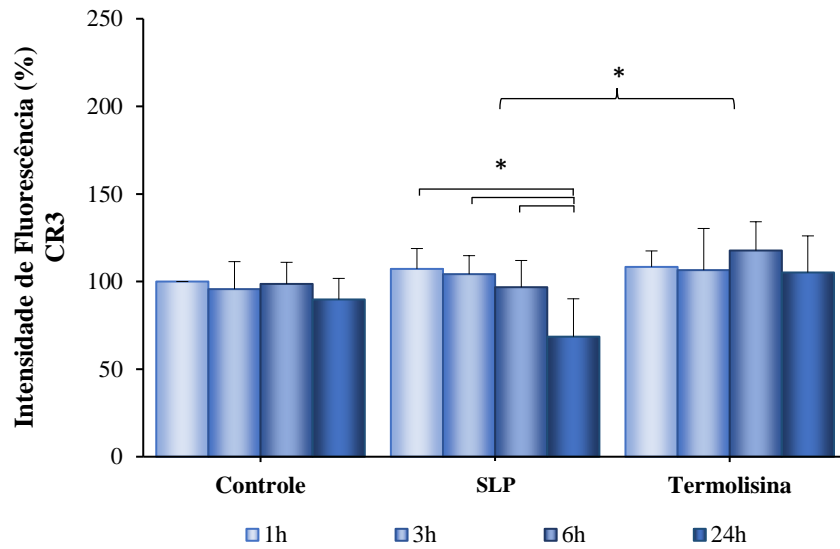


Figura 19: Presença de CR3 em macrófagos peritoneais murinos tratados com proteases de leptospiras patogênicas. Os macrófagos murinos foram incubados com sobrenadante de cultura de leptospiras patogênicas (SLP) ou com termolisina recombinante por 1 h, 3 h, 6 h e 24 h e analisados por citometria de fluxo (FACSCanto) na presença de anticorpos monoclonais específicos anti-CR3. Um total de 10.000 eventos foi adquirido por amostra. A análise dos dados foi realizada pelo teste ANOVA com o *software* FlowJo (Tree Star). * $p < 0,05$.

5.8 Análise da presença de receptores de macrófagos por microscopia confocal

De acordo com os resultados obtidos até o momento, decidimos explorar a ação das proteases presentes no SLP e da termolisina recombinante sobre os receptores de reconhecimento de padrões moleculares (TLR2 e CD206) e sobre a molécula CD11b. Macrófagos peritoneais foram tratados com SLP e termolisina recombinante por 1h e 24 h a 37 °C. Após o término das incubações, as células foram lavadas e marcadas com anticorpos específicos contra cada receptor (TLR2, CD206 e CD11b). O resultado foi obtido por microscopia confocal.

Nós observamos que, quando as células foram previamente tratadas com SLP, houve uma diminuição da intensidade de fluorescência de TLR2 mesmo com apenas 1 h de incubação, e mais evidente após 24 h de incubação (**Figura 20**). A incubação dos macrófagos com SLP e termolisina recombinante por 1 h e 24 h provocou uma perda significativa de sua fluorescência comparado ao controle, com mais evidência na presença de SLP (**Figura 21**).

O mesmo foi observado para CD11b (**Figura 22**) e CD206 (**Figura 24**). Quando as células foram incubadas previamente com a termolisina recombinante também observamos uma perda significativa da intensidade de fluorescência dessas moléculas de superfície, porém em menor grau. A análise estatística mostrou uma diminuição de CD11b na presença de SLP e termolisina recombinante em 1 h. Entretanto, em 24 h houve um decaimento somente na presença de SLP diferentemente da termolisina que não apresentou diferença quando comparado ao controle (**Figura 23**). E ao incubarmos os macrófagos com ambas as proteases por 1 h e 24 h, obtivemos uma redução significativa de CD206 em relação ao controle (**Figura 25**). Neste contexto, acreditamos que há outras proteases secretadas por leptospiros patogênicas que podem afetar a presença de moléculas na superfície de macrófagos, prejudicando a resposta imune por estas células.

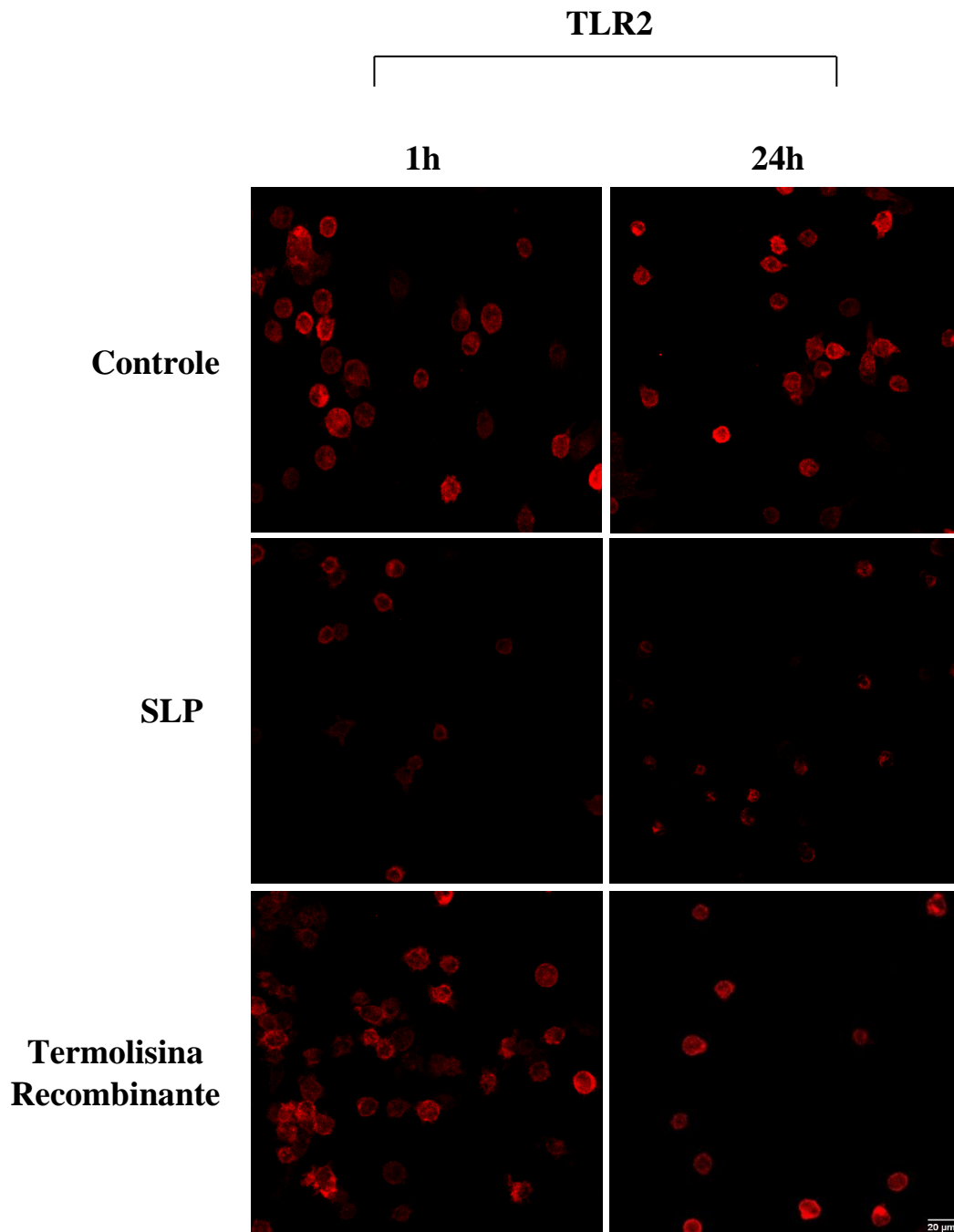


Figura 20. Efeito da ação enzimática de proteases de leptospiros patogênicas sobre TLR2 de macrófagos. Macrófagos peritoneais murinos foram tratados com sobrenadante de cultura de leptospiros patogênicas (SLP) e termolisina recombinante por 1 h e 24 h 37 °C com 5% de CO₂. Em seguida, estas células foram marcadas com anti-CD-282 Pe (TLR2) e as imagens foram capturadas por microscopia confocal.

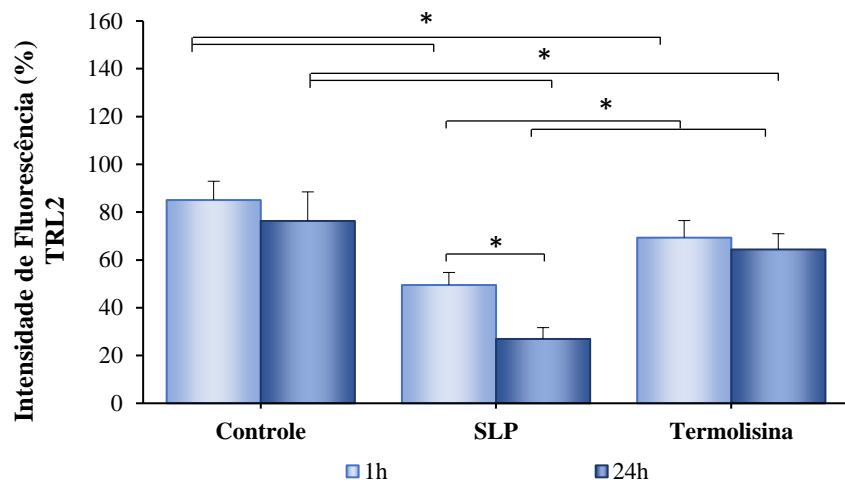


Figura 21. Efeito da ação enzimática de proteases de leptospiras patogênicas sobre TLR2 de macrófagos. Macrófagos peritoneais murinos foram tratados com sobrenadante de cultura de leptospiras patogênicas (SLP) e termolisina recombinante por 1 h e 24 h a 37 °C com 5% de CO₂. * (ANOVA * p <0,05).

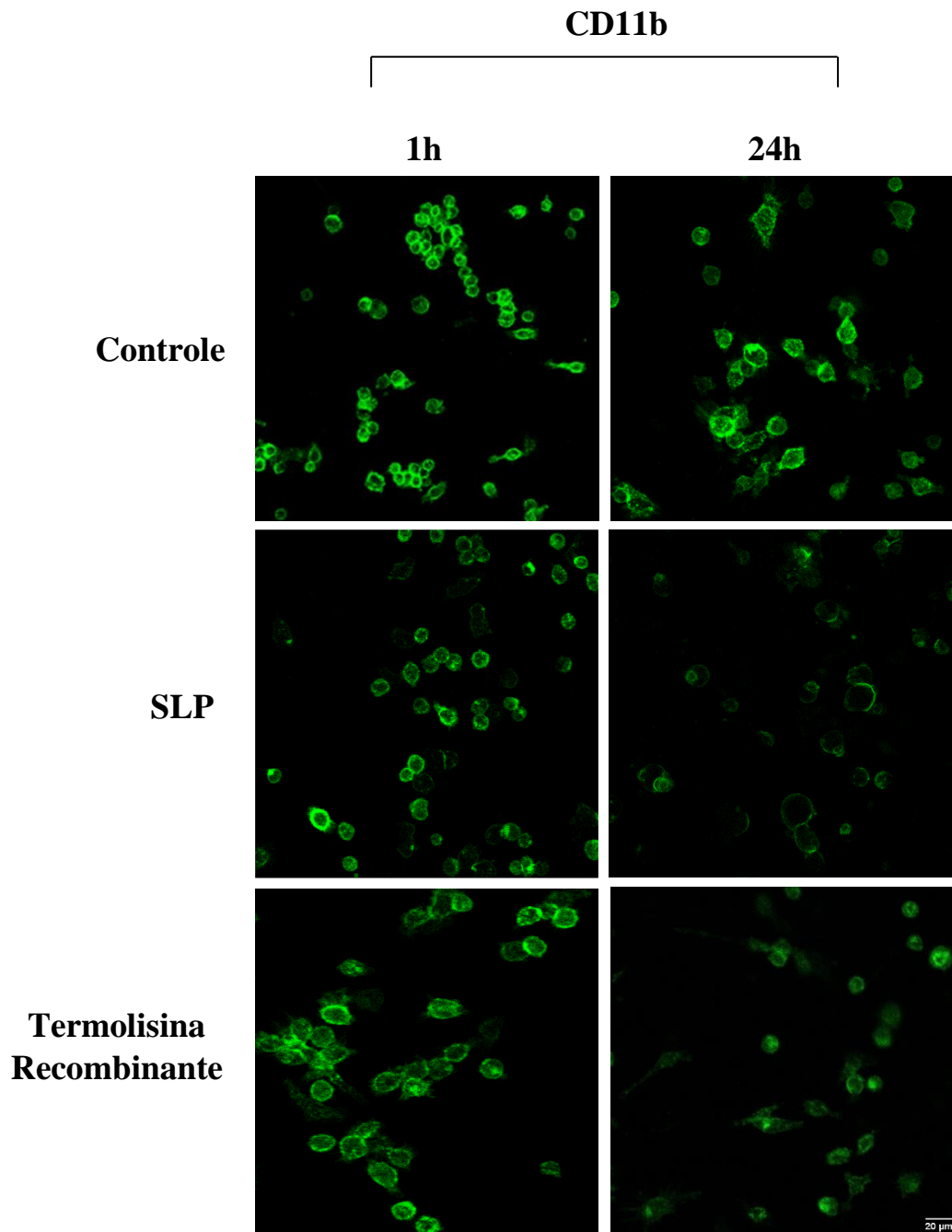


Figura 22. Efeito da ação enzimática de proteases de leptospiros patogênicas sobre CD11b de macrófagos. Macrófagos peritoneais murinos foram tratados com sobrenadante de cultura de leptospiros patogênicas (SLP) e termolisina recombinante por 1 h e 24 h 37 °C com 5% de CO₂. Em seguida, estas células foram marcadas com anti-CD11b FITC (CR3) e as imagens foram capturadas por microscopia confocal.

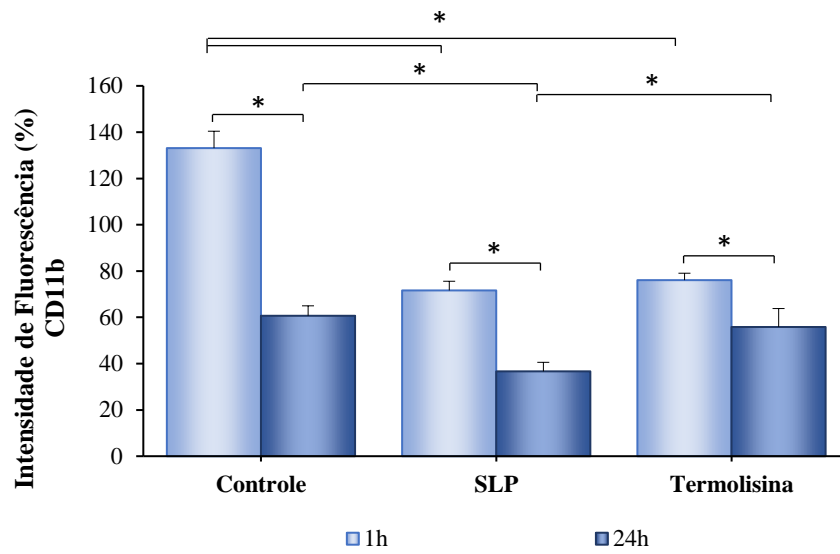


Figura 23. Efeito da ação enzimática de proteases de leptospiros patogênicas sobre CD11b de macrófagos. Macrófagos peritoneais murinos foram tratados com sobrenadante de cultura de leptospiros patogênicas (SLP) ou com termolisina recombinante por 1 h e 24 h 37 °C com 5% de CO₂. (ANOVA * $p < 0,05$).

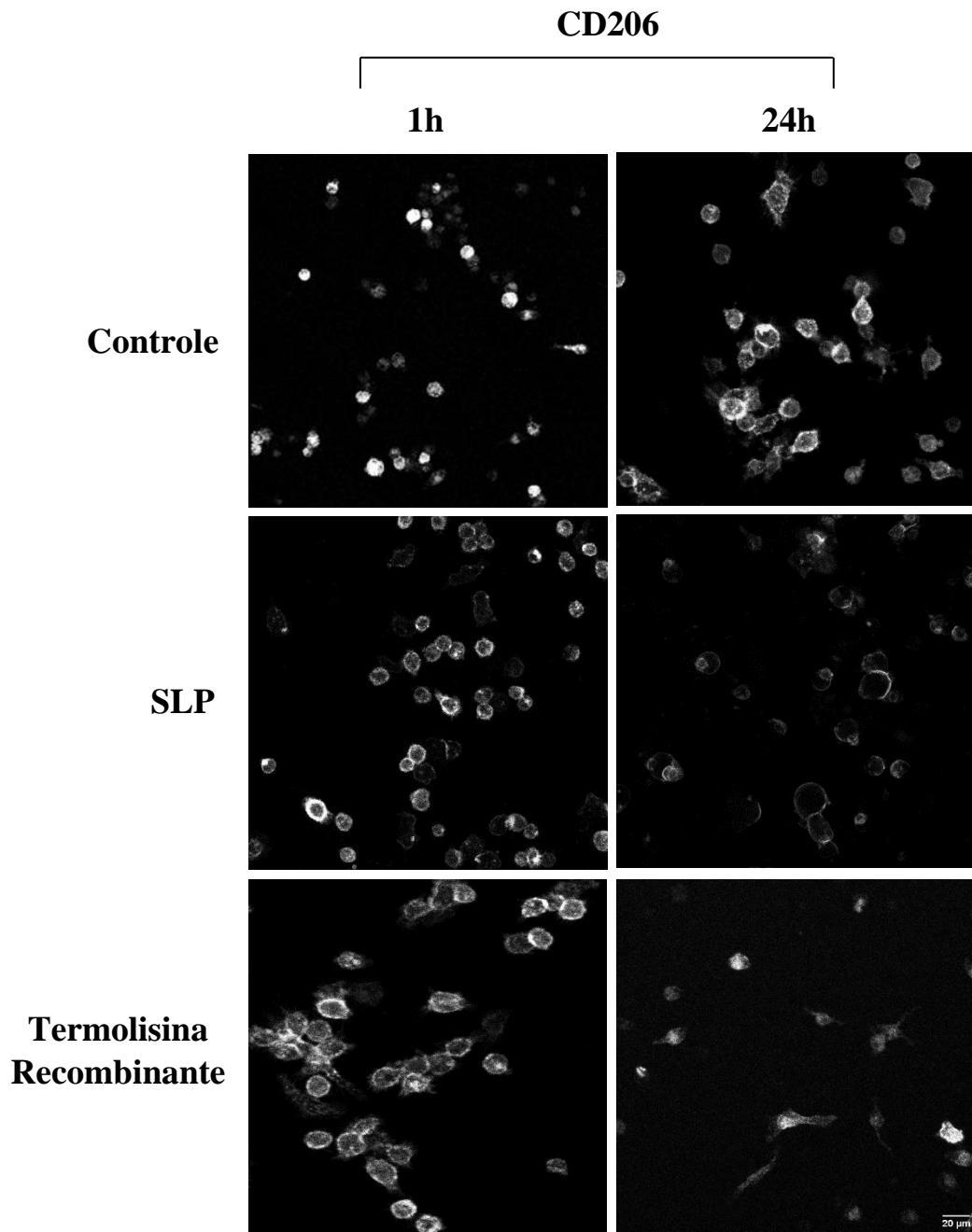


Figura 24. Efeito da ação enzimática de proteases de leptospiros patogênicas sobre CD206 de macrófagos. Macrófagos peritoneais murinos foram tratados com sobrenadante de cultura de leptospiros patogênicas (SLP) e termolisina recombinante por 1 h e 24 h 37 °C com 5% de CO₂. Em seguida, estas células foram marcadas com anti-CD206 APC (receptor de manose) e as imagens foram capturadas por microscopia confocal.

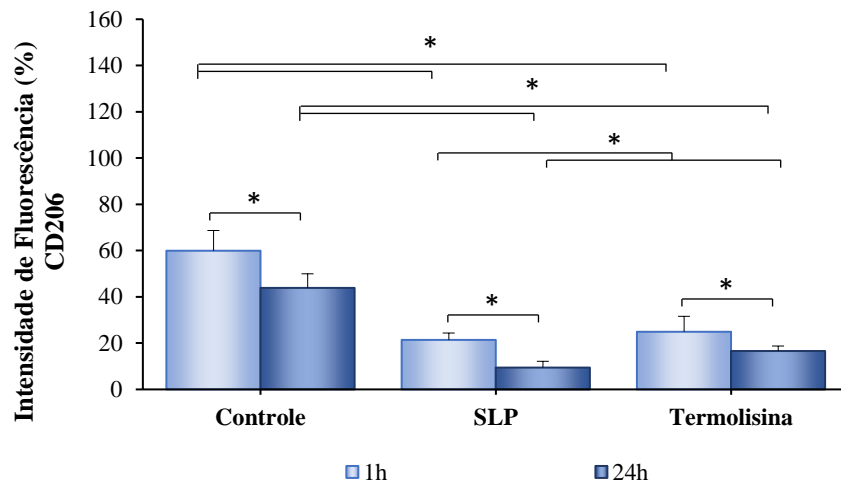


Figura 25. Efeito da ação enzimática de proteases de leptospiros patogênicas sobre CD206 de macrófagos. Macrófagos peritoneais murinos foram tratados com sobrenadante de cultura de leptospiros patogênicas (SLP) ou com termolisina recombinante por 1 h e 24 h 37 °C com 5% de CO₂. (ANOVA * $p < 0,05$)

5.9 Avaliação da atividade proteolítica das proteases presentes em SLP, SLNP e termolisina recombinante na opsonofagocitose

A opsonização é uma das funções biológicas mais importantes sendo os fragmentos C3b e iC3b responsáveis por se ligarem covalentemente na superfície de diferentes patógenos e facilitarem a internalização dos mesmos por células fagocitárias. (revisado em Bohlsón et al., 2014; Takizawa et al., 1996). Neste sentido, decidimos investigar se as proteases secretadas por leptospiros patogênicos poderiam degradar as opsoninas já depositadas na superfície da bactéria, prejudicando assim a sua internalização por macrófagos. A estirpe não patogênica *L. biflexa* sorovar Patoc foi opsonizada com C3b e iC3b presentes no SHN por 20 min a 37 °C, sendo posteriormente lavadas com PBS 1x. Em seguida, estas bactérias opsonizadas foram incubadas com SLP, SLNP e termolisina recombinante com doses crescentes indicadas na legenda da **Figura 26** por 1 h a 37 °C. Estas bactérias foram novamente lavadas com PBS 1x. A degradação de opsoninas presentes na superfície das leptospiros foi analisada por *Western blot*.

Quando as leptospiros opsonizadas com C3b e iC3b foram expostas a diferentes concentrações de SLP (5, 10, 20 µg/ml), notamos uma progressiva degradação, mais evidente na banda de aproximadamente 67 kDa (**Figura 27A**), derivada da cadeia α' de iC3b (**Figura 26B**). Da mesma forma, ao incubarmos as leptospiros opsonizadas com apenas 5 µg de termolisina recombinante, já foi possível observar a degradação do fragmento de 45 kDa da cadeia α' (**Figura 27B**). Este resultado sugere que talvez a fagocitose de leptospiros patogênicos seja prejudicada pela clivagem de opsoninas depositadas na membrana destas bactérias por meio da ação enzimática das proteases presentes nos seus sobrenadantes, diferentemente das proteases secretadas por leptospiros não patogênicos (SLNP), que não afetou a sua opsonização por C3b e iC3b presentes no soro (**Figura 27C**), induzindo a uma rápida fagocitose e morte destas bactérias por macrófagos. Uma vez ativado o Sistema Complemento, ocorre a clivagem da molécula C3 pelas C3-convertases independentemente da via de ativação. A anafilotoxina C3a (10 kDa) é liberada, gerando a cadeia α' (105 kDa) que, juntamente com a cadeia β (75 kDa), compõe o fragmento C3b do Complemento (Janssen et al., 2006).

Diante dos resultados obtidos, o próximo passo deste experimento foi verificar se a esta clivagem de opsoninas depositadas nas leptospiras estariam de fato afetando a sua fagocitose por macrófagos.

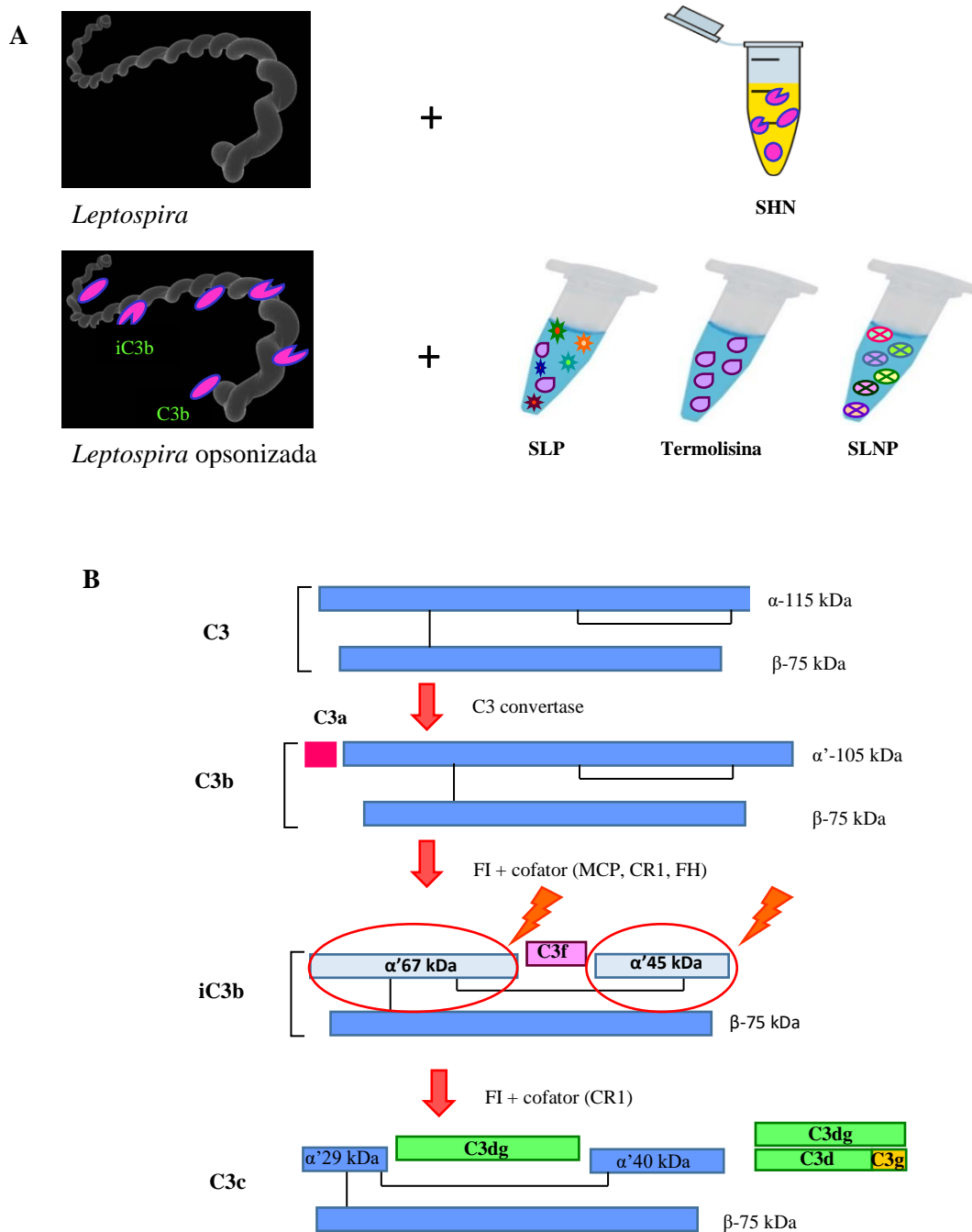


Figura 26: Tratamento de leptospiras não patogênicas opsonizadas. *L. biflexa* sorovar Patoc foi opsonizada por C3b e iC3b presentes no soro humano normal (SHN) por 20 min. Em seguida, estas bactérias já opsonizadas foram lavadas 5x com PBS 1x e incubadas com sobrenadante de cultura de leptospiras patogênicas (SLP), sobrenadante de cultura de leptospiras não patogênicas (SLNP) ou termolisina recombinante por 1h a 37 °C seguido por novas lavagens. A **Figura B** ilustra a representação esquemática de C3 e seus fragmentos como C3b e iC3b com as possíveis clivagens subsequentes da cadeia α' . Os produtos das clivagens foram analisados por *Western blot*, empregando-se anticorpos policlonais de anti-C3 humano. FI; Fator I; FH: Fator H.

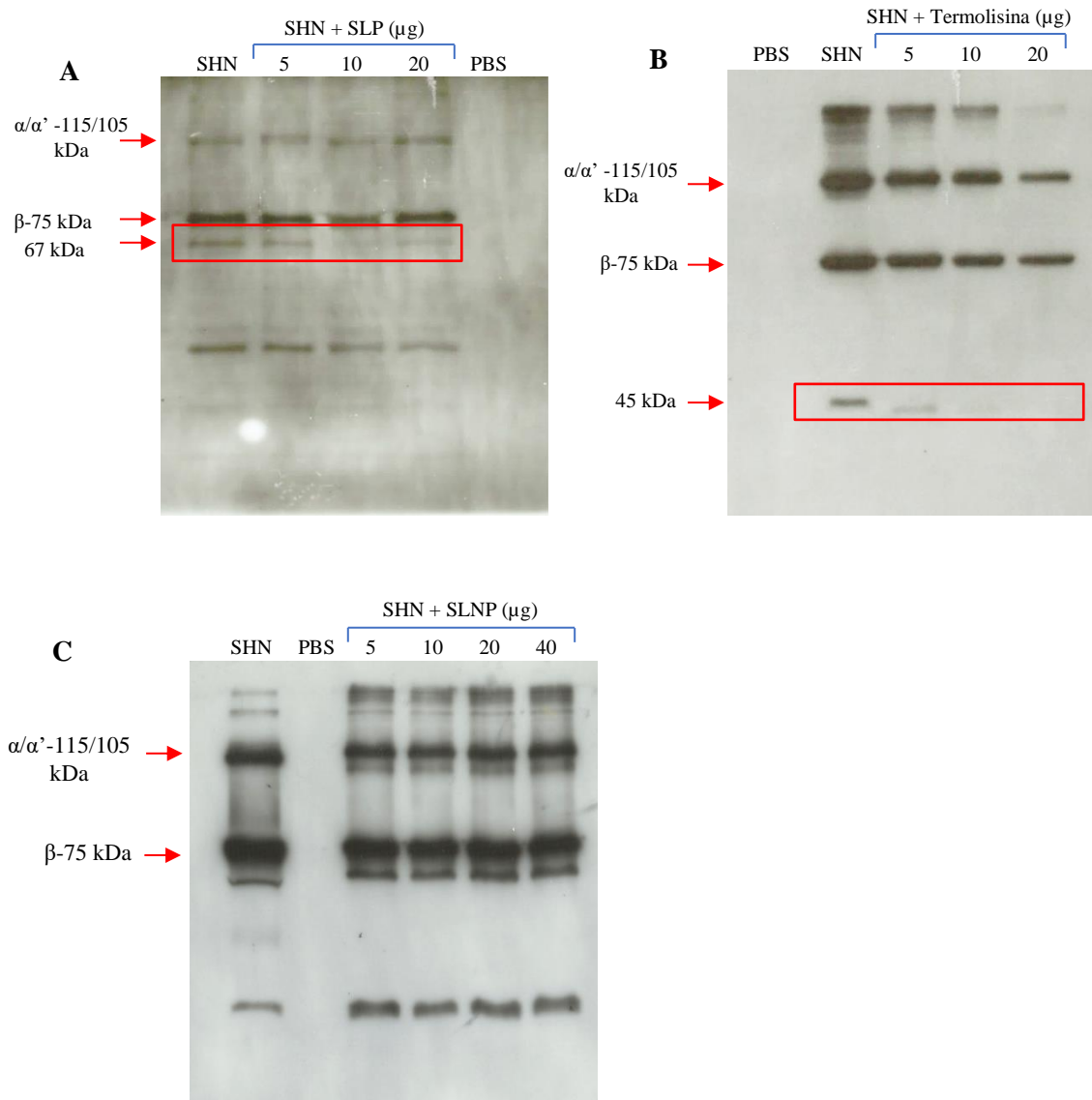


Figura 27: Clivagem de opsoninas depositadas na membrana de leptospiras não patogênicas. *L. biflexa* sorovar Patoc foi opsonizada por C3b e iC3b presentes no soro humano normal (SHN). Em seguida, estas bactérias foram lavadas e expostas ao sobrenadante de cultura de leptospiras patogênicas (SLP) (A), termolisina recombinante (B) e sobrenadante de cultura de leptospiras não patogênicas (SLNP) (C) por 1h a 37 °C. Como controle negativo, as bactérias foram incubadas apenas com PBS. Todos os ensaios foram realizados 5x. No retângulo vermelho estão evidenciados produtos de clivagem enzimática de C3.

5.10 Avaliação da atividade proteolítica da papalisina recombinante sobre a proteína C3 do Sistema Complemento de forma dose dependente

Durante a realização deste trabalho, o grupo da Dra. Angela Silva Barbosa (Instituto Butantan) começou a investigar o efeito da enzima papalisina sobre a clivagem de proteínas do Sistema Complemento. Decidimos então estender nossos estudos, avaliando se a papalisina poderia contribuir para o escape da fagocitose de leptospiros patogênicos. Visto que a papalisina foi identificada em análises exoproteômicas e que são secretadas por leptospiros patogênicos capazes de degradar proteínas da matriz e do plasma, novos objetivos surgiram a partir da descoberta desta protease, os quais serão investigados nos experimentos a seguir.

Inicialmente, confirmamos a atividade proteolítica da papalisina sobre C3. Conforme apresentado nas **Figura 28 A e B**, esta ação é relativamente potente, visto que com 300 ng observamos a clivagem de C3 em 1 h de incubação e com apenas 50 ng, a degradação da proteína C3 já pôde ser observada no período de 24 h.

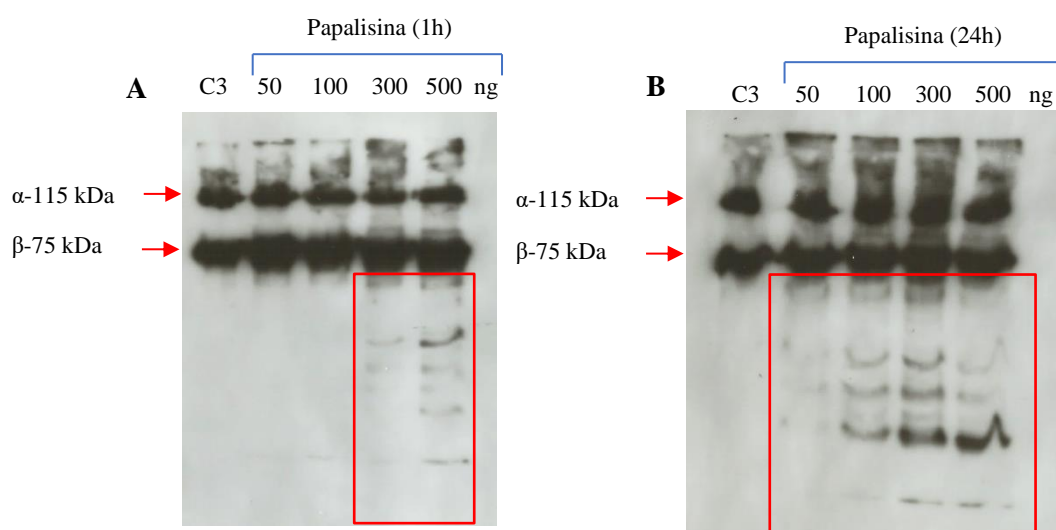


Figura 28: Análise da atividade proteolítica da papalisina recombinante sobre C3. A papalisina recombinante foi incubada com a proteína C3 por 1 h e 24 h a 37 °C. Como controle negativo, C3 foi incubado unicamente com PBS. Os produtos das clivagens foram analisados por *Western blot*, utilizando anticorpo policlonal anti-C3. Este ensaio foi repetido 5x. No retângulo vermelho, a presença dos fragmentos gerados após clivagem de C3 purificado humano na presença de papalisina estão destacados.

5.11 Avaliação da viabilidade dos macrófagos peritoneais na presença de papalisina recombinante

As células peritoneais aderentes foram incubadas com a papalisina recombinante por 1 h e 24 h em doses crescentes (50, 100, 300 e 500 ng). Em seguida, as células foram desprendidas da placa com PBS/EDTA (5mM) a 4 °C. O número total de células foi determinado por contagem em câmara de Neubauer, diluídas 20x em diluente *Turk* (Sigma-Aldrich).

Nós observamos uma diferença estatística significativa da viabilidade celular entre 1 h e 24 h, em todos os grupos. O número de células viáveis na presença de papalisina diminuiu de forma dose-dependente, quando comparado ao controle (**Figura 29**). A papalisina demonstrou potente atividade proteolítica sobre C3 do Sistema Complemento, uma vez que com apenas 50 ng já foi observado fragmentos de clivagem de C3 em 24 h.

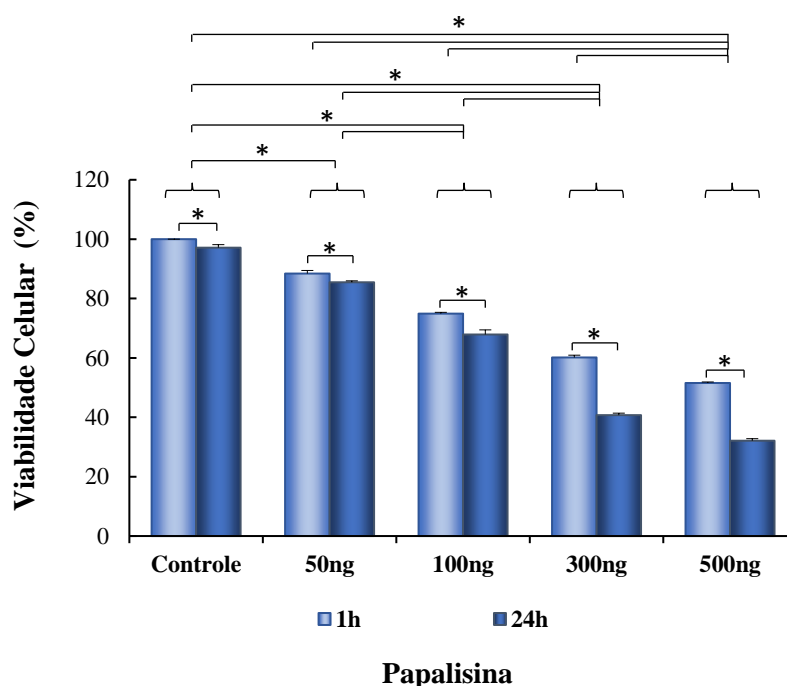


Figura 29: A papalisina recombinante afeta a viabilidade dos macrófagos murinos. Os macrófagos peritoneais foram incubados com a papalisina recombinante de forma dose-dependente (50, 100, 300 e 500 ng) por 1 h e 24 h. Foi observado diferença estatística entre 1 h e 24 h com 0, 50, 300 e 500 ng. A viabilidade dos macrófagos foi afetada estatisticamente nos dois períodos independentes com o aumento da concentração da papalisina, exceto com 50 ng em 24h comparado ao controle. Este ensaio foi repetido de três a cinco vezes. (ANOVA $p < 0,05$)

5.12 Degradação de opsoninas depositadas na membrana de leptospiros patogênicas por SLP, termolisina e papalisina recombinantes.

Em experimentos anteriores, nós descrevemos uma progressiva degradação dos fragmentos de aproximadamente 67 kDa e 45 kDa derivados da cadeia α' de iC3b, depositados na membrana da *L. biflexa* sorovar Patoc (não patogênica), quando essas bactérias opsonizadas foram expostas ao SLP ou termolisina recombinante de forma dose dependente (5, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$). Com apenas 5 $\mu\text{g/ml}$, esses dados foram confirmados (**Figura 27**).

As bactérias patogênicas foram previamente tratadas com 10% de SHN por 20 min para opsonização. Em seguida, estas leptospiros foram incubadas com 10 $\mu\text{g/ml}$ de SLP, termolisina e papalisina recombinantes por 1h e 24 h a 37 °C. Estas bactérias foram então lavadas com PBS 1x e a degradação de opsoninas presentes na superfície das leptospiros foi analisada por *Western blot*.

Com apenas 1 h de incubação, a degradação da cadeia α/α' de 115 /107 kDa e de 45 kDa na presença dessas proteases (**Figura 30A**) foi observada. Quando as bactérias foram incubadas com a termolisina recombinante, a degradação foi mais acentuada com a clivagem da cadeia β também de 75 kDa. Em 24 h de incubação, as proteases de leptospiros patogênicas foram capazes de degradar quase completamente as cadeias α/α' de 115 /105 kDa e β de 75 kDa e o fragmento de 45 kDa possivelmente parte da opsonina iC3b depositadas na membrana da bactéria, (**Figura 30B**) sugerindo que talvez a fagocitose de leptospiros patogênicas seja prejudicada pela clivagem de opsoninas depositadas na membrana destas bactérias por meio da ação enzimática das proteases presentes nos seus sobrenadantes.

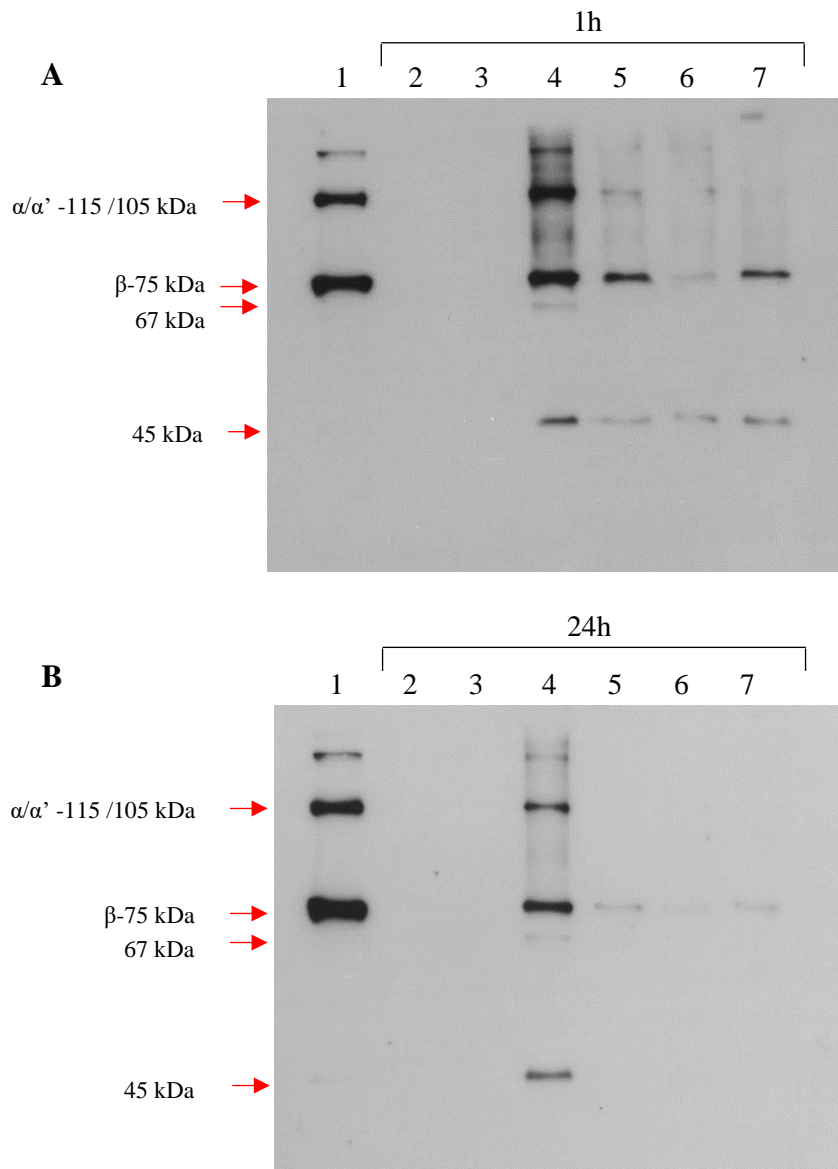


Figura 30: Clivagem de opsoninas depositadas na superfície de leptospiras. *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm (LPF) foi opsonizadas por C3b e iC3b presentes no soro humano normal (SHN). Em seguida, estas bactérias foram lavadas e tratadas com sobrenadante de cultura de leptospiras patogênicas (SLP), termolisina recombinante ou papalisina recombinante por 1 h (A) e 24 h (B) a 37 °C. SHN foi utilizado como controle positivo sem prévia incubação com LPF (1); PBS (2) e soro depletado de C3 (3) foram ambos utilizados como controles negativos; LPF opsonizada com SHN (4), LPF opsonizada e exposta ao SLP (5); LPF opsonizada e exposta à termolisina recombinante (6); e, à papalisina recombinante (7). Os experimentos foram repetidos três vezes cada e as imagens acima são representativas de um deles. As setas vermelhas estão evidenciando produtos de clivagem enzimática de C3.

Paralelamente, amostras de SHN foram previamente incubadas com 10 $\mu\text{g/ml}$ de SLP, termolisina ou papalisina recombinantes por 1 h e 24 h a 37 $^{\circ}\text{C}$. Em seguida, estas amostras de soros foram incubadas com culturas de *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm por 20 min a 37 $^{\circ}\text{C}$. Nós observamos que a cadeia α/α' de C3 (115/107 kDa) desapareceu completamente sendo degradada pelo SLP, termolisina e papalisina recombinantes e a termolisina recombinante também foi capaz de degradar a cadeia β de 75 kDa em apenas 1 h de incubação (**Figura 31**). Estes resultados demonstram que o SLP, termolisina e papalisina recombinantes são capazes de clivar as opsoninas C3b/iC3b derivadas da incubação com SHN, impedindo a sua deposição na membrana de leptospiros patogênicas e consequentemente prejudicando a opsonização e fagocitose dessas bactérias.

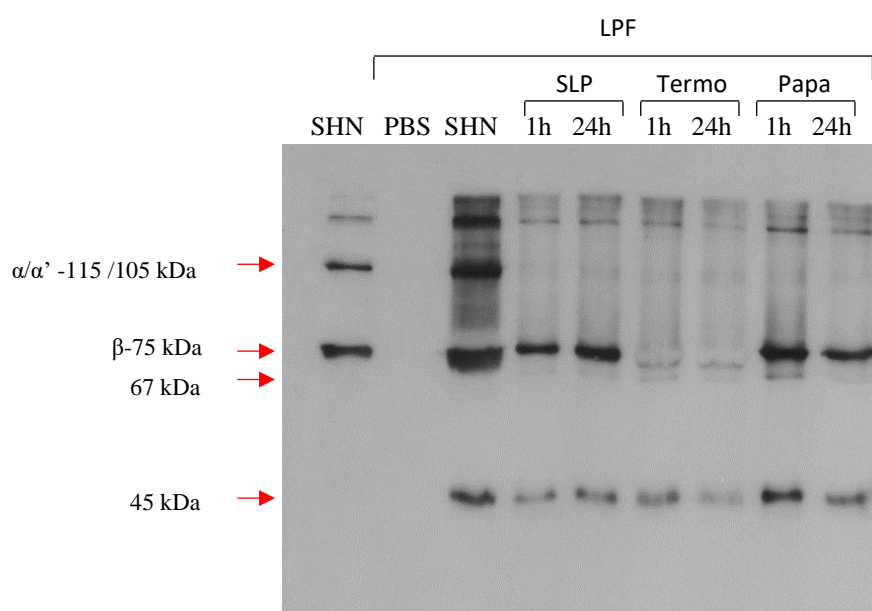


Figura 31: Degradação de opsoninas por proteases de leptospiros patogênicas. Amostras de soro humano normal (SHN) foram inicialmente tratadas com 10 $\mu\text{g/ml}$ de SLP, termolisina ou papalisina recombinante por 1 h e 24 h a 37 $^{\circ}\text{C}$. Em seguida, *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm (LPF) foram tratadas como indicado: SHN foi utilizado como controle positivo sem prévia incubação com bactérias (1); PBS como controle negativo (2); SHN como controle positivo (3); amostras de SHN tratadas previamente com SLP por 1 h (4) e 24 h (5) foram adicionadas à LPF; amostras de SHN tratadas com termolisina recombinante por 1 h (6) e 24 h (7) foram incubadas com LPF; amostras de SHN tratadas com papalisina recombinante por 1 h (8) e 24 h (9) foram incubadas com LPF. Os experimentos foram repetidos três vezes cada e as imagens acima são representativas de um deles. As setas vermelhas estão evidenciando produtos de clivagem enzimática de C3.

5.13 Análise da presença de moléculas na superfície de macrófagos THP-1 tratados com SLP, termolisina ou papalisina recombinantes.

Diante dos resultados obtidos até o momento, decidimos investigar se as proteases secretadas por leptospiros patogênicas poderiam de alguma forma prejudicar a fagocitose por macrófagos humanos por meio da degradação de seus receptores. Apesar do SHN como fonte de Complemento ser capaz de promover a fagocitose e morte da espécie não patogênica de leptospira em 1 h, leptospiros patogênicas possuem a habilidade de escapar do Sistema Complemento, sendo capazes de sobreviver quando em contato com soro. Conseqüentemente, a capacidade de escapar da fagocitose pode ser considerada um fator de virulência para leptospiros patogênicos, responsáveis por sua invasão *in vivo*, além de sua resistência à atividade do Complemento (Banfi et al., 1981, Toma et al., 2011).

THP-1 é uma linhagem celular monocítica de leucemia humana estabelecida por Tsuchiya e colaboradores em 1980 (Tsuchiya et al., 1980). Estas células são amplamente utilizadas para o estudo da resposta imunológica de macrófagos por sua semelhança às células mononucleares do sangue periférico (PBMC) apresentando algumas vantagens, por exemplo, a sua homogeneidade genética, o que minimiza o grau de variabilidade no fenótipo celular (Chanput et al., 2014).

O reconhecimento de patógenos pelos fagócitos depende de vários tipos de receptores, entre eles os Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs, *Pattern Recognition Receptors*) que, por sua vez, reconhecem os Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMP, *Pathogen-Associated Molecular Pattern*). Dentre os PRRs, destacam-se os *Toll-Like Receptors* (TLRs) que se encontram tanto na membrana plasmática como na parte endossomal. Após a interação PRR-PAMP, ocorre a liberação de sinais intracelulares que podem culminar com a indução de fatores de transcrição de genes importantes para o processo inflamatório (Takeda, Akira, 2004, Werts, 2010).

Culturas de THP-1 foram incubadas por 1 h e 24 h com 20 µg/ml de SLP, termolisina ou papalisina recombinantes. Em seguida, estas células foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos contra cada molécula de superfície: anti-CD282, anti-CD284, anti-CD206, anti-CD35, anti-CD64, anti-CD11a, anti-CD11b e anti-CD11c.

Ao incubarmos as células THP-1 com termolisina recombinante por 1 h e 6 h observamos um aumento da presença de TLR2 na superfície destas células comparado ao controle. Entretanto, houve uma diminuição deste receptor quando as células foram

tratadas com SLP por 24 h (**Figura 32A**). Da mesma forma, foi observado um decaimento do receptor TLR4 em THP-1 na presença de SLP e papalisina recombinante por 24 h, diferentemente do que foi observado em 24 h de incubação com a termolisina, no qual houve um aumento deste receptor na superfície destas células (**Figura 32B**).

O receptor de manose (CD206) que reconhece certos açúcares terminais presentes nos carboidratos da superfície microbiana apresentou redução na superfície das células THP-1 na presença de SLP por 24 h (**Figura 33A**), sugerindo que o SLP poderia prejudicar o reconhecimento de leptospiras por macrófagos humanos por meio da clivagem desses receptores postergando desta forma, a resposta imune contra essas bactérias.

As mais importantes opsoninas são IgG e fragmentos gerados com a ativação do Sistema Complemento (iC3b e C3b). O processo de fagocitose pode ser facilitado mediante a interação dessas opsoninas com receptores específicos como Fc γ R (para IgG) e CR1, CR3 e CR4, presentes nas superfícies de células fagocitárias como neutrófilos e macrófagos (Revisado por Bohlsón et al., 2014, Takizawa et al., 1996). O receptor Fc γ RI apresentou uma redução de sua presença ao tratar os macrófagos com SLP, termolisina ou papalisina recombinantes por 1 h. No entanto, nós observamos um aumento de Fc γ RI na superfície de THP-1 de forma tempo-dependente até 24 h de incubação, demonstrando que este receptor pode ter um papel importante na resposta imune contra leptospiras (**Figura 33B**).

O receptor CR1 apresentou um decaimento significativo na superfície de THP-1 em 1 h na presença de SLP e termolisina recombinante. E em 24 de incubação com SLP nós observamos uma diminuição mais intensa deste receptor em THP-1 (**Figura 34A**), diferentemente do que foi observado com CR3 e CR4 que mostraram aumento de expressão quando as células THP-1 foram tratadas com termolisina e papalisina recombinantes por 1 h respectivamente (**Figuras 34B e 35**).

Este resultado demonstra que apesar de termos observado um aumento na presença de CR3 e CR4 na superfície de macrófagos em 1 h de incubação com termolisina e papalisina recombinantes, esses receptores de fagocitose assim com CR1, diminuem a sua presença ou retornam ao seu nível basal no decorrer do tempo de incubação com essas proteases, sugerindo que o processo de fagocitose de leptospiras pode ser prejudicado, tanto pela degradação de opsoninas depositadas em sua membrana como pela clivagem

de receptores de reconhecimento e fagocitose presentes nas superfícies de macrófagos fundamentais para a eliminação da bactéria.

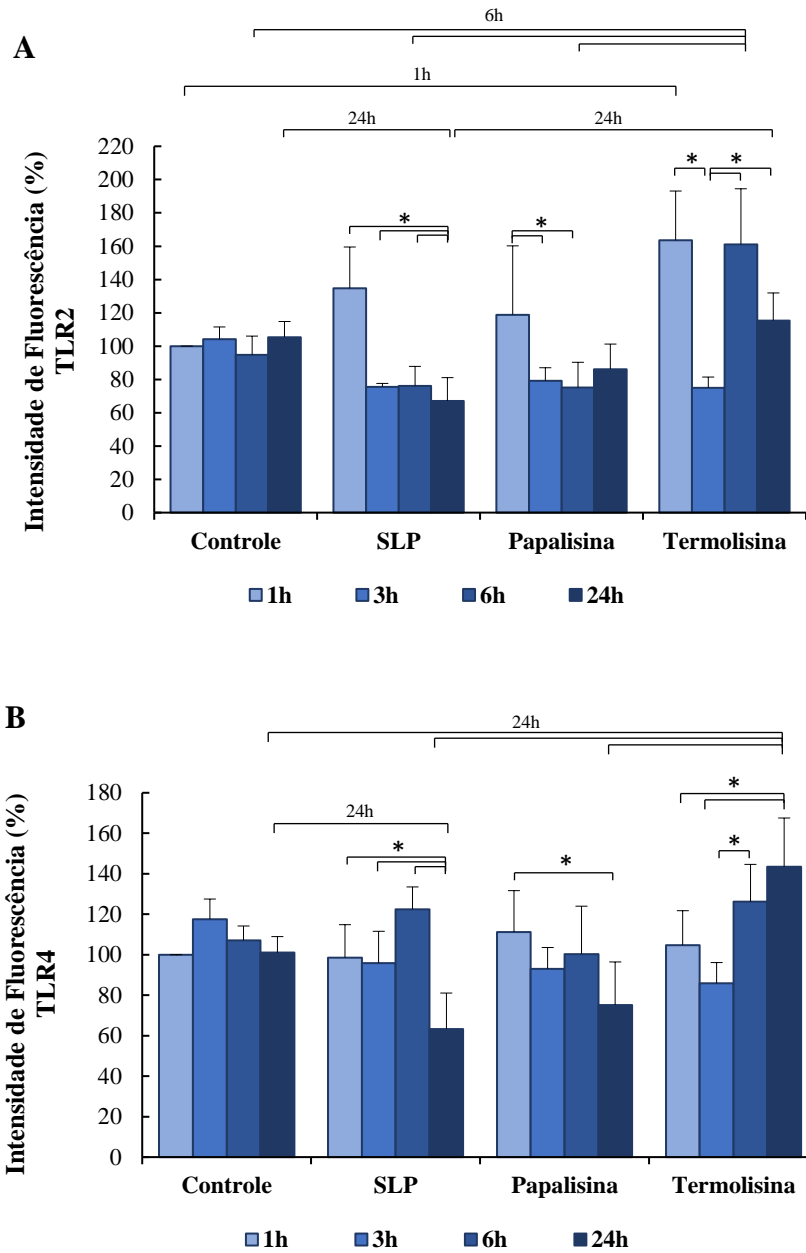


Figura 32: Presença de TLR2 e TLR4 em macrófagos tratados com SLP, termolisina ou papalisina recombinantes tempo-dependente. Os macrófagos THP-1 foram incubados com sobrenadante de leptospiros patogênicas (SLP), termolisina ou papalisina recombinantes por 1 h, 3 h, 6 h e 24 h. Anticorpos monoclonais específicos (A) anti-CD282 (TLR2) e (B) anti-CD284 (TLR4) foram empregados. Análises por citometria de fluxo foram realizados usando FACSCanto, com aquisição de 10.000 eventos por amostra. A análise dos dados foi realizada pelo teste ANOVA com o software FlowJo (Tree Star). * $p < 0,05$

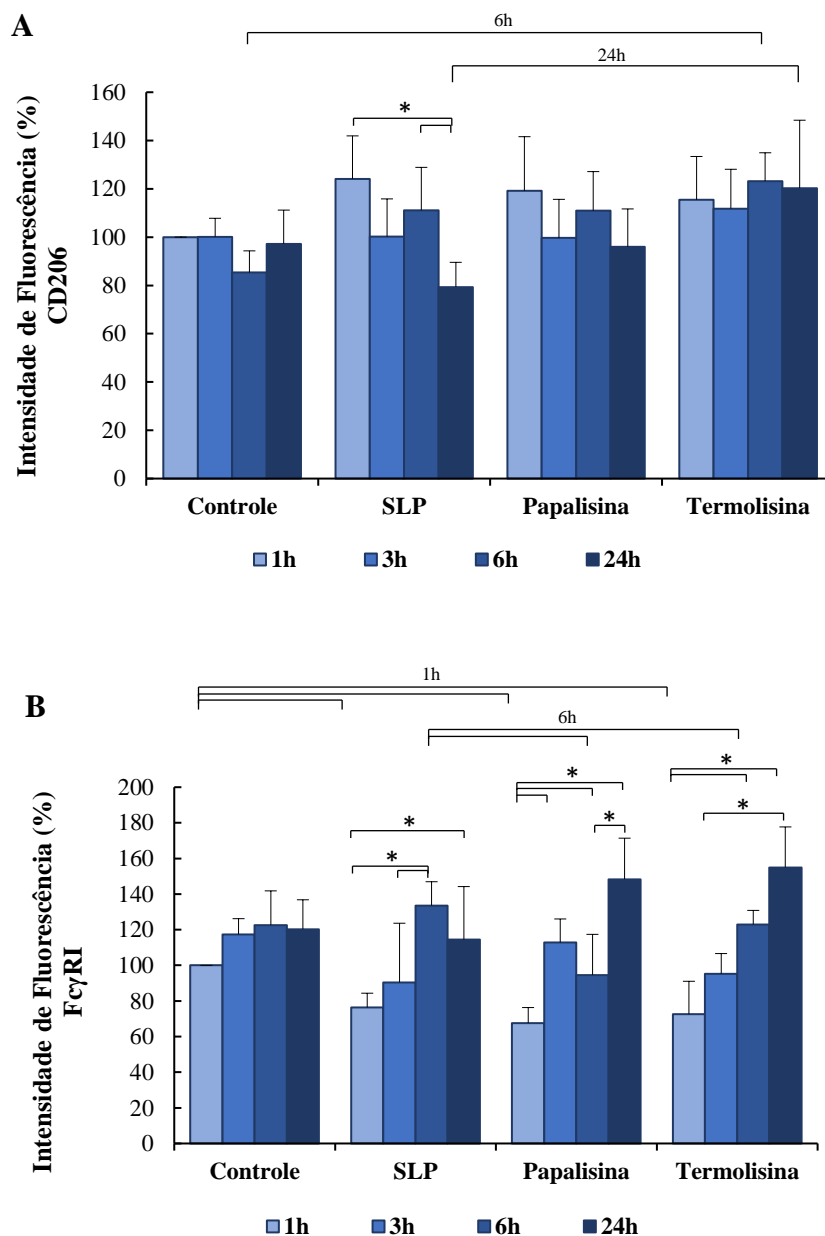


Figura 33: Presença de CD206 e Fc γ RI em macrófagos tratados com SLP, termolisina ou papalisina recombinantes tempo-dependente. Os macrófagos THP-1 foram incubados com sobrenadante de leptospiros patogênicas (SLP), termolisina ou papalisina recombinantes por 1 h, 3 h, 6 h e 24 h. Anticorpos monoclonais específicos (A) anti-CD206 (receptor de manose e (B) anti-CD64 (Fc γ RI) foram empregados. Análises por citometria de fluxo foram realizados usando FACSCanto, com aquisição de 10.000 eventos por amostra. A análise dos dados foi realizada pelo teste ANOVA com o *software* FlowJo (Tree Star). * $p < 0,05$

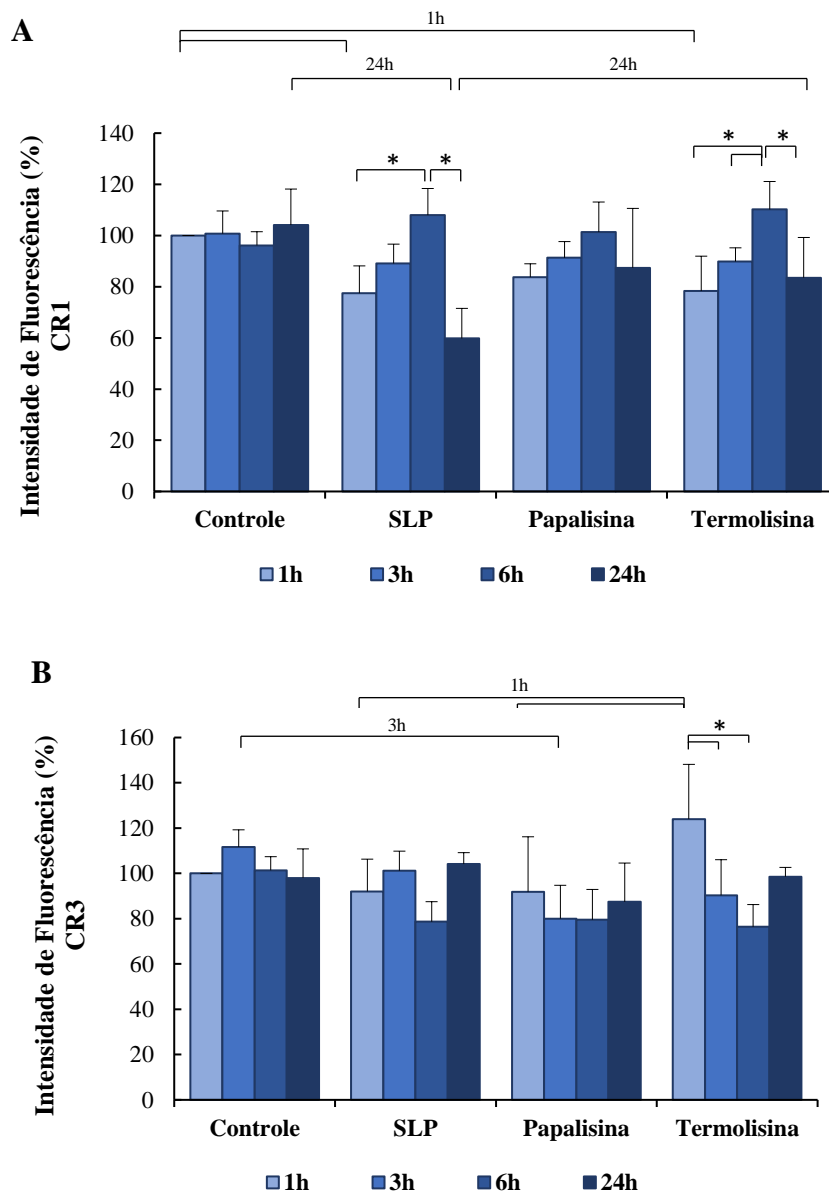


Figura 34: Presença de CR1 e CR3 em macrófagos tratados com SLP, termolisina ou papalisina recombinantes tempo-dependente. Os macrófagos THP-1 foram incubados com sobrenadante de cultura de leptospiras patogênicas (SLP), termolisina ou papalisina recombinantes por 1 h, 3 h, 6 h e 24 h. Anticorpos monoclonais específicos (A) anti-CD35 (CR1) e (B) anti-CD11b (CR3) foram empregados. Análises por citometria de fluxo foram realizados usando FACSCanto, com aquisição de 10.000 eventos por amostra. A análise dos dados foi realizada pelo teste ANOVA com o *software* FlowJo (Tree Star). * $p < 0,05$

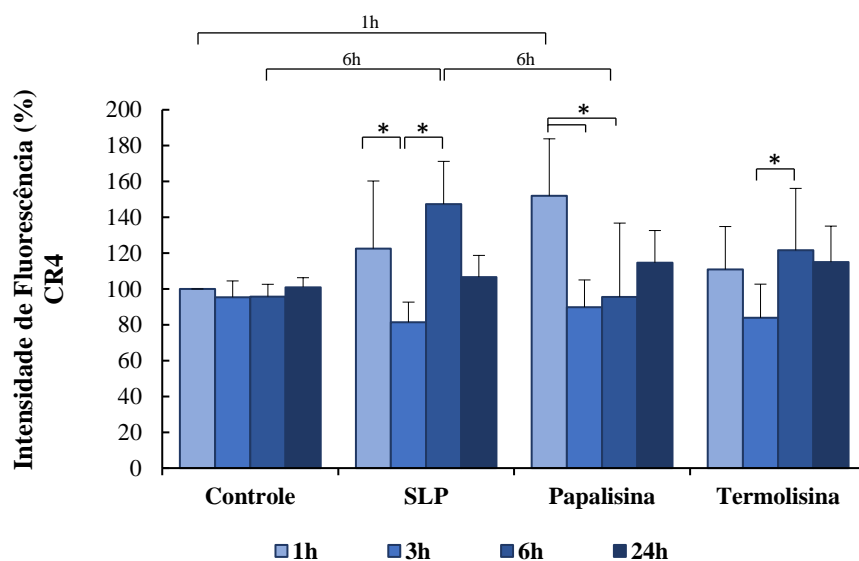


Figura 35: Presença de CR4 em macrófagos THP-1 tratados com SLP, termolisina ou papalisina recombinantes. Os macrófagos THP-1 foram incubados com sobrenadante de cultura de leptospiros patogênicas (SLP), termolisina ou papalisina recombinantes por 1 h, 3 h, 6 h e 24 h. Anticorpo monoclonal específico anti-CD11c (CR4) foi empregado. Análises por citometria de fluxo foram realizados usando FACSCanto, com aquisição de 10.000 eventos por amostra. A análise dos dados foi realizada pelo teste ANOVA com o *software* FlowJo (Tree Star). * $p < 0,05$

5.14 Fagocitose de leptospiros patogênicos por macrófagos THP-1 na presença de proteases

As células THP-1 foram tratadas com SLP, termolisina ou papalisina recombinantes por 1 h e 24 h a 37 °C. Da mesma forma, a estirpe patogênica *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm foi previamente tratada com 10% de soro humano normal por 20 minutos a 37 °C para a sua opsonização sendo posteriormente lavadas com PBS 1x. Em seguida, estas bactérias opsonizadas foram incubadas com SLP, termolisina e papalisina recombinantes por 1 h e 24 h a 37 °C. Após o término da incubação com as proteases, as bactérias foram adicionadas às placas de culturas de macrófagos por 1h 37 °C. As células então receberam 25 µg/ml de gentamicina (Sigma) para eliminar as bactérias não fagocitadas. A taxa de fagocitose foi avaliada por citometria de fluxo.

Ao incubarmos as células THP-1 com os SLP, termolisina e papalisina recombinantes por 1 h e 24 h, nós observamos uma redução da fagocitose comparadas com as células que não receberam o sobrenadante das leptospiros. Além disso, houve uma diferença estatística na fagocitose de leptospiros que foram opsonizadas com C3b e iC3b presentes no SHN por macrófagos incubados com as proteases em comparação com as bactérias que não foram opsonizadas. Ao incubarmos tanto as leptospiros que foram opsonizadas quanto os macrófagos THP-1 com o SLP, termolisina ou papalisina recombinantes por 1 h e 24 h, nós observamos que a fagocitose foi ainda mais afetada (**Figuras 36, 37**), demonstrando que as proteases secretadas por leptospiros patogênicos poderiam prejudicar a fagocitose das leptospiros pela clivagem de opsoninas no SHN mas também pela remoção ou inibição de receptores essenciais para o reconhecimento e fagocitose desta bactéria como vimos no experimento anterior.

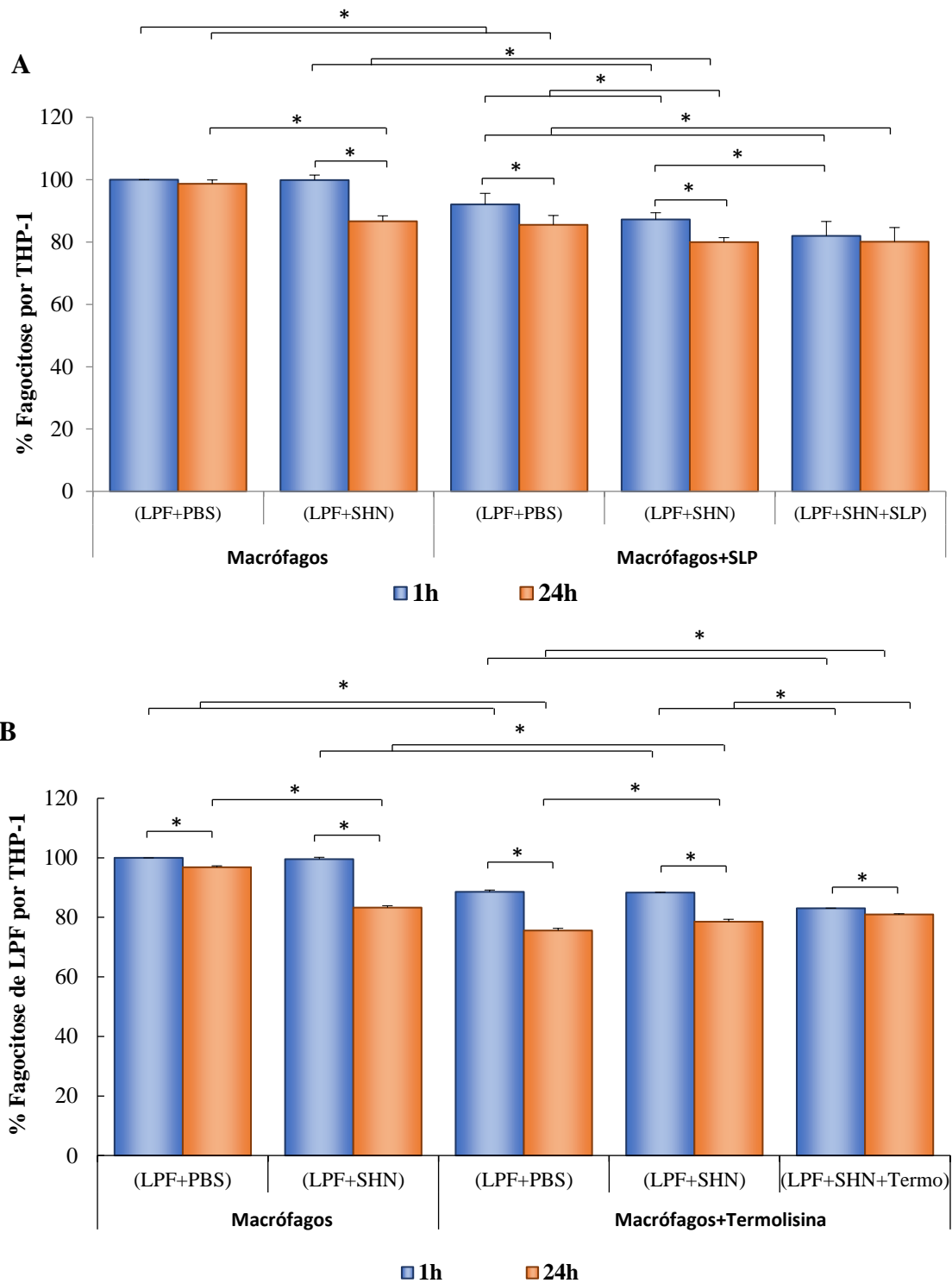


Figura 36: Fagocitose de leptospirose patogênica por macrófagos THP-1 na presença de SLP ou termolisina recombinante. As células THP-1 e as bactérias patogênicas *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm (LPF) foram incubadas com 20 µg/ml de (A) sobrenadante de cultura de leptospirose patogênica (SLP) ou (B) termolisina (termo) recombinante por 1 h e 24 h a 37 °C. Como controle, as células e as bactérias foram incubadas unicamente com PBS. As leptospirose ainda foram tratadas com 10 % de soro humano normal (SHN) por 20 min. Posteriormente, as bactérias tratadas foram adicionadas às culturas de macrófagos e incubadas por 1 h 37 °C, 5% de CO₂. Foram realizados três experimentos independentes. ANOVA, * $p < 0,05$

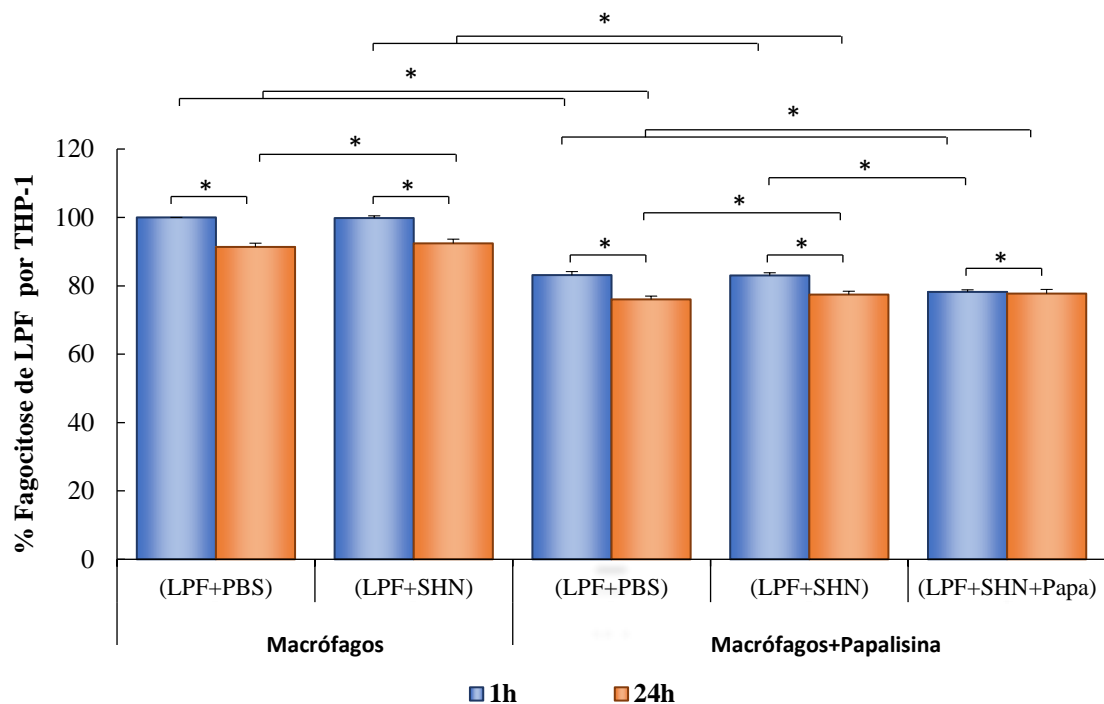


Figura 37: Fagocitose de leptospiros patogênicos por macrófagos THP-1 na presença de papalisina recombinante. As células THP-1 e as bactérias patogênicas *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm (LPF) foram incubadas com 20 µg/ml papalisina (papa) recombinante por 1 h e 24 h a 37 °C. Como controle, as células e as bactérias foram incubadas unicamente com PBS. As leptospiros ainda foram tratadas com 10 % de soro humano normal (SHN) por 20 min. Posteriormente, as bactérias tratadas foram adicionadas às culturas de macrófagos e incubadas por 1 h 37 °C, 5% de CO₂. Foram realizados três experimentos independentes. ANOVA, * $p < 0,05$.

6 Discussão

Ao longo dos últimos anos, o nosso grupo tem investigado a interação de leptospiros patogênicos com o Sistema Complemento tendo contribuído com diversas descobertas em relação ao mecanismo de evasão dessas bactérias frente a esse sistema. Esta linha de pesquisa surgiu a partir da observação de que leptospiros patogênicos são resistentes ao tratamento com soro humano normal, ao passo que as saprófitas são rapidamente eliminadas, mostrando que este mecanismo notadamente dependente do Sistema Complemento, uma vez que a inativação do soro a 56 °C por 30 min promove a sobrevivência das bactérias (Barbosa et al., 2009).

Leptospiros patogênicos expressam uma série de proteínas em sua superfície com a capacidade de interagir com moléculas da matriz extracelular e células do hospedeiro (Barbosa et al., 2006). A interação com reguladores negativos do Complemento como o FH e o C4BP com a proteína de membrana LcpA (*leptospiral complement regulator-acquiring protein A*) presente somente nas estirpes patogênicas pode contribuir para a regulação negativa das três vias do Complemento. Esta proteína ainda é capaz de interferir na formação da Via Terminal, através de sua interação com a Vitronectina e C9, impedindo a deposição do MAC na superfície da bactéria (Barbosa et al., 2010; da Silva et al., 2015).

Assim como as leptospiros, outros microrganismos patogênicos também secretam proteases capazes de clivar diferentes componentes do Complemento, apresentado desta forma, uma estratégia de evasão ao sistema imune do hospedeiro. As principais classes de proteases secretadas por bactérias são: cisteíno-, aspartil-, serino- e metalo proteases, que estão envolvidas na clivagem de uma ampla gama de substratos, incluindo moléculas das Vias Alternativa, Clássica e das Lectinas, além de componentes da Via Terminal (Potempa et al., 2012).

Em um estudo realizado anteriormente por nosso grupo, observou-se que várias espécies de leptospiros patogênicos foram capazes de secretar proteases que clivam proteínas do Complemento como a molécula central C3, assim como seus fragmentos, C3b e iC3b, além de proteínas da Via Alternativa (Fator B), Via Clássica e Via das Lectinas (C4b e C2) (Fraga et al., 2014), além dos componentes finais C6, C7, C8 e C9 do MAC (Amamura et al., 2017). Ensaio utilizando inibidores de protease revelaram uma inibição da atividade proteolítica pela 1,10-fenantrolina, indicando a participação de metaloproteases. Dentre estas, conseguimos comprovar a atividade proteolítica da

termolisina recombinante LIC13322, uma metaloprotease expressa exclusivamente por estirpes patogênicas de leptospira capaz de degradar a molécula C3 (Fraga et al., 2014).

A fagocitose de microrganismos envolve uma série de eventos coordenados, iniciando-se pelo reconhecimento pelas células fagocíticas, seguido da ativação das vias de sinalização que levam à resposta imune e eliminação do patógeno (Lim et al., 2017). Estudos anteriores demonstraram que leptospiros patogênicas *L. interrogans* serovar Lai strain Lai apresentam a capacidade de sobreviver e se replicar dentro de macrófagos humanos mas não em macrófagos murinos (Li et al., 2010, Toma et al., 2011). Neste contexto, ressaltamos ainda que os aspectos da interação das leptospiros com macrófagos ainda não são totalmente elucidados.

Com este objetivo, propusemo-nos a investigar a ação de proteases secretadas por leptospiros patogênicas sobre partículas de zimosan, pois se trata-se de um modelo relativamente bem conhecido. Para tanto, partículas de zimosan foram previamente tratadas com soro de (B6.C3^{+/+}) ou (B6.C3^{-/-}) antes de serem fagocitadas por macrófagos peritoneais murinos. Em um primeiro momento, nós observamos menor número de células que fagocitaram acima de 3 partículas de zimosan na presença de termolisina recombinante (**Figura 10**). Esta redução também pôde ser aparentemente percebida em células fagocíticas tratadas com SLP, porém não foi estatisticamente significativa (**Figura 9B**). A diferença estatística da fagocitose observada entre as duas proteases se deve pelo fato de haver além da termolisina, outros componentes no sobrenadante total de leptospiros patogênicas que podem estar atuando de alguma forma na internalização destas bactérias.

Para confirmar o potencial efeito das proteases sobre o número de macrófagos que fagocitaram, tratamos não somente as partículas de zimosan, mas também as células fagocitárias com as proteases de leptospiros. E curiosamente nós observamos um aumento da fagocitose do zimosan tratado com SLP e termolisina recombinante (**Figuras 11 e 12**). Este fato sugere que, de alguma maneira, as enzimas secretadas por leptospiros poderiam afetar a superfície do zimosan, amplificando o seu reconhecimento por receptores presentes na membrana externa de macrófagos murinos. Este aumento também foi observado quando zimosan foi incubado com soro. Uma das hipóteses seria que a degradação de C3 pelas proteases como já constatado anteriormente em Fraga et al. (2014), geraria mais opsoninas (C3b e iC3b) e conseqüentemente, maior taxa de fagocitose. Na infecção por leptospiros, o aumento da fagocitose pode colaborar para a

sua disseminação no organismo, uma vez que esta bactéria é capaz de induzir apoptose da linhagem celular de macrófagos murinos J774 (Merien et al., 1996; Jin et al., 2009).

Para aprimorar o nosso estudo em relação à fagocitose de zimosan por macrófagos murinos, decidimos expandir o tempo de incubação dos macrófagos com as proteases presentes nos sobrenadantes de leptospiras além da termolisina recombinante. As células foram previamente incubadas com SLP ou termolisina recombinante por 1 h, 3 h, 6 h e 24 h. E em seguida, as partículas de zimosan-FITC foram adicionadas à cultura de células e a fagocitose analisada por citometria de fluxo. Nós observamos uma diminuição de aproximadamente 20% da fagocitose de partículas de zimosan quando as células foram tratadas com termolisina recombinante, enquanto a incubação com SLP causou um leve aumento da fagocitose (**Figura 15**). Como dito anteriormente, essa diferença estatística da fagocitose de zimosan pelos macrófagos murinos tratados com termolisina recombinante talvez possa ser explicada por se tratar de uma proteína purificada apresentando ação proteolítica mais potente comparada às demais proteínas presentes no SLP. No entanto, novos experimentos serão necessários para melhor esclarecer este ponto.

Em 1983, Cinco e colaboradores demonstraram que leptospiras saprófitas (não patogênicas) são ingeridas e mortas por neutrófilos, mesmo sem a participação de opsoninas. Já as leptospiras patogênicas foram internalizadas por estas células, apenas se previamente opsonizadas por IgG específica. Em 2011, Toma e colaboradores realizaram experimentos na tentativa de distinguir os mecanismos intracelulares após a fagocitose de leptospiras patogênicas por macrófagos murinos. Com os resultados obtidos por esses autores, foi demonstrado que as leptospiras patogênicas foram capazes de limitar a fusão dos fagossomos com os lisossomos permitindo, portanto, a sobrevivência das mesmas no citosol.

Os receptores de membrana dos macrófagos podem desempenhar uma série de funções incluindo diferenciação celular, adesão, fagocitose, ativação e citotoxicidade. A fagocitose é facilitada quando partículas como os microrganismos são cobertas por certas proteínas conhecidas como opsoninas, para as quais os fagócitos apresentam receptores em sua membrana plasmática. As mais importantes opsoninas são IgG e fragmentos gerados com a ativação do Sistema Complemento especialmente (iC3b e C3b) (Mosser and Zhang, 2011).

As integrinas são uma família de moléculas de adesão que medeiam

principalmente adesão e migração celular e são expressas em todos os leucócitos. Algumas delas estão também envolvidas com a fagocitose. Esta família é composta por distintas cadeias α que compartilham uma cadeia β comum: LFA-1 (CD11a/CD18), CR3 (CD11b/CD18), e CR4 (CD11c/CD18) (Issekutz e Issekutzs, 1992, Tan et.al., 2000).

Além disso, a fagocitose ocorre mediante a interação dessas opsoninas com receptores específicos como Fc γ R (para IgG) e CR1, CR3 e CR4. O CR1 é encontrado em eritrócitos, monócitos circulantes, neutrófilos e principalmente em linfócitos B. Este receptor liga-se a C4b, C3b, iC3b, C1q e MBL, contribuindo para a atividade fagocitária. Os CR3 e CR4 medeiam funções similares devido à sua estrutura homóloga e agem como receptor para o fragmento iC3b e C3b, presentes nas superfícies de células fagocitárias como neutrófilos e macrófagos (revisado por Bohlson et al., 2014, Takizawa et al., 1996). A integrina CD11b/CD18 é um heterodímero composto pelas subunidades $\alpha_M\beta_2$, conhecida também como CR3 que, além de atuar no reconhecimento de padrões, também desempenha importantes funções como adesão e migração de leucócitos, e na captação de partículas revestidas por moléculas do Complemento mediando a fagocitose. CR3 é expresso na superfície de muitos leucócitos incluindo monócitos, células NK, granulócitos e macrófagos. O bloqueio da subunidade CD11b de CR3, reduz drasticamente a fagocitose de zimosan (Ehlers, 2000, Fujimoto et al., 2016, Lukácsi et al., 2017).

O aumento da expressão da molécula de adesão LFA-1 pode ser importante para leucócitos polimorfonucleares na infecção por leptospirose. A reação inflamatória aguda observada na presença de microrganismos ou lesão tecidual é caracterizada pela adesão e migração destas células para o sítio inflamatório (Issekutz, Issekutz; 1992).

Sendo assim, com a finalidade de investigar se SLP e a termolisina recombinante seriam capazes de alterar a atividade fagocitária pelos macrófagos murinos, por meio da degradação ou remoção dos receptores CR1, CR3 e CR4, as células foram tratadas com as proteases das leptospirosas patogênicas por 1 h, 37 °C em 5% de CO₂. No entanto, nós não observamos alterações significativas na presença desses receptores nestas condições.

Para determinar a sobrevivência de leptospirosas em um tempo prolongado, Toma e colaboradores infectaram macrófagos derivados da medula óssea de camundongos com *L. biflexa* e *L. interrogans* por diferentes tempos (2 h, 24 h ou 48 h). Eles observaram que poucas unidades de *L. biflexa* em uma concentração de 10³ de macrófagos ou em seu

sobrenadante foram detectados em 24 h após a infecção. Entretanto, um grande número de células associadas a várias *L. interrogans* foram observadas em até 48 h após a infecção. Todas as bactérias patogênicas estavam intactas ao passo que as não patogênicas se encontraram degradadas (Toma et al., 2011). Considerando o tempo de exposição proposto pelo grupo, decidimos prolongar o tempo de incubação dos macrófagos com as proteases para analisar se receptores de opsoninas e a molécula LFA-1 poderiam ser degradadas de forma tempo-dependente.

De fato, alguns receptores tiveram a sua expressão modulada. Os receptores Fc γ RI e CR1 mantiveram a sua intensidade de fluorescência mesmo quando as células foram incubadas com as proteases por até 24 h (**Figura 17**). Entretanto, as moléculas LFA-1, CR3 e CR4 apresentaram uma diminuição de sua expressão ao longo das 24 h de incubação com o SLP (**Figuras 18 e 19**). Diante desses resultados, podemos inferir que a secreção de proteases por leptospiros patogênicos poderia contribuir para a sua evasão dos macrófagos após 24 h de infecção, uma vez que o decaimento desses receptores acarretaria em menor opsonofagocitose, diferentemente das estirpes não patogênicas, incapazes de secretar proteases com atividade proteolítica significativa sobre estes substratos, sendo rapidamente eliminadas pelos macrófagos (Cinco et al., 1981; Toma et al., 2011).

O sistema imune inato reconhece componentes estruturais conservados em microrganismos denominados Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) como os TLR. para induzir respostas imunes, como a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, e IL-18. A ativação dos TLRs desencadeia uma cascata de sinalização que resulta na liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12, e IL-18 e consequentemente o recrutamento de leucócitos para o local de infecção (Tsujimoto et al., 2006, Kumagai et al., 2008, Imhof et al., 2017).

O receptor de manose (CD206) é uma glicoproteína transmembrana pertencente à família da lectina do tipo-C, sendo expresso principalmente em macrófagos e células dendríticas. Este receptor reconhece uma série de carboidratos presentes nas superfícies de microrganismos tais como *Candida albicans*, *Pneumocystis carinii* e *Leishmania donovani*. Após o reconhecimento, os patógenos são internalizados e degradados pela via fagocítica (Ezekowitz et al., 1991, Martínez-Pomares et al., 1998, Chakraborty et al., 2001, Azad et al., 2014).

A mesma análise feita com receptores de macrófagos murinos, também foi realizada com receptores presentes na superfície de THP-1 incluindo a papalisina recombinante. Houve uma diminuição dos receptores de reconhecimento TLR2, TLR4 e de manose quando as células foram incubadas com o SLP e papalisina recombinante por 24 h (**Figuras 32 e 33A**), diferentemente do observado com a termolisina recombinante que aumentou a presença desses receptores em THP-1 além do receptor Fc γ RI (**Figura 33B**). Além disso, o tratamento das células com as proteases causou um aumento dos receptores CR1, CR3 e CR4 nas primeiras horas de incubação, porém em 24 h houve um nítido decaimento da presença desses receptores na superfície dos macrófagos (**Figuras 34 e 35**).

Decidimos investigar por microscopia confocal a ação das proteases de leptospiras patogênicas sobre os receptores TLR2, CR3 e CD206. Nós incubamos as células com SLP ou termolisina recombinante por 1 h e 24 h 37 °C e observamos que a intensidade de fluorescência de TLR2, CR3 e CD206 foi reduzida nos macrófagos na presença de SLP (**Figuras 20-25**). Contudo, após o período de 24 h de exposição com as proteases de leptospiras patogênicas, os macrófagos exibiram uma drástica perda de fluorescência dessas moléculas, corroborando com os resultados previamente comentados. Deste modo, podemos inferir que a secreção de proteases secretadas pelas leptospiras patogênicas pode ser importante como mecanismo de evasão não somente ao Sistema Complemento, mas também aos macrófagos, impedindo estas células de reconhecê-las e montar uma resposta imune eficiente.

A degradação de opsoninas garante que a fagocitose seja prejudicada como já foi observado em *Enterococcus faecalis*, cuja clivagem de C3b e iC3b pela metalo protease GelE resulta em uma redução substancial da fagocitose por leucócitos polimorfonucleares humanos (Park et al., 2007, 2008). Conforme demonstrado anteriormente pelo nosso grupo pela Dra Tatiana Rodrigues Fraga (Fraga et al., 2014) foi observado que a proteína C3 do Complemento é clivada pelas proteases de leptospira nas cadeias α e β , gerando diversos fragmentos de degradação. Além disso, utilizando os componentes purificados do complemento, observamos que os fragmentos C3b e iC3b também são clivados pelas proteases de leptospira. Estes dois fragmentos são importantes opsoninas, possibilitando a fagocitose pela ligação aos receptores CR1 e CR3, respectivamente (Fraga et al., 2014).

De acordo com a literatura, *L interrogans* apresenta um atípico LPS diferindo das bactérias Gram-negativas que tem a capacidade de ativar o TLR4 resultando na produção

de citocinas pró-inflamatórias. O LPS de leptospiros ativam macrófagos humanos apenas por TLR2. Em camundongos, considerados animais resistentes à leptospirose, o LPS é capaz de ativar os macrófagos tanto por TLR2 quanto por TLR4. Animais com duplo *knockout* infectados com *L. interrogans* rapidamente morrem por insuficiência renal e hepática (Nahori et al., 2005; Chassin et al., 2009). Acredita-se que esta diferença de reconhecimento entre macrófagos humanos e murinos possa estar relacionada com a susceptibilidade ou resistência à infecção.

A estirpe patogênica *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm (LPF) foi incubada com SHN para opsonização das bactérias por C3b/iC3b geradas pela ativação do Sistema Complemento. Em seguida, as leptospiros foram incubadas com SLP, termolisina ou papalisina recombinantes por 1 h e 24 h a 37 °C. Nós observamos que as proteases secretadas por leptospiros patogênicas foram capazes de degradar opsoninas depositadas na membrana da bactéria com 1 h de incubação e com maior intensidade no período de 24 h (**Figura 30**) Além disso, o SHN foi incubado com as proteases e em seguida adicionado às culturas de leptospiros patogênicas. Nós observamos a degradação total da cadeia α/α' de C3 (115/105 kDa) e a termolisina recombinante também foi capaz de degradar a cadeia β de 75 kDa em apenas 1 h de incubação (**Figura 31**). Esse resultado nos indica que as estirpes patogênicas de *Leptospira* poderiam evadir da fagocitose por macrófagos possivelmente pela inativação das opsoninas presentes no soro através da degradação dos fragmentos que as compõem.

A fagocitose de microrganismos envolve uma série de eventos coordenados, iniciando-se pelo reconhecimento pelas células fagocíticas, seguido da ativação das vias de sinalização que levam à resposta imune e eliminação do patógeno (Lim et al., 2017). Estudos anteriores envolvendo a fagocitose de leptospiros, demonstraram que certas estirpes de leptospiros patogênicas apresentam a capacidade de sobreviver e se replicar dentro de macrófagos humanos, mas não em macrófagos murinos (Li et al., 2010, Toma et al., 2011). Neste contexto, ressaltamos ainda que os aspectos da interação das leptospiros com macrófagos ainda não são totalmente elucidados.

Macrófagos e leptospiros foram expostos ao SLP, termolisina e papalisina recombinante e observamos que a fagocitose de leptospiros foi notadamente reduzida ao tratar as células THP-1 com as proteases independentemente se a bactéria foi opsonizadas ou não. Além disso, o tratamento tanto de THP-1 quanto de leptospiros com SLP, termolisina ou papalisina recombinantes reduziu ainda mais a porcentagem de fagocitose

comparadas com as amostras que não receberam as proteases (**Figuras 36 e 37**). Deste modo, podemos inferir que leptospiros patogênicas seriam capazes de evadir da fagocitose por macrófagos, possivelmente pela degradação das opsoninas depositadas em sua superfície ou pela remoção ou inibição de receptores de fagocitose presentes nas superfícies de macrófagos, representando um importante mecanismo de evasão.

A identificação de alvos biológicos para as proteases de leptospira é de grande importância para o melhor entendimento da patogênese da doença, bem como também poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e/ou preventivas na infecção por estes patógenos. Para dar continuidade no estudo relacionado às proteases secretadas por leptospiros patogênicas, nosso grupo pretende estudar a papalisina como potente candidato vacinal, no qual se espera obter resultados promissores e eficazes para combater a leptospirose.

7. Conclusões

- O tratamento de macrófagos peritoneais com termolisina recombinante por 1 h, 3 h, 6 h e 24 h causou redução da fagocitose de partículas de zimosan em comparação com as células que não receberam o tratamento;
- A incubação de macrófagos peritoneais com o SLP diminuiu a presença de LFA-1, CR3 e CR4 na superfície das células;
- Houve uma redução da intensidade de fluorescência dos receptores TLR2, CD11b e CD206 presentes na superfície de macrófagos peritoneais ao serem incubadas com SLP e termolisina recombinante por 1 h e 24 h;
- Foi observado degradação da banda de 67 kDa da cadeia α de C3 depositadas na membrana da leptospira não patogênica *L. biflexa* sorovar Patoc em contato com SLP e da banda de 45 kDa da cadeia α quando estas bactérias opsonizadas foram expostas a termolisina recombinante;
- Houve degradação da cadeia α de C3 depositadas na superfície da leptospira patogênica *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm na presença de SLP, termolisina e papalisina recombinante e a cadeia β também foi degradada por termolisina em apenas 1 h de incubação. Em 24 h de incubação com as proteases, as duas cadeias de C3 foram quase totalmente degradadas. Além disso, as proteases

também clivam os fragmentos de C3, impedindo as opsoninas de depositarem sobre a superfície das leptospiros;

- Foi observado redução da presença de TLR2, TLR4, CD206 e CR1 em macrófagos THP-1 tratados com SLP por 24 h;
- A porcentagem de fagocitose de leptospiros patogênicas por macrófagos THP-1 foi diminuída quando estas células foram incubadas com o SLP, termolisina e papalisina recombinante. E ao tratarmos tanto as células quanto as bactérias opsonizadas ou não com as proteases, observamos uma redução mais expressiva da fagocitose de leptospiros.

Diante de todos esses resultados obtidos durante o período do Doutorado, podemos inferir que a secreção de proteases por leptospiros patogênicas pode ser considerada um mecanismo de evasão tanto ao Sistema Complemento pela clivagem de suas moléculas presentes no soro normal como também à fagocitose por macrófagos uma vez que essas proteases mostraram ser capazes de degradar opsoninas depositadas nas membranas das leptospiros dificultando a sua internalização pelas células. Além disso, vimos também que a ação proteolítica do SLP, termolisina e papalisina recombinante foi capaz de reduzir a presença de receptores de reconhecimento e fagocitose presentes na superfície dos macrófagos, seja pela degradação ou inibição desses receptores, prejudicando a resposta imune contra as leptospiros favorecendo desta forma, a sua disseminação no organismo.

8. Referências

- Adler B, Moctezuma AP. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*. 2009; 140(3):287-96.
- Akashi S, Saitoh S, Wakabayashi Y, Kikuchi T, Takamura N, Nagai Y, Kusumoto Y, Fukase K, Kusumoto S, Adachi Y, Kosugi A, Miyake K. Lipopolysaccharide interaction with cell surface Toll-like receptor 4-MD-2: higher affinity than that with MD-2 or CD14. *J Exp Med*, 2003; 198(7):1035-42. doi: 10.1084/jem.20031076. Epub 2003 Sep 29.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 2006;124(4):783-801. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015.
- Aldo PB, Craveiro V, Guller S, Mor G. Effect of culture conditions on the phenotype of THP-1 monocyte cell line. *Am J Reprod Immunol*. 2013 Jul;70(1):80-6. doi: 10.1111/aji.12129.
- Amamura TA, Fraga TR, Vasconcellos SA, Barbosa AS, Isaac L. Pathogenic *Leptospira* Secreted Proteases Target the Membrane Attack Complex: A Potential Role for Thermolysin in Complement Inhibition. *Front Microbiol*. 2017 May 30;8:958. doi: 10.3389/fmicb.2017.00958
- Anderson CL, Shen L, Eicher DM, Wewers MD, Gill JK. Phagocytosis mediated by three distinct Fc gamma receptor classes on human leukocytes. *J Exp Med*. 1990 Apr 1;171(4):1333-45. doi: 10.1084/jem.171.4.1333.
- Ballard SA, Williamson M, Adler B, Vinh T, Faine S. Interactions of virulent and avirulent leptospires with primary cultures of renal epithelial cells. *J. Med. Microbiol.*- Vol. 21, 1986. 59-67.
- Barbosa AS, Abreu PA, Neves FO, Atzingen MV, Watanabe MM, Vieira ML, Morais ZM, Vasconcellos SA, Nascimento AL. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. *Infect Immun*, 2006; 74(11):6356-64. doi: 10.1128/IAI.00460-06.
- Barbosa AS, Abreu PA, Vasconcellos SA, Morais ZM, Gonçalves AP, Silva AS, Dahi MR, Isaac L. Immune evasion of leptospira species by acquisition of human complement regulator C4BP. *Infect Immun*. 2009;77(3):1137-43.
- Barbosa AS, Monaris D, Silva LB, Morais ZM, Vasconcellos SA, Cianciarullo AM, Isaac L, Abreu PA. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. *Infect Immun*. 2010;78(7):3207-16.
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*. 2003 Dec;3(12):757-71.
- Bohlon SS, O'Conner SD, Hulsebus HJ, Ho MM, Fraser DA. Complement, c1q, and c1q-related molecules regulate macrophage polarization. *Front Immunol*. 2014;5:402.
- Carroll MC, Isenman DE. Regulation of humoral immunity by complement. *Immunity*. 2012;37(2):199-207

- Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, Silva LB, Monaris D, Abreu PA, Strobel S, Józsi M, Isaac L, Barbosa AS. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. *J Infect Dis.* 2012;205(6):995-1004.
- Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, Pagotto AH, Serrano SM, Abreu PA, 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. *Immunobiology.* 2016;221(5):679-89. doi: 10.1016/j.imbio.2016.01.001.
- Cerqueira GM, Picardeau M. A century of *Leptospira* strain typing. *Infection, Genetics and Evolution.* 2009;9(5):760-8. doi: 10.1016/j.meegid.2009.06.009
- Cinco M, Banfi E, Soranzo MR. Studies on the interaction between macrophages and leptospire. *J Gen Microbiol.* 1981 Jun;124(2):409-13.
- Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, Stein C, Abela-Ridder B, Ko AI. Global morbidity and mortality of leptospirosis: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(9):e0003898.
- Daëron M. Structural bases of Fc gamma R functions. *Int Rev Immunol.* 1997;16(1-2):1-27. doi: 10.3109/08830189709045701.
- Daffern PJ, Pfeifer PH, Ember JA, Hugli TE. C3a is a chemotaxin for human eosinophils but not for neutrophils. I. C3a stimulation of neutrophils is secondary to eosinophil activation. *J Exp Med.* 1995; 181(6): 2119–27.
- Del Tordello E, Vacca I, Ram S, Rappuoli R, Serruto D. *Neisseria meningitidis* NalP cleaves human complement C3, facilitating degradation of C3b and survival in human serum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(1):427-32.
- Dempsey PW, Allison ME, Akkaraju S, Goodnow CC, Fearon DT. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science.* 1996;271(5247):348-50.
- Dias Da Silva W, Lepow IH. Complement as a mediator of inflammation. II. Biological properties of anaphylatoxin prepared with purified components of human complement. *J Exp Med.* 1967;125(5):921-46.
- Dunne DW, Resnick D, Greenberg J, Krieger M, Joiner KA. The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(5):1863-7. doi: 10.1073/pnas.91.5.1863.
- Ehlers MR. CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. *Microbes Infect.* 2000 Mar;2(3):289-94.
- Ekdahl KN, Persson B, Mohlin C, Sandholm K, Skattum L, Nilsson B. Interpretation of Serological Complement Biomarkers in Disease. *Front Immunol.* 2018 Oct 24;9:2237. doi: 10.3389/fimmu.2018.02237.

- Erdei A, Sándor N, Mácsik-Valent B, Lukácsi S, Kremlitzka M, Bajtay Z. The versatile functions of complement C3-derived ligands. *Immunol Ver.* 2016;274(1):127-140. doi: 10.1111/imr.12498.
- Erdei A, F, Barbosa AS, ust G, Gergely G. The role of C3 in the immune response. *Immunol Today.* 1991. PMID: 1755944 Review.
- Evangelista KV, Coburn J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol.* 2010;5(9):1413-1425.
- Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis. 2.ed. Melbourne: MedSci 1999; p. 353.
- Fang Y, Xu C, Fu YX, Holers VM, Molina H. Expression of complement receptors 1 and 2 on follicular dendritic cells is necessary for the generation of a strong antigen-specific IgG response. *J Immunol.* 1998;160(11):5273-9.
- Fearon DT. Human complement receptors for C3b (CR1) and C3d (CR2). *J Invest Dermatol.* 1985;85(1 Suppl):53s-57s. doi: 10.1111/1523-1747.ep12275473.
- Fitzgerald KA, Kagan JC. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell.* 2020;180(6):1044-1066. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.041. Epub 2020 Mar 11.
- Fraga TR, Courrol DS, Castiblanco-Valencia MM, Hirata IY, Vasconcellos AS, Juliano L, Barbosa AS, Isaac L. Immune evasion by pathogenic leptospira strains: the secretion of proteases that directly cleave complement proteins. *J Infect Dis.* 2014;209(6):876-86.
- Fraga TR, Isaac L, Barbosa AS. Complement Evasion by Pathogenic *Leptospira*. *Front Immunol.* 2016 Dec 21;7:623. doi: 10.3389/fimmu.2016.00623. eCollection 2016.
- Furth R, Cohn ZA. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med.* 1968;128(3):415-35. doi: 10.1084/jem.128.3.415.
- Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med.* 2003;197(9):1107-17. doi: 10.1084/jem.20021787. Epub 2003 Apr 28.
- Gonçalves-de-Albuquerque CF, Burth P, Silva AR, Younes-Ibrahim M, Castro-Faria-Neto HC, Castro-Faria MV. *Leptospira* and inflammation. *Mediators Inflamm.* 2012. doi: 10.1155/2012/317950.
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003 Jan;3(1):23-35. doi: 10.1038/nri978.
- Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005 Dec;5(12):953-64. doi: 10.1038/nri1733.
- Siamon Gordon. Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity.* 2016;44(3):463-475. doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.026.
- Gropp K, Schild L, Schindler S, Hube B, Zipfel PF, Skerka C. The yeast *Candida albicans* evades human complement attack by secretion of aspartic proteases. *Molecular Immunology.* 2009;47(2):465-75.

- Haake DA, Dundoo M, Cader R, Kubak BM, Hartskeerl RA, Sejvar JJ, Ashford DA. Leptospirosis, water sports, and chemoprophylaxis. *Clin Infect Dis*. 2002;34(9):e40-3. doi: 10.1086/339942. Epub 2002 Apr 4.
- Haake DA. Hamster model of leptospirosis. *Curr Protoc Microbiol*. 2006 Sep;Chapter 12:Unit 12E.2. doi: 10.1002/9780471729259.mc12e02s02.
- Honda-Ogawa M, Ogawa T, Terao Y, Sumitomo T, Nakata M, Ikebe K, Maeda Y, Kawabata S. Cysteine proteinase from *Streptococcus pyogenes* enables evasion of innate immunity via degradation of complement factors. *J Biol Chem*. 2013;288(22): 15854-64
- Hong YQ, Ghebrehiwet B. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3. *Clin Immunol Immunopathol*. 1992;62(2):133-8.
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol*, 1999;162(7):3749-52.
- Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197-216. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359. Epub 2001 Oct
- Janssen BJ, Huizinga EG, Raaijmakers HC, Roos A, Daha MR, Nilsson-Ekdahl K, Nilsson B, Gros P. Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity. *Nature*. 2005;437(7058):505-11. doi: 10.1038/nature04005.
- Jusko M, Potempa J, Karim AJ, Miroslaw Ksiazek M, Kristian Riesbeck K, Peter Garred P, Sigrun Eick S, Anna M Blom AM. A metalloproteinase karilysin present in the majority of *Tannerella forsythia* isolates inhibits all pathways of the complement system. *J Immunol*. 2012;188(5):2338-49.
- Jusko M, Potempa J, Kantyka T, Bielecka E, Miller HK, Kalinska M, Dubin G, Garred P, Shaw LN, Blom AM. Staphylococcal proteases aid in evasion of the human complement system. *J Innate Immun*. 2014;6(1):31-46.
- Kitashoji E, Koizumi N, Lacuesta TLV, Usuda D, Ribo MR, Tria ES, Go WS, Kojiro M, Parry CM, Dimaano EM, Villarama JB, Ohnishi M, Suzuki M, Ariyoshi K. Diagnostic accuracy of recombinant immunoglobulin-like protein A-Based IgM ELISA for the early diagnosis of leptospirosis in the Philippines. *Neglected Tropical Diseases*. 2015;9(6):e0003879.
- Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(10):736-47.
- Laudisi F1, Spreafico R, Evrard M, Hughes TR, Mandriani B, Kandasamy M, Morgan BP, Sivasankar B, Mortellaro A. Cutting edge: the NLRP3 inflammasome links complement-mediated inflammation and IL-1 β release. *J Immunol*. 2013 Aug 1;191(3):1006-10. doi: 10.4049/jimmunol.1300489.

- Laarman AJ, Ruyken M, Malone CL, van Strijp JA, Horswill AR, Rooijackers SH. *Staphylococcus aureus* metalloprotease aureolysin cleaves complement C3 to mediate immune evasion. *J Immunol*. 2011;186(11):6445-53.
- Lachmann PJ, Pangburn MK, Oldroyd RG. Breakdown of C3 after complement activation. Identification of a new fragment C3g, using monoclonal antibodies. *J Exp Med*. 1982 Jul 1;156(1):205-16.
- Lacroix-Lamandé S, d'Andon MF, Michel E, Ratet G, Philpott DJ, Girardin SE, Boneca IG, Vandewalle A, Werts C. Downregulation of the Na/K-ATPase pump by leptospiral glycolipoprotein activates the NLRP3 inflammasome. *J Immunol*, 2012 Mar 15;188(6):2805-14. doi: 10.4049/jimmunol.1101987. Epub 2012 Feb 8.
- Lambris JD, Ricklin D, Geisbrecht BV. Complement evasion by human pathogens. *Nature Reviews Microbiology*. 2008; (6):132-142.
- Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(2):296-326.
- Levett PN. Systematics of leptospiraceae. In Adler B. *Leptospira* and Leptospirosis. New York: Springer; 2015.11-20.
- Li S, Ojcius DM, Liao S, Li L, Xue F, Dong H, Yan J. Replication or death: distinct fates of pathogenic *Leptospira* strain Lai within macrophages of human or mouse origin. *Innate Immun*. 2010. Apr; 16(2):80-92.
- Lim JJ, Grinstein S, Roth Z. Diversity and Versatility of Phagocytosis: Roles in Innate Immunity, Tissue Remodeling, and Homeostasis *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 May 23;7:191. doi: 10.3389/fcimb.2017.00191. eCollection 2017.
- Liu D, Niu ZX. The structure, genetic polymorphisms, expression and biological functions of complement receptor type 1 (CR1/CD35). *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2009;31(4):524-35. doi: 10.3109/08923970902845768.
- Lub M, Kooyk YV, Figdor CG. Ins and outs of LFA-1. *Immunol Today*. 1995 Oct;16(10):479-83. doi: 10.1016/0167-5699(95)80031-x.
- Lukácsi S, Nagy-Baló Z, Erdei A, Sándor N, Bajtay Z. The role of CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in complement-mediated phagocytosis and podosome formation by human phagocytes. *Immunol Lett*. 2017 Sep;189:64-72. doi: 10.1016/j.imlet.2017.05.014. Epub 2017 May 26.
- Lund ME, To J, O'Brien BA, Donnelly S. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *J Immunol Methods*. 2016;430:64-70. doi: 10.1016/j.jim.2016.01.012. Epub 2016 Jan 27.
- Manthey HD, Woodruff TM, Taylor SM, Monk PN. Complement Component C5 (C5a). *J Biochem Cell Biol*. 2009;85:213-217.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M: The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004, 25:677-86.

- Marangoni A, Aldini R, Sambri V, Montagnani M, Ballardini G, Storni E, Cevenini R. Uptake and killing of *Leptospira interrogans* and *Borrelia burgdorferi*, spirochetes pathogenic to humans, by reticuloendothelial cells in perfused rat liver. *Infect Immun*. 2000 Sep;68(9):5408-11.
- Marikovsky M, Arnon R, Fishelson Z. *Schistosoma mansoni*: localization of the 28 kDa secreted protease in cercaria. *Parasite Immunol*. 1990;12(4):389-401.
- Marshall RB. Ultrastructural changes in renal tubules of sheep following experimental infection with *Leptospira interrogans* serotype *pomona*. *Journal of Medical Microbiology*, 1974.7505-508.
- Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J, Young TA, Sanchez Y, Siqueira I, Bolin CA, Reis MG, Riley LW, Haake DA, Ko AI. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol Microbiol*. 2003; 49(4): 929–945.
- Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 2007;449(7164):819-26. doi: 10.1038/nature06246.
- Meri T, Murgia R, Stefanel P, Meri S, Cinco M. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires. *Microb Pathog* 2005;39:139_47.
- Merien F, Baranton G, Perolat P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. *Infect Immun*. 1997; 65(2):729-38
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986, 136:2348-57.
- Müller-Eberhard, H. J. (1986). The membrane attack complex of complement. *Annu Rev Immunol* 4: 503-28.
- Nahori MA, et al. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. *J Immunol*. 2005;175(9):6022-31.
- Nally JE, Chantranuwat C, Wu XY, Fishbein MC, Pereira MM, Silva JJP, Blanco DR, Lovett MA. Alveolar Septal Deposition of Immunoglobulin and Complement Parallels Pulmonary Hemorrhage in a Guinea Pig Model of Severe Pulmonary Leptospirosis. *Am J Pathol*. 2004 Mar; 164(3): 1115–1127. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63198-7.
- Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity*, 2006;24(1):19-28. doi: 10.1016/j.immuni.2005.11.010.
- Orth D, Ehrlenbach S, Brockmeyer J, Khan AB, Huber G, Karch H, Sarg B, Lindner H, Würzner R. EspP, a serine protease of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, impairs complement activation by cleaving complement factors C3/C3b and C5. *Infect Immun*. 2010;78(10):4294-301.

- Palaniappan RU, Ramanujam S, Chang YF. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis.* 2007;20(3):284-92.
- Park SY, Kim KM, Lee JH, Seo SJ, Lee IH. Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. *Infect Immun.* 2007;75(4):1861-9.
- Park SY, et al. Immune evasion of *Enterococcus faecalis* by an extracellular gelatinase that cleaves C3 and iC3b. *J Immunol.* 2008;181(9):6328-36.
- Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood.* 1989;74(7):2527-34.
- Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect.* 2013;43(1):1-9.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 1998;282(5396):2085-8. doi: 10.1126/science.282.5396.2085.
- Popadiak K, Potempa J, Riesbeck K, Blom AM. Biphasic effect of gingipains from *Porphyromonas gingivalis* on the human complement system. *J Immunol.* 2007;178(11):7242-50.
- Potempa M, Potempa J, Kantyka T, Nguyen K, Wawrzonek K, Manandhar SP, Popadiak K, Riesbeck K, Eick S, Blom AM. *Interpain A*, a cysteine proteinase from *Prevotella intermedia*, inhibits complement by degrading complement factor C3. *PLoS Pathog.* 2009;5(2)e1000316.
- Potempa M, Potempa J. Protease-dependent mechanisms of complement evasion by bacterial pathogens. *Biol. Chem.* 2012;393(9):873-88.
- Qin Zhenyu The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis.* 2012 ;221(1):2-11. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.09.003.
- Raddi G, Morado DR, Yan J et al. Three-dimensional structures of pathogenic and saprophytic *Leptospira* species revealed by cryo-electron tomography. *J Bacteriol.* 2012; 194:1299-1306.
- Ramu P, Tanskanen R, Holmberg M, Lähteenmäki K, Korhonen TK, Meri S. The surface protease PgtE of *Salmonella enterica* affects complement activity by proteolytically cleaving C3b, C4b and C5. *FEBS Letters.* 2007;581(9):1716-20.
- Ravetch JV, Kinet JP. Fc receptors. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:457-92. doi: 10.1146/annurev.iy.09.040191.002325.
- Ricaldi J, Swancutt MA, Matthias MA. Current trends in translational research in leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis.* 2013;26(5):399-403.
- Ravetch JV, Kinet JP. Fc receptors. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:457-92. doi: 10.1146/annurev.iy.09.040191.002325.

Riva R, Korhonen TK, Meri S. The outer membrane protease PgtE of *Salmonella enterica* interferes with the alternative complement pathway by cleaving factors B and H. *Front Microbiol.* 2015;6:63.

Roghani A, Stopforth RJ, Dahal LN, Cragg MS. New revelations from an old receptor: Immunoregulatory functions of the inhibitory Fc gamma receptor, FcγRIIB (CD32B). *J Leukoc Biol.* 2018 Feb 6. doi: 10.1002/JLB.2MIR0917-354R.

Rooijackers SHM, van Strijp JAG. Bacterial complement evasion. *Molecular Immunology* 44 (2007) 23–32.

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

Sahu A, Sunyer JO, Moore WT, Sarrias MR, Soulika AM, Lambris JD. Structure, functions, and evolution of the third complement component and viral molecular mimicry. *Immunol Res.* 1998;17(1-2):109-21. doi: 10.1007/BF02786436.

Silva LB, Miragaia L dos S, Breda LC, Abe CM, Schmidt MC, Moro AM, Monaris D, Conde JN, Józsi M, Isaac L, Abreu PA, Barbosa AS. Pathogenic *Leptospira* species acquire factor H and vitronectin via the surface protein LcpA. *Infect Immun.* 2015;83(3):888-97.

Shimazu, R., S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake, and M. Kimoto. 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* 189:1777–1782.

Spichler AS, Vilaça PJ, Athanazio DA, Albuquerque JO, Buzzar M, Castro B, Seguro A, Vinetz JM. Predictors of lethality in severe leptospirosis in urban Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;79(6):911-4.

Springer TA, Dustin ML, Kishimoto TK, Marlin SD. The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. *Annu Rev Immunol.* 1987;5:223-52. doi: 10.1146/annurev.iy.05.040187.001255.

Strauss-Ayali D, Conrad SM, Mosser DM. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J Leukoc Biol.* 2007; 82(2):244-52. doi: 10.1189/jlb.0307191. Epub 2007 May 2.

Stuart LM, Alan R, Ezekowitz B. Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity,* 2005;22(5):539-50. doi: 10.1016/j.immuni.2005.05.002.

Takabe K, Nakamura S, Ashihara M et al. Effect of osmolarity and viscosity on the motility of pathogenic and saprophytic *Leptospira*. *Microbiol Immunol.* 2013;57(3):236-9.

Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol.* 2004;16(1):3-9

Tan SM, Hyland RH, Shamkhani A-Al, Douglass WA, Shaw JM, Law SK. Effect of integrin beta 2 subunit truncations on LFA-1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18)

- assembly, surface expression, and function. *J Immunol.* 2000;165(5):2574-81.doi: 10.4049/jimmunol.165.5.2574.
- Takizawa F, Tsuji S, Nagasawa S. Enhancement of macrophage phagocytosis upon iC3b deposition on apoptotic cells. *FEBS Lett.* 1996;397(2-3):269-72.
- Thomas CA, Li Y, Kodama T, Suzuki H, Silverstein SC, Khoury JE. Protection from lethal gram-positive infection by macrophage scavenger receptor-dependent phagocytosis. *J Exp Med*, 2000;191(1):147-56. doi: 10.1084/jem.191.1.147.
- Toma C, Okura N, Takayama C, Suzuki T. Characteristic features of intracellular pathogenic *Leptospira* in infected murine macrophages. *Cell Microbiol.* 2011 Nov;13(11):1783-92.
- Tsuchimoto, M., M. Niikura, E. Ono, H. Kida, and R. Yanagawa. 1984. Leptospiral attachment to cultured cells. *Zentbl. Bakteriologie. Mikrobiologie. Hyg.* 258:268–2
- Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol*, 2002;20:825-52. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.103001.114744.
- Underhill DM, Goodridge HS. Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(7):492-502. doi: 10.1038/nri3244.
- Vieira ML, Vasconcellos AS, Gonçalves AP, Morais ZM, Nascimento ALTO. Plasminogen acquisition and activation at the surface of leptospira species lead to fibronectin degradation. *Infection and Immunity.* 2009;77(9):4092-101.
- Walport MJ. Complement first of two parts. *The New England Journal of Medicine.* 2001;344 (14):1058-66.
- Vincent AT, Schiettekatte O, Goarant C, Neela VK, Bernet E, Thibeaux R, Ismail N, Mohd Khalid MKN, Amran F, Masuzawa T, Nakao R, Amara Korba A, Bourhy P, Veyrier FJ, Picardeau M. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019, 13(5):e0007270. doi: 10.1371/journal.pntd.0007270.
- Vorup-Jensen T, Jensen RK. Structural Immunology of Complement Receptors 3 and 4. *Front Immunol.* 2018 Nov 26;9:2716. doi: 10.3389/fimmu.2018.02716. eCollection 2018.
- Werts C. Interaction of *Leptospira* with the Innate Immune System. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2018;415:163-187. doi: 10.1007/82_2017_46.
- Wright, S.D., R.A. Ramos, P.S. Tobias, R.J. Ulevitch, and J.C. Mathison. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science.* 249:1431–1433.
- Wolff DG, Castiblanco-Valencia MM, Abe CM, Monaris D, Morais ZM, Souza GO, Vasconcellos AS, Isaac L, Abreu PA, Barbosa AS. Interaction of leptospira elongation factor Tu with plasminogen and complement factor h: a metabolic leptospiral protein with moonlighting activities. *PLoS One.* 2013;8(11):1-10.

Xue F, Zhao X, Yang Y, Zhao J, Yang Y, Cao Y, Hong C, Liu Y, Sun L, Huang M, Gu J. Responses of murine and human macrophages to leptospiral infection: a study using comparative array analysis. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013 Oct 10;7(10):e2477. doi: 10.1371/journal.pntd.0002477. eCollection 2013.

Zipfel PF, Würzner R, Skerka C. Complement evasion of pathogens: common strategies are shared by diverse organisms. *Molecular Immunology*. 2007;44(16),3850-7.

9. Anexos

Anexo A -Trabalhos apresentados em congressos.

- Amamura TA, Fraga TR, Vasconcellos SA, Barbosa AS, Isaac L. Pathogenic *Leptospira* Secreted Proteases Target the Membrane Attack Complex: A Potential Role for Thermolysin in Complement Inhibition. *Front Microbiol*. 2017 May 30;8:958. doi: 10.3389/fmicb.2017.00958

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.