DENISE HARUMI SILVA YAMASHITA

PARTICIPAÇÃO DO COMPONENTE C3 DO SISTEMA COMPLEMENTO MURINO NA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS E FAGOCITOSE CONTRA *Leptospira interrogans*

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

São Paulo
2017

DENISE HARUMI SILVA YAMASHITA

PARTICIPAÇÃO DO COMPONENTE C3 DO SISTEMA COMPLEMENTO MURINO NA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS E FAGOCITOSE CONTRA *Leptospira interrogans*

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

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Prof.ª Drª Lourdes Isaac

Versão Original

São Paulo
2017

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)

Harumi Silva Yamashita, Denise
Participação do componente C3 do Sistema Complemento Murino na produção de anticorpos específicos e fagocitose contra Leptospira interrogans / Denise Harumi Silva Yamashita; orientador Lourdes Isaac. -- São Paulo, 2017.
92 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Leptospirose. 2. C3. 3. Sistema Complemento. 4. Anticorpos. 5. Fagocitose. I. Isaac, Lourdes , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Denise Harumi Silva Yamashita

Título da Dissertação: "Participação do componente C3 do Sistema Complemento Murino na produção de anticorpos específicos e fagocitose contra *Leptospira interrogans"*

Orientador: Profª. Dra. Lourdes Isaac

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a **...../...../.....**, considerou a candidata:

( ) Aprovada ( ) Reprovada

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

ICB USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "***Avaliação da função fagocítica de células da linhagem monocítica de camundongos deficientes na proteína C3 do Complemento infectados pela Leptospira spp***", registrado sob o protocolo nº ***76/2015***, 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 **16/10/2015** 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 tem validade de **04 (quatro) anos** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Lourdes Isaac**
- Membros da Equipe: *Denise Harumi Silva Yamashita (Pós-graduanda)*

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 phagocytic function of mice monocytic lineage of cells deficient on the complement protein C3 infected by Leptospira spp***", protocol nº ***76/2015***, 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 **10/16/2015** 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 **04 (four) years** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Lourdes Isaac**
- Team members: Denise Harumi Silva Yamashita (Graduate Student)

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
Mus musculus	C57bl/6 C3/KO	Fêmea/Female	4-8 semanas/weeks	60
	C57bl/6	Fêmea/Female	4-8 semanas/weeks	60

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

Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

EXPEDIÇÃO
DATA 22/10/2015
REL. N.º 2437

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida.
Aos meus pais Laurice e Ivao, a minha irmã Beatriz Sayuri,
e ao meu noivo Diogo Destefano.

AGRADECIMENTOS

Devo agradecer de todo o meu coração primeiramente minha família, aos meus pais, Laurice e Ivao, por estarem sempre me apoiando e me ajudando em todos os momentos. Por acreditarem em mim e por terem me ensinado a ter respeito, humildade, gratidão e perseverança através de vossos exemplos de vida. À minha tia Kinuyo, pelo apoio e carinho de sempre, por nunca medir esforços para me ajudar. À minha irmã Beatriz, por dizer que tem orgulho de mim e isso me motiva a ser forte e nunca desistir dos meus objetivos. Ao meu querido noivo, Diogo, pelo carinho, força e incentivo. Você foi essencial nesta etapa. Amo vocês infinitamente.

À Profa Lourdes Isaac que me deu a oportunidade de estar realizando meu mestrado em seu laboratório. Pelos conselhos, paciência, apoio e carinho. Por todo o conhecimento que me foi dado, o que contribui grandemente para a minha formação. Obrigada por tudo!

Aos amigos do laboratório de Complemento: Julia, Priscilla, Thaís, Anielly, Claudinha, Leo, Ana Catarina e Elena. Pelo convívio diário, companheirismo, pelo apoio em certos momentos difíceis, pelos ótimos momentos que passamos juntos e pela amizade. Cada um de vocês tem uma contribuição especial neste trabalho. Amo vocês.

À Marlene Florido, por ter sido maravilhosa comigo, pela amizade e ensinamentos. Obrigada pelos conselhos e apoio constante.

À Ellen e Leo Batista por todo auxílio prestado durante os experimentos de qPCR e por sempre serem tão gentis comigo. Agradeço também a Prof.ª Márcia Mayer pelas contribuições dadas em minha qualificação e por permitir que eu realizasse as análises de fagocitose em seu laboratório.

Ao Dr. Marcos Bryan, Gisele e Antonio da Faculdade de Medicina Veterinária - USP, pelo fornecimento das leptospiras utilizadas neste projeto.

À Marlise e Luciano, pela ajuda com os experimentos de LDH e pelo carinho que tiveram comigo.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Medicina - USP pelo fornecimento das hemácias de coelho.

À Eliane, Fernanda, Ricardo e Prof. Momtchilo por participarem dos meus primeiros experimentos de imunização dos animais, vocês me ajudaram e ensinaram muito. Agradeço também pela ajuda com a coloração das lâminas e pelo carinho e amizade.

Aos alunos vizinhos de laboratório: Tábata, Renata, Núria, Chris Lambert, Edson, Lucila, Marina, Cris, Zé, Monique e Silvana. Agradeço muito a vocês pelas inúmeras vezes que me ajudaram. Obrigada pelo carinho, apoio e amizade.

Ao Paulo Albe, pela ajuda com as lâminas de microscopia e pela amizade.

À Dra. Silvia Massironi e Márcio Caldas pelo apoio e fornecimento dos camundongos e também aos funcionários do biotério pela manutenção dos animais.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Imunologia, agradeço pela atenção, carinho e suporte, meu carinho e gratidão por vocês.

À Rosana Prisco, pelo precioso apoio estatístico.

Aos ex-alunos do laboratório: Mónica, Íris, Adriana, Tati e Leandro, pelos ensinamentos transmitidos no início da pós.

Aos amigos que fiz no departamento: Eliseu, Dhemerson, Vinicius, Fernanda e Rogério, por todas as vezes que precisei de ajuda e pelos momentos de descontração.

Aos animais utilizados neste estudo, o meu agradecimento e respeito.

À Capes pelo auxílio financeiro pessoal durante todo o período do mestrado.

À Fapesp pelo auxílio financeiro do laboratório. Processos: 2010/50043-0 e 2015/09972-0.

Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu.
É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu.

Trem bala - Ana Vilela

RESUMO

Yamashita DHS**.** Participação do componente central C3 do Sistema Complemento murino na produção de anticorpos específicos e fagocitose contra *Leptospira interrogans*. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

A leptospirose é uma doença infecciosa importante mundialmente com mais de um milhão de casos estimados a cada ano. Estudos acerca dos mecanismos imunológicos envolvendo infecções por bactérias leptospiras, seu comportamento e sua capacidade de sobrevivência no hospedeiro, são de grande importância para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes. Neste tipo de infecção, a resposta imune inata e imune adaptativa (mediada por Complemento, fagocitose e anticorpos) são essenciais para o seu controle.

O Sistema Complemento é importante para a eliminação de leptospiras, entretanto ainda não se sabe se a morte destas bactérias depende mais da fagocitose ou da formação do complexo de ataque à membrana. No presente estudo, foram empregados camundongos C57BL/6 selvagens (B6.C3$^{+/+}$) e deficientes da proteína C3 (B6.C3$^{-/-}$) do Sistema Complemento.

Inicialmente investigamos *in vivo* a produção de anticorpos anti-leptospiras durante a infecção do animal. Os camundongos de ambas as linhagens foram imunizados com a *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm (espécie patogênica) e com a proteína *leptospiral immunoglobulin-like* (LigBC), presente somente em espécies patogênicas. Nossos resultados mostraram que os camundongos B6.C3$^{-/-}$ apresentaram menos anticorpos específicos contra as leptospiras, bem como para a proteína LigBC, em comparação com os camundongos B6.C3$^{+/+}$, igualmente imunizados. É importante destacar que a produção de anticorpos e proliferação de linfócitos B envolve a participação do complemento via CR2 e que pode ser modulada por fragmentos C3d(g), reconhecidos como importantes adjuvantes na imunidade humoral.

Nós avaliamos também o processo de fagocitose utilizando macrófagos peritoneais derivados de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$. Observamos que *L. interrogans* mostrou-se resistente à internalização por macrófagos peritoneais de ambas as linhagens de camundongos, entretanto quando estas leptospiras foram previamente tratadas com soro de B6.C3$^{+/+}$, como fonte geradora de opsoninas C3b e iC3b, o número de leptospiras aumentou significativamente. Macrófagos derivados de camundongos B6.C3$^{-/-}$ fagocitaram menos leptospiras, quando comparados com os macrófagos de B6.C3$^{+/+}$. Esta observação não pôde ser estendida para outras partículas, uma vez que não detectamos diferenças na ingestão de Zimosan por macrófagos de ambas as linhagens. A capacidade microbicida dependente da produção de NO não foi afetada pela ausência de C3. Também observamos que na ausência de C3, estas células fagocitárias secretam níveis reduzidos de citocinas TNF-α, IL-10, IL12p70 e MCP-1. Por outro lado, a citocina IL-6 foi secretada em maior concentração por macrófagos deficientes de C3, quando comparados com os macrófagos de camundongos C3$^{+/+}$.

Em apoio a estas conclusões, nossos resultados demonstram que o C3 é importante na defesa do hospedeiro, contribuindo para a melhor compreensão do papel do C3 do Sistema Complemento para controlar esta infecção.

Palavras-chave: Leptospira. C3. Sistema Complemento. Anticorpos. Fagocitose.

ABSTRACT

Yamashita DHS. Participation of the central component C3 of the Complement System murine in the production of specific antibodies and phagocytosis against *Leptospira interrogans*. [Masters thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Leptospirosis is an important infectious disease worldwide with more than one million cases estimated each year. Studies on the immunological mechanisms involving infections by leptospires bacteria, their behavior and their survival capacity in the host, are of great importance for the development of more effective treatments. In this type of infection, the innate immune and adaptive immune response (Complement mediated, phagocytosis and antibodies) are essential for its control.
The Complement System is important for the elimination of leptospires, however it is not yet known if the death of these bacteria depends more on phagocytosis or the formation of the membrane attack complex. In the present study, C57BL/6 wild (B6.C3$^{+/+}$) and C3 protein deficient (B6.C3$^{-/-}$) mice from the Complement System were used.
We first investigated the production of anti-leptospire antibodies *in vivo* during the infection of the animal. Mice from both strains were immunized with the *Leptospira interrogans* serovar Kennewicki Pomona Fromm strain (pathogenic species) and the leptospiral immunoglobulin-like protein (LigBC), present only in pathogenic species. Our results showed that B6.C3$^{-/-}$ mice had fewer specific antibodies against leptospires as well as for LigBC protein compared to equally immunized B6.C3$^{+/+}$ mice. It is important to highlight that the production of antibodies and proliferation of B lymphocytes involves the participation of the complement via CR2 and that can be modulated by fragments C3d(g), recognized as important adjuvants in humoral immunity.
We also evaluated the phagocytosis process using peritoneal macrophages derived from B6.C3$^{+/+}$ and B6.C3$^{-/-}$ mice. We observed that *L. interrogans* was resistant to the internalization by peritoneal macrophages of both strains of mice, however when these leptospires were previously treated with serum of B6.C3$^{+/+}$, as the source of opsonin C3b and iC3b, the number of internalized leptospires significantly increased. Macrophages derived from B6.C3$^{-/-}$ mice phagocyted less leptospires when compared to B6.C3$^{+/+}$ macrophages. This observation could not be extended to other particles, since we did not detect differences in the ingestion of Zimosan by macrophages of both strains. The microbicidal capacity dependent on NO production was not affected by the absence of C3. We also observed that in the absence of C3, these phagocytic cells secrete reduced levels of cytokines TNF-α, IL-10, IL12p70 and MCP-1. On the other hand, the IL-6 cytokine was secreted in higher concentration by C3-deficient macrophages compared to the macrophages of C3$^{+/+}$ mice.
In support of these findings, our results demonstrate that C3 is important in host defense, contributing to a better understanding of the role of Complement C3 in controlling this infection.

Keywords: Leptospira*.* C3. Complement System. Antibody. Phagocytosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo de transmissão da leptospirose. 19
Figura 2 - *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae. 22
Figura 3 - Representação esquemática da dupla membrana de leptospiras. 23
Figura 4 - Classificação das Leptospiras. 24
Figura 5 - As vias de ativação do Sistema Complemento. 26
Figura 6 - Complexo de Ataque à Membrana. 29
Figura 7 - Representação esquemática da clivagem de C3 e seus fragmentos. 38
Figura 8 - Amplificação do gene *16S rRNA* por PCR 54
Figura 9 – Genotipagem de amostras de DNA de camundongos, após eletroforese em gel de agarose. 57
Figura 10 - Atividade hemolítica mediada pela Via Alternativa do SC dos soros das linhagens B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$. 58
Figura 11 - Expressão das proteínas recombinantes LipL32, LigAC e LigBC. 59
Figura 12 - Produção de anticorpos anti-LigBC. 61
Figura 13 - Produção de anticorpos contra *L. interrogans.* 61
Figura 14 - Fagocitose de *L. biflexa* e *L. interrogans* na ausência do soro. 63
Figura 15 - Viabilidade dos macrófagos infectados com *L. interrogans.* 64
Figura 16 - Interação de *L. biflexa* e *L. interrogans* com C3b humano. 66
Figura 17 - Efeito da opsonização de *L. interrogans* pelos componentes do soro. ... 68
Figura 18 - Ensaio de fagocitose de partículas de Zimosan por macrófagos peritoneais de B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$. 70
Figura 19 - Produção de NO por macrófagos peritoneais infectados com *L. interrogans.* 71
Figura 20 - Dosagem de citocinas geradas por macrófagos de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ infectados com *L. interrogans.* 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para a confirmação do genótipo dos animais. 45
Tabela 2 - Nomenclatura das proteínas recombinantes de *L. interrogans* 47
Tabela 3 - Valores da atividade hemolítica sérica mediada pela Via Alternativa..... 59
Tabela 4 – Internalização de *L. interrogans* pelos macrófagos de B6.C3$^{+/+}$..... 68

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

B6.C3$^{+/+}$ - camundongo C57BL/6 selvagem

B6.C3$^{-/-}$ - camundongo C57BL/6 deficiente

C4BP - *C4b-binding protein*

Ca^{++} - cálcio

CR1/2/3/4 - receptores de Complemento tipo 1/tipo 2/tipo 3/tipo 4

CRIg - *complement receptor of the immunoglobulin superfamily*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

CVF - fator de veneno de cobra

EDTA - ácido tetra-acético etilenodiamino

EGTA - ácido tetra-acético etilenoglicol

ELISA - *Enzyme Lynked Immuno Sorbent Assay*

EMJH - *Ellinghausen-McCullough-Johnson Harris*

FB - Fator B

FD - Fator D

FH - Fator H

FI - Fator I

GVB - *gelatin veronal buffer*

IFN-γ - interferon-gama

IL- interleucina

iNOS - óxido nítrico induzível sintetase

L. biflexa - *Leptospira biflexa*

L. interrogans - *Leptospira interrogans*

LDH - lactato desidrogenase

LigB - *Leptospiral immunoglobulin-like protein* B

LPS - lipopolissacarídeo

MAC - complexo de ataque à membrana

MASP 1/2/3 - *Mannose-binding lectin associated serine protease* – 1/2/3

MAT - Teste de Aglutinação Microscópica

MBL - *Mannose binding lectin*

MCP-1 *monocyte chemoattractant protein-1*

Mg^{++} - magnésio

MOI - multiplicidade de infecção

MRs - receptores de manose

NF-kb - nuclear *factor kappa b*

NO - óxido nítrico

OPD - dihidrocloreto de orto-fenilenodiamina

PBS - solução fosfato salina

PCR - reação em cadeia com DNA polimerase

qPCR - PCR quantitativo em tempo real

ROS - espécies reativas de oxigênio

SBF - soro bovino fetal

SC - Sistema Complemento

SHN - soro humano normal

SMF- sistema mononuclear fagocitário

TA - temperatura ambiente

TGF-β - fator de transformação de crescimento

TLR 2/4 - receptores de Toll tipo 2/ tipo 4

TNF-α - fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 Introdução 18
1.1 Leptospirose 18
1.2 Leptospiras 21
1.3 Sistema Complemento 25
1.3.1 Via Clássica 27
1.3.2 Via das Lectinas 27
1.3.3 Via Alternativa 28
1.3.4 Complexo de Ataque à Membrana 29
1.4 Funções do Sistema Complemento 29
1.5 Sistema Complemento e leptospiras 32
1.6 Resposta imune à leptospirose 33
1.6.1 Os macrófagos na infecção por Leptospira spp. 35
1.7 Proteína C3 37
1.8 Modelo animal 39
2 Objetivos 41
2.1 Objetivo geral 41
2.2 Objetivos específicos 41
3 Delineamento Experimental 43
4 Material e métodos 44
4.1 Modelos animais 44
4.2 Sorovares de leptospiras e cultivo 44
4.3 Confirmação da deficiência de C3 dos animais B6.C3$^{-/-}$ 45
4.3.1 Extração de DNA da cauda e reação de PCR 45
4.4 Obtenção dos soros dos camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ 46
4.5 Determinação da atividade hemolítica 46
4.6 Seleção da proteína recombinante para ensaio de imunização 47
4.7 Imunização dos animais com a proteína recombinante LigBC 48
4.8 Imunização dos animais com *L. interrogans* 48
4.9 Determinação da concentração de anticorpos específicos contra as proteínas LigBC 48
4.10 Determinação da concentração de anticorpos específicos contra *L. interrogans* 49
4.11 Obtenção e cultivo de macrófagos peritoneais murinos 50
4.12 Preparação das leptospiras para os ensaios de fagocitose 50

4.13 Cultura de macrófagos peritoneais de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ com *L. interrogans* e *L. biflexa* 50

4.14 Avaliação da citotoxicidade dos macrófagos peritoneais infectados com *L. interrogans* 51

4.15 Avaliação da deposição de C3 em *L. interrogans* e *L.biflexa* 51

4.16 Cultura de macrófagos peritoneais de camundongos B6.C3$^{+/+}$ com *L. interrogans* 52

4.17 Extração de DNA genômico e análise da quantificação do número de leptospiras fagocitadas por macrófagos peritoneais 53

4.18 Cultura de macrófagos peritoneais derivados de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ com Zimosan na presença ou ausência do soro 55

4.19 Mensuração da produção de NO por macrófagos peritoneais infectados com *L. interrogans* 55

4.20 Dosagem de citocinas nos sobrenadantes de culturas de macrófagos peritoneais infectados com *L. interrogans* 56

4.21 Análise estatística 56

5 Resultados 57

5.1 Confirmação da deficiência de C3 dos animais B6.C3$^{-/-}$ 57

5.2 Determinação da atividade hemolítica dos soros mediada pela ativação da Via Alternativa 58

5.3 Seleção da proteína recombinante LigBC para ensaio de imunização 59

5.4 Produção de anticorpos em camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ imunizados com a proteína de membrana de leptospira LigBC 60

5.5 Produção de anticorpos em camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ imunizados com a *L. interrogans* 60

5.6 Comparação da fagocitose de *L. interogans* por macrófagos dos camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ na ausência do soro 62

5.7 Análise da citotoxicidade dos macrófagos infectados com diferentes proporções de MOI de *L. interrogans* 64

5.8 Deposição de C3 na superfície de *L. biflexa e L. interrogans* 65

5.9 Fagocitose de *L. interrogans* opsonizada por soro por macrófagos peritoneais de B6.C3$^{+/+}$ 67

5.10 Fagocitose de Zimosan na presença ou ausência de soro por macrófagos de B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ 69

5.11 Determinação do NO secretado nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais infectados com *L. interrogans* 70

5.12 Análise do perfil de citocinas por macrófagos peritoneais infectados com *L. interrogans* 72

6 Discussão 74

7 Conclusão 81

Referências* 82

1 Introdução

1.1 Leptospirose

A leptospirose é uma doença infecciosa de origem bacteriana causada por diferentes espécies de bactérias do gênero *Leptospira* spp. (Levett, 2001). Uma estimativa recente revelou que a carga global da leptospirose é um milhão de casos a cada ano com cerca de 60 mil mortes (Costa et al., 2015).

Os primeiros isolados de leptospiras foram descritos há aproximadamente 100 anos por pesquisadores japoneses, a partir de experimentos utilizando-se cobaias como o primeiro modelo animal de infecção aguda. Os animais foram então infectados com sangue de pacientes com leptospirose e desenvolveram sintomas similares àqueles observados nos doentes, tais como albuminúria, congestão conjuntival, icterícia e hemorragia, critérios utilizados para a definição do quadro da doença. As leptospiras foram encontradas no fígado e nos rins e, baseando-se em suas características morfológicas, foram nomeadas como *Spirochaeta icterohaemorragiae* (Inada et al., 1916).

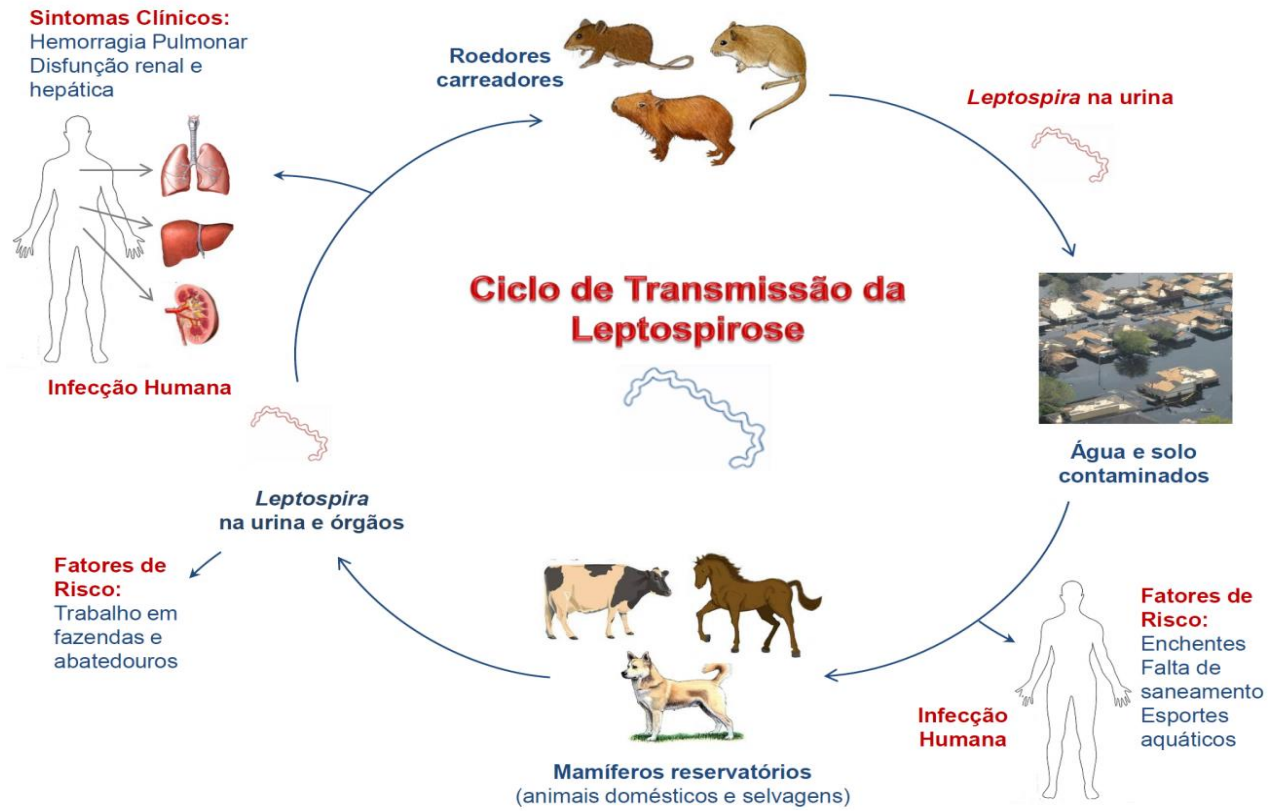
Antecedendo a descoberta, em meados de 1886 o médico patologista Adolf Weil observou um tipo particular de icterícia, acompanhada de esplenomegalia, disfunção renal, conjuntivite e erupções cutâneas em seus pacientes, o que foi comprovado anos mais tarde com o isolamento dessa bactéria, e assim, a doença em sua forma mais grave foi reconhecida como Síndrome de Weil (Weil, 1886).

Espécies patogênicas de leptospiras têm sido isoladas em uma ampla variedade de animais, como, por exemplo, cães, gatos, cavalos, búfalos, gados, porcos, gambás, morcegos, ovelhas e cervos (Adler, 2015). Além disso, as leptospiras também têm sido recuperadas de animais como crocodilos, focas e leões-marinhos (Colagross-Schouten et al., 2002; Pérez-Flores et al., 2017).

Embora muitos animais sejam apontados como fonte de leptospiras, os roedores são considerados os principais hospedeiros de manutenção da doença e também o principal transmissor para esta infecção em humanos, especialmente os ratos em centros urbanos (Bharti et al., 2003; Haake, Levett, 2015). Nos animais infectados, as leptospiras podem colonizar túbulos renais que servem como reservatório destas bactérias que são liberadas na urina, podendo sobreviver por

horas ou dias no ambiente contaminado. Por esta razão, as leptospiras estão amplamente difundidas na natureza (Haake, Levett, 2015) (**Figura 1**).

Figura 1 - Ciclo de transmissão da leptospirose.



O ciclo de transmissão da leptospirose inicia-se principalmente quando os animais contaminados liberam as espiroquetas pela urina, contaminando o solo e a água. Os roedores são considerados os principais reservatórios da infecção humana. Os seres humanos podem se infectar de diferentes maneiras através de enchentes, esportes aquáticos, trabalho em fazendas e abatedouros, fatores de risco que se destacam no ciclo de transmissão. Os sintomas característicos da doença em estágios mais graves estão relacionados com a apresentação clínica: hemorragia pulmonar, disfunção renal e hepática (Fraga et al., 2014).

A leptospirose é considerada uma doença de grande impacto social, pois costuma afetar populações mais pobres que vivem em regiões com carência de saneamento básico e habitação adequada. Esses aspectos são os principais fatores de risco epidemiológico, uma vez que estes indivíduos estão mais expostos ao lixo a céu aberto e aos ratos atraídos a esses locais em busca de alimentos (Hagan et al., 2016). Em situações de enchentes, devido à falta de infraestrutura, a água contaminada pela urina dos roedores pode misturar-se com a água das chuvas, tornando os animais e os seres humanos mais vulneráveis à infecção por leptospiras (Ko et al., 1999; Ko et al., 2009).

Os seres humanos são considerados hospedeiros acidentais da doença. O contato direto com sangue, urina, tecidos e órgãos do animal infectado é considerado fator de risco para a transmissão da leptospirose e pode afetar principalmente determinadas ocupações profissionais como aquelas desempenhadas por veterinários, fazendeiros, açougueiros, militares, catadores de lixo, cientistas e tratadores do sistema de esgoto e do controle de roedores, entre outras ocupações que demandam o contato com os animais (Steneroden et al., 2011). Além disso, como mencionado anteriormente a transmissão também ocorre através do contato indireto com a água ou solo contaminados após a disseminação das leptospiras pela urina dos animais infectados (Smythe et al., 1997; Levett, 2001).

Na fase aguda, os pacientes geralmente apresentam febre, fadiga, calafrios, fortes dores de cabeça, mal-estar, fotofobia, dor retro-orbital, e, de forma incomum a outras doenças, podem ainda apresentar hemorragia conjuntival (Haake, Levett, 2015). Outros possíveis sintomas incluem tosse, dores articulares e manchas pelo corpo (Zaki, Shanbag, 2010). Alguns dos sintomas apresentados durante a fase aguda são semelhantes aos sintomas de outras doenças de infecções virais, o que pode acarretar um diagnóstico incorreto em muitos casos. Por esta razão, alguns casos de leptospirose muitas vezes não são corretamente diagnosticados e notificados (Burt et al., 2012; Taylor et al., 2015).

Dores abdominais, náuseas, diarreia e vômitos são sintomas gastrointestinais que podem contribuir para casos de desidratação. Se o paciente evoluir para um quadro mais avançado da infecção, os sintomas podem progredir para complicações relacionadas à icterícia, insuficiência renal e hepática, meningite, miocardite e uveíte (Bharti et al., 2003). A gravidade da doença implica na disfunção de múltiplos órgãos. No fígado e nos pulmões frequentemente são observadas intensas hemorragias, enquanto nos rins, a inflamação resulta em nefrite intersticial caracterizada por edema e infiltração de células inflamatórias (Yang et al., 2006).

O diagnóstico para a leptospirose baseia-se na avaliação geral do paciente, histórico de exposição a eventuais locais de risco, além da apresentação clínica dos sintomas característicos da doença (Ko et al., 1999; Ooteman et al., 2006; Bharti et al., 2003). Os testes sorológicos são os mais frequentemente utilizados para o diagnóstico de leptospirose. A detecção de anticorpos IgG específicos geralmente pode ser observada a partir da segunda semana pós-infecção e podem ser detectados pelos métodos como *Enzyme Lynked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) ou

por Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) (Picardeau, 2013). O MAT consiste na pesquisa de anticorpos no soro de um paciente infectado, quando este é misturado a um painel de antígenos de leptospiras vivas em várias diluições. O resultado do é positivo, quando os anticorpos aglutinam com pelo menos um dos sorovares de leptospira (World Health Organization, 2003).

Outros ensaios moleculares como reação em cadeia com DNA polimerase (PCR) ou PCR quantitativo em tempo real (qPCR) também corroboram para a pesquisa das espiroquetas em amostras de sangue ou urina, permitindo a identificação ou até mesmo quantificação de leptospiras presentes no hospedeiro infectado (Fukunaga, Mifuchi, 1989; Picardeau, 2013).

O tratamento é feito sob a administração oral de duas drogas antimicrobianas: a doxaciclina e a azitromicina para os pacientes que apresentam as formas leves da doença. Os pacientes acometidos com as formas graves necessitam de intervenção hospitalar, administração de antibióticos como a ampicilina via intravenosa ou intramuscular, além de terapias de suporte para redução das taxas de mortalidade (Levett, 2001).

A vacinação contra a leptospirose para seres humanos ainda não foi introduzida no Brasil e há vacinas apenas para uso em animais. Apenas alguns países como Cuba, China, Rússia, Japão e França, disponibilizam a vacina para pessoas que vivem em situações de risco. São preparações de bacterinas (leptospiras inativadas pelo calor), que conferem baixa proteção e induzem imunidade em curto prazo, sendo necessárias anualmente doses de reforço da vacina (Haake, Levett, 2015; Dellagostin et al., 2017).

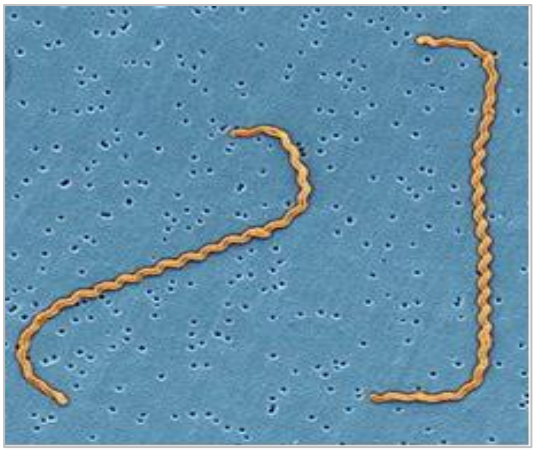
1.2 Leptospiras

As leptospiras são bactérias do tipo espiroqueta e pertencem à família *Leptospiraceae* de ordem *Spirochaetales*, distribuídas em 3 gêneros: *Leptospira* spp.*, Leptonema* spp. e *Treponema* spp. (Faine et al., 1999). São bactérias finas, móveis e apresentam uma forma característica típica helicoidal com extremidades em forma de ganchos (Levett, 2001) (**Figura 2**).

No espaço periplasmático, as leptospiras apresentam flagelos, que impulsionam seu movimento em dois sentidos, rotação e translação (Bharti et al., 2003). Quanto ao tamanho medem entre 0,1-0,2 µm de largura e de 6 a 20 µm de

comprimento com uma amplitude helicoidal de aproximadamente 0,1-0,15 µm e de 0,5 µm de comprimento (Levett, 2001; Schreier et al., 2009).

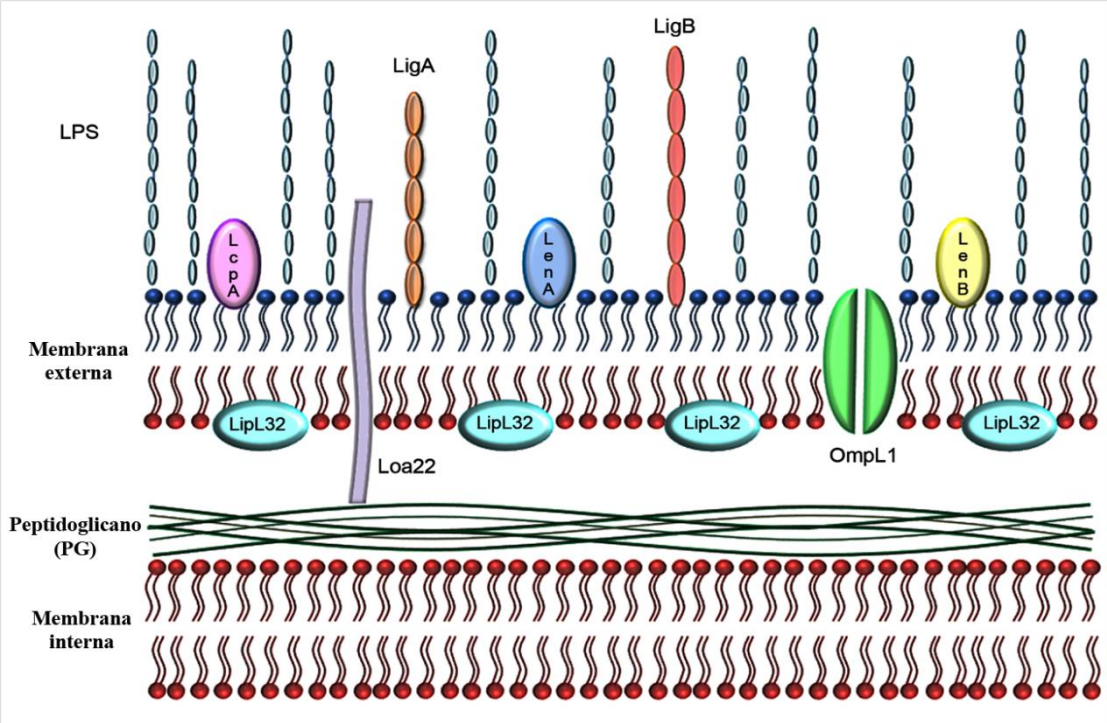
Figura 2 - *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae.



Microscopia eletrônica de varredura da *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae aderidas em uma membrana de 0,22 µm (Levett, 2001).

As leptospiras possuem um envoltório celular com dupla membrana, sendo a membrana interna revestida por uma espessa camada de peptideoglicano e a membrana externa por lipopolissacarídeo (LPS), proteínas, lipoproteínas e lipídeos (Haake, 2000; Evangelista, Coburn, 2010) (**Figura 3**). O LPS das leptospiras é semelhante ao LPS de outras bactérias Gram-negativas e seu reconhecimento como observado na maioria das bactérias Gram-negativas é predominantemente detectado por receptores semelhantes a Toll tipo 4 (TLR-4) (Goris et al., 2011). Entretanto, diferenças na composição do lipídeo A das leptospiras, região responsável pela atividade endotóxica do LPS, permitem que as leptospiras sejam reconhecidas por macrófagos humanos apenas por TLR-2. Ao contrário dos macrófagos humanos, o LPS das leptospiras é reconhecido principalmente por macrófagos murinos por TLR-2, mas TLR-4 também contribui para a ativação e sinalização celular (Nahori et al., 2005; Werts, 2010).

Figura 3 - Representação esquemática da dupla membrana de leptospiras.



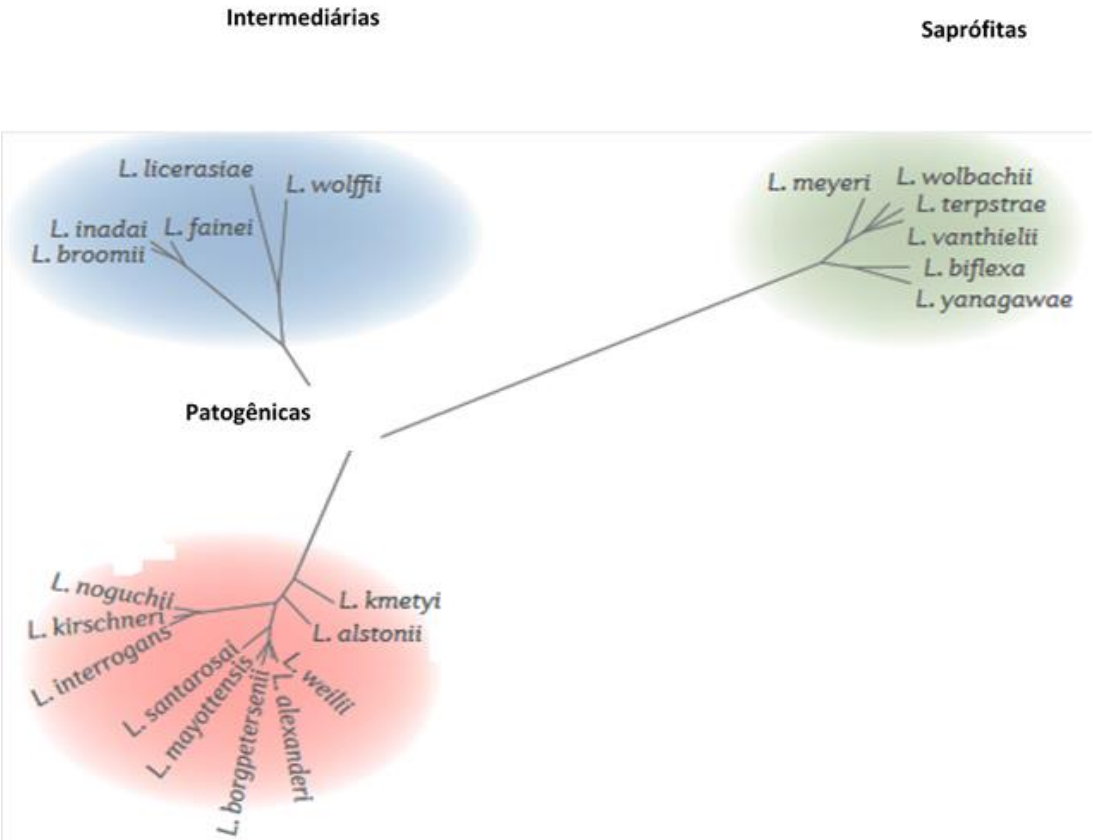
A dupla membrana das leptospiras é composta por uma membrana interna estritamente associada à camada de peptideoglicano. A membrana externa é composta por LPS e uma série de lipoproteínas como LipL32, LigA, LigB, Loa22 e a proteína porina OmpL1 (Fraga et al., 2011).

As leptospiras são bactérias aeróbicas obrigatórias, multiplicam-se melhor em temperaturas entre 28 °C e 30 °C no pH 7,2 e 7,6. Para o cultivo das leptospiras são utilizados meios especiais como o *Ellinghausen-McCullough-Johnson Harris* (EMJH), suplementado com 10% de soro de coelho ou 1% de albumina sérica com adição de ácidos graxos de cadeia longa. O crescimento do número de leptospiras leva de 4 a 7 dias e pode ser acompanhado por microscopia óptica sob campo escuro (Faine et al., 1999).

Tradicionalmente, existem dois tipos de classificação para diferenciar as espécies, onde o primeiro baseia-se na composição variável de carboidratos que formam o LPS, tendo como base mais de 200 sorovares distribuídos em 23 sorogrupos. O segundo sistema de classificação baseia-se na caracterização genômica entre as espécies, apoiando-se em experimentos de hibridação do DNA (Levett, 2001; Ko et al., 2009; Evangelista, Coburn, 2010). A análise filogenética baseada no sequenciamento do gene *16S rRNA* indica que existem três grupos de leptospiras que incluem espécies patogênicas, espécies saprófitas de vida livre e outras espécies classificadas como um grupo intermediário, cuja patogenicidade

causa sintomas leves e sem complicações fatais (Ko et al., 2009; Chiriboga et al., 2015) (**Figura 4**). Recentemente foi descrita uma nova espécie do gênero denominada *Leptospira idonii* e sua patogenicidade ainda é incerta (Saito et al., 2013).

Figura 4 - Classificação das Leptospiras.



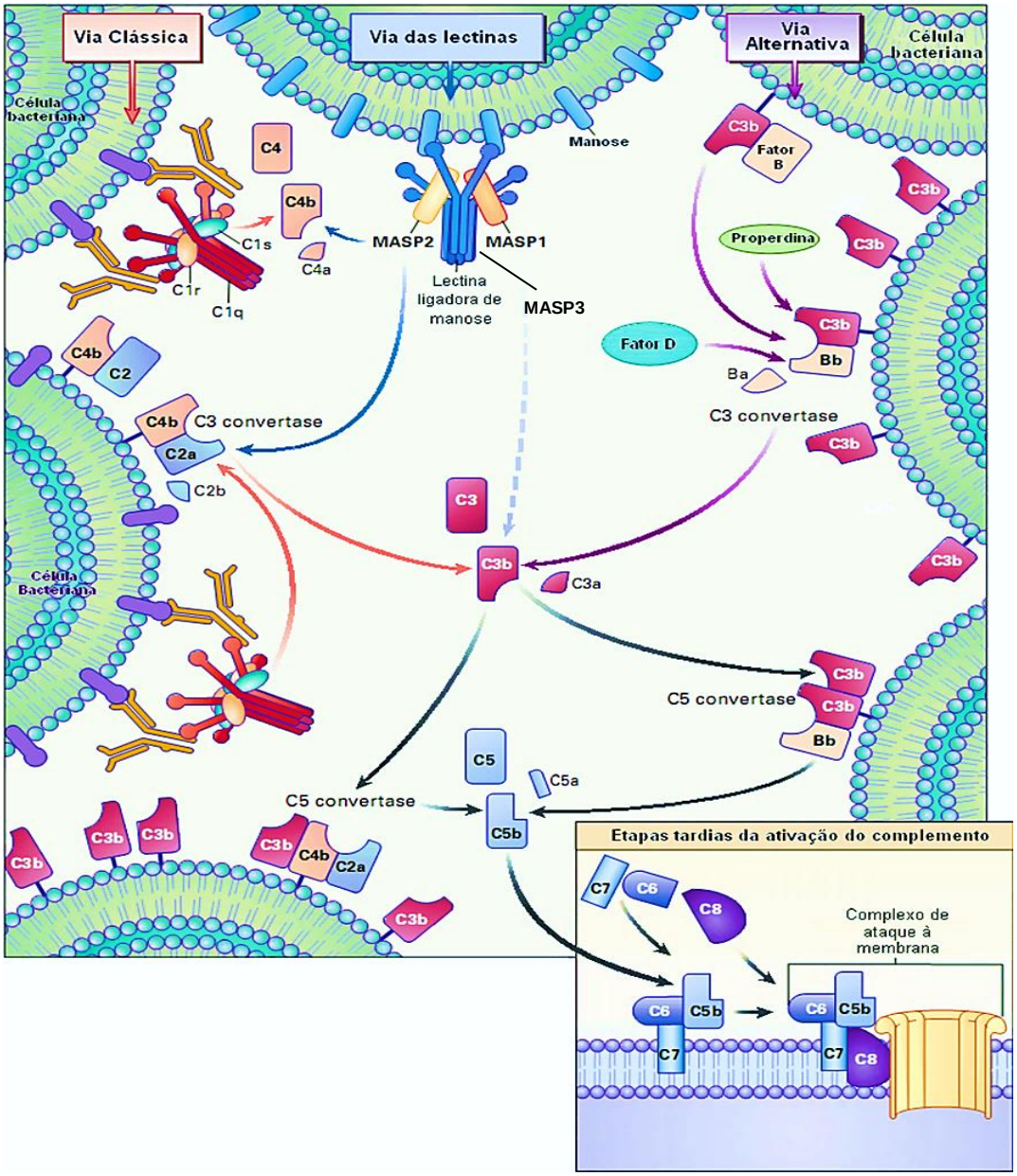
(Modificado de: Picardeau, 2017).

1.3 Sistema Complemento

O Sistema Complemento (SC) é conhecido por ser um dos participantes mais importantes da imunidade do hospedeiro, sua contribuição é fundamental para o desenvolvimento de uma resposta imune eficiente, auxiliando outros elementos celulares, como fagócitos e linfócitos B e modulando ativamente as respostas imunes inatas e adaptativas (Walport, 2001).

Seu repertório é constituído e organizado por proteínas solúveis e proteínas associadas a superfícies celulares. A ativação do SC pode ocorrer por ativação de três importantes vias: Via Clássica, Via das Lectinas e Via Alternativa (Walport, 2001; Nesargikar et al., 2012) (**Figura 5**). Quando ocorre ativação do SC por qualquer uma das vias, os componentes interagem entre si sequencialmente, formando cascatas enzimáticas complexas que terminam com a formação do complexo de ataque à membrana (MAC), um complexo lítico que culmina em lise e morte celular (Morgan, Harris, 1999).

Figura 5 - As vias de ativação do Sistema Complemento.



O SC pode ser ativado por três diferentes vias: Via Clássica, Via das Lectinas e Via Alternativa. As C3-convertases das Via Clássica e Via das Lectinas são geradas geralmente na presença das moléculas C2 e C4 por complexos de antígeno-anticorpo ou por interações de ligação de Lectinas com resíduos de carboidratos nas superfícies microbianas, respectivamente. A Via Alternativa é iniciada pela hidrólise espontânea da ligação tiól-ester de C3 seguida pela ligação de Fator B (FB) e posterior clivagem pelo Fator D (FD), gerando as C3-convertases desta via. Por meio das C3-convertases mais moléculas de C3 são clivadas, gerando C3b. A associação dos fragmentos C3b às C3-convertases, formam as C5-convertases que participam da clivagem de C5 em C5a e C5b. Ao final das cascatas inicia-se a formação do MAC, quando o C5b ainda associado a C5-convertase liga-se as moléculas C6, C7, C8 e C9 (Walport, 2001).

1.3.1 Via Clássica

A Via Clássica foi a primeira a ser descrita; sua ativação é dependente principalmente do reconhecimento de complexos antígeno-anticorpo por moléculas C1q, pertencentes ao complexo C1 (Ehrlich, Morgenroth, 1900). O complexo C1 é formado por um conjunto de subunidades conhecidas como C1q, C1r e C1s. A atividade desse complexo é dependente de íons cálcio (Ca^{++}) e magnésio (Mg^{++}) e, após a ligação de C1q à porção Fc dos anticorpos IgM ou IgG, ocorre a ativação da serino protease C1r, que cliva a subunidade C1s (Lacroix et al., 1989). A ativação de C1s resulta na clivagem das proteínas C2 e C4. A clivagem de C4 gera dois fragmentos, C4b um fragmento maior que se deposita sobre superfícies celulares e mais um fragmento pequeno e solúvel com função desconhecida. Em seguida, ocorre a clivagem de C2, em C2a e C2b, o C2b permanece ligado ao C4b, formando o complexo enzimático C3-convertase (C4bC2a), os quais levam a clivagem e ativação do componente C3, após a formação do complexo enzimático C3-convertase. No complexo, C2b atua como serino protease, clivando C3 em C3a e C3b, e com a clivagem de moléculas C3, modulam a formação de outro complexo conhecido como C5-convertase (C4bC2aC3bn) pela adição do fragmento C3b à C3-convertase (Pangburn, Rawal, 2002).

1.3.2 Via das Lectinas

A Via das Lectinas é iniciada pelo reconhecimento de carboidratos presentes na superfície de microrganismos. As lectinas *mannose binding lectin* (MBL) ou ficolinas interagem com carboidratos ou resíduos acetilados presentes exclusivamente na superfície dos patógenos, sendo ambas associadas a três serino-proteases conhecidas como *MBL-associated serino protease* (MASP-1, MASP-2 e MASP-3) (Turner, 1996; Schwaeble et al., 2002). Essas lectinas apresentam similaridade estrutural e funcional com a proteína C1q. Na presença de Ca^{++} e Mg^{++}, MASP-1 apresenta função homóloga a C1s, ativando MASP-2. Além disso, MASP-1 também promove a clivagem da proteína C2. No entanto, apenas a MASP-2 pode iniciar a formação da C3-convertase C4bC2a da Via das Lectinas, uma vez que, MASP-2 é capaz de clivar as proteínas C2 e C4, gerando os fragmentos C2a e C4b

(Matsushita, Fujita, 1992; Thiel et al., 1997). A MASP-3 possui atividade regulatória sobre MASP-2 e inibe a clivagem das moléculas C2 e C4, atuando como um regulador negativo da Via das Lectinas (Dahl et al., 2001).

O restante do processo de ativação dessa via é similar ao que ocorre na Via Clássica, na qual as atividades desses complexos C4bC2a apresentarão a mesma finalidade de clivar mais moléculas C3 para formar as C3- e C5-convertases (C4bC2aC3bn).

1.3.3 Via Alternativa

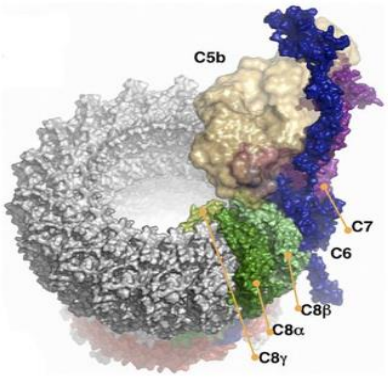
A Via Alternativa é continuamente ativada em condições fisiológicas normais do hospedeiro. Esta via é iniciada pela hidrólise espontânea da ligação tiól-ester encontrada na cadeia α intacta do C3 nativo (Law et al., 1979). A C3(H_20) formada possui sítio de ligação para o Fator B (FB). Tal ligação ocorre na presença de íons Mg^{++} e, uma vez ligado, o FB sofre ação proteolítica do Fator D (FD) gerando os fragmentos Ba e Bb. O fragmento Bb permanece ligado a C3(H_20), formando a primeira C3-convertase da Via Alternativa, a C3(H_20)Bb (Lachmann, Hugher-Jones, 1984; Law, Dodds, 1990). Os níveis de deposição de C3 podem ser aumentados por uma alça de amplificação da Via Alternativa. A molécula properdina, que opera exclusivamente nesta via promove a estabilidade dos complexos C3-convertases, que clivam C3 em C3a e C3b (Medicus et al., 1976). Uma vez que as moléculas C3b se associam ao FB, e este pode sofre posterior clivagem pelo FD e consequentemente geram a segunda C3-convertase conhecida como C3bBb (Fearon et al., 1973).

No segundo momento de ativação da Via Alternativa, o complexo C3bBb participa na clivagem de mais moléculas C3 e a contínua deposição de C3b nas imediações, favorecendo a formação da C5-convertase (C3bBbC3bn). A C5-convertase cliva a proteína C5 em C5a e C5b. O C5b se associa a C6, C7, C8 e C9, culminando na gênese do MAC, da mesma maneira como ocorre nas outras vias de ativação do SC.

1.3.4 Complexo de Ataque à Membrana

O MAC é formado ao final da ativação das três cascatas do SC. Iniciado pelo complexo C5-convertase, o fragmento C5b ainda associado a esta enzima passa a interagir com a proteína C6, que por sua vez, é capaz de interagir com a proteína C7 em fase aquosa. Os componentes C6 e C7 são as primeiras moléculas que se associam ao fragmento C5b, formando o complexo C5b67, o qual é inserido na membrana plasmática, permitindo a inserção da proteína C8. Para a formação completa do MAC, várias moléculas de C9 também são incorporadas na membrana alvo ($C5b6789_n$), formando um grande poro de atividade citotóxica, culminando em lise celular osmótica (Morgan, Harris, 1999) (**Figura 6**).

Figura 6 - Complexo de Ataque à Membrana.



Com a clivagem de C5 pelas C5-convertases são gerados os fragmentos C5a e C5b. A molécula C5a é libertada na circulação e o C5b associado a C5-convertase passa a interagir com as moléculas C6, C7, C8 e várias moléculas de C9, gerando um grande poro na bicamada lipídica conhecido como MAC (Aleshin et al., 2012).

1.4 Funções do Sistema Complemento

O SC participa dos mecanismos de ação desenvolvidos contra bactérias invasoras e na eliminação de diversos outros patógenos. Ativado por esses microrganismos, numerosos produtos são gerados durante a sua ativação, que vão

exibir potentes estímulos designados para permitir a ativação da resposta imunológica (Ricklin et al., 2010).

A sequência de eventos após a ativação do SC pode incluir a geração de anafilotoxinas, como os fragmentos C3a e C5a, conhecidos como potentes mediadores pró-inflamatórios. Ambos possuem funções comuns relacionadas a processos que envolvem a capacidade de orientar a migração de leucócitos circulantes para os tecidos, estimular mastócitos e basófilos a liberarem histamina, ativar células endoteliais, aumentando a expressão de moléculas de superfícies como β2 integrina, auxiliar na geração de citocinas e oxidantes em células fagocíticas e promover a ativação dos complexos inflamassomas (Dias da Silva, 1967; Johnson et al., 1975; Elsner et al., 1994; Ember et al., 1994; Foreman et al., 1994; Daffern et al., 1995; Hartmann et al., 1997; Albrecht et al., 2004; Laudisi et al., 2013).

O SC também coopera com as células fagocíticas, uma vez que são recrutadas por quimiotaxia pelos fragmentos C3a e C5a para o sítio inflamatório, essas células internalizam agentes infecciosos via receptores de superfície tais como TLRs, receptores de manose (MRs), receptores de Complemento (CRs) e receptores para porção Fc de anticorpos IgG (FcϒRs) (Underhill, Goodridge, 2012).

O C1q e os fragmentos C3b, iC3b e C4b, são opsoninas que se fixam na superfície de microrganismos e células apoptóticas. Essas moléculas intensificam o processo de fagocitose, uma vez que a opsonização por estas aumenta a habilidade de macrófagos e neutrófilos em fagocitar os microrganismos e promover a eliminação das partículas alvo (Bohlson et al., 2014).

Os CRs estão presentes nos macrófagos e a fagocitose mediada por esses receptores ocorre por um processo dependente de uma variedade de proteínas do citoesqueleto, como F-actina, vinculina, paxilina, entre outras. Após a ligação das opsoninas complexadas aos antígenos aos receptores específicos permitem a formação de pequenos pseudópodes. Essa interação é suficiente para permitir a ingestão do microrganismo e a subsequente fagocitose. A internalização destas partículas por CRs requer a participação de microtúbulos e é acompanhada pelo acúmulo de vesículas compostas por proteínas do citoesqueleto que formam o fagossomo (Aderem, Underhill, 1999).

Mediante a interação de C1q e C3b com os receptores CR1 presentes em macrófagos, neutrófilos e outras células sanguíneas ocorrem o processo de adesão

de células apoptóticas, debris celulares e de imunocomplexos presentes na circulação (Korb, Ahearn, 1997). A opsonização dessas partículas com os fragmentos do SC promove o deslocamento destas para o fígado e baço, onde serão removidas por macrófagos teciduais. Além disso, as células de Kupffer murinas expressam o *complement receptor of the immunoglobulin superfamily* (CRIg), capaz de interagir com o fragmento C3b ligado ao antígeno, resultando no processo de fagocitose (Cornacoff et al., 1983; Klickstein et al., 1997; Helmy et al., 2006).

Como opsonina, o fragmento iC3b é considerado mais potente do que os outros fragmentos do SC, já que apresenta alta afinidade de interação com receptores pertencentes à família das integrinas caracterizados por CR3 (CD11b/CD18) e CR4 (CD11c/CD18), bem como com o CRIg, cuja interações promovem a fagocitose de microrganismos por macrófagos (Johnson et al., 1984; Ezekowitz et al., 1985; van Lookeren Campagne et al., 2007).

Macrófagos também podem secretar componentes do SC, especialmente elementos que compõem a Via Alternativa, tais como FB, FD, C3, C5 e properdina (Hartung, Hadding, 1983). A liberação dos componentes no meio extracelular pode culminar na geração de C3-convertases, clivando os fragmentos C3 em C3a e C3b, e a ação local desses mediadores pode aumentar os processos de opsonização, bem como de fagocitose (Ezekowitz et al., 1984). Além disso, a properdina também pode se ligar a partículas alvos, podendo contribuir tanto para os processos de opsonização quanto para a fagocitose (Flierman, Daha, 2007; Kemper et al., 2008).

As proteínas do SC também estão envolvidas na regulação e ativação dos linfócitos T devido à secreção local de C3a para o meio extracelular. A anafilotoxina C3a é importante para manter a sobrevivência dos linfócitos T e, quando em cooperação com a opsonina C3b, pode induzir a diferenciação dos linfócitos $TCD4^+$ para o padrão TH1, sendo essa função importante para a secreção da citocina pró-inflamatória IFN-gama (IFN-γ) (Kolev et al., 2015).

Linfócitos T ativados também são capazes de secretar o componente C3 e a clivagem intracelular da molécula ocorre mediante ação de enzimas catepsinas L (Liszewski et al., 2013), tais fragmentos gerados localmente podem contribuir para a modulação de linfócitos T humanos. Em camundongos, a modulação de linfócitos T pode ser influenciada por C3a, entretanto, a clivagem extracelular de C3 é

dependente da formação das C3-convertases, gerada após a secreção de C3, FB e FD, proteínas que compõem estes complexos (Lalli et al., 2008; Strainic et al., 2008).

A ativação dos linfócitos B inicia-se pela interação do receptor para antígenos (BCR) presente na superfície celular, representado por (IgM e IgD) e duas cadeias polipeptídicas (Igα e Igβ), responsáveis por desencadear uma sequência de eventos intracelulares (Batista, Harwood, 2009). A influência do SC na sinalização dos linfócitos B ocorre a partir da existência de um complexo trimolecular caracterizados pelo CR2 e por duas outras proteínas denominadas como CD19-CD81 presentes nessas células, o qual tem função de interagir com os antígenos opsonizados com os fragmentos iC3b, C3d e C3d(g) (Fang et al., 1998; Carroll, Isenman, 2012).

Existem duas modalidades distintas para a interação do antígeno opsonizado com os fragmentos ligados ao CR2: 1) a primeira função ocorre na superfície celular do linfócito B, no qual o receptor BCR atua em conjunto com os correceptores CD19-CD81 potencializando a ativação e expansão clonal dos linfócitos B, e, 2) a segunda função envolve os processos de maturação de afinidade, troca de isótipo, geração de linfócitos B efetores de memória, ocorrendo em centros germinativos com a participação de células foliculares dendríticas, cuja interação dos receptores CR2 com antígenos opsonizados com os fragmentos derivados de C3 garante a retenção prolongada do antígeno nesses locais para o reconhecimento por linfócitos B (Ahearn et al., 1996; Fischer et al., 1996; Roozendall, Carroll, 2007).

1.5 Sistema Complemento e leptospiras

A importância do SC contra as leptospiras é denotada pela eliminação eficiente de algumas estirpes saprofíticas, enquanto outras estirpes que apresentam fatores de virulência não são eliminadas pelos seus mecanismos (Meri et al., 2005; Barbosa et al., 2009). Estudos anteriores realizados por nosso grupo demonstraram que as leptospiras patogênicas são capazes de secretar proteases que promovem a clivagem de importantes proteínas que compõem as três vias de ativação do Sistema Complemento, tais como: C3, C3b, C4b, iC3b, FB e C2 e também as proteínas C6, C7, C8 e C9 que compõem o MAC. Nesses estudos foram utilizados

sobrenadantes de culturas de espécies patogênicas como fonte de proteínas que interagissem com as proteínas pertencentes ao SC. Observou-se que essas bactérias apresentam uma classe de proteases que são secretadas nessas culturas e quando incubadas com as proteínas inativam as três vias do Complemento (Fraga et al., 2014; Amamura et al., 2017).

Outro estudo realizado por nosso grupo demonstrou uma interação entre o sistema fibrinolítico e o SC, onde as leptospiras patogênicas foram capazes de interagir com o plasminogênio. Em sua forma ativa (plasmina) e proteínas *leptospiral immunoglobulin-like proteins* (Ligs) presentes na membrana externa dessas leptospiras. Os resultados revelaram que as leptospiras, por meio de suas proteínas de membrana LigA e LigB interagiram com o plasminogênio gerando plasmina, esta capaz de degradar as proteínas C3, C3b e C5 (Castiblanco-Valencia et al., 2016).

Além disso, também foi demonstrado que as leptospiras patogênicas interagem com os reguladores Fator H (FH) e C4b-*binding protein* (C4BP). O FH atua na Via Alternativa, inibindo a ligação do fragmento Bb ao C3b, impedindo a formação e acelerando o decaimento da C3-convertase. O análogo processo regulatório ocorre na Via Clássica e na Via das Lectinas, quando a proteína C4BP está em atuação. A interação das leptospiras patogênicas com qualquer um dos reguladores pode representar um poderoso mecanismo de escape, uma vez que tanto o FH como o C4BP, são co-fatores para a atividade da serino-protease Fator I (FI), responsável pela clivagem das opsoninas C3b e C4b (Barbosa et al., 2009; Castiblanco-Valencia et al., 2012).

1.6 Resposta imune à leptospirose

A grande maioria dos estudos sobre o reconhecimento de padrões moleculares de leptospira centrou-se sobre o papel dos TLRs. Mediante o reconhecimento do LPS pelo TLR-4, são deflagradas vias que culminam na ativação do fator de transcrição nuclear *factor kappa b* (NF-kb) pela molécula adaptadora *myeloid differentiation primary response protein 88* (MyD-88), estimulando a produção de citocinas (Medzhitov et al., 1997; Adachi et al., 1998). Estes receptores são importantes para o reconhecimento das leptospiras em células murinas que reconhecem o LPS mediante a participação dos receptores TLR-2 e TLR-4,

enquanto que em células humanas, o reconhecimento do LPS de leptospiras e sinalização dessa molécula ocorrem apenas pela via de TLR-2 (Nahori et al., 2005; Chassin et al., 2009).

Para demonstrar a importância da molécula TLR no reconhecimento das leptospiras em células murinas, nos estudos realizados por Viriyakosol et al. (2006) foram utilizados camundongos C3H/HeJ, pertencentes a uma linhagem que apresenta deficiência especificamente na molécula TLR-4 e, como resultado, foi observado que esses animais foram susceptíveis à infecção letal causada pela estirpe patogênica *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae. Os animais desenvolveram os sintomas graves da doença, como disfunção hepática e renal, bem como hemorragia pulmonar. Além disso, também foram observados baixos níveis de citocinas inflamatórias, como interleucina (IL)-6 (IL-6) e *tumor necrosis factor* (TNF-α) em comparação com os camundongos selvagens.

Em camundongos infectados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni, foi demonstrado que TLR-2 e TLR-4 também estão envolvidos na sinalização de complexos inflamassomas. Como primeiro sinal, o LPS é reconhecido pelos TLRs e, em seguida, uma glicoproteína presente na membrana externa das leptospiras promove a regulação da bomba de Na^+ e K^+, levando à ativação de *Nod-like receptor protein* 3 (NLRP3) e a secreção das citocinas IL-1β e IL-18 (Lacroix-Lamandé et al., 2012).

Além do reconhecimento das leptospiras por TLR-2 e TLR-4, Cinco et al. (2002), demonstraram o envolvimento do CR3 presente em macrófagos murinos (receptor comum dos fragmentos C3b e iC3b) na interação direta de leptospiras fixadas à fibronectina, mediando a fagocitose sem opsoninas, uma vez que os receptores interagem com moléculas de adesão tais como: fibrinogênio, fibronectina, vitronectina entre outros componentes da matriz extracelular (Takada et al., 2007).

Os anticorpos desenvolvidos contra as leptospiras desempenham um papel fundamental na proteção da infecção por leptospirose. Adler e Faine (1976), concluíram que os anticorpos são essenciais para promover imunidade protetora, uma vez que os camundongos tratados com ciclofosfamida foram suscetíveis ao desafio letal por leptospiras. Tal substância é responsável pela inibição de linfócitos B (Turk, 1973). Jost et al. (1986) também demonstrou que os anticorpos foram importantes para proteger animais da infecção letal por leptospiras, os quais foram imunizados passivamente com anticorpos contra o LPS antes do desafio.

1.6.1 Os macrófagos na infecção por Leptospira spp.

Vários trabalhos foram realizados na tentativa de elucidar o papel dos macrófagos na fagocitose de leptospiras. Os macrófagos foram reconhecidos como um importante mecanismo de defesa imune, uma vez que a depleção de macrófagos em camundongos tratados com sílica ocasionou a morte dos camundongos infectados com as leptospiras (Isogai et al., 1986).

Após o reconhecimento do microrganismo, a fagocitose ocorre com a formação do fagolisossoma, um processo em que promove a extensão da membrana fagocítica e posterior fusão com os grânulos lisossomais. Dentro desses compartimentos especializados ocorre a digestão intracelular dos microrganismos (Cohn, Hisch, 1960). A morte dos microrganismos dentro do fagolisossoma é controlada por diversas enzimas proteolíticas presentes nos lisossomos. Outro processo chave que ocorre na membrana dos fagolisossoma, é a geração de metabolitos oxidativos, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ânion superóxido (O_2^-), a partir da oxidação da enzima NADPH oxidase, um sistema conhecido como explosão respiratória (Bedard, Krause, 2007).

A enzima catalase, codificada pelo gene *katE* e expressa durante a fase de infecção por leptospiras, é uma molécula reconhecida por desempenhar um papel na infecção. Neste contexto, as espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas durante a formação da explosão respiratória podem ser degradadas pela enzima catalase, conferindo as leptospiras resistência à capacidade destrutiva dos macrófagos (Eshghi et al., 2012).

Além dos ROS, a geração de NO complementa o quadro de ativação dos macrófagos, cujos efeitos também podem controlar e eliminar o agente patogênico. O NO é uma molécula intermediária do nitrogênio, sua síntese é dependente da metabolização da arginina, catalisado pela enzima óxido nítrico induzível sintetase (iNOS), cuja expressão ocorre por estímulos ao reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), ativando TLRs, especialmente na presença de INF-ϒ (Mantovani et al., 2004).

Prêtre et al. (2011) observaram uma elevada produção do NO em camundongos e hamsters infectados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni, cujos efeitos da molécula reduziram a carga de leptospiras nos rins e diminuíram a mortalidade dos animais infectados. Além disso, também foi demonstrado que

culturas de células de Kupffer, quando estimuladas com a lipoproteína LipL32 das leptospiras, produzem intermediários de nitrogênio que podem controlar e inibir a replicação das leptospiras (Yang et al., 2002).

Em outro estudo realizado com as espiroquetas, os anticorpos foram considerados como os elementos mais importantes para a opsonização de leptospiras, facilitando a internalização destas bactérias por monócitos e macrófagos (Faine et al., 1964; Banfi et al., 1982; Wang et al., 1984).

A polimerização da actina desempenha um papel importante na movimentação do microrganismo para o interior da célula no processo de fagocitose (Aderem, Underhill, 1999). Em estudos utilizando uma linhagem de células de macrófagos murinos J774A.1, foi demonstrado que a internalização das leptospiras foi mediada por endocitose, uma rota independente da polimerização dos filamentos de actina, sugerindo que a entrada das leptospiras foi independente de fagocitose. Além disso, a presença de leptospiras nos compartimentos vesiculares foi confirmada pelo marcador da proteína de membrana associado aos lisossomos (LAMP-1). Dessa forma, os autores sugeriram que as leptospiras poderiam evitar a ativação de outros mecanismos de ação desencadeados por esta via fagocítica (Liu et al., 2007). Entretanto, foi observado que as leptospiras fagocitadas pela linhagem de macrófagos humanos THP-1 escapam para o citosol e ainda são capazes de sobreviver e se replicar nessas células (Li et al., 2010).

O processo de apoptose é um tipo de morte celular programada e trata-se de um mecanismo que pode ser utilizado pelos patógenos para escapar da morte pelos fagócitos, como por exemplo, as bactérias *Listeria monocytogenes* e *Shigella flexneri*, utilizam do mecanismo para escapar dos macrófagos e serem libertadas para o meio extracelular (Zychlinsky et al., 1992; Barsig, Kaufmann, 1997). Em um estudo realizado por Jin et al. (2009), foi relatado que a *L. interrogans* sorovar Lai foi capaz de induzir apoptose nos macrófagos por meio da ativação de proteases, mais especificamente, pelas vias das caspases-3 e caspases-8.

Estudos relatam que as leptospiras patogênicas são capazes de sobreviver e se multiplicar dentro e fora dos macrófagos (Cinco et al., 1981). Na tentativa de distinguir mecanismos intracelulares após a fagocitose de leptospiras patogênicas por macrófagos murinos foi utilizada a *L. interrogans* sorovar Manilae UP-MMC-NIID. Os autores observaram que a estirpe não foi capaz de induzir apoptose nos macrófagos murinos, mesmo sendo esta considerada uma estirpe altamente

virulenta. Suas conclusões foram baseadas em observações microscópicas que mostraram leptospiras intactas dentro dos vacúolos fagocíticos, aumento e replicação das leptospiras nesses compartimentos e liberação das espiroquetas no meio extracelular após 24 horas de incubação e sem causar apoptose celular (Toma et al., 2011).

Estudos que possam determinar a interação dos fatores de virulência das leptospiras com macrófagos humanos e murinos ainda são limitados. Apenas dois destes estudos confirmam que as proteínas de membrana externa LMB 216 e LigB, como tendo um papel na infecção dos macrófagos murinos, promovendo o aumento da taxa de absorção das leptospiras (Toma et al., 2014).

Diante das diversidades dos mecanismos de fagocitose, nosso grupo deseja aprofundar os conhecimentos acerca dos processos de fagocitose a fim de explorar e entender a participação do SC na opsonização destas bactérias.

1.7 Proteína C3

C3 é uma molécula que desempenha inúmeras funções após sua clivagem pelas C3-convertases. Além das C3-convertases, outras moléculas como a trombina podem assumir ação enzimática sobre C3, o que consequentemente leva à geração dos fragmentos ativos como C3a e C3b (Lambris, 1988; Huber-Lang et al., 2006).

O gene *C3* humano está localizado no cromossomo 19 e a proteína é composta pela cadeia α (110 kDa) e cadeia β (75 kDa), unidas entre si por pontes dissulfeto. Sua concentração sérica corresponde a aproximadamente 1,2 mg/ml em humanos (Lambris, 1988; Morley, Walport, 2000).

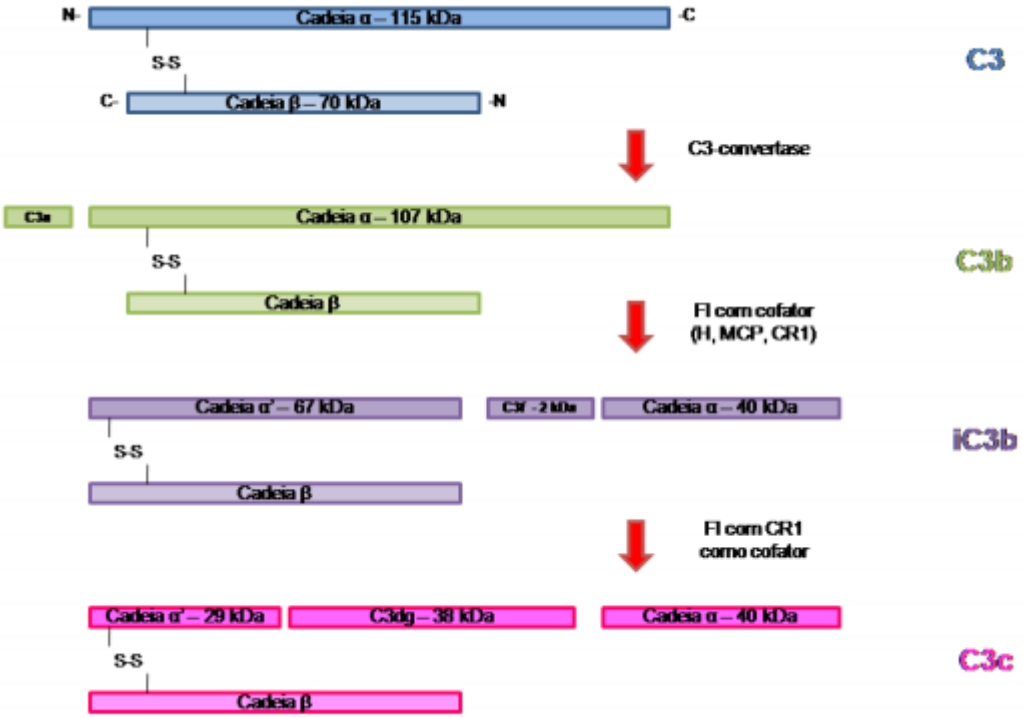
A proteína C3 é sintetizada como uma pró-molécula que sofre modificações pós-traducionais que incluem a clivagem do peptídeo sinal (22 aa), remoção de uma sequência de 4 argininas, glicosilação e formação da ligação tiol-éster intracadeia (Law et al., 1979).

Sintetizada principalmente pelos hepatócitos, a produção desta proteína é influenciada pelos mediadores: IL-1, IL-6, TNF-α e INF-γ, os quais induzem a síntese da proteína C3 na fase aguda em diversos tipos celulares, como monócitos/macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, células endoteliais, mioblastos, células T, astrócitos, células mesangiais glomerulares, adipócitos, osteoblastos,

células epiteliais intestinais e células dendríticas (Botto et al., 1992; Morley, Walport, 2000; Reis et al., 2006).

A molécula C3 apresenta um amplo espectro de interações por meio de determinados fragmentos gerados nas clivagens enzimáticas dessa proteína. Com a clivagem de C3, o componente iC3b é gerado após o fragmento C3b sofrer clivagem pelo FI na presença dos cofatores *membrane cofator protein* (MCP), FH e do receptor CR1 que atuam na regulação do SC. Com esta clivagem ocorre a liberação dos fragmentos C3f e o iC3b pode sofrer mais uma clivagem adicional pelo FI, gerando o fragmento C3c e C3d(g), os quais podem ser posteriormente clivados em C3d e C3dg por proteases plasmáticas (Lambris, 1988; Morley, Walport, 2000) (**Figura 7**).

Figura 7 - Representação esquemática da clivagem de C3 e seus fragmentos.



As enzimas C3-convertases clivam a proteína C3, culminando na geração dos fragmentos C3a e C3b. O fragmento C3b pode ser clivado pelo FI, na presença dos cofatores: Fator H, MCP, CR1. O fragmento iC3b, é gerado após conversão do C3b e liberação dos fragmentos C3c e C3dg, os quais podem ser clivados em C3d e C3g por proteases plasmáticas (Modificado de Botto, 2000).

1.8 Modelo animal

Modelos animais têm sido utilizados para avaliar fatores de virulência associados à patogênese da doença, fisiologia da inflamação, bem como, mecanismos que geram a resposta imune contra as leptospiras. Os roedores são considerados os principais hospedeiros de manutenção e são animais resistentes à leptospirose. Embora eles não consigam reproduzir a mesma condição de leptospirose humana durante a fase aguda, os animais acabam desenvolvendo os sintomas crônicos da doença. Além disso, modelos murinos que apresentam deficiências específicas em um determinado gene de interesse, têm sido fundamentais para a descoberta de fatores importantes para o controle da doença. Como, por exemplo, os camundongos C3H/HeJ deficientes em TLR-4, foram importantes para compreender o reconhecimento das leptospiras por células imunes (Viriyakosol et al., 2006).

Os hamsters são animais que apresentam os sinais de infecção semelhantes aos da infecção humana. Entretanto, estes animais são mais utilizados para testes de vacina ou para restauração da virulência das estirpes de leptospiras e não são considerados modelos apropriados para o estudo da doença. Além disso, não existem modelos destes animais com diferentes perfis genéticos e também faltam reagentes específicos para estudos com hamsters, o que impossibilita o desenvolvimento de técnicas utilizadas na pesquisa (Gomes-Solecki et al., 2017).

Utilizando modelos experimentais murinos, dois trabalhos foram desenvolvidos por nosso grupo. O primeiro trabalho foi realizado para investigar a importância do componente C5 na resposta *in vivo* à infecção por *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm. Os resultados demonstraram que a proteína C5 é importante para conferir proteção dos animais nos primeiros dias de infecção. Além disso, os camundongos C5 deficientes apresentaram maior quantidade de bactérias nos órgãos alvo e um menor número de células T, dependentes da estimulação de C5a, em comparação com os animais selvagens (Castro, 2014).

Concomitante a este estudo, outro trabalho foi desenvolvido por nosso grupo, utilizando o mesmo modelo murino deficiente da proteína C3, onde foi explorado *in vivo* a importância de C3 na infecção destes animais por *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm. Os principais resultados mostraram que

o componente C3 é importante para eliminação das leptospiras patogênicas, uma vez que foi mostrado *in vitro,* maior sobrevida dessas bactérias na presença do soro deficiente do camundongo B6.C3$^{-/-}$. Além disso, no fígado, baço e rins dos camundongos deficientes em C3, foram encontrados maior número de leptospiras em comparação com os camundongos selvagens (Vassalakis, 2017).

Para dar continuidade aos estudos que já foram caracterizados, neste projeto escolhemos utilizar a mesma espécie patogênica para avaliar a importância da proteína C3 na opsonização e produção de anticorpos contra *L. interrogans*.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desse projeto é avaliar a importância da proteína C3 na produção de anticorpos *in vivo* durante a infecção por leptospiras e na fagocitose *in vitro* de leptospiras por macrófagos murinos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a produção de anticorpos específicos anti-leptospira e anti-LigBC nos camundongos selvagens e deficientes da proteína C3.

- Comparar a fagocitose de espécies de leptospiras patogênica e não patogênica por macrófagos peritoneais murinos de camundongos selvagens e deficientes da proteína C3.

- Avaliar a citotoxicidade de macrófagos infectados com diferentes proporções de *L. interrogans*.

- Analisar a deposição da proteína C3 nas superfícies de espécies de leptospiras patogênica e não patogênica.

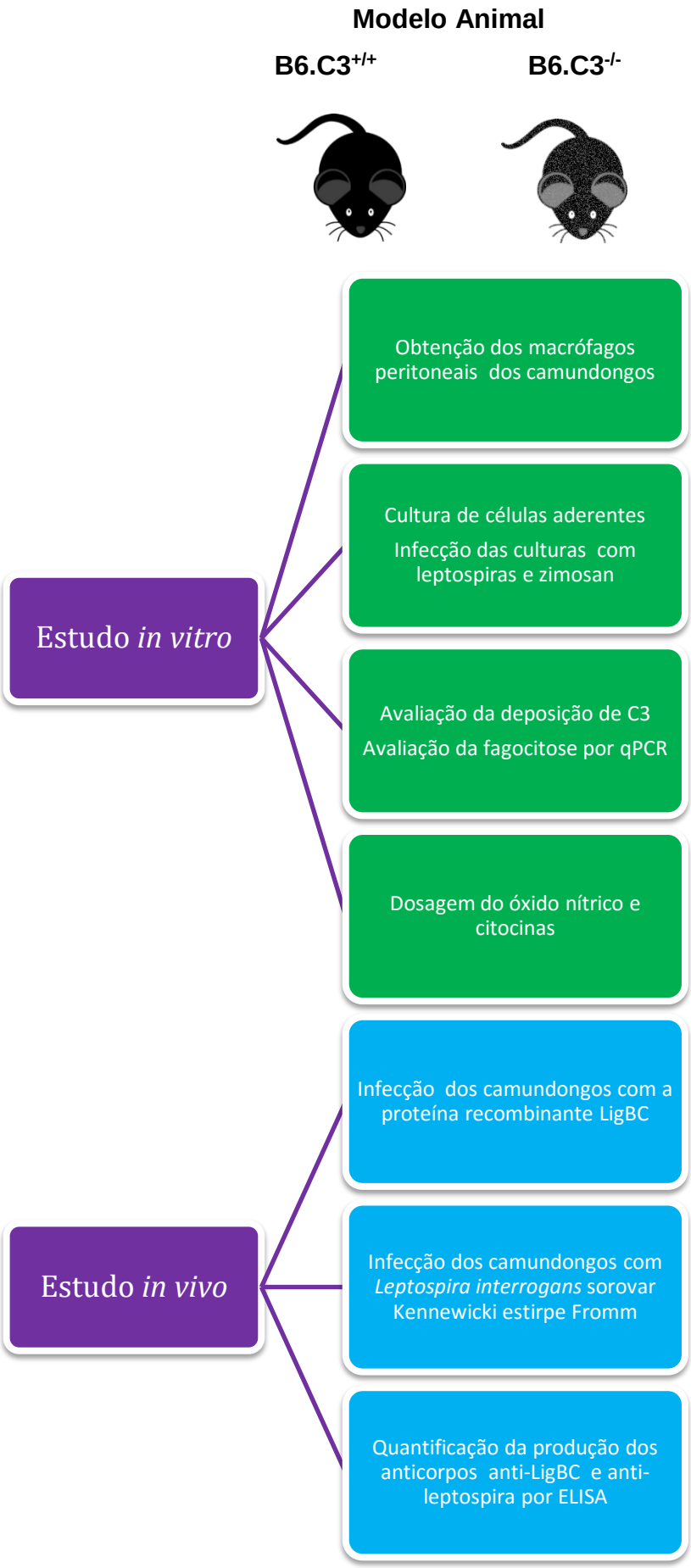
- Analisar a capacidade de opsonização dos fragmentos de C3 nas leptospiras e o processo de fagocitose destas bactérias por macrófagos peritoneais murinos.

- Comparar a fagocitose de Zimosan na presença ou ausência do soro por macrófagos peritoneais murinos obtidos de camundongos selvagens e deficientes da proteína C3.

- Determinar a importância da proteína C3 para a geração do óxido nítrico em macrófagos peritoneais murinos infectados com leptospiras.

- Quantificar a produção de citocinas sintetizadas por macrófagos peritoneais murinos em cultura, após o desafio com leptospiras.

3 Delineamento Experimental



4 Material e métodos

4.1 Modelos animais

Neste estudo foram utilizados camundongos machos da linhagem C57*Black*/6. 129S4-C3^{tm}/Crr/^{J} (deficientes de C3 B6.C3$^{-/-}$) obtidos do *The Jackson Laboratory.* Camundongos C57BL/6 (selvagens B6.C3$^{+/+}$), fornecidos pelo Biotério de Camundongos do Instituto de Ciências Biomédicas do Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo – USP foram utilizados como grupo controle. Todos os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com 5 animais, em sala climatizada até a realização dos experimentos. A execução deste projeto foi realizada em concordância com o Comitê de Ética no Uso de Animais, conforme o certificado 76/2015 (CEUA-ICB-USP).

4.2 Sorovares de leptospiras e cultivo

Para a realização dos experimentos foram utilizadas duas espécies de leptospiras: a primeira considerada uma espécie não patogênica, *Leptospira biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I, e a segunda considerada uma espécie patogênica: *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm, gentilmente cedidas pelo Professor Dr. Marcos Bryan Heinemann - Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária – USP.

A virulência da *L. interrogans* foi mantida em hamsters experimentalmente infectados com doses letais da espécie. As leptospiras foram isoladas a partir do macerado de fígado de hamsters, após a morte desses animais. As culturas de leptospiras foram mantidas por cinco dias em estufa bacteriológica a 29 °C sob condições aeróbicas em meio de cultura EMJH (líquido – BD Difco® – EUA), suplementado com 0,015% de L-asparagina, 0,001% de piruvato de sódio, 0,001% de cloreto de cálcio, 0,001% de cloreto de magnésio, 0,03% de peptona e 0,02% de extrato de carne. Este procedimento é rotineiramente realizado no Laboratório de Zoonoses Bacterianas pela Dra. Gisele Oliveira de Souza.

4.3 Confirmação da deficiência de C3 dos animais B6.C3$^{-/-}$

4.3.1 Extração de DNA da cauda e reação de PCR

Para extrair o DNA dos animais para confirmação do seu genótipo, foram coletadas as caudas dos casais de machos e fêmeas obtidos do *The Jackson Laboratory.* Foi retirado cerca de 1 cm de cauda de cada animal e armazenado em nitrogênio líquido, e posteriormente -20 °C até o momento da extração. O material foi macerado sobre uma placa de metal congelado e passado para um tubo contendo 200 µl de tampão de lise Tris HCl 50 nM pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0; SDS 0,5% com 1,5 mg/ml de proteinase K e incubado por 2 h a 65 °C. Posteriormente, foram acrescentados mais 200 µl do mesmo tampão de lise sem a proteinase K e as amostras foram centrifugadas por 20 min a 13000 *g* em temperatura ambiente (TA). O sobrenadante foi recolhido e transferido para um novo tubo onde foi precipitado com 800 µl de etanol absoluto e mais 40 µl de acetato de sódio 3 M e centrifugado por 5 min a 2300 *g*. O DNA foi, então, lavado com etanol 70% e após essa etapa foi adicionado 200 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM (TE) para ressuspender a amostra. Após a extração, o DNA foi quantificado empregando-se espectrofotômetro GeneQuant *pro RNA/DNA Calculator* (Biosciences Amersham, Inglaterra, Reino Unido). Para a confirmação do genótipo dos animais, empregamos a reação em cadeia usando PCR (**Tabela 1**). Empregando o *kit Illustra TM Taq DNA Polimerase* (cat. 27-0798-06, GE Healthcare Limited, Inglaterra, Reino Unido) e para a purificação dos fragmentos amplificados, utilizamos o *kit Illustra TM PCR, DNA and Gel Band Purification* (cat. 28-9034-70, GE).

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para a confirmação do genótipo dos animais.

Identificação	Sentido 5' → 3'
C3 Comum Forward	ATC TTG AGT GCA CCA AGC C
C3 Selvagem Reverse	GGT TGC AGC AGT CTA TGA AGG
C3 Mutante Reverse	GCC AGA GGC CAC TTG TGT AG

PCR	
Reagentes	**1 x**
Água	23,8
Tampão 10 x	6,0
$MgCl_2$ 25 mM	6,0
dNTP 2,5 mM	4,8
C3 Comum Forward 20 µM	3,5
C3 Selvagem Reverse 20 µM	3,5
C3 Mutante Reverse 20 µM	2,0
Taq 5 U/µl	0,4
DNA 300 ng/µl	10
Volume final	60 µl

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

Os camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ foram anestesiados, via intraperitoneal, 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 5 minutos centrifugado a 1700 *g* por 15 min a 4 °C para separação dos soros. Os soros obtidos foram alicotados e armazenados a -80 °C, até o momento de uso.

4.5 Determinação da atividade hemolítica

Utilizamos eritrócitos de coelho gentilmente cedidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Para avaliar a atividade da Via Alternativa os eritrócitos foram coletados de coelhos em solução anticoagulante de Alsever. Para os experimentos foram utilizados eritrócitos lavados 3 x em tampão *gelatin veronal buffer* (GVB) com 0,1% gelatina, 5 mM Veronal, 145 mM NaCl, 0,025% NaN_3, 0,5 M de $CaCl_2$, ácido tetra-acético etilenoglicol (EGTA) 0,2 M e $MgCl_2$ O,2 M pH 7,4 centrifugados por 10 min a 1125 *g* a 4 °C. Depois de lavados, os eritrócitos foram preparados em uma suspensão de 3% no mesmo tampão GVB-EGTA-Mg^{++}. Os soros de camundongos foram diluídos seriadamente de 1:2 a 1:16 em tubos *eppendorf* e mantidos em banho de gelo. Em uma placa de 96 poços (Costar, *medium binding – polystirene*, Corning, Inc.) os soros foram adicionados em um volume de 100 µl e na mesma placa também foram adicionados 100 µl da suspensão de eritrócitos de coelho. Como controle, foram

incluídos os poços correspondentes a 100% de lise e 0% de lise dos eritrócitos. A placa foi incubada a 37 °C por 30 min e para interromper a reação foram adicionados aos poços 15 µl de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Em seguida, a placa foi centrifugada a 1125 *g* por 7 min a 4 °C. A leitura da absorbância dos sobrenadantes foi feita a 405 nm.

Comparamos os valores obtidos com o esperado de 100% de hemólise descontando-se o controle negativo (branco): % de lise = [(D.O. amostra – D.O. branco) / (D.O. 100% - D.O. branco)] x 100. Em seguida, calculamos o volume necessário de soro, para hemolisar 50% de eritrócitos. Uma unidade de AP50 representa o volume necessário para hemolisar 50% de eritrócitos. O número de unidades AP50 será expresso considerando-se 1 ml de soro.

4.6 Seleção da proteína recombinante para ensaio de imunização

As proteínas presentes na espécie patogênica *L. interrogans* e candidatas para o ensaio de imunização foram expressas em nosso laboratório pela Dra. Mónica Marcela Castiblanco-Valencia (**Tabela 2**).

Para escolha da proteína a ser utilizada no ensaio de imunização dos camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$, as proteínas foram submetidas à separação por SDS-PAGE 12% em condições não redutoras com tampão de amostra (sem β-mercaptoetanol) e transferidas para membrana de fluoreto polivinidileno (PVDF). Para visualização das proteínas, a membrana foi corada com *Coomassie Brilliant Blue* R-250 0,1% (Sigma-Aldrich) contendo 50% de metanol e descoradas com ácido acético 10% contendo 50% de metanol.

Tabela 2 - Nomenclatura das proteínas recombinantes de *L. interrogans.*

Nomenclatura das proteínas recombinantes de *L. interrogans*	**Característica**	**Massa molecular (kDa)**
LipL32	Lipoproteína	32
LigAC	Proteína de superfície com domínios *Ig-like*	63
LigBC	Proteína de superfície com domínios *Ig-like*	56

4.7 Imunização dos animais com a proteína recombinante LigBC

Para avaliar a participação de C3 na estimulação da produção de anticorpos, grupos de sete camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ foram inoculados por via intraperitoneal com doses de 250 µl contendo 5 µg da proteína recombinante LigBC misturado com 50 µl de hidróxido de alumínio (10 mg/ml) em 0,130 M de NaCl, 0,002 M de KCl, 0,010 M de Na_2HPO_4 e 0,001 M de KH_2PO_4, pH 7,4 (PBS 1 x). Depois de 15 dias, os animais receberam a mesma dose em uma segunda imunização intraperitoneal e, após uma semana desta última inoculação, os animais foram então anestesiados e sangrados pelo plexo orbital para a coleta do sangue. Em seguida, as amostras de sangue foram processadas para obtenção dos soros imunes. Como controle negativo, foram utilizadas amostras de soros coletados de camundongos inoculados apenas com PBS.

4.8 Imunização dos animais com *L. interrogans*

Culturas de *L. interrogans* foram centrifugadas a 4.487 *g* por 20 min a 20 °C. Em seguida, as culturas foram lavadas 2 x com PBS 1 x. Após esta etapa, as culturas foram ressuspendidas em 1 ml de PBS 1 x e o número de bactérias foi determinado empregando microscopia óptica sob campo escuro. Grupos de sete camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ foram inoculados por via intraperitoneal com 1,5 x 10^8 leptospiras/ml. Após 15 dias, os animais receberam o mesmo inóculo em uma segunda imunização e após uma semana desta última inoculação, os animais foram anestesiados e sangrados pelo plexo orbital para obtenção do sangue e posteriormente dos soros para análise da produção de anticorpos anti-leptospiras. Como controle negativo, foram utilizadas amostras de soros pré-imunes coletadas dos dois grupos de animais antes das imunizações com as leptospiras.

4.9 Determinação da concentração de anticorpos específicos contra as proteínas LigBC

A proteína recombinante LigBC (5 µg/ml) foi diluída em tampão 0,1 M $NaHCO_3$, 0,1 M Na_2CO_3, pH 9,6 e imobilizada em placas de 96 poços (Costar*, high binding*, Corning Inc.) por 16 h a 4 °C. No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 x com PBS-T. Os sítios de ligação não específicos foram bloqueados com 10% de leite desnatado em pó (Molico®) diluído em PBS-T por 2 h a 37 °C. Após o período

do bloqueio, os soros foram diluídos seriadamente de 1:100 a 1:25600 com 1% de leite desnatado em pó diluído em tampão PBS-T e adicionados às placas. As placas foram incubadas por 1 h a 37 °C e após o término da incubação, adicionou-se o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo produzido em coelho e conjugado com peroxidase (KPL) na diluição de 1:5000 em tampão PBS-T. A revelação foi feita utilizando a solução contendo o substrato dihidrocloreto de orto-fenilenodiamina (OPD) 0,04% diluído em tampão citrato de sódio dibásico 0,1 M e fosfato de sódio monobásico 0,2 M pH 5,0 e H_2O_2 0,015%. A reação foi interrompida com a adição de 50 µl de H_2SO_4 4 N. A leitura de absorbância foi realizada em microleitor de ELISA (*Labsystems Uniscience, Multiskan EX*) no comprimento de onda de 492 nm.

4.10 Determinação da concentração de anticorpos específicos contra *L. interrogans*

Culturas de *L. interrogans* foram centrifugadas a 2800 *g* por 20 min a 20 °C. Em seguida, as culturas foram lavadas 2 x com PBS 1 x. Após lavagens, as leptospiras foram inativadas a 100 °C por 30 min, e em seguida, foram ressuspendidas em tampão 0,1 M $NaHCO_3$, 0,1 M Na_2CO_3, pH 9,6. Para a cobertura das placas de 96 poços (Costar*, high binding*, Corning Inc.) foram utilizados 100 µl da suspensão de leptospiras inativadas correspondendo a 10^8 leptospiras/ml por poço. As placas foram mantidas por 16 h a 4 °C. No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 x com PBS-T. Os sítios de ligação não específicos foram bloqueados com 10% de leite desnatado em pó diluído em PBS-T por 2 h a 37 °C. Após o período de bloqueio, os soros foram diluídos seriadamente de 1:100 a 1:25600 em tampão com 1% de leite desnatado em pó diluído em PBS-T e adicionados às placas. As placas foram incubadas por 1 h a 37 °C e após o término da incubação, adicionou-se o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo produzido em coelho e conjugado com peroxidase (KPL) na diluição de 1:5000 em tampão PBS-T. A revelação foi feita utilizando o substrato OPD 0,04% diluído em tampão citrato de sódio dibásico 0,1 M e fosfato de sódio monobásico 0,2 M pH 5,0 e 0,015% de H_2O_2. A reação foi interrompida com a adição de 50 µl de H_2SO_4 4 N. A leitura de absorbância foi realizada no comprimento de onda de 492 nm em microleitor de ELISA.

4.11 Obtenção e cultivo de macrófagos peritoneais murinos

Os camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ foram injetados com de 1 ml de tioglicolato (Sigma-Aldrich) estéril e aquecido antes do seu emprego a 4% na cavidade peritoneal. O tioglicolato é uma substância irritante capaz de provocar o aumento do número de células inflamatórias *in vivo* para o exsudato peritoneal. Após 3 dias de estimulação, os animais foram anestesiados e sacrificados e, introduzindo-se intraperitoneal 5 ml de PBS 1 x gelado por camundongo. As células peritoneais foram coletadas e centrifugadas a 600 *g* por 10 min a 4 °C. Posteriormente, o sedimento foi ressuspenso em 1 ml de RPMI 1640 (Sigma-Aldrich). A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer e ajustada para a concentração desejada de 2 x 10^5 células peritoneais. Alíquotas de 200 µl/poço da suspensão foram adicionadas em placas de 24 poços (Costar, placa de cultura celular estéril, Corning Inc.) e foram mantidas sob as condições de 5% de CO_2 por 2 h a 37 °C. Após este período, os poços foram lavados 3 x com PBS 1 x para remoção das células não aderentes e, após o término das lavagens, RPMI 1640 foi adicionado nas placas contendo majoritariamente macrófagos aderentes que foram mantidos a 5% de CO_2 por 16 h a 37 °C.

4.12 Preparação das leptospiras para os ensaios de fagocitose

As suspensões de *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I (não patogênica) e *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm *interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm (patogênica) cultivadas por cinco dias, foram centrifugadas a 4487 *g* por 20 min a 20 °C e lavadas 2 x com PBS 1 x. Ao final das lavagens, os sedimentos foram ressuspendidas com 1 ml de PBS 1 x.

4.13 Cultura de macrófagos peritoneais de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ com *L. interrogans* e *L. biflexa*

As células peritoneais de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ foram incubadas em placas de 24 poços (Costar, placas de cultura celular estéril, Corning Inc.) com 2 x 10^7 de *L. interrogans* ou 2 x 10^7 de *L. biflexa* multiplicidade de infecção (MOI) de 1:50 diluídas em RPMI 1640 sem antibióticos e soro bovino fetal SBF (SBF) em um volume final de 200 µl/poço por 30 min a 37 °C. O processo de fagocitose ocorreu por 30 min e, após este período, os poços foram lavados 3 x com PBS 1 x. Após o

término das lavagens, o antibiótico gentamicina (Sigma-Aldrich) foi adicionado em cada poço em um volume final de 100 µl (25 µg/ml) por 1 h a 37 °C, a fim de eliminar as leptospiras não internalizadas pelos macrófagos. Posteriormente, os poços foram lavados novamente 3 x com PBS 1 x e ao final das lavagens, foram adicionados aos poços 100 µl de H_20 Milli-Q estéril para lise das células aderentes e contagem do número de leptospiras fagocitadas.

4.14 Avaliação da citotoxicidade dos macrófagos peritoneais infectados com *L. interrogans*

Para avaliar a citotoxicidade 2 x 10^5 macrófagos peritoneais murinos foram cultivados conforme descrição no item 4.11 foram infectados com *L. interrogans* diluídas em RPMI 1640 sem antibióticos e SBF na MOI de 1:5, 1:50 e 1:100, por 30 min, a 37 °C. Após este período, 20 µl dos sobrenadantes foram coletados e transferidos a uma nova placa de 96 poços (Costar, *medium binding* - *polystirene*, Corning, Inc.) para determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) com *kit* comercial (LDH, Labtest, SP, Brasil), conforme as instruções do fabricante. A liberação de LDH ocorre por células eucarióticas em situações de perda da integridade da membrana plasmática e, portanto, pode ser um método de avaliação de viabilidade celular. A atividade de LDH no sobrenadante de cultura é proporcional ao número de células lisadas. Como controle positivo, são utilizadas células tratadas com 2% de TRITON-X 100 em RPMI 1640 por 30 min. A liberação de LDH nesta condição foi considerada como 100% de morte celular. A absorbância foi lida em microleitor de ELISA no comprimento de onda de 340 nm.

4.15 Avaliação da deposição de C3 em *L. interrogans* e *L.biflexa*

As culturas de *L. interrogans* e *L. biflexa* foram centrifugadas a 2800 *g* por 20 min a 20 °C e ressuspendidas no final com 1 ml de PBS 1 x. Em câmara de Petroff-Hausser foram contadas 2 x10^8 leptospiras/ml que foram tratadas com 10% de soro humano normal (SHN) ou com PBS 1 x, como controle. Por 1 h as amostras foram incubadas a 37 °C. Após a incubação, as suspensões foram centrifugadas a 10.000 *g* por 15 min a 10° C e lavadas 5 x com PBS 1 x. Ao final das lavagens, as suspensões foram reduzidas com tampão β-mercapto e as deposições de C3 nas superfícies das espécies de leptospiras foram analisadas por *Western Blot.*

As suspensões foram submetidas a SDS-PAGE 12% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, a membrana foi incubada com 10% de leite desnatado em pó em PBS-T. Após este período, a membrana foi lavada 3 x com PBS-T e incubada com anticorpo primário anti-C3 humano feito em cabra (*Complement Technology*) na diluição de 1:5000 em PBS-T com 5% de leite desnatado em pó por 1 h a 37 °C. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens com PBS-T e a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-IgG de cabra conjugado à peroxidase feito em coelho (*Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.*) na diluição de 1:10.000 em PBS-T com 5% de leite desnatado em pó por 1 h a 37 °C. Ao final, a membrana foi lavada 3 x com PBS-T e a revelação foi efetuada com o *kit Enhanced Chemiluminescence System* (ECL, Amersham), conforme instruções do fabricante.

4.16 Cultura de macrófagos peritoneais de camundongos B6.C3$^{+/+}$ com *L. interrogans*

Para os experimentos envolvendo opsonização de *L. interrogans*, as culturas bacterianas foram previamente incubadas com 10% de soro de B6.C3$^{+/+}$ como fonte de opsoninas dependentes da ativação do SC. Como controle negativo, utilizamos uma fração do mesmo soro inativado pelo calor a 56 °C por 1 h ou soro de B6.C3$^{-/-}$. Outro controle negativo introduzido foi soro de B6.C3$^{+/+}$ pré-incubado com 10 mM de EDTA, quelante de Ca^{++} e Mg^{++}, inativando assim as três vias de ativação do SC.

As bactérias foram incubadas com os diferentes tratamentos de soro por 30 min a 37 °C. Ao término das incubações, as suspensões foram lavadas 3 x com PBS 1 x por 10 min a 10.000 *g* a 10 °C. Após as lavagens, as leptospiras foram ressuspendidas em 1 ml de PBS 1 x e o número de bactérias foi determinado empregando microscópio óptico e condensador para campo escuro. A concentração de 2 x 10^7 *L. interrogans* (MOI 1:50) em RPMI 1640 sem antibióticos e SBF foi adicionada em um volume final de 200 µl/poço contendo 2 x 10^5 de macrófagos cultivados conforme descrição no item 4.11 e o processo de fagocitose ocorreu por 30 min. Após este período, os macrófagos foram lavados 3 x com PBS 1 x. Ao final das lavagens, adicionamos aos macrófagos o antibiótico gentamicina diluído no RPMI 1640 em um volume final de 100 µl (25 µg/ml) por 1 h a 37 °C. Ao término das incubações, os macrófagos foram lavados 3 x com PBS 1 x e as reações foram

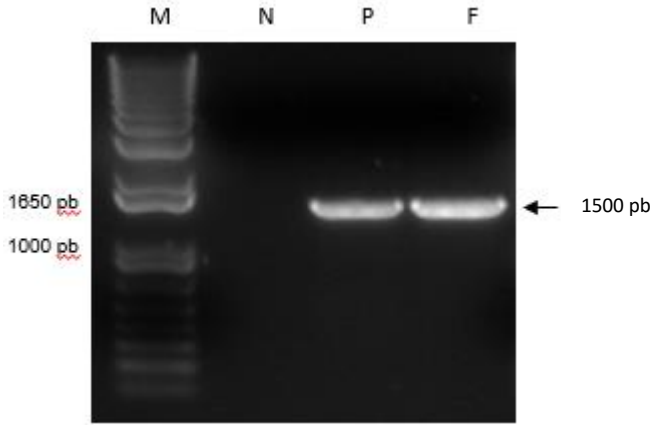
finalizadas com a adição de 100 µl de H_20 Milli-Q estéril para lise das células aderentes e contagem do número de leptospiras fagocitadas.

4.17 Extração de DNA genômico e análise da quantificação do número de leptospiras fagocitadas por macrófagos peritoneais

As avaliações dos ensaios de fagocitose foram realizadas por qPCR. As amostras contendo as leptospiras fagocitadas foram centrifugadas a 10.000 *g* por 10 min a 20 °C. O DNA total foi extraído utilizando-se o *kit Illustra Tissue & Cells Genomic Prep Mini Spin*, conforme instruções do fabricante (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK).

Para análise quantitativa das leptospiras fagocitadas, inicialmente foi feita uma curva padrão a partir do gene *16s rRNA* de leptospiras obtida por PCR convencional nas seguintes condições: 50 ng de DNA extraído das culturas de *L. biflexa* ou *L. interrogans*, 5 µl de tampão 10 x, 10 mM de dNTP, 1,5 mM de $MgCl_2$, 2 pmol/µl de oligonucleotídeos universais *16S rRNA* [5´-GAGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3´] e [5´-GAAGGAGGTGWTCCARCCGCA-3´] (Exxtend Biotecnologia Ltda) e 0,5 U de Platinum *Taq* Polimerase (Invitrogen) para um volume final de 50 µl. O PCR foi realizado em termociclador convencional (MJ Research, Waltham, MA, EUA). As amostras foram aquecidas a 94 °C por 15 min para desnaturação inicial e 25 ciclos a 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s e 72 °C por 45 s, seguido de uma extensão final a 72 °C por 10 min. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris 80 mM, ácido acético glacial 40 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,5 (TAE), corado com o corante Gel Red Nucleic Acid (Biotium). As bandas de DNA foram visualizadas sob luz UV. Em seguida, o produto de aproximadamente 1500 pb foi purificado (**Figura 8**) utilizando-se o *kit* QIAquick Gel Extraction (Qiagen, North Rhine-Westphalia, Alemanha) e espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific) para realização da curva padrão. As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de 1% agarose e o produto esperado de aproximadamente 1500 pb foi purificado. Os produtos purificados e quantificados gerados a partir do PCR convencional foram diluídos em série (na razão 10) e a curva padrão conteve 10 a 10^8 cópias de DNA. A curva padrão utilizada neste estudo, foi realizada em nosso laboratório pela Dra. Adriana Patrícia Granado Martinez.

Figura 8 - Amplificação do gene *16S rRNA* por PCR.



Produtos do gene *16S rRNA* de leptospira (1500 pb) amplificados por PCR a partir de DNA genômico de *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I e *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm. Foram utilizados os *primers* universais para o gene *16S rRNA.* (M) – Marcador de tamanho em pares de bases (pb) (*1 kb plus DNA ladder*) N – Controle negativo sem DNA, P – Patoc, F - Fromm. Imagem cedida pela Dra. Adriana Patrícia Granado Martinez.

A reação de amplificação foi realizada em microplacas (*MicroAmp*^{TM} *Optical 96-Well* - Life Technologies) conforme segue: foram as seguintes: 20 pmol/µl de cada sequência de oligonucleotídeos para a região específica do gene *16S rRNA* da *Leptospira* (*forward:* 5´- TAGTGAACGGGATAGATAC- 3´ e *reverse:* 5´- GGTCTACTTAATCCGTTAGG-3´) 10 µl de *Syber Green master mix* (Life Technologies) e 3 µl de DNA total das amostras de leptospiras fagocitadas em um volume final de 20 µl. As condições experimentais compreenderam uma desnaturação inicial a 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 min e seguido de dois ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min a uma etapa final a 0,5 – 95 °C (rampa) por 15 s. As amostras foram amplificadas no Termociclador *Step One Plus Real Time PCR System* (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA), em colaboração com o Laboratório de Microbiologia Oral da Profa. Dra. Márcia Pinto Alves Mayer.

A quantificação das leptospiras obtidas na amplificação foram multiplicadas pelo volume total da purificação e o valor final dividido por 2, uma vez que o gene *16S rRNA* é representado por 2 cópias no genoma dessas bactérias (Fukunaga, Mifuchi, 1989).

4.18 Cultura de macrófagos peritoneais derivados de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ com Zimosan na presença ou ausência do soro

Para os ensaios de fagocitose utilizando partículas de Zimosan de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich), macrófagos peritoneais de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ foram cultivados em lamínulas de vidro de 20 x 20 mm, conforme descrição no item 4.11. As partículas de Zimosan (14 mg/ml) foram fervidas por 15 min e lavadas 3 x com PBS 1 x. Em seguida, as partículas foram ressuspendidas em tampão GVB-EGTA-Mg^{++} (Rieder et al., 1988). Para opsonização, os soros de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ foram adicionados (v/v) ao Zimosan por 30 min a 37 °C. Após a incubação, as partículas de Zimosan pré-incubadas com os soros de camundongo B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ ou somente com PBS 1 x foram lavadas 3 x com PBS 1 x e ressuspendidas com RPMI 1640. As preparações foram adicionadas às culturas de macrófagos peritoneais por 1 h e mantidas a 37 °C com 5% de CO_2. Após a incubação, as lamínulas foram lavadas 3 x com PBS 1 x para remover o excesso de partículas não fagocitadas. Ao final, as lamínulas foram tratadas com fixador 5% de paraformaldeido (Sigma-Aldrich) e 4% de sacarose (Sigma-Aldrich) e mantidas por 30 min em TA. Posteriormente, o excesso de fixador foi removido após lavagens com PBS 1 x e as lamínulas foram coradas com *kit* Panócito. As análises de fagocitose foram realizadas por microscopia óptica de luz (Nikon Eclipse E200) por meio da contagem de 100 macrófagos que fagocitaram uma, três ou mais de três partículas de Zimosan.

4.19 Mensuração da produção de NO por macrófagos peritoneais infectados com *L. interrogans*

Os macrófagos peritoneais de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ cultivados nas mesmas condições descritas no item 4.11 foram infectados com 2 x 10^7 de *L. interrogans* diluídas em RPMI 1640 sem antibióticos e SBF por 24 h e 48 h. Após este período, 50 µl dos sobrenadantes foram coletados e transferidos em duplicata, para uma placa de 96 poços (Costar, *medium binding – polystirene*, Corning, Inc.). As reações foram determinadas pelo método colorimétrico baseado na reação de Griess (Chae et al., 2004). A produção de NO foi determinada pela dosagem de seu produto primário de degradação, nitrito (NO_2), o qual é mais estável. Para determinar

indiretamente a quantidade de NO gerada, a cada 50 µl de sobrenadante também foram adicionados 50 µl do reagente de Griess que contém 58 mM de sulfanilamida (Sigma) diluído em 44 µM ácido fosfórico (H_3PO_4) (Merck) e 0,38 mM de dicloridrato de N-1-naftil-etilenodiamina (Sigma). Como branco, utilizou-se 50 µl de RPMI 1640 e o mesmo volume de reagente de Griess. Uma curva padrão foi feita com diferentes concentrações de nitrito de sódio ($NaNO_2$) (Synth) (100 a 1,56 µM) e 50 µl de Griess. A placa foi protegida da luz e incubada por 10 min à TA. Ao término da incubação, a absorbância foi lida em microleitor de ELISA no comprimento de onda de 540 nm.

4.20 Dosagem de citocinas nos sobrenadantes de culturas de macrófagos peritoneais infectados com *L. interrogans*

A presença das citocinas *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), IL-6, interleucina (IL) 10 (IL-10), TNF-α e interleucina-12 (p70) (IL12p70) foi mensurada nos sobrenadantes dos macrófagos peritoneais de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ incubados com 2 x 10^7 de *L. interrogans* diluídas em RPMI 1640 sem antibióticos e SBF por 24 h e 48 h, utilizando-se o *kit* comercial (CBA *mouse* BD – *cytometric beads array*), seguindo instruções do fabricante.

4.21 Análise estatística

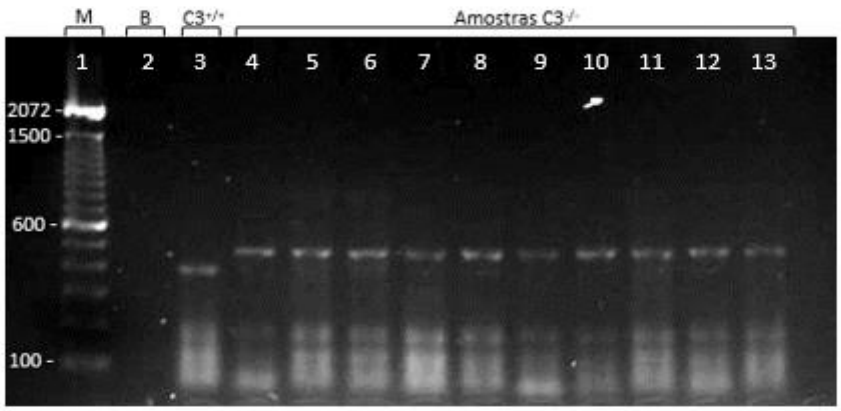
As análises estatísticas foram realizadas pela Sra. Rosana Duarte Prisco do Setor de Estatística, ICB-USP. Os ensaios de fagocitose foram avaliados empregando-se teste t-Student assumindo variâncias iguais para *L. biflexa* e variâncias diferentes para *L. Interrogans*. Os ensaios de fagocitose com soros e LDH foram analisados utilizando-se o programa ANOVA um fator, seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey. As dosagens de NO e citocinas, foram analisados empregando-se o programa ANOVA dois fatores, seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey quando necessário. A homogeneidade de variâncias foi verificada e quando necessário empregou-se transformação logarítmica. O nível de significância adotado foi $p<0,05$.

5 Resultados

5.1 Confirmação da deficiência de C3 dos animais B6.C3$^{-/-}$

Para confirmar o fundo genético dos animais B6.C3$^{-/-}$, as amostras de DNA utilizadas foram de animais que nasceram após o cruzamento dos camundongos obtidos do *Jackson Laboratory*, além de amostra de um animal B6.C3$^{+/+}$ (selvagem) usado como controle. De acordo com o fundo genético, os produtos poderiam teoricamente apresentar 3 padrões distintos: a) uma banda com 500 pb, aproximadamente, para a condição de homozigose de B6.C3$^{-/-}$; b) uma banda com 350 pb, aproximadamente, para B6.C3$^{+/+}$; (homozigoto); e, c) uma banda de 350 pb e outra banda de 500 pb, aproximadamente, correspondentes a animais heterozigotos. Observamos que o DNA de todos os animais deficientes de C3 apresentaram a banda 500 pb e enquanto o DNA do animal selvagem amplificou como esperado (350 pb) (**Figura 9**).

Figura 9 – Genotipagem de amostras de DNA de camundongos, após eletroforese em gel de agarose.



Em 1 - marcador 100 pb; B- controle negativo (sem DNA); 3 – amostra de DNA de B6.C3$^{+/+}$ (aproximadamente 350 pb); 4 a 13 - amostras de DNA de B6.C3$^{-/-}$ (aproximadamente 500 pb).

5.2 Determinação da atividade hemolítica dos soros mediada pela ativação da Via Alternativa

Após a confirmação genotípica, determinamos a atividade hemolítica do "pool" de soros dos camundongos de ambas as linhagens B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$. Para determinar a atividade funcional do Sistema Complemento constatamos como esperado que o soro do camundongo B6.C3$^{+/+}$ apresentou maior atividade hemolítica do que o soro do camundongo B6.C3$^{-/-}$. Entretanto, nós também observamos alguma atividade hemolítica no soro do camundongo B6.C3$^{-/-}$. Tal fenômeno ocorre pela atividade da enzima trombina que pode clivar C5, independentemente da ação de C3 (Huber-Lang et al., 2006) (**Figura 10**).

Os valores AP50 foram calculados considerando-se o volume de soro necessário para hemolisar 50% dos eritrócitos de coelho (**Tabela 3**).

Figura 10 - Atividade hemolítica mediada pela Via Alternativa do SC dos soros das linhagens B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$.

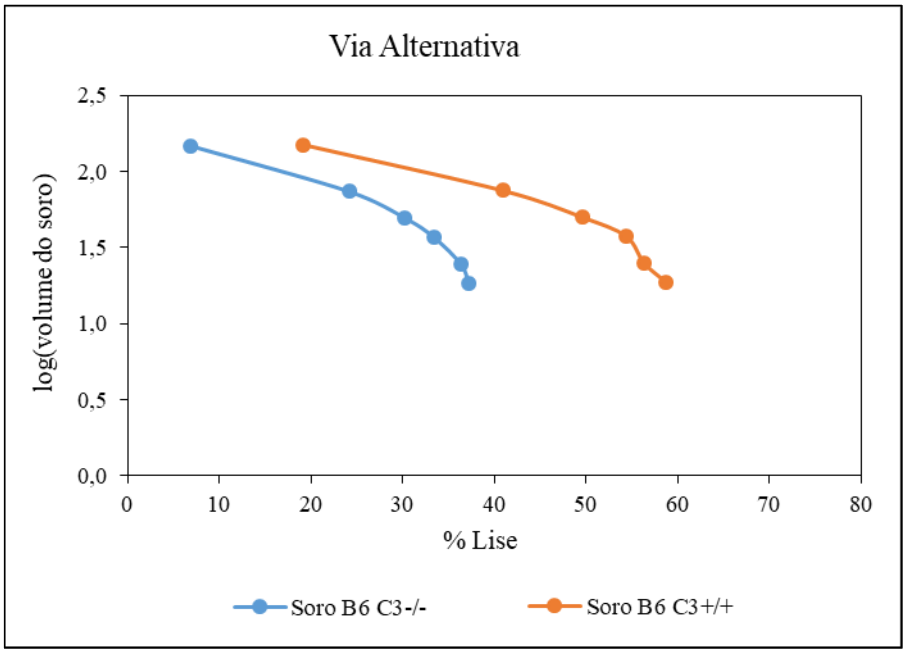


Tabela 3 - Valores da atividade hemolítica sérica mediada pela Via Alternativa.

Soros	**Atividade hemolítica U/ml soro (AP50)**
B6.C3$^{+/+}$	391
B6.C3$^{-/-}$	85

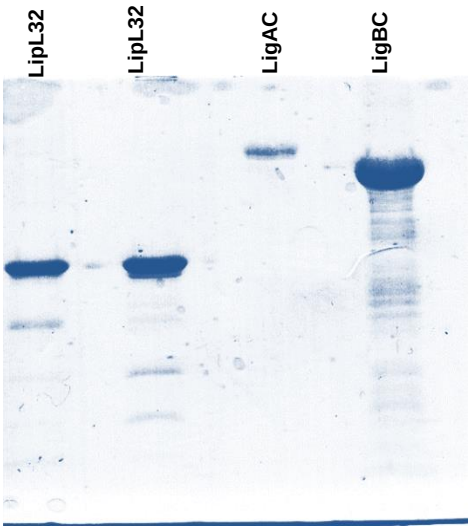
Empregamos soros de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$. Uma unidade hemolítica corresponde ao volume de soro necessário para lisar 50% de eritrócitos.

5.3 Seleção da proteína recombinante LigBC para ensaio de imunização

Em nosso laboratório foram expressas as proteínas recombinantes Ligs LigAC e LigBC correspondentes às porções C-terminais das proteínas LigA e LigB e a proteína LipL32 (Castiblanco-Valencia 2014) (**Figura 11**).

Nós selecionamos a proteína recombinante LigBC porque a banda correspondente foi mais intensa e possuíamos quantidade suficiente para realização dos experimentos, descritos a seguir.

Figura 11 - Expressão das proteínas recombinantes LipL32, LigAC e LigBC.



As proteínas LipL32, LigAC e LigBC foram analisadas por SDS-PAGE em condições não redutoras. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF, a qual foi corada com *Coomassie Brilliant Blue.*

5.4 Produção de anticorpos em camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ imunizados com a proteína de membrana de leptospira LigBC

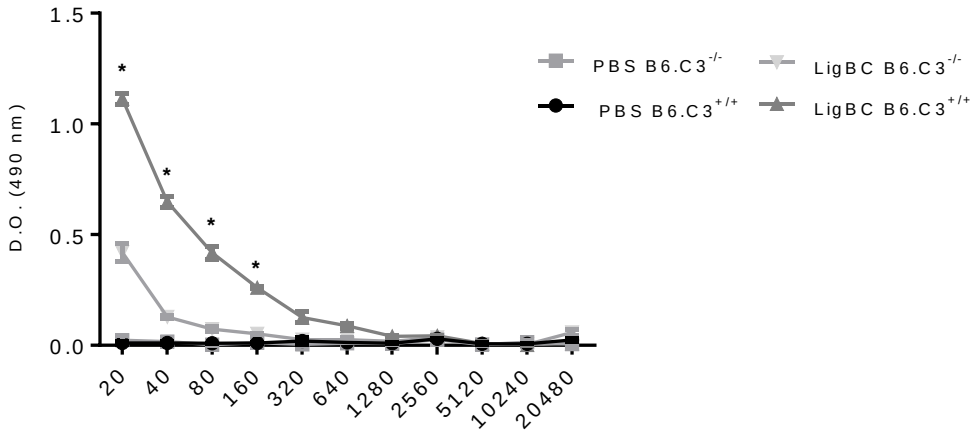
Para avaliar a importância do efeito adjuvante de C3 para a produção de anticorpos específicos contra leptospiras, administramos nos animais 0,5 µg da proteína recombinante LigBC em hidróxido de alumínio. Soros dos camundongos imunizados com a LigBC foram analisados 20 dias depois e a produção de anticorpos específicos foi determinada por ELISA. A geração de anticorpos IgG específicos foi comparada entre os soros de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$. Nossos resultados demonstram que na presença de C3 há maior produção de anticorpos específicos contra a proteína LigBC (**Figuras 12**).

5.5 Produção de anticorpos em camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ imunizados com a *L. interrogans*

Grupos semelhantes de animais utilizados no estudo anterior também foram empregados neste estudo. Para estimular a produção de anticorpos *in vivo*, inoculamos nos animais 250 µl contendo 1,5 x 10^8 de leptospiras/ml em PBS 1 x.

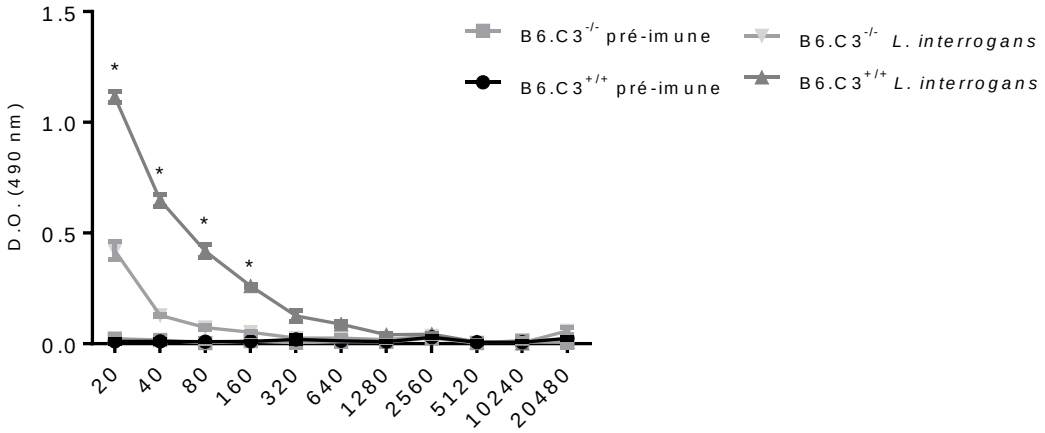
Soros pré-imunes foram obtidos dos camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ cinco dias antes da administração do inóculo e foram utilizados como controle negativo. Soros dos camundongos infectados com *L. interrogans* foram analisados 20 dias pós-infecção e a produção de anticorpos específicos IgG foi determinada por ELISA. Essas observações indicam que a deficiência de C3 limitou funções importantes para gerar amplificação da resposta humoral contra a proteína LigBC ou contra a leptospira, que incluem: retenção do antígeno acoplado aos fragmentos de C3 por células dendríticas foliculares e estimulação dos linfócitos B dependente do SC (Carroll, 2008) (**Figuras 12** e **13**).

Figura 12 - Produção de anticorpos anti-LigBC.



Os camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ foram imunizados intraperitoneal com a proteína recombinante LigBC diluída em hidróxido de alumínio ou apenas com PBS como controle negativo. Grupos de camundongos machos foram divididos em sete animais cada e as análises foram realizadas a partir de amostras por "pool" dos soros para a quantificação dos anticorpos anti-LigBC por ELISA. A análise estatística foi realizada empregando o Múltiplo teste t com correção de Holm-Sidak com um limiar de significância de *p*=0,004.

Figura 13 - Produção de anticorpos contra *L. interrogans.*



Os camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ foram imunizados intraperitoneal com *L. interrogans.* Grupos de camundongos machos foram divididos em sete animais cada. Como controle, os soros desses animais foram coletados antes das imunizações (pré-imune). As determinações das concentrações de anticorpos anti-leptospiras foram feitas por ELISA. A análise estatística foi realizada empregando o Múltiplo teste t com correção de Holm-Sidak com um limiar de significância de *p*=0,004.

5.6 Comparação da fagocitose de *L. interrogans* por macrófagos dos camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ na ausência do soro

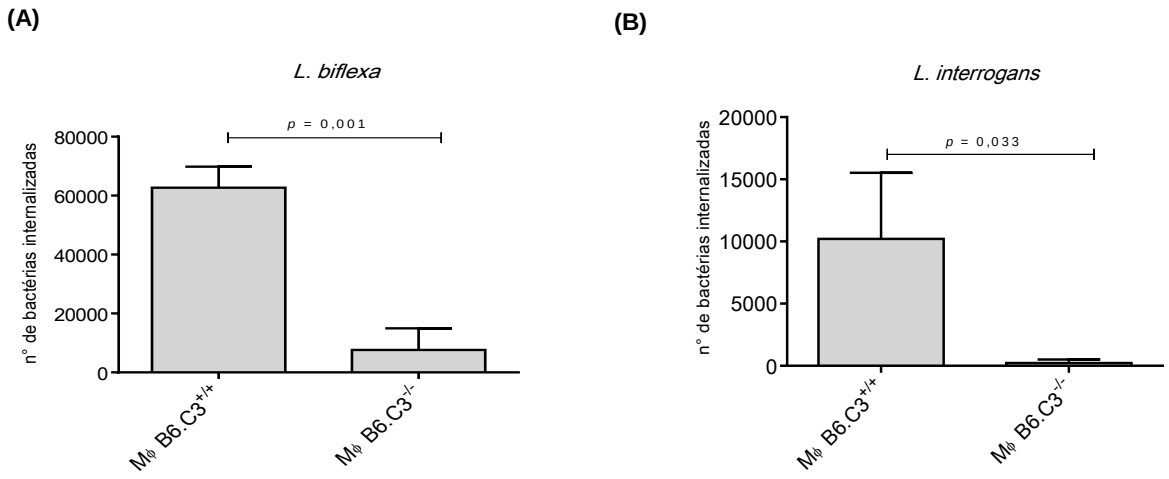
Os macrófagos peritoneais derivados de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ foram infectados com as espécies: *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm (patogênica) e *Leptospira biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I (não patogênica) por 30 min, a 37 °C, 5% CO_2. Em seguida, as culturas de macrófagos foram lavadas com PBS 1 x e tratadas com o antibiótico gentamicina para eliminar as leptospiras não internalizadas. Após 1 h de incubação, as culturas foram novamente lavadas com PBS 1 x e os macrófagos foram lisados com H_20 Milli-Q gelada e estéril para determinação do número de leptospiras fagocitadas. A quantificação de leptospiras internalizadas foi determinada por qPCR, após a extração do DNA genômico total das culturas de macrófagos.

Os resultados expressos na **Figura 14A** demonstram que macrófagos de camundongos B6.C3$^{+/+}$ apresentam maior capacidade de internalizar a espécie não patogênica, onde foram internalizadas uma média de 62.717 *L. biflexa* e 10.201 *L. interrogans*, comparando-se com os macrófagos de camundongos B6.C3$^{-/-}$. Mesmo assim, observou-se que a espécie patogênica foi menos internalizada tanto nos macrófagos de camundongos B6.C3$^{+/+}$ como nos macrófagos de camundongos B6.C3$^{-/-}$.

Observamos ainda que a espécie patogênica se mostrou mais resistente à ação dos macrófagos derivados dos camundongos B6.C3$^{+/+}$, em comparação com a espécie não patogênica, sugerindo a existência de um possível mecanismo anti-fagocítico (**Figura 14B**). Por outro lado, foram internalizadas 231 *L. interrogans* e 7.607 *L. biflexa* pelos macrófagos dos camundongos B6.C3$^{-/-}$. Observamos que as duas espécies foram relativamente menos ingeridas, quando incubadas com os macrófagos dos camundongos B6.C3$^{-/-}$. Os efeitos observados provavelmente não foram devidos a mecanismos de evasão conhecidos das leptospiras aos macrófagos, dado que as leptospiras não patogênicas não expressam fatores de virulência e são suscetíveis aos mecanismos de eliminação por fagocitose (Toma et al., 2011). Macrófagos ativados são capazes de sintetizar a proteína C3 (Hartung, Hadding, 1983). Esta proteína secretada pode auxiliar na internalização de microrganismos na ausência do soro, uma vez que poderá gerar as opsoninas C3b e iC3b, e assim, facilitar o processo de fagocitose pelos macrófagos (Hartung,

Hadding, 1983; Ezekowitz et al., 1984). Nós especulamos que a diferença na ingestão de leptospiras poderia estar associada à ausência de C3 dos macrófagos derivados de camundongos B6.C3$^{-/-}$ que apresentaram redução na internalização de leptospiras e fagocitose ineficaz, uma vez que essas células são incapazes de sintetizar e secretar a proteína C3, do SC. Nós tentamos investigar a liberação de C3 pelos macrófagos peritoneais por ELISA. Entretanto, não conseguimos por enquanto detectar a secreção da proteína nos sobrenadantes das culturas infectadas por *L. interrogans*. Precisamos continuar investigando a presença desses fragmentos importantes e demonstrar a participação deles na fagocitose das espiroquetas.

Figura 14 - Fagocitose de *L. biflexa* e *L. interrogans* na ausência do soro.

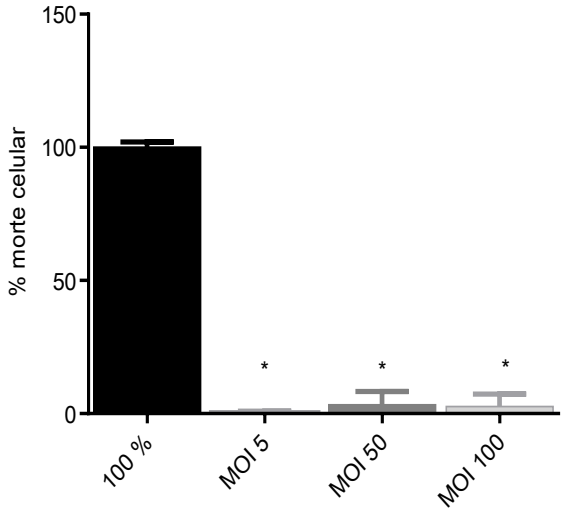


Macrófagos (MΦ) peritoneais foram obtidos de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ previamente estimulados com tioglicolato. As culturas de macrófagos foram infectadas com diferentes espécies de leptospiras e o número de bactérias fagocitadas foi analisado por qPCR. (**A**) cultura de macrófagos infectada com *L. biflexa* por 30 min. O gráfico representa a média de três experimentos independentes realizados cada um em triplicata. Teste t-Student: Foi detectada diferença significativa entre os macrófagos de camundongos B6. C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$, p=0,001. (**B**) cultura de macrófagos infectada com *L. interrogans* por 30 min. O gráfico representa a média de quatro experimentos independentes realizados cada um em triplicata. Teste t-Student: Foi detectada diferença significativa entre os macrófagos de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$, p=0,033.

5.7 Análise da citotoxicidade dos macrófagos infectados com diferentes proporções de MOI de *L. interrogans*

No ensaio anterior, observamos que macrófagos deficientes de C3 fagocitaram menos leptospiras (**Figuras 14A** e **B**). Uma vez que a citotoxicidade mediada pela *L. interrogans* poderia diminuir a ingestão destas pelos macrófagos, investigamos o número de macrófagos viáveis, pela liberação da enzima LDH. Para isso, os macrófagos foram infectados com *L. interrogans* em diferentes proporções de MOI de (1:10, 1:50 e 1:100) por 30 min. Os resultados revelaram que a incubação dos macrófagos com diferentes proporções de *L. interrogans* não aumentou a liberação de LDH, indicando ausência de citotoxicidade e morte dos macrófagos em função da presença desta bactéria (**Figura 15**).

Figura 15 - Viabilidade dos macrófagos infectados com *L. interrogans.*



Porcentagem de citotoxicidade macrófagos infectados com *L. interrogans* em diferentes proporções de MOI de (1:5, 1:50 e 1:100) por 30 min, medida pela liberação de LDH. Como controle positivo, foram utilizados macrófagos tratados com Triton-X 100 (100%). O gráfico representa a média de 3 experimentos independentes cada um realizado em triplicata. * indica diferença significativa entre os grupos infectados e o grupo controle, onde $p<0,001$.

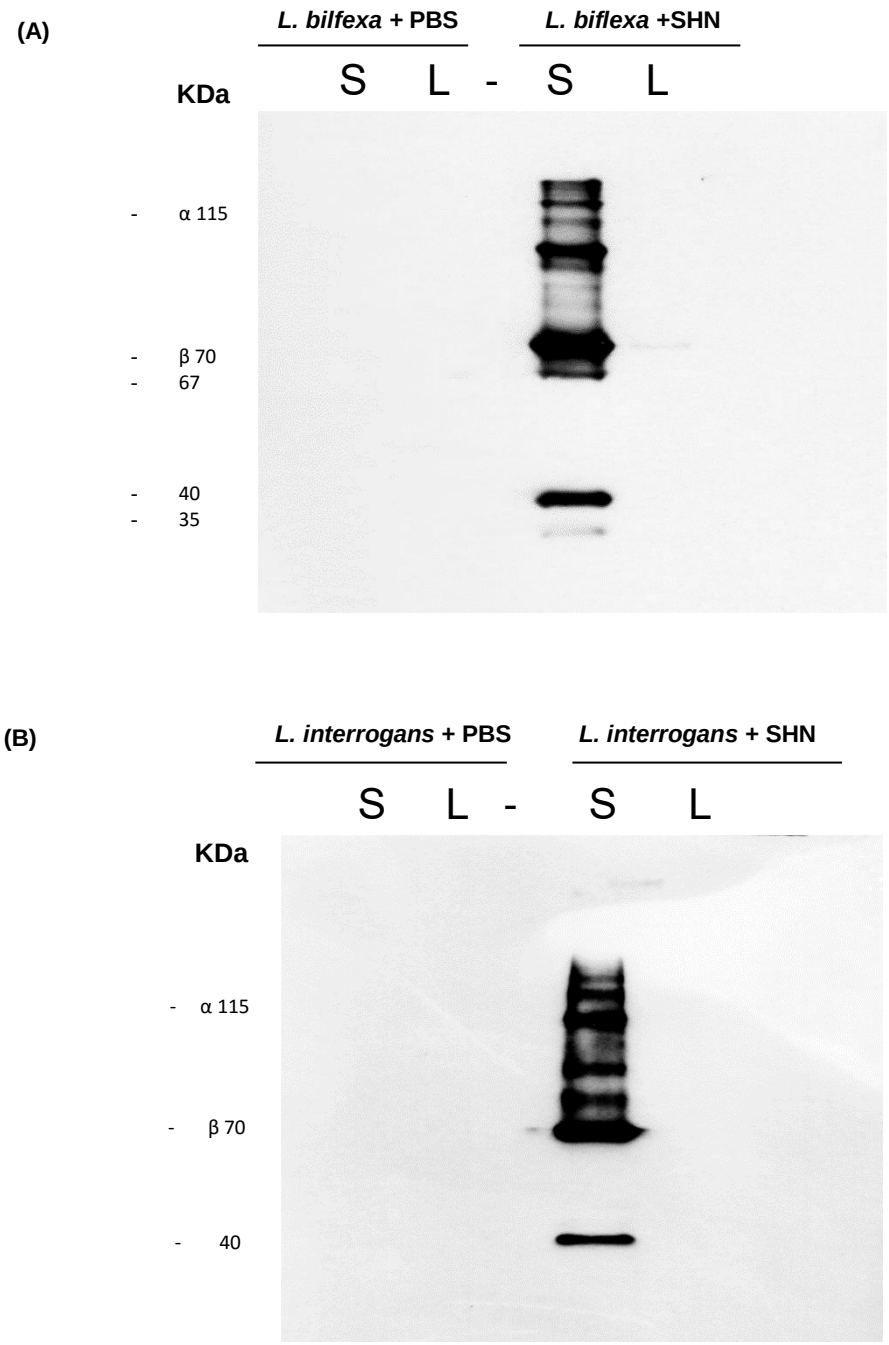
5.8 Deposição de C3 na superfície de *L. biflexa e L. interrogans*

Para confirmar a capacidade de C3 e seus fragmentos se depositarem na superfície das leptospiras, incubamos 2 x 10^8 de *L. biflexa* ou *L. interrogans* com 10% de SHN ou com PBS, como controle. Após o término das incubações, os sedimentos foram lavados 5 x com PBS 1 x. Ao término das lavagens, os sedimentos foram ressuspendidos com PBS 1 x e a análise da interação de *L. biflexa* e *L. interrogans* foi determinada qualitativamente por *Western blot*.

A deposição de C3 na *L. biflexa* foi confirmada pela presença de uma banda de 115 kDa, o que corresponde à cadeia α e uma outra banda de 70 kDa, que corresponde à cadeia β da proteína C3. Além disso, também observamos uma banda de 40 kDa que representa o fragmento C3d e fragmentos da cadeia α´ de C3: 35 kDa e 67 kDa (**Figura 16A**). Observamos também que houve interação de C3 com *L. interrogans* pela presença de uma banda de 115 kDa, o que corresponde à cadeia α e uma outra banda de 70 kDa, que representa a cadeia β de C3 e mais o fragmento C3d de 40 kDa (**Figura 16B**).

A detecção desses fragmentos indica que houve ativação da Via Alternativa ou Via das Lectinas do SC sobre a superfície das duas espécies de leptospiras quando incubadas previamente com SHN.

Figura 16 - Interação de *L. biflexa* e *L. interrogans* com C3b humano.



Culturas de (**A**) *L. biflexa* e (**B**) *L. interrogans* foram incubadas com PBS 1 x ou 10% de SHN como fonte de C3 por 1 h a 37 °C. Após 5 lavagens, os sedimentos foram analisados por *Western blot* empregando anti-C3 humano feito em cabra na diluição 1:5000 e como anticorpo secundário foi utilizado anticorpo anti-IgG de cabra feito em coelho e conjugado com peroxidase 1:10000. (S): sedimentos precipitados, (L): sobrenadante da 5ª lavagem.

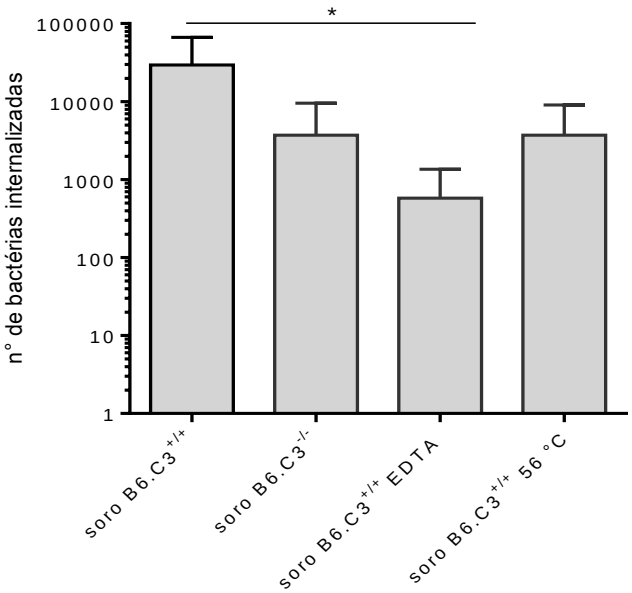
5.9 Fagocitose de *L. interrogans* opsonizada por soro por macrófagos peritoneais de B6.C3$^{+/+}$

Na ausência do componente central C3, mesmo o SC sendo inicialmente ativado, não há geração dos fragmentos C3b e iC3b, considerados importantes opsoninas e, portanto, facilitadoras do processo de fagocitose, por meio da ligação aos seus receptores específicos CR1, CR3 e CR4 (Ezekowitz, Gordon, 1986). No resultado anterior (**Figuras 14A** e **B**), nós mostramos que, de um modo geral, a espécie patogênica foi menos internalizada por macrófagos peritoneais do que a espécie patogênica de leptospira. Em razão disso, nosso próximo passo foi verificar se a adição do soro de camundongo B6.C3$^{+/+}$ aumentaria a fagocitose de *L. interrogans*. Incubamos a espécie patogênica com 10% de soro de camundongo B6.C3$^{+/+}$ ou com os controles: mesmo soro inativado pelo calor após aquecimento a 56 °C por 1 h, mesmo soro tratado com EDTA e soro deficiente da proteína C3 derivado do camundongo B6.C3$^{-/-}$. O tempo para fagocitose de *L. interrogans* foi 30 min, em seguida, as culturas de macrófagos foram lavadas com PBS 1 x, tratadas com o antibiótico gentamicina e após 1 h de incubação os macrófagos foram lisados com $H_2$0 milli-Q gelada e estéril para recuperação das leptospiras internalizadas. O DNA total foi extraído e o número de leptospiras fagocitadas foi quantificado por qPCR.

Nós observamos que os macrófagos internalizaram em média 29.530 leptospiras tratadas previamente com soro de B6.C3$^{+/+}$. O aumento na internalização da espécie patogênica está associado ao tratamento com o soro de B6.C3$^{+/+.}$ A opsonização conferida pelos componentes presentes no soro foi mediada pela ação do SC, uma vez que suas propriedades opsonizantes provocaram o aumento da ingestão de *L. interrogans* pelos macrófagos. Em contraste, na ausência de C3, em média um menor número de leptospiras 3.705 foi fagocitado pelos macrófagos, quando na presença do soro de camundongo B6.C3$^{-/-}$. Da mesma forma, observamos que os macrófagos apresentaram em média 575 leptospiras fagocitadas, quando adicionamos as bactérias tratadas com o mesmo soro tratado com EDTA e 3.693 leptospiras fagocitadas, quando utilizamos o mesmo soro inativado a 56 °C. Ambos os tratamentos impedem a ativação das vias do SC e o comprometimento provavelmente resultou em fagocitose ineficaz, o que pode

explicar, em parte, o menor número de *L. interrogans* ingeridas pelos macrófagos peritoneais (**Figura 17**) e (**Tabela 4**).

Figura 17 - Efeito da opsonização de *L. interrogans* pelos componentes do soro.



Macrófagos (MΦ) peritoneais foram obtidos de camundongos B6.C3$^{+/+}$ previamente estimulados com tioglicolato. As culturas de macrófagos foram infectadas com *L. interrogans* na presença de 10% de soro B6.C3$^{+/+}$, mesmo soro inativado pelo calor a 56 °C ou mesmo soro tratado com EDTA ou com soro de B6.C3$^{-/-}$. A fagocitose foi analisada por qPCR. O gráfico representa a média de 4 experimentos independentes realizados cada um em triplicata. ANOVA: Foi detectada diferença significante entre os tratamentos p=0,028; Tukey: Soro B6.C3$^{+/+}$ EDTA ≠ Soro B6.C3$^{+/+}$, * indica diferença significativa p<0,05.

Tabela 4 – Internalização de *L. interrogans* pelos macrófagos de B6.C3$^{+/+}$.

Células	número de leptospiras ingeridas após o tratamento com soros			
Macrófagos B6.C3$^{+/+}$	B6.C3$^{+/+}$	B6.C3$^{-/-}$	B6.C3$^{+/+}$ a 56 °C	B6.C3$^{+/+}$ EDTA
	29.530	3.705	3.693	575

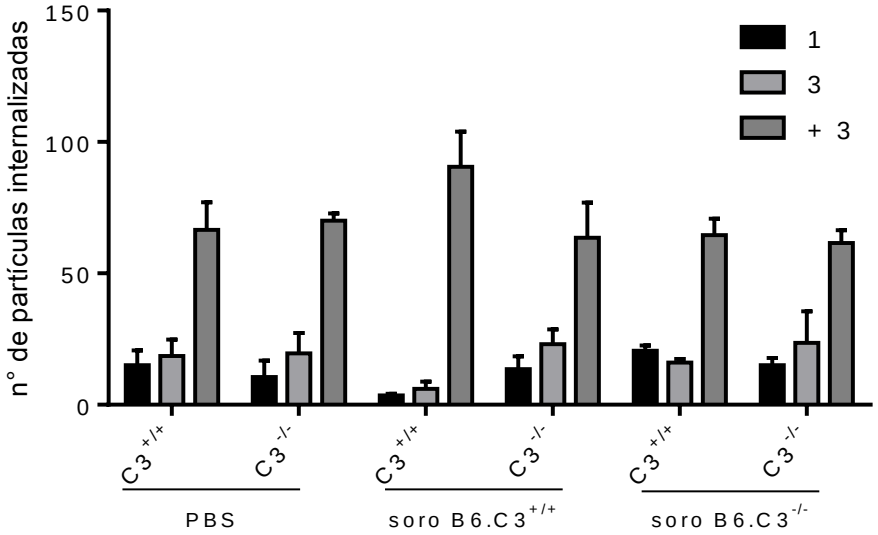
5.10 Fagocitose de Zimosan na presença ou ausência de soro por macrófagos de B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$

Conforme observamos que os macrófagos de camundongos B6.C3$^{-/-}$ fagocitam menos leptospiras (**Figuras 14A** e **B**), ficamos interessadas em avaliar se a fagocitose de outras partículas por esses macrófagos poderia ser também afetada. Para esse fim, utilizamos partículas de Zimosan previamente tratadas com soro de camundongos B6.C3$^{+/+}$ ou B6.C3$^{-/-}$ ou simplesmente com PBS por 30 min a 37 °C. Após incubação, as partículas de Zimosan foram centrifugadas e lavadas 3 x com PBS 1 x. As partículas foram adicionadas às culturas de macrófagos de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ e o tempo de fagocitose foi 1 h a 37 °C em 5% de CO_2. Após o término da reação, as culturas de macrófagos foram lavadas 3 x com PBS 1 x para remoção das partículas de Zimosan não internalizadas. Conforme mostrado na **Figura 18** observamos que os macrófagos de camundongos B6.C3$^{-/-}$ não apresentaram dificuldades em fagocitar as partículas de Zimosan não opsonizadas.

Observamos que a fagocitose de Zimosan pelos macrófagos de camundongos B6.C3$^{+/+}$ foi intensificada pela opsonização do soro de camundongo B6.C3$^{+/+}$, como fonte de opsoninas do SC. Além disso, observamos a fagocitose de partículas tratadas com o soro de camundongo B6.C3$^{-/-}$ foi semelhante a fagocitose de Zimosan por macrófagos de ambas as linhagens de camundongo B6.C3$^{-/-}$ (**Figura 18**).

As partículas de Zimosan são fagocitadas principalmente por receptores de manose (MR) (Sung et al., 1983). Uma vez que nós mostramos que a fagocitose de leptospiras foi reduzida na ausência de C3 (**Figura 14B**), acreditamos que a ingestão destas bactérias não depende tanto de MR, uma vez que a falta da proteína C3 não interferiu na fagocitose do Zimosan por macrófagos peritoneais de camundongos B6.C3$^{-/-}$.

Figura 18 - Ensaio de fagocitose de partículas de Zimosan por macrófagos peritoneais de B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$.



Macrófagos peritoneais obtidos de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ previamente estimulados com tioglicolato foram incubados com partículas de Zimosan tratadas com soro de B6.C3$^{+/+}$, soro de B6.C3$^{-/-}$ ou apenas com PBS. A fagocitose foi determinada por contagem de partículas internalizadas por 100 macrófagos em microscopia óptica (1000 x). O gráfico representa a média de 2 experimentos independentes realizados cada um em duplicata.

5.11 Determinação do NO secretado nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais infectados com *L. interrogans*

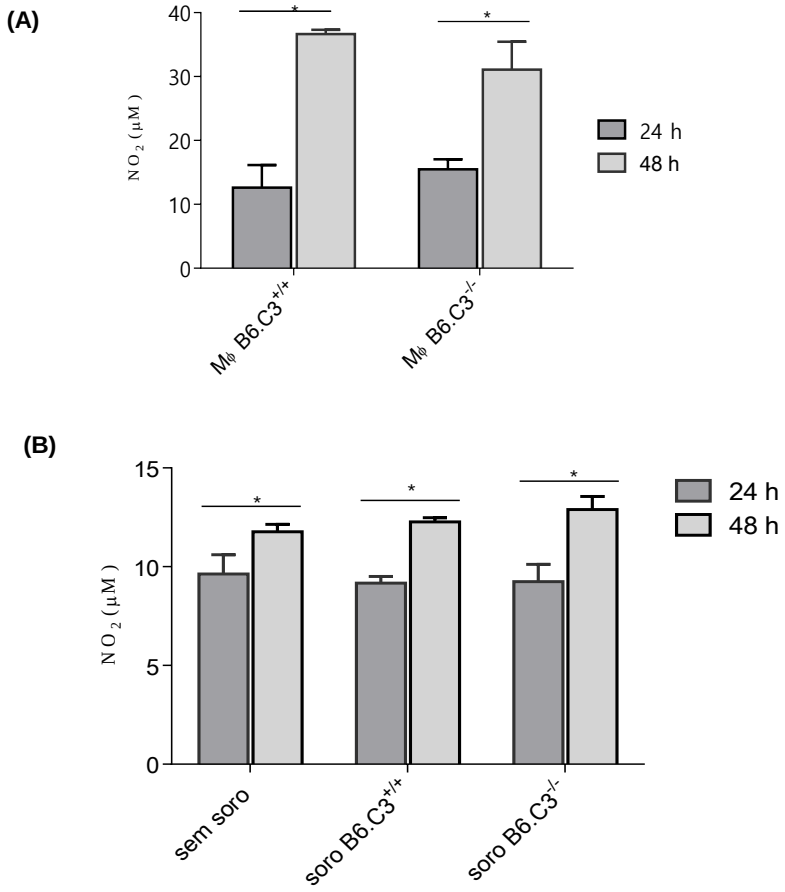
Macrófagos ativados desempenham importante papel na defesa contra microrganismos e produzem NO após ativação da enzima óxido nítrico induzível sintetase. A expressão de iNOS ocorre em resposta à estimulação por moléculas como LPS e citocinas TNF-α, IL-1β e INF-ϒ, induzindo a síntese de NO, após a exposição ao agente patogênico (Adams, 1996).

Neste estudo, decidimos investigar o papel da proteína C3 na estimulação e produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ estimulados com *L. interrogans*. Empregando a técnica de Griess, foram dosadas as concentrações de nitrito produzidas nas culturas nos tempos de 24 h e 48 h. Observamos que ambas as culturas de macrófagos infectados com *L. interrogans* foram capazes de produzir NO. Observamos ainda maior produção do NO após 48 h de estimulação. Tanto os macrófagos derivados de camundongos

B6.C3$^{+/+}$, quanto os macrófagos derivados de camundongos B6.C3$^{-/-}$ foram capazes de produzir NO em concentrações semelhantes (**Figura 19A**).

Avaliamos também a estimulação de NO por macrófagos peritoneais de camundongos B6.C3$^{+/+}$ infectados com *L. interrogans* opsonizada pelo soro B6.C3$^{+/+}$ ou com soro de B6.C3$^{-/-}$. Conforme mostrado na **Figura 19B** novamente observamos aumento da produção de óxido nítrico com 48 h de incubação dos macrófagos infectados com *L interrogans*, entretanto, não foi possível observar diferenças significativas entre os diferentes soros.

Figura 19 - Produção de NO por macrófagos peritoneais infectados com *L. interrogans.*



(**A**) Macrófagos (MΦ) peritoneais obtidos de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ previamente estimulados com tioglicolato foram infectados com *L. interrogans* por 24 h e 48 h. Foram realizados três experimentos independentes cada um em triplicata. ANOVA: linhagem e tempo, p=0,037, Tukey: B6.C3$^{+/+}$ 48 h ≠ B6.C3$^{+/+}$ 24 h; B6.C3$^{-/-}$ 48 h ≠ B6.C3$^{-/-}$ 24 h, *p<0,05. (**B**) Macrófagos peritoneais foram infectados com *L. interrogans* previamente tratadas com soro B6.C3$^{+/+}$ ou soro B6.C3$^{-/-}$ por 24 h e 48 h. Foram realizados três experimentos independentes cada um em triplicata. ANOVA: tratamento e tempo, p=0,0166; tempo *p<0,001 48 h ≠ 24 h independente do tratamento.

5.12 Análise do perfil de citocinas por macrófagos peritoneais infectados com *L. interrogans*

Este estudo foi realizado com a finalidade de verificar se existiriam diferenças entre os níveis de secreção de citocinas da imunidade inata por macrófagos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ infectados por *L. interrogans* por 24 h e 48 h. O perfil das seguintes citocinas nos diferentes tempos foi analisado por CBA.

Observamos um aumento na secreção de IL-10 nos macrófagos de camundongos B6.C3$^{+/+}$ em comparação com os macrófagos de camundongos B6.C3$^{-/-}$, que apresentaram uma menor expressão de IL-10 no tempo de 24 h. Entretanto, com 48 h de estimulação, ambas os macrófagos das duas linhagens B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ apresentaram diminuição da secreção de IL-10 (**Figura 20A**).

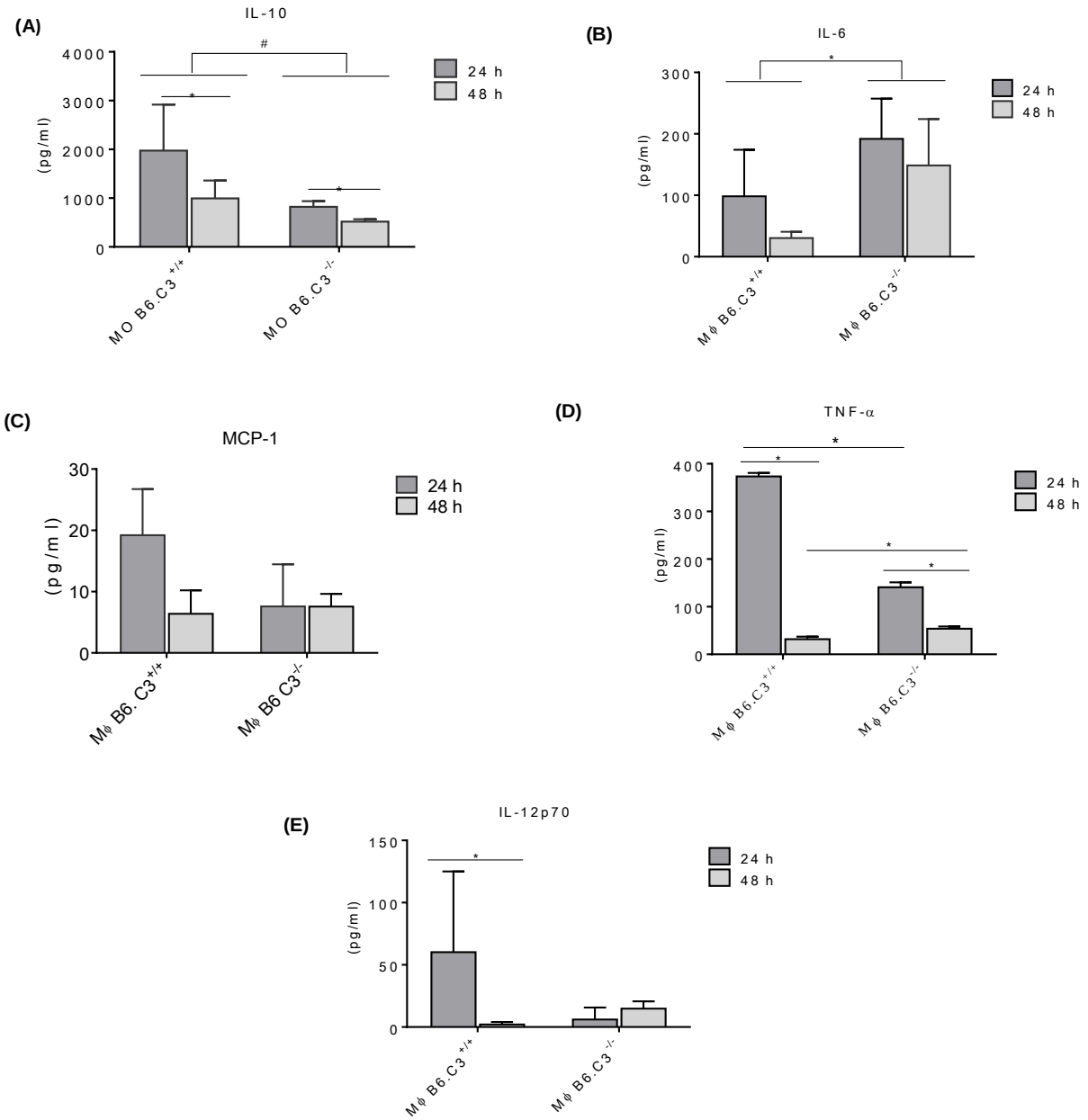
Por outro lado, observamos uma diferença na produção de IL-6 entre os macrófagos das duas linhagens de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$. Observamos um aumento na expressão de IL-6 por macrófagos de B6.C3$^{-/-}$ após 48 h de infecção por *L. interrogans* (**Figura 20B**).

Para a produção de MCP-1 pelos macrófagos das duas linhagens B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ não foi observada diferenças significativas (**Figura 20C**).

Na **Figura 20D** avaliamos maior secreção de TNF-α pelos macrófagos de camundongos B6.C3$^{+/+}$ após 24 h, sendo os níveis reduzidos das citocinas após 48 h de incubação em ambos os macrófagos derivados das duas linhagens.

Observamos também aumento da secreção de IL-12p70 após 24 h infecção de macrófagos de B6.C3$^{+/+}$ (**Figura 20E**).

Figura 20 - Dosagem de citocinas geradas por macrófagos de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ infectados com *L. interrogans.*



Os macrófagos (MΦ) peritoneais de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ foram previamente estimulados por tioglicolato. As culturas de MΦ de ambas as linhagens foram infectadas com *L. interrogans* por 24 h e 48 h para quantificação de citocinas secretadas nos sobrenadantes dos MΦ. A dosagem das citocinas foi realizada por CBA. (**A**) IL-10 ANOVA: linhagem e tempo, p= 0,573; tempo, * p=0,034 # indica 48 h ≠ 24 h, independente da linhagem; p=0,005 B6.C3$^{-/-}$ ≠ B6.C3$^{+/+}$ independente do tempo (**B**) IL-6 ANOVA: linhagem e tempo, p=0,302; tempo, p=0,063; linhagem, *p=0,006 B6.C3$^{+/+}$ ≠ B6.C3$^{-/-}$, independente do tempo (**C**) MCP-1 ANOVA: linhagem e tempo, p=0,080; tempo, p=0,079; linhagem, p=0,140 (**D**) TNF-α ANOVA: linhagem e tempo, p<0,001; Tukey, B6.C3$^{-/-}$ ≠ B6.C3$^{+/+}$ independente do tempo; 48 h ≠ 24h, independente da linhagem, *p<0,05 (**E**) IL-12p70 ANOVA: linhagem e tempo, p=0,007; Tukey, B6.C3$^{+/+}$ 48 h ≠ B6.C3$^{+/+}$ 24 h, *p<0,05.

6 Discussão

Nosso grupo tem investigado a interação das leptospiras com o SC, tendo elucidado vários mecanismos de evasão a esse sistema. Estudos anteriores demonstraram que as leptospiras patogênicas interagem com reguladores FH e C4BP, para evitar a deposição de C3b e C4b em suas superfícies (Meri et al., 2005; Barbosa et al., 2009; Castiblanco-Valencia et al., 2012). Além disso, as leptospiras patogênicas são capazes de recrutar plasminogênio humano, e uma vez convertido em plasmina, há clivagem de C3b, C5 e fibrinogênio (Castiblanco-Valencia et al., 2016).

O SC é importante para a eliminação de leptospiras não patogênicas (Meri et al., 2005; Barbosa et al., 2009), entretanto, ainda não se sabe se a morte dessas bactérias depende mais da fagocitose ou da formação do complexo de ataque à membrana. Em razão disso, dois estudos utilizando modelos murinos empregando camundongos deficientes de C5 (B6.C5$^{-/-}$) ou de C3 (B6.C3$^{-/-}$) inoculados com *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm foram realizados por nosso grupo. Os resultados mostraram que camundongos B6.C5$^{-/-}$ apresentaram maior número de leptospiras e lesões menores no fígado no terceiro dia de infecção. O recrutamento de células inflamatórias atraídas por fragmentos C5a também foi prejudicado nesses animais (Castro, 2014). Embora seja importante no início da resposta inflamatória, ambas as linhagens de camundongos B6.C5$^{+/+}$ e B6.C5$^{-/-}$, foram capazes de controlar a infecção aos 6 dias após inoculação de *L. interrogans*.

Em tese desenvolvida em nosso laboratório (Vassalakis, 2017) o mesmo modelo murino utilizado aqui neste projeto foi empregado, para investigar a importância da proteína C3 para eliminar esta bactéria. Inicialmente, foi demonstrado que as leptospiras patogênicas sobreviveram quando foram incubadas *in vitro* com o soro de camundongo B6.C3$^{+/+}$, enquanto que as leptospiras não patogênicas foram rapidamente eliminadas na presença do mesmo soro. Estes resultados corroboram com dados anteriormente descritos (Meri et al., 2005; Barbosa et al., 2009), que também observaram maior sobrevida de leptospiras patogênicas incubadas com o SHN, quando comparadas com as leptospiras não patogênicas que foram rapidamente eliminadas nas mesmas condições. Além disso, no mesmo trabalho (Vassalakis, 2017) foi demonstrado que camundongos B6.C3$^{-/-}$ apresentaram falhas

na eliminação de leptospiras, pois maior número destas bactérias foi encontrado no fígado e nos rins após infecção *in vivo* por *L. interrogans*.

Neste estudo, decidimos investigar a participação de C3 na geração de anticorpos durante a infecção *in vivo* e a contribuição desta proteína para a fagocitose *in vitro* de *L. interrogans*.

Vários estudos experimentais utilizando animais deficientes em C3 demonstram a importância do SC para o desenvolvimento de respostas de anticorpos específicos a antígenos. Pepys (1974) descreveu pela primeira vez que ao depletar complemento do soro de camundongos havia menor produção de anticorpos contra eritrócitos de carneiro.

Em experimentos realizados por Shigeoka et al. (1984), ratos selvagens tratados com fator de veneno de cobra (CVF), substância esta, responsável por induzir a depleção de C3 por hiperativação do SC, apresentaram falhas na produção de anticorpos contra *Streptococcus* do grupo B e morreram pós-infecção, ao contrário dos ratos selvagens não tratados com o CVF, que sobreviveram após o desafio de dose letal.

Carter, Fearon (1992) observaram que a estimulação de linfócitos B em cooperação do complexo CR2-CD19-CD81 e do BCR juntos com o antígeno acoplado ao C3d resultou em uma resposta mais potente de anticorpos do que quando houve ativação do BCR sozinho. Além disso, o mesmo grupo também demonstrou que o acoplamento de C3d ao antígeno de lisozima de ovo de galinha reduziu a quantidade de antígeno necessário para uma ótima resposta humoral de até 10.000 vezes (Dempsey et al., 1996).

Considerando a capacidade do fragmento C3d(g) na estimulação de linfócitos B em associação com o CR2 presentes em linfócitos B e em células foliculares dendríticas (Carroll, 2008), imunizamos camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ com *L. interrogans*. Nossos resultados mostraram que camundongos B6.C3$^{-/-}$ produziram menos anticorpos IgG específicos após 21 dias de imunização, do que camundongos B6.C3$^{+/+}$. Além disso, nossos dados puderam ser comprovados quando grupos semelhantes de animais inoculados com a proteína recombinante LigBC, presente na membrana externa de *L. interrogans*. Camundongos B6.C3$^{-/-}$ também produziram menos anticorpos anti-LigBC, do que observado com camundongos B6.C3$^{+/+}$ igualmente tratados. Nós concluímos que a falha na geração de anticorpos pode ser explicada por menor amplificação da resposta por linfócitos

B, provavelmente por menor interação do antígeno acoplado ao fragmento C3d(g) com CR2. Tal efeito foi relatado anteriormente por Pozdnyakova et al. (2003), em experimentos com camundongos deficientes em C3 e deficientes em CR1/2 imunizados com polissacarídeo capsular do tipo III de *Streptococcus* do Grupo B. A menor produção de anticorpos foi acompanhada por falhas na troca do isótipo do anticorpo de IgM para IgG. Além disso, os animais apresentaram uma menor retenção do antígeno pelas células foliculares dendríticas nos centros germinativos e uma fraca exposição do antígeno na zona marginal.

As leptospiras são bactérias bastante móveis e, após penetrarem pelas mucosas ou pele íntegra, disseminam-se no hospedeiro atingindo a circulação sanguínea com posterior colonização de órgãos alvos como fígado, pulmões e rins (Levett, 2001; Viriyasokol et al., 2006; Chassin et al., 2009). Portanto, nesse tipo de resposta, os anticorpos são de extrema importância bloqueando a entrada de patógenos nas células do hospedeiro, além de auxiliarem em processos de ativação da Via Clássica do SC e opsonização.

Além de demonstrar a importância de C3 na imunidade humoral na leptospirose, neste trabalho também investigamos *in vitro* a fagocitose *de L. interrogans* e *L. biflexa*, utilizando macrófagos peritoneais derivados de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$. Os macrófagos são células cruciais no controle da infecção por leptospiras. A depleção de macrófagos em camundongos tratados com sílica resultou em morte dos animais desafiados com as leptospiras (Isogai et al., 1986).

Outros estudos relatam que *a L. interrogans* sorovar Lai pode induzir apoptose para evadir dos macrófagos (Jin et al., 2009), entretanto, a infecção de macrófagos com uma estirpe diferente da utilizada no trabalho anterior (*L. interrogans* sorovar Manilae), não foi capaz de promover o mesmo efeito (Toma et al., 2011). Inicialmente, nós avaliamos se a espécie utilizada neste projeto poderia provocar morte celular nos macrófagos, entretanto ao determinar a liberação da enzima lactato desidrogenase, não observamos citotoxicidade dos macrófagos infectados com *L. Interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm.

Diversos trabalhos relatam que certas leptospiras patogênicas são resistentes à fagocitose por macrófagos peritoneais murinos e humanos, desde que não estejam opsonizadas (Banfi et al., 1982; Wang et al., 1984). Além disso, Cinco et al. (2002) sugerem a participação do CR3 na internalização direta de leptospiras.

Nossos resultados mostram que *L. interrogans* resiste à ação dos macrófagos de camundongos B6.C3$^{+/+}$, uma vez que esta espécie foi internalizada em número menor do que a *L. biflexa*. Este resultado inicial nos levou a investigar se, na presença do soro normal de camundongo selvagem (B6.C3$^{+/+}$), conseguiríamos reverter este efeito refratário *da L. interrogans* e se a internalização da espécie patogênica seria aumentada pelos macrófagos. Para avaliar tal fenômeno, incubamos a *L. interrogans* com o soro de camundongo B6.C3$^{+/+}$. Nosso resultado, demonstrou que a adição do soro facilitou a internalização da espécie patogênica por macrófagos de camundongos B6.C3$^{+/+,}$ o que não foi possível observar quando o soro de camundongo B6.C3$^{-/-}$ foi empregado. Da mesma forma, observamos menor internalização *de L. interrogans*, quando utilizamos o mesmo soro tratado com EDTA ou com mesmo soro inativado a 56 °C, uma vez que, a atividade das três vias do SC, foi bloqueada nessas condições. Nossos dados sugerem que a opsonização conferida pelos componentes presentes no soro foi mediada pela ação do SC, uma vez que suas propriedades opsonizantes aumentaram a ingestão de *L. interrogans*, o que não foi observado na presença do soro tratado com EDTA, inativado a 56 °C ou soro de camundongo B6.C3$^{-/-}$. Além disso, nosso grupo demonstrou que *L. interrogans* pode interagir com os reguladores FH e C4BP, promovendo a inativação de C3b (Meri et al., 2005; Barbosa et al., 2009; Castiblanco-Valencia et al., 2012). Entretanto, com a clivagem de C3b, mais moléculas iC3b são geradas, levando ao acúmulo das opsoninas, o que consequentemente também promove o aumento de fagocitose das leptospiras.

Vários estudos demonstram a importância da opsonização por ação do SC. Camundongos selvagens e deficientes de C3 foram infectados com *Streptococcus* do grupo B, agente causador de meningite em neonatos e em adultos portadores de doenças crônicas. Os resultados demonstraram que a opsonização das bactérias pelo SC se faz necessária para diminuição da viabilidade bacteriana e requer a opsonização com anticorpo homólogo derivado de coelhos imunizados como fonte de anticorpos específicos. Em comparação, a opsonização das bactérias como o soro deficiente em C3 diminuiu a fagocitose e remoção do microrganismo infeccioso pelos macrófagos. Nos ensaios *in vivo*, os animais B6.C3$^{-/-}$ não foram protegidos contra a infecção por *Streptococcus* do grupo B e apresentaram falhas na imunidade manifestada por uma menor sobrevida dos hospedeiros e por resistência das bactérias em seus organismos (Wessels et al., 1995).

Resultados semelhantes foram observados por Mershon et al. (2009) que verificaram a participação do SC na proteção contra o *Cryptococcus gattii*. Nos ensaios *in vivo* com camundongos selvagens e deficientes de C3 e FB foram demonstrados que os animais morreram rapidamente após a infecção provocada pelo fungo. O FB opera apenas na Via Alternativa e é responsável por formar, por exemplo, os complexos C3-convertases $C3H_20Bb$ e C3bBb. Uma vez que, a morte ocorreu nos dois modelos animais, os autores sugeriram a participação das 3 vias do SC em resposta ao patógeno. Além disso, o tratamento desses animais com CVF, também provocou a morte desses animais.

Outro estudo realizado com *Borrelia burgdorferi* da mesma família das espiroquetas mostrou que a opsonização dessas bactérias providas do soro como fonte das proteínas do Complemento, aumentou a capacidade de ingestão destas pelos macrófagos. Em contrapartida, a incubação com o soro deficiente em C3 resultou em menor ingestão do patógeno, prejudicando, portanto, o processo de fagocitose (Hawley et al., 2015).

A *Staphylococcus aureus* é conhecida por causar artrite séptica severa nos pacientes infectados com este patógeno. Para avaliar o papel do SC na artrite séptica, camundongos $C3^{-/-}$ foram inoculados com *S. aureus*. Após inoculação foi observado artrite severa bem como aumento da carga bacteriana nos rins desses animais. Um número de *S. aureus* opsonizada com soro de camundongo $C3^{-/-}$ foi internalizada por macrófagos peritoneais, comparado com a *S. aureus* opsonizada com soro de camundongo $C3^{+/+}$. Na et al. (2016) mostraram que a deficiência de C3 aumentou a suscetibilidade da artrite séptica, uma vez que na ausência de C3 houve menor eliminação de bactérias, possivelmente devido a diminuição de opsonização e fagocitose de *S. aureus*.

Demonstramos também a deposição de C3 humano e seus fragmentos na superfície tanto de *L. interrogans* quanto de *L. biflexa*. Esses resultados corroboram com os dados obtidos por nosso grupo que demonstraram de modo quantitativo por ELISA, maior deposição de C3 superfície da *L. biflexa* do que na *L. interrogans* (Barbosa et al., 2009). A deposição de C3 e outras proteínas do SC está sendo avaliada por nosso grupo pelos alunos Priscilla Yuri da Silva Okochi e Leonardo Moura Midon.

Os aspectos da interação das leptospiras com os macrófagos é ainda mais interessante. Nós mostramos que os macrófagos de camundongos deficientes de C3

apresentaram internalização reduzida de ambas as espécies: *L. interrogans* e *L. biflexa*. Outro estudo também relata que os macrófagos de camundongos deficientes de C3 apresentaram endocitose prejudicada de peptídeo β amiloide (faβ) (Fu et al., 2012).

Nós especulamos que o C3 sintetizado localmente por estas células fagocitárias contribuiu para aumentar a fagocitose de *L. interrogans* por macrófagos de camundongos B6.C3$^{+/+}$. Essa informação é consistente com estudos que fornecem evidências de que macrófagos ativados secretam componentes do SC localmente e que essa ação poderia contribuir para opsonização e fagocitose de microrganismos na ausência de C3 (Hartung, Hadding, 1983; Ezekowitz et al., 1984). Além disso, foi demonstrado que o C3 gerado intracelularmente em monócitos também sofre ação proteolítica por enzimas catepsinas L, que processam o C3, culminando na secreção de fragmentos ativos, como C3a e C3b, no meio extracelular (Liszewski et al., 2013). Nós tentamos sem sucesso detectar a secreção da proteína no sobrenadante de macrófagos estimulados com *L. interrogans*, entretanto, obter níveis detectáveis de C3 por ELISA. Ensaios futuros serão necessários para comprovar a influência da proteína secretada pelos macrófagos na internalização de *L. interrogans*.

Após verificar que as leptospiras são menos ingeridas por macrófagos de camundongos B6.C3$^{-/-}$ nós avaliamos se as mesmas células responderiam de modo semelhante, utilizando partículas de Zimosan. Nossos resultados mostraram que a deficiência de C3 não suprimiu a ingestão de Zimosan, promovendo a internalização da mesma quantidade de partículas em comparação com o controle. Nossos dados sugerem que possivelmente a ausência de C3 estaria afetando na ação de outro receptor importante para a fagocitose de leptospiras, independente de do Complemento.

Anteriormente foi descrito por nosso grupo que as opsoninas C3b e iC3b promoveram a ativação de neutrófilos, culminando na geração de ROS. Nos ensaios, leptospiras opsonizadas com soro humano foram capazes de ativar 3 vezes mais neutrófilos, gerando produção elevada de ROS, em comparação com leptospiras não opsonizadas (Castiblanco-Valencia, 2014). Outro produto que contribui para o quadro de ativação de macrófagos e neutrófilos é o NO. O NO é uma molécula importante que pode inibir a replicação de *Salmonella typhimurium* (Richardson et al., 2009) e de *Vibrio cholerae* (Davies et al., 2011), entre outros

microrganismos. No presente estudo, nós avaliamos se a proteína C3 poderia influenciar na produção de NO. Nós demonstramos que no modelo murino a presença de C3 não interferiu com a produção de NO por macrófagos peritoneais, uma vez que ambos os macrófagos derivados das duas linhagens apresentaram níveis similares da molécula, nos tempos de 24 h e 48 h.

Além da produção de NO, nós também avaliamos a importância da proteína C3 na geração de citocinas em macrófagos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$. Embora os níveis de IL-6 apresentaram-se mais altos no camundongo B6.C3$^{-/-}$, observamos que as citocinas IL-10, TNF-α, MCP-1, IL-12p70 foram menos expressadas em comparação com o camundongo B6.C3$^{+/+}$. Coletivamente, esses dados sugerem que o componente C3 pode modular a produção local de certas citocinas da imunidade inata e dessa forma contribuir para a defesa imunológica local em tecidos afetados. Uma vez que nosso grupo demonstrou que a deficiência de C5 ou de C3 prejudicou o recrutamento de células inflamatórias, nos dois modelos animais (Castro, 2014; Vassalakis, 2017).

Strey et al. (2003) mostraram o papel de C3 como modulador de mediadores inflamatórios, onde C3 foi capaz de modular a produção de citocinas mediante ativação de Nf-kb. Coletivamente, esses dados sugerem que o componente C3 pode modular a produção local de certas citocinas da imunidade inata e dessa forma contribuir para a defesa imunológica local em tecidos afetados. Uma vez que nosso grupo demonstrou que a deficiência de C5 ou de C3 prejudicou o recrutamento de células inflamatórias, nos dois modelos animais (Castro, 2014; Vassalakis, 2017).

Este trabalho contribuiu para aprimorar os conhecimentos sobre a interação de macrófagos e leptospiras, enfatizando a importância de C3 para controlar a infecção *in vivo* por *L. interrogans*. Com base em nossos resultados, convém ressaltar que os macrófagos são essenciais no combate à infecção e, portanto, estes estudos fornecem importantes evidências de que a cooperação do Sistema Complemento nos processos de fagocitose ou na produção de anticorpos podendo funcionar como um importante mecanismo de defesa contra as leptospiras patogênicas.

7 Conclusão

- ✓ A produção de anticorpos específicos anti-leptospira ou anti-LigBC foi dependente da proteína C3 do Sistema Complemento.

- ✓ Quando comparada com a *L. biflexa* a *L. interrogans* é menos fagocitada por macrófagos peritoneais quando opsonizada com C3, a ingestão é facilitada.

- ✓ Os macrófagos peritoneais de camundongos B6.C3$^{+/+}$ apresentaram melhor capacidade de fagocitar *L. interrogans*, ao contrário dos macrófagos de camundongos B6.C3$^{-/-}$.

- ✓ A produção de óxido nítrico pelos macrófagos infectados com *L. interrogans* não é dependente de C3.

- ✓ A ausência de C3 provoca diminuição da secreção de citocinas IL-10, IL-12p70 e TNF-α nas culturas de macrófagos infectados com *L. interrogans*.

Referências*

Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, Nakanishi K, Akira S. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. Immunity. 1998 Jul;9(1):143-50.

Adams HR. Pshysiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. J Am Med Assoc 1996; 209:1297-302.

Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annu Rev Immunol. 1999;17:593:623.

Adler B, Faine S. Susceptibility of mice treated with cyclophosphamide to lethal infection with *Leptospira interrogans* serovar Pomona. Infect. Immun. 1976;14:703-8.

Adler B. Leptospira and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Immunology. 2015; 387: 2196-9965.

Ahearn JM, Fischer MB, Choix D, Goerg S, Ma M, Xia J, Zhou X, Howard RG, Rothstein TL, Carroll MC. Disruption of the Cr2 locus results in a reduction in B-1a cells and in an impaired B cell response to T-dependent antigen. Immunity. 1996 Mar;4(3):251-62.

Albrecht EA, Chinnaiyan AM, Varambally S, Kumar-Sinha C, Barrette TR, Sarma JV, Ward PA. C5a-induced gene expression in human umbilical vein endothelial cells. Am J Pathol. 2004 Mar;164(3):849-59.

Aleshin AE, Schraufstatter IU, Stec B, Bankston LA, Liddington RC, DiScipio RG. Sctruture of complement C6 suggests a mechanism for initiation and unidirectional, sequential assembly of membrane attack complex (MAC). J Biol Chem. 2012 Mar 23;287(13):101210-22.

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.

Banfi E, Cinco M, Bellini M, Soranzo MR. The role of antibodies and serum complement in the interaction between macrophages and leptospires. J Gen Microbiol 1982;128:813–6.

Barbosa AS, Abreu PA, Vasconcellos SA, Morais ZM, Gonçales AP, Silva AS, Daha MR, Isaac L. Immune evasion of leptospira by acquisition of human complement regulation C4BP. Infect Immun. 2009 Mar;77(3):1137-43.

Barsig J, Kaufmann SH. The mechanism of cell death in Listeria monocytogenes-infected murine macrophages is distinct from apoptosis. Infect Immun. 1997 Oct;65(10):4075-81.

*De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.htlm

Batista FD, Harwood NE. The who, how and where of antigen presentation to B cells. Nat Rev Immunol. 2009 Jan;9(1):15-27.

Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiol Rev. 2007;87(1):245-313.

Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Mathias 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):752-71.

Bohlson SS, O'Conner SD, Hulsebus HJ, Ho MM, Fraser DA. Complement c1q, and c1q-related molecules regulate macrophage polarization. Front Immunol. 2014 Aug 21;5:402.

Botto M, Lissandrini D, Sorio C, Walport MJ. Biosynthesis and secretion of complement component (C3) by activated human polymorphonuclear leukocytes. J Immunol. 1992 Aug 15;149(4):1348-55.

Burt FJ, Rolph MS, Rulli NE, Mahalingam S, Heise MT. Chikungunya: a re-emerging virus. Lancet. 2012 Feb 18;379(9816):662-71.

Carroll MC, Isenman DE. Regulation of humoral immunity by complement. Immunity. 2012 Aug 24;37(2):199-207.

Carroll MC. Complement and humoral immunity. Vaccine 2008 Dec 30;26 Suppl 8:128-33.

Carter RH, Fearon DT. CD19:lowering the threshould for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. Science. 1992 Apr 3;256(5053):105-7.

Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, Breda LC, Vasconcellos SA, Figueira CP, Picardeau M, Wunder E, Ko AL, Barbosa AS, Isaac L. Acquisition of negative complement regulators by the saprophyte Leptospira biflexa expressing LigA or LigB confers enhanced survival in human serum. Immunol Lett. 2016 May;173:61-8.

Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, Pagotto AH, Serrano SM, Abreu PA, Barbosa AS, 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 May;221(5):679-89.

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 Mar 15;205(6):995-1004.

Castiblanco-Valencia MM. Interação de proteínas de membrana de leptospira com os reguladores Fator H e C4BP do sistema complemento humano. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Castro JA. Importância do componente C5 do Sistema Complemento para o controle de leptospirose in vivo em modelos murinos. [dissertação (Mestrado em

Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Chae SY, Lee M, Kim SW, Bae YH. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin. Biomaterials. 2004 Feb;25(5):843-50.

Chassin C, Picardeau M, Gounjon JM, Bourhy P, Quellard N et al. TLR-4 and TLR-2-mediated B cell response control the clearance of the bacterial pathogen Leptospira interrogans. J Immunol. 2009;183(4):2669-77.

Chiriboga J, Barragan V, Arroyo G, Sosa A, Birdsell DN, Espãna K, Mora A, Espín E, Mejía ME, Morales M, Pinargote C, Gonzalez M, Hartskeerl R, Keim P, Bretas G, Eisenberg JN, Trueba G. High Prevalence of Intermediate Leptospira spp. DNA in Febrile Humans from Urban and Rural Ecuador. Emerg Infect Dis. 2015 Dec;21(12):2141-7.

Cinco M, Banfi E, Soranzo MR. Studies on the interaction between macrophages and leptospires. J Gen Microbiol. 1981 Jun;124(2):409-13.

Cinco M, Cini B, Perticarari S, Presani G. Leptospira interrogans binds to the CR3 receptor on mammalian cells. Microb Pathog. 2002 Dec;33(6):299-305.

Cohn ZA, Hir sch JG. The influence of phagocytosis on the intracellular distribution of granule-associated components of polymorphonuclear leucocytes. J Exp Med. 1960 Dec 1;112:1015-22.

Colagross-Schouten AM, Mazet JA, Gulland FM, Miller MA, Hietala S. Diagnosis and seroprevalence of leptospirosis in California sea lions from coastal California. J Wildl Dis. 2002 Jan;38(1):7-17.

Cornacoff JB, Hebert LA, Smead WL, VanAman ME, Birmingham DJ, Waxman FJ. Primate erytrocyte-immune complex-clearing mechanism. J Clin Invest. 1983 Feb;71(2):236-47.

Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgeson P, Martinez-Silveira MS, Stein C, Abela-Ridder B, Ko Al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. PloS Negl Trop Dis. 2015 Sep 17;9(9):e0003898.

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 Jun 1;181(6):2119-27.

Dahl MR, Thiel S, Matsushita M, Fujita T, Willis AC et al. MASP-3 and its Association with distinct complexes of the mannan-binding lectin Complement activation pathway. Immunity. 2001;15(1):127-35.

Davies BW, Bogard RW, Dupes NW, Gerstenfield TA, Simmons LA, Mekalanos JJ. DNA damage and reactive nitrogen species are barriers to Vibrio cholera colonization of the infant mouse intestine. PLoS Pathog. 2011 Feb;7(2)e1001295.

Dellagostin OA, Grassmann AA, Rizzi C, Schuch RA, Jorge S, Oliveira TL, McBride AJ, Hartwig DD. Reverse Vaccinology: An Approach for Identifying Leptospiral Vaccine Candidates. Int J Mol Sci. 2017 Jan 14;18(1).pii.E158.

Dempsey PW, Allison ME, Akkaraju S, Goodnow CC. Fearon DT. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. Science. 1996 Jan 19;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 May 1;125(5):921-46.

Ehrlich P, Morgenroth J. Ueber haemolysin dritte Mitteilung. Berliner Klinische Wochenschrift. 1900;37:453.

Elsner J, Oppermann M, Czech W, Kapp A. C3a activates the respiratory burst in human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes via pertussis toxin-sensitive G-proteins. Blood. 1994 Jun 1;83(11):3324-31.

Ember JA, Sanderson SD, Hugli TE, Morgan EL. Induction of interleukin-8 synthesis from monocytes by human C5a anaphylotoxin. Am J Pathol. 1994 Feb;144(2):393-403.

Eshghi A, Lourdault K, Murray GL, Bartpho T, Sermswan RW, Picardeau M, Adler B, Snarr B, Zuerner RL, Cameron CE. Leptospira interrogans catalase is required for resistance to H202 and for virulence. Infect Immun. 2012 Nov;80(11):3892-9.

Evangelista KV, Coburn J. Leptospira as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. Future Microbiol. 2010 Sep;5(9):1413-25.

Ezekowitz RA, Gordon S. Interaction and regulation of macrophages receptors. Ciba Found Symp. 1986;118:127-36.

Ezekowitz RA, Sim RB, Hill M, Gordon S. Local opsonization by secreted macrophage complement components. Role of receptors for complement in uptake of zymosan. J Exp Med. 1984 Jan 1;159(1):244-60.

Ezekowitz RA, Sim RB, MacPherson GG, Gordon S. Interaction of human monocytes, macrophages, and polymorphonuclear leukocytes with zymosan in vitro. Role of type complement receptors and macrophage-derived complement. J Clin Invest. 1985 Dec;76(6):2368-76.

Faine S, Adler B, Bolin C, et al. Leptospira and leptospirosis (2nd ed). Melbourne: MediSci, 1999.

Faine S, Shahar A, Aronson M. Phagocytosis and its significance in leptospiral infection. Aust J Exp Biol Med Sci. 1964 Oct; 42:579-88.

Fang Y, Xu C, Fu XY, 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 Jun 1;160(11):5273-9.

Fearon DT, Austen KF, Ruddy S. Formation of a hemolytically active cellular intermediate by the interaction between properdin factors B and D and the activated third component of complement. J Exp Med. 1973 Dec 1;138(6):1305-13.

Fischer MB, Ma M, Goerg S, Zhou X, Xia J et al. Regulation of the B cell response to T-dependent antigens by classical pathway. J Immunol. 1996;157(2):549-56.

Flierman R, Daha MR. The clearance of apoptotic cells by complement. Immunobiology. 2007;212(4-5):363-70.

Foreman KE, Vaporciyan AA, Bonish BK, Jones ML, Johnson KJ, Glosky MM, Eddy SM, Ward PA. C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. J Clin Invest. 1994 Sep;94(3):1147-55.

Fraga TR, Barbosa AS, Isaac L. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. Scand J Immunol. 2011 May; 73(5):408-19.

Fraga TR, Courrol Ddos S, Castiblanco-Valencia MM, Hirata IY, Vasconcellos SA, 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 Mar;209(6):876-86.

Fu H, Liu B, Frost JL, Hong S, Jin M, Ostaszewski B, Shankar GM, Costantino IM, Carroll MC. Complement component C3 and complement receptor type 3 contribute to the phagocytosis and clearance of fibrillar Aβ by microglia. Glia 2012 May;60(6)993-1003.

Fukunaga M, Mifuchi I. Unique organization of Leptospira interrogans rRNA genes. J Bacteriol. 1989 Nov;171(11):5763-1.

Gomes-Solecki M, Santecchia I, Werts C. Animal Models of Leptospirosis: Of Mice and Hamsters. Front Immunol. 2017 Feb 21;8:58.

Goris MG, Wagenaar JF, Hartskeerl RA, van Gorp EC, Schuller S, Monahan AM, Nally JE, van der Poll T, van´t Veer C. Potent innate immune response to pathogenic leptospira in human whole blood. Plos One. 2011 Mar 31;6(3):e18279.

Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. Infect Immun. 2000 Apr;68(4):2276-85.

Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in humans. Curr Top Microbiol Immunol. 2015;387:65-97.

Hagan JE, Moraga P, Costa F, Capian N, Ribeiro GS, Wunder EA Jr, Felzemburgh RD, Reis RB, Nery N, Santana FS, Fraga D, Dos Santos BL, Santos AC, Queiroz A, Tassinari W, Carvalho MS, Reis MG, Diggle PJ, Ko Al. Spatiotemporal Determinants of Urban Leptospirosis Transmission: Four-Year Prospective Cohort Study of Slum Residents in Brazil. PloS Negl Trop Dis. 2016 Jan 15;10(1):e0004275.

Hartmann K, Henz BM, Krüger-Krasagakes S, Köhl J, Burger R, Guhl S, Haase I, Lippert U, Zuberbier T. C3a e C5a stimulate chemotaxis of human mast cells. Blood. 1997 Apr 15;89(8):2863-70.

Hartung HP, Hadding U. Synthesis of complement by macrophages and modulation of their functions through complement activation. Springer Semin Immunopathol. 1983;6(4):283-326.

Hawley KL, Olson CM Jr, Carreras-González A, Navasa N, Anquita J. Serum C3 Enhances Complement Receptor-3 Mediated Phagocytosis of Borrelia burgdorferi. Int J Biol Sci. 2015 Sep 11;11(11):1269-71.

Helmy KY, Katschke Jr, Gorgani NN, Kljavin NM, Eliott JM, Diehl L, Scales SJ, Ghilardi N, van Lookeren Campagne M. CRIg: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. Cell. 2006 Mar 10;124(5):915-27.

Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, Rittirsch D, Neff TA, McGuire SR, Lambris JD, Warner RL, Flierl MA, Hoesel LM, Gebhard F, Younger JG, Drouin SM, Wetsel RA, Ward PA. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. Nat Med. 2006 Jun;12(6):682-7.

Inada R, Ido Y, Hoki R, Kaneko R, Ito H. The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (Spirochaetosis Icterohaemorrhagica). J Exp Med. 1916;23:377-402.

Isogai E, Kitagawa H, Isogai H, Kurebayashi Y, Ito N. Phagocytosis as a defense mechanism against infection with leptospiras. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A. 1986 Feb;261(1):65-74.

Jin D, OjciusDM, Sun D, Dong H, Luo Y, Mao Y, Yan J. Leptospira interrogans induces apoptosis in macrophages via caspase-8 and caspase-3 dependent pathways. Infect Immun. 2009 Feb; 77 (2):799-809.

Johnson AR, Hugli TE, Müller-Eberhard HJ. Release of histamine from rat mast cells by the complement peptides C3a e C5a. Immunology. 1975 Jun;28(6):1067-80.

Johnson E, Eskeland T, Bertheussen K. Phagocytosis by human monocytes of particles activating the alternative pathway of complement. Scand J Immunol. 1984 Jan;19(1):31-9.

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

Kemper C, Mitchell LM, Zhang L, Hourcade DE. The complement protein properdin binds apoptotic T cells and promotes complement activation and phagocytosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jul 1;105(26):9023-8.

Klickstein LB, Barbashov SF, Liu T, Jack RM, Nicholson-Weller A. Complement receptor type 1 (CR1-CD35) is a receptor for C1q. Immunity. 1997 Sep;7(3):345-55.

Ko AI, Galvão MR, Ribeiro CMD, Johnson WD, Riley LW. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Lancet Infec Dis. 1999;354:820-5.

Ko AI, Goarant C, Picardeau M. Leptospira: The dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. Nature Rev Microbiol. 2009;7(10):736-47.

Kolev M, Dimeloe S, Le Friec G, Navarini A, Arbore G, Povoleri GA, Fischer M, Belle R, Loeliger J, Develioglu L, Bantug GR, Watson J, Couzi L, Afzali B, Lavender P, Hess C, Kemper C. Complement Regulates Nutrient Influx and Metabolic Reaprogramming during TH1 Cell Responses. Immunity. 2015 Jun 16;42(6):1033-47.

Korb LC, Ahearn JM. C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. J Immunol. 1997 May 15;158(10):4525-8.

Lachmann PJ, Hughes-Jones NC. Initiation of complement activation. Springer Semin Immunopathol. 1984;7(2-3):143-62.

Lacroix MB, Aude CA, Arlaud GJ, Colomb MG. Isolation and functional characterization of the proenzyme form of the catalytic domains of human C1r. Biochem J. 1989 Feb 1;257(3):885-91.

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 glycoprotein activates the NLRP3 inflammasome. J Immunol. 2012 Mar 15;188(6):2805-14.

Lalli PN, Strainic MG, Yang M, Lin F, Medof ME, Heeger PS. Locally produced C5a binds to T-cell-expressed C5aR to enhance effector T-cell expansion by limiting antigen-induced apoptosis. Blood.2008 Sep 1;112(5):1759-66.

Lambris JD. The multifunctional role of C3, the third component of complement. Immunol Today. 1988 Dec;9(12):387-93.

Laudisi F, 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-1β release. J Immunol. 2013 Aug 1;19(3):1006-10.

Law SK, Dodds AW. C3, C4 and C5: the thioester site. Biochem Soc Trans. 1990;18:1155-9.

Law SK, Lichtenberg NA, Levine RP. Evidence for an ester linkage between the labile binding site of C3b and receptive surfaces. J Immunol. 1979;123(3):1388-94.

Levett PN. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev. 2001 Apr;14(2):296-326.

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.

Liszewski MK, Kolev M, Le Friec G, Leung M, Bertram PG, Fara AF, Subias M, Pickering MC, Drouet C, Meri S, Arstilla TP, Pekkarinen PT, Ma M, Cope A, Reinheckel T, Rodriguez de Cordoba S, Afzali B, Atkinson JP, Kemper C. Intracellular complement activation sustains T cell homeostasis and mediates effector differentiation. Immunity. 2013 Dec 12;39(6):1143-57.

Liu Y, Zheng W, Li L, Mao Y, Yan J. Pathogenesis of leptospirosis: interaction of Leptospira interrogans with in vitro cultured mammalian cells. Med Microbiol Immunol. 2007 Dec;196(4):233-9.

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 Dec;25(12):677-86.

Matsushita M, Fujita T. Activation of the Classical Complement Pathway by Mannose-binding Protein in Association with a Novel C1s-like Serine Protease. J Exp Med. 1992;176:1497-502.

Medicus RG, Götze O, Müller-Eberhard HJ. Alternative pathway of complement: recruitment of precursor properdin by the labile C3/C5 convertase and the potential of the pathway. J Exp Med. 1976 Oct 1;144(4):1076-93.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature. 1997 Jul 24;388(6640):394-7.

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 Oct; 39(4):139-47.

Mershon KL, Vasuthasawat A, Lawson GW, Morrison SL, Beenhouwer DO. Role of complement in protection against Cryptococcus gattii infection. Infect Immun. 2009 Mar;77(3):1061-70.

Morgan BP, Harris CL. Immune-complex solubilization by C in: Complement Regulatory Proteins. Academic Press. 1999.

Morley BJ, Walport MJ. The complement facts book. London: Academic Press; 2000. 228 p.

Na M, Jarneborn A, Ali A, Welin A, Magnusson M, Stokowska A, Pekna M, Jin T. Deficiency of the Complement Component 3 but not Factor B Aggravates Staphylococcus aereus Septic Arthritis in Mice. Infect Immun. 2016 Mar 24;84(4):930-9.

Nahori MA, Fournié-Amazouz, Que-Gerwirth NS, Balloy V, Chignard CR, Raetz I, Saint Girons I, Werts C. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lypopolissacaride in murine and human cells. J Immunol. 2005 Nov 1;175(9):6022-6031.

Nesargikar PN, Spiller B, Chavez R. The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors. Eur J Microbiol Immunol (Bp).2012. Jun;2(2):103-11.

Ooteman MC, Vago AR, Koury MC. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. J Microbiol Methods. 2006 May;65(2):247-57.

Pangburn MK, Rawal N. Structure and function of complement C5 convertase enzymes. Biochem Soc Trans. 2002;30 (Pt 6):1006-10.

Pepys MB. Role of complement in induction of antibody production in vivo. Effect of cobra factor and other C3-reactive agents on thymus-dependent and thymus-dependent antibody responses. J Exp Med. 1974 Jul 1;140(1):126-45.

Pérez-Flores J, Charruau P, Cedeño-Vázquez R, Atilano D. Evidence for Wild Crocodiles as a Risk for Human Leptospirosis Mexico. Ecohealth. 2017 Mar;14(1):58-68.

Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. Méd Maladies Infect. 2013 Jan;43(1):1-9.

Picardeau M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? Nat Rev Microbiol. 2017 May;15(5):297-307.

Pozdnyakova O, Guttormsen HK, Lalani FN, Carroll MC, Kasper DL. Impaired antibody to group B streptococcal type III capsular polysaccharide in C3-and complement receptor 2-deficient mice. J Immunol. 2003 Jan 1;170(1):84-90.

Prêtre G, Olivera N, Cédola M, Haase S, Alberdi L, Brihuega B, Gómez RM. Role of inducible nitric oxide synthase in the pathogenesis of experimental leptospirosis. Microb Pathog. 2011 Sep;51(3):203-8.

Reis ES, Barbuto JA, Isaac L. Human monocyte-derived dendritic cells are a source of several complement proteins. Inflamm Res. 2006 May;55(5):179-84.

Richardson AR, Soliven KC, Castor ME, Barnes PD, Libby SJ, Fang FC. The Base Excision Repair system of Salmonella enterica serovar typhimurium conteracts DNA damage by host nitric oxide. PloS Pathog. 2009 May;5(5):e1000451.

Ricklin D, Hajishengalis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key for immune surveillance and homeostasis. Nat Immunol. 2010 Sep;11(9):785-97.

Rieder H, Ramadori G, Meyer zum Büschenfelde KH. Guinea pig Kupffer cells can be activated in vitro to an enhanced superoxide response. J Hepatol. 1988 Dec;7(3):338-44.

Roozendall R, Carroll MC. Complement receptors CD21 and CD35 in humoral immunity. Immunol Rev. 2007 Oct;219: 157-66.

Saito M, Villanueva SY, Kawamura Y, Iida K, Tomida J, Kanemaru T, Kohno E, Miyahara S, Umeda A, Amako K, Gloriani NG, Yoshida S. Leptospira idonii sp. Nov., isolated from environmental water. Int J Evol Microbiol. 2013 Jul;63(Pt 7):2457-62.

Schreier S, Triampo W, Doungchawee G, Triampo D, Chadsuthi S. Leptospirosis research: fast, easy and reliable enumeration of mobile leptospires. Biol Res. 2009;42(1):5-12.

Schwaeble W, Dahl MR, Thiel S, Stover C, Jensenius JC. The mannan-binding-lectin-associated serine proteases (MASPs) and Map 19: four components of the lectin pathway activation complex encoded by two genes. Immunobiology. 2002 Sep;205(4-5):455-66.

Shigeoka AO, Jensen CL, Pincus SH, Hill HR. Absolute requirement for complement in monoclonal IgM antibody-mediated protection against experimental infection with type III group B streptococci. J Infect Dis. 1984 Jul;150(1):63-70.

Smythe L, Dohnt M, Norris M, Symonds M, Scott J. Review of leptospirosis notifications in Queensland 1985 to 1996. Commun Dis Intell. 1997 Jan 23;21(2):17-20.

Steneroden KK, Hill AE, Salman MD. Zoonotic disease awareness in animal shelter workers and volunteers and the effect of training. Zoonoses Public Health. 2011 Nov;58(7):449-53.

Strainic MG, Liu J, Huang D, An F, Lalli PN, Muqim N, Shapiro VS, Dubyak GR, Heeger PS, Medof ME. Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4+ T cells. Immunity. 2008 May;28(3):425-35.

Strey CW, Markiewski M, Mastellos D, Tudoran R, Spruce LA, Greenbaum LE, Lambris JD. The proinflammatory mediators C3a e C5a are essential for liver regeneration. J Exp Med. 2003 Sep 15;198(6):913-23.

Sung SS, Nelson RS, Silverstein SC. Yeast mannans inhibit binding and phagocytosis of zymosan by mouse peritoneal macrophages. J Cell Biol. 1983 Jan;96(1):160-6.

Takada Y, Ye X, Simon S. The Integrins. Genome Biology, 2007;8(5):215.

Taylor AJ, Paris DH, Newton PN. A Systematic Review of the Mortality from Untreated Leptospirosis. PloS Negl Trop Dis. 2015 Jun 25:9(6):e0003866.

Thiel S, Vorup-Jenses T, Stover CM, Schwaeble W, Laursen SB, Poulsem K et al. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. Nature. 1997;386:506-10.

Toma C, Murray GL, Nohara T, Mizuyama M, Koizumi N, Adler B, Suzuki T. Leptospiral outer membrane protein LMB216 is involved in enhancement of phagocytic uptake by macrophages. Cell Microbiol. 2014 Sep;16(9):1366-77.

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.

Turk JL. Evidence for a preferential effect of cyclophosphamide on B-cells. Proc R Soc Med. 1973 Aug;66(8):805-8.

Turner MW. The lectin pathway of complement activation. Res Immunol. 1996 Feb;147(2):110-5.

Underhill DM, Goodridge HS. Information processing during phagocytosis. Nat Rev Immunol. 2012 Jun 15;12(7):492-502.

van Lookeren Campagne M, Wiesmann C, Brown EJ. Macrophage complement receptors and pathogen clearance. Cell Microbiol. 2007 Sep;9(9):2095-102.

Vassalakis JA. O papel do componente C3 do Sistema Complemento na infecção *in vivo* por *Leptospira interrogans*. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Viriyakosol S, Mathias MA, Swancutt MA, Kirkland TN, Vinetz JM. Toll-like receptor 4 against lethal Leptospira interrogans serovar icterohaemorrhagiae infection and contributes to in vivo control of leptospiral burden. Infect Immun. 2006 Feb;74(2):887-95.

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

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

Weil A. Ueber einer eigenhuemliche, mit Miztumor, Icterus un Nephritis einhergehende acute Infektionkrankheit. Deutsch Arch Klin Med. 1886 39:209.

Werts C. Leptospirosis: a Toll road from B lymphocytes. Chang Gung Med. 2010 Nov-Dec;33(6):591-601.

Wessels MR, Butko P, Ma M, Warren HB, Lage AL, Carroll MC. Studies of B streptococcal infection in mice deficient in complement component C3 or C4 demonstrate an essential role for complement in both innate and acquired immunity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Dec 5;92(25):11490-4.

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

Yang CW, Hung CC, Wu MS, Tian YC, Chang CT, Pan MJ, Vanderwalle A. Toll-like receptor 2 mediates early inflammation of leptospiral outer membrane proteins In proximal tubule cells. Kidney Int 2006;69:815-22.

Yang CW, Wu MS, Pan MJ, Hsieh WJ, andewalle A, Huang CC. The Leptospira outer membrane protein Lipl32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. J Am Soc Nephrol. 2002 Aug;13(8):2037-45.

Zaki SA, Shangab P. Clinical manifestations of dengue and leptospirosis in children in Mumbai: an observational study. Infection. 2010 Aug;38(4):285-91.

Zychlinsky A, Prevost MC, Sansonetti PJ. Shigella flexneri induces apoptosis in infected macrophages. Nature. 1992 Jul 9;358(6382):167-9.