JULIA AVIAN VASSALAKIS

O PAPEL DO COMPONENTE C3 DO SISTEMA COMPLEMENTO NA INFECÇÃO *IN VIVO* POR *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

JULIA AVIAN VASSALAKIS

O PAPEL DO COMPONENTE C3 DO SISTEMA COMPLEMENTO NA INFECÇÃO *IN VIVO* POR *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: Profª 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)

Avian Vassalakis, Julia
O papel do componente C3 do Sistema Complemento na infecção in vivo por Leptospira interrogans / Julia Avian Vassalakis; orientadora Lourdes Isaac. -- São Paulo, 2017.
93 p.

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

1. Leptospira interrogans. 2. C3. 3. Sistema Complemento. 4. Infecções bacterianas. I. Isaac, Lourdes, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Julia Avian Vassalakis

Titulo da Dissertação/Tese: O papel do componente C3 do Sistema Complemento na infecção *in vivo* por *Leptospira interrogans*.

Orientador: Dra. Lourdes Isaac

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

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

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

Nome: .....

Instituição: .....

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

Nome: .....

Instituição: .....

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

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA

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

ICBUSP

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

CERTIFICADO

Certificamos que a solicitação de licença de uso de animais intitulada "***O papel do componente C3 do sistema complemento na resposta contra infecção por Leptospira em modelo murino***", registrada sob **nº 74**, nas fls. 34, do livro 3, foi analisada e aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-ICB/USP) em 26/06/2015.

Por esta licença, estão autorizados a manipular animais dentro dos limites do projeto proposto e no âmbito da Lei Federal nº 11.794, o Dr.(Dra.) ***Lourdes Isaac*** (Investigador Principal) e os membros da equipe: *Julia Avian Vassalakis.* Esta licença de uso de animais expira em 26/06/2019.

Havendo interesse na renovação da proposta, a solicitação deverá ser protocolada pela secretaria da CEUA-ICB/USP *até o último dia de validade da atual proposta.* Após essa data, uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that permission for the use of animals was granted to the research proposal "***The role of complement component C3 in the response against Leptospira infection in murine model***", registered as **Number 74**, in pages 34, of book 3, by the local ETHICS COMMITTEE ON THE USE OF ANIMALS (CEUA-ICB/USP) in 6/26/2015.

Under this license, ***Lourdes Isaac*** (Principal Investigator) and team members *Julia Avian Vassalakis* are authorized to make use of animals within the limits of the research proposal presented to this committee and of the Brazilian Federal Law nº 11.794.

This license expires in 6/26/2019. In case the investigators wish to renew this license, this must be presented to CEUA-ICB/USP before the last day of validity of the present license. After such date, a new research proposal must be presented.

São Paulo, 02 de julho de 2015.

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Vice-Coordenadora-CEUA- ICB/USP

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

EXPEDIÇÃO
DATA 8/7/15
REL. Nº 1570

Dedico esse trabalho às três mulheres da minha vida: minha avó, Nadir (*in memorian*), a mulher mais forte que já conheci na vida, meu anjo da guarda e meu amor eterno, à minha irmã Barbara e à minha mãe Irene. Tudo que eu sou devo a vocês.

AGRADECIMENTOS

À minha família, minha base, meu apoio maior, por toda força que me deram em todos os momentos. Principalmente, agradeço a minha irmã Barbara, meu amor incondicional e melhor amiga, minha mãe Irene que sempre foi minha confidente e meu porto seguro, ao meu pai Yannis, por todo suporte que foi dado na vida e ao meu tio Roberto, por toda ajuda nos tempos mais difíceis, por todo carinho e risadas que dividimos nos últimos anos. Sem vocês, eu nada seria!

À minha orientadora Lourdes Isaac por ter me recebido da melhor forma possível em seu laboratório, pela confiança, amizade e paciência, por todo conhecimento que me passou, pelos bons momentos e por ter sido absurdamente importante para o meu crescimento profissional.

À Denise, minha amiga e vizinha de bancada que sempre me ajudou, me escutou, me deu conselhos e esteve ao meu lado quando precisei. Dedê, obrigada por tudo, amo você!

Às minhas japonesas Priscilla e Thaís, pela ajuda, risadas, brincadeiras e por tudo que passamos e crescemos juntas no laboratório. Minhas lindas, vocês vão estar sempre no meu coração.

Ao meu amigo Íris, por toda ajuda do começo até o fim desse projeto, por ter me salvado tantas vezes, por sempre ter me escutado, pelas risadas e todos os momentos bons que passamos. Muito do que eu sei devo a você.

À todos os colegas e funcionários que passaram pelo laboratório e os que ainda estão (Leonardo, Anielle, Ana Catarina, Elena). Agradeço principalmente, à Marlene Florido, que foi minha companheira e ombro amigo tantas vezes e à Claudinha, por toda ajuda no laboratório e pelo bom humor contagiante.

Aos funcionários do biotério pelo fornecimento e manutenção dos camundongos, principalmente à Silvia Massironi e Márcio Caldas que sempre fizeram mais que o possível para me atenderem, entendendo minhas necessidades e todas as variáveis envolvidas nesse projeto.

À todos os funcionários e professores do departamento de imunologia por toda ajuda e bons momentos nos últimos três anos.

Aos Dr. Marcos Brayan, a Gisele Souza e a todos do Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária da USP pelo fornecimento de culturas de leptospiras.

À Dra. Márcia Meyer, por permitir que utilizasse seu laboratório para realizar as análises por PCR-RT.

Ao Dr. Thales de Britto e Dr. Bruno Cogliati pelas análises histopatológicas e todo conhecimento que me passaram durante o mestrado.

Ao Paulo Albe, por ter confeccionado as lâminas histológicas.

À Carla Longo, por ter realizado os experimentos de citometria de fluxo.

Ao meu namorado Rafael, por ser quem você é, pela paciência, pelo carinho, por me acalmar inúmeras vezes e por estar sempre ao meu lado. Te amo!

Aos meus amigos – de Santos ou não – que sempre estiveram do meu lado quando eu precisei.

Aos meus amigos Bianca e Rafael, que abriram suas casas pra mim quando precisei de estadia em São Paulo. Obrigada pelas risadas, conversas, pelas cervejas e pelo apoio.

À todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte desse projeto e contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO

À Capes - PROEX 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.

Perfer et obdura, dolor hic tibi proderit olim.

- Ovid

RESUMO

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.

O Sistema Complemento é parte da resposta imune inata e é de suma importância para a eliminação de processos infecciosos e para garantir a homeostase. A leptospirose é uma zoonose causada por bactérias do gênero *Leptospira*. Essas bactérias invadem o organismo pela pele lesionada ou mucosas após contato direto ou indireto com a urina de roedores, invadindo a corrente sanguínea até atingir órgãos como fígado, pulmão, baço e rim. Neste trabalho investigamos a importância da proteína C3 do SC na infecção *in vivo* por *L. interrogans*. Foram empregados camundongos C57BL/6 deficientes da proteína C3 (B6.C3$^{-/-}$) e como controle camundongos congênicos (B6.C3$^{+/+}$) infectados com a bactéria *Leptospira interrogans* serovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm (LPF). Observamos que a deficiência da proteína C3 causa uma falha na resposta imunológica, causando uma diminuição da proliferação celular de monócitos, neutrófilos, linfócitos B, linfócitos T CD4 e T CD8 no baço. Essa falha da proliferação celular tem como consequência uma diminuição da resposta inflamatória, dificultando a eliminação bacteriana dos principais órgãos-alvo (fígado, rim, pulmão e baço) nos primeiros dias de infecção. A diminuição da proliferação celular no baço dos camundongos B6.C3$^{-/-}$ pôde ser observada na circulação periférica, onde não foi encontrado um número significativamente alto no terceiro dia de infecção como foi observado nos camundongos selvagens, aumentando apenas no sexto dia de infecção. Apesar dos camundongos deficientes de C3 apresentarem uma capacidade menor de eliminação da LPF nos dias iniciais de infecção, ao sexto dia os camundongos foram capazes de eliminar a LPF de seus órgãos alvo, apesar de ainda apresentarem números mais elevados de bactéria quando comparados com os camundongos selvagens. Essa falha da eliminação da carga bacteriana demonstrou ter consequências em fases mais tardias da doença, principalmente no rim, onde observamos o aparecimento de nefrite intersticial apenas nos camundongos deficientes de C3. Na análise histopatológica, observamos que a proteína C3 ajudou a desencadear um processo inflamatório mais intenso no fígado, desenvolvendo necrose e áreas maiores de infiltrados leucocitários, visto em menor intensidade nos camundongos deficientes de C3. A eliminação das leptospiras pode ocorrer pela urina dos hospedeiros. Nossos dados mostraram que os camundongos eliminam a as bactérias pela urina na fase mais tardia da infecção, após seis dias e que os camundongos deficientes possuem um número maior de LPF sendo eliminada do que os camundongos selvagens nesse momento da infecção. Nosso trabalho foi capaz de demonstrar que a proteína C3, principalmente nos dias iniciais da infecção, é importante para montar uma resposta inflamatória apropriada para combater a infecção por LPF e eliminar a bactéria do organismo.

Palavras-chave: Leptospira. C3. Sistema Complemento. Infecções bacterianas.

ABSTRACT

Vassalakis JA. The role of Complement System component C3 during *in vivo* infection by *Leptospira interrogans*. [Masters thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

The Complement System is part of the innate immune response and is of paramount importance for the elimination of infectious diseases and to guarantee homeostasis. Leptospirosis is a zoonosis caused by bacteria of the genus *Leptospira*. These bacteria invade the body through the injured skin or mucous membranes after direct or indirect contact with the urine of rodents, invading the bloodstream until reach organs such as liver, lung, spleen and kidney. In this work, we investigated the importance of the Complement protein C3 in the *in vivo* infection by *L. interrogans*. C57BL/6 mice deficient in C3 protein (B6.C3$^{-/-}$) and, as control, congenic mice (B6.C3$^{+/+}$) infected with *Leptospira interrogans* serovar Kennewicki strain Pomona Fromm (LPF) were used. We observed that deficiency of C3 protein causes a failure of the immune response, causing a decrease in the cellular proliferation of monocytes, neutrophils, B lymphocytes, T CD4 and T CD8 lymphocytes in the spleen. This failure of cell proliferation results in a decrease in the inflammatory response, making it difficult to eliminate the bacteria from the main target organs (liver, kidney, lung and spleen) in the first days of infection. The decrease in cell proliferation in the spleen of the B6.C3$^{-/-}$ mice could be observed in the peripheral circulation, where no significant number was found on the third day of infection as observed in the wild type mice, increasing only on the sixth day of infection. Although the C3-deficient mice had a lower LPF elimination capacity on the initial days of infection, mice were able to eliminate the LPF from their target organs on the sixth day, although they still had higher numbers of bacteria when compared to the wild type animals. This failure of elimination of bacterial load has been shown to have consequences in later stages of the disease, especially in the kidney, where we observed the appearance of interstitial nephritis only in C3-deficient mice. In the histopathological analysis, we observed that the C3 protein triggered an intense inflammatory process in the liver, developing necrosis and larger areas of leukocyte infiltrates, seen in a lower intensity in C3 deficient mice. The elimination of leptospiras can occur through the urine of the hosts. Our data showed that the mice eliminate the bacteria by the urine in the later phase of the infection after six days and that the C3-deficient mice have a larger number of LPF being eliminated than the wild type mice at that time of the infection. Our work has been able to demonstrate that C3 protein, especially in the early days of infection, is important in assembling an appropriate inflammatory response to fight LPF infection and eliminate the bacteria in the body.

Keywords: Leptospira. C3. Complement System. Bacterial infections.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – As três vias de ativação do SC e a formação do MAC. 21

Figura 2 – Ligação tiól-éster..... 23

Figura 3 – Representação do Complexo de Ataque à Membrana 24

Figura 4 – Reguladores do SC..... 28

Figura 5 – Representação esquemática da estrutura geral da proteína C3 do SC e de seus fragmentos 29

Figura 6 – Morfologia da bactéria *Leptospira*..... 31

Figura 7 – Ciclo de transmissão da leptospirose 34

Figura 8 - Amplificação do gene *16S rRNA* por PCR 48

Figura 9 – Sobrevivência de espécies de leptospiras patogênica e não-patogênica na presença de soro dos camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$. 50

Figura 10 – Variação do peso corporal dos camundongos infectados com LPF durante três e seis dias. 51

Figura 11 – Contagem de leucócitos circulantes totais em camundongos infectados com LPF por três e seis dias. 53

Figura 12 – Proporção de células MN e PMN presentes na circulação sanguínea de camundongos infectados com LPF por três e seis dias. 54

Figura 13 – Desenvolvimento de esplenomegalia em camundongos infectados com LPF por três e seis dias. Relação peso corporal/peso (em porcentagem) do baço dos camundongos.... 55

Figura 14 – Número de células CD11b^{+} e neutrófilos presentes no baço de camundongos infectados com LPF por três e seis dias determinados por citometria de fluxo. 57

Figura 15 – Número de linfócitos B presentes no baço de camundongos infectados com LPF por três e seis dias determinado por citometria de fluxo. 58

Figura 16 - Número de linfócitos T presentes no baço de camundongos infectados com LPF após três e seis dias determinado por citometria de fluxo. 59

Figura 17 – Quantificação de LPF no fígado de camundongos infectados por três e seis dias. 60

Figura 18 – Quantificação de LPF no baço de camundongos infectados por três e seis dias. . 61

Figura 19 – Quantificação de LPF no pulmão de camundongos infectados por três e seis dias. 61

Figura 20 – Quantificação de LPF no rim de camundongos infectados por três e seis dias. ... 62

Figura 21 – Quantificação de LPF na urina de camundongos infectados por três e seis dias. . 63

Figura 22 – Lesões observadas no fígado de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ infectados por três, seis e quinze dias com LPF. 65

Figura 23 – *Score* das lesões observadas no fígado dos camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ infectados com LPF. 66

Figura 24 – Alterações observadas no baço dos camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ infectados durante três, seis e quinze dias com LPF. 68

Figura 25 – *Score* das alterações observadas no baço de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ infectados com LPF. 69

Figura 26 – Análise histopatológica de pulmão de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ infectados por três, seis dias e quinze com LPF. 70

Figura 27 – Lesões observadas no rim dos camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ infectados por três, seis e quinze dias com LPF. 72

Figura 28 – *Score* de lesão no rim dos camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ infectados durante três, seis e quinze dias com LPF. 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais espécies patogênicas, intermediárias e saprófitas de bactérias do gênero *Leptospira*. 32

Tabela 2 – Tipos celulares marcados e anticorpos conjugados com fluorocromos utilizados. 45

Tabela 3 – Sobrevivência dos animais B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ inoculados com diferentes doses de LPF após 15 dias. 50

Tabela 4 – Variação do peso corporal dos camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ após três e seis dias de infecção com 1,5 x 10^8 LPF representado por média e erro padrão. 51

Tabela 5 – Contagem de leucócitos sanguíneos periféricos por ml de sangue encontrados em camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ infectados com 1,5 x 10^8 LPF por três e seis dias representados em média e erro padrão. 53

Tabela 6 – Porcentagem de células mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) encontradas no sangue de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ infectados com 1,5 x 10^8 LPF por três e seis dias representados por média e erro padrão. 54

Tabela 7 – Relação entre peso corporal e peso do baço dos camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ após três e seis dias de infecção com 1,5 x 10^8 LPF representado por média e erro padrão. ... 55

Tabela 8 – Quantificação das subpopulações celulares presentes no baço de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ inoculados com 1,5 x 10^8 LPF ou PBS representada por média e erro padrão. 59

Tabela 9 – Quantificação de DNA de LPF encontradas por qPCR no fígado, baço, pulmão, rim e urina de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ infectados após três e seis dias com 1,5 x 10^8 representados em média e erro padrão. 63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT -	Alanina aminotransferase
ANOVA -	Análise de variância
APC -	Célula apresentadora de antígeno
AST -	Aspartato aminotransferase
B6.C3$^{+/+}$ -	Camundongo C57BL/6 normal
B6.C3$^{-/-}$ -	Camundongo C57BL/6 C3 deficiente
C1INH -	Do inglês *C1-inhibitor*
C3aR -	Receptor de C3a
C4BP -	Do inglês *C4b binding protein*
C5aR1 -	Receptor de C5a
$C_{24}H_{39}NaO_4$ -	Deoxicolato de sódio
CR1/2/3 -	Receptor de Complemento tipo 1/ tipo 2/ tipo 3
DAF-1 -	Do inglês *decay-accelerating factor 1*
DC -	Célula dendrítica
DNA -	Ácido desoxirribonucleico
EDTA -	Do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*
ELISA -	Do inglês *enzyme-linked immunoabsorbent assay*
EMJH -	Do inglês *Ellinghausen McCullough Johnson and Harris*
Fc -	Do inglês *fragment crystallizable*
FD -	Fator D
FH -	Fator H
FI -	Fator I
FHL-1 -	Fator H *like*-1
FHR-1 -	Fator H *related*-1
HE -	Hematoxilina-Eosina
IFN-γ -	Interferon γ
IL-1β -	Interleucina-1β
IL-10 -	Interleucina-10
IL-12 -	Interleucina-12
IL-1Ra -	Receptor antagonista de IL-1

IL-6 -	Interleucina 6
LcpA -	Do inglês *leptospiral complement regulator-acquiring protein A*
Lig A/B -	Do inglês *High-molecular-wieght leptospiral immunoglobulin-like repeat A/B*
LPF -	*Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm
LPS -	Lipopolissacarídeo
MAC -	Complexo de ataque à membrana
MAPK -	Do inglês *Mitogen Activated Protein Kinase*
MASP-1/-2/-3 -	Do inglês *mannose binding lectin associated serine protease-1/-2/-3*
MAT -	Do inglês *microscopic agglutination test*
Mb -	Megabase
MBL -	Do inglês *mannose binding lectin*
MCP-1 -	Do inglês *monocyte chemotactic protein-1*
MIP-2 -	Do inglês *macrophage inflammatory protein-2*
$MgCl_2$ -	Cloreto de magnésio
NaCl -	Cloreto de sódio
$Na_3P_2O_7$ -	Pirofosfato de sódio
NK -	Células *natural killer*
Patoc -	*Leptospira biflexa* sorovar Patoc
pb -	Par de base
PBS -	Do inglês *Phosphate buffer saline*
pDC -	Célula dendrítica plasmocitoide
PI3k -	Do inglês *phosphatidylinositide 3-kinases*
qPCR -	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
SC -	Sistema Complemento
SDS -	Dodecil sulfato de sódio
SHN -	Soro humano normal
SNC -	Sistema Nervoso Central
sTNF-α RII -	Receptor solúvel II de TNF-α
TA -	Temperatura ambiente

TNF-α -	Fator de necrose tumoral-α
Tris -	Trizma Base
UFC -	Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1 Introdução 20
1.1 Sistema Complemento 20
1.1.1 Via Clássica 22
1.1.2 Via Alternativa 22
1.1.3 Via das Lectinas 23
1.1.4 Formação do Complexo de Ataque à Membrana 24
1.1.5 Funções do Sistema Complemento 25
1.1.6 Regulação do Sistema Complemento 26
1.1.7 Proteína C3 28
1.2 Leptospiras 30
1.3 Leptospirose 33
1.4 Resposta imune contra leptospiras 35
1.5 Sistema Complemento na resposta contra leptospirose 37
2 Objetivos 40
2.1 Objetivo Geral 40
2.2 Objetivos específicos 40
3 Delineamento experimental 41
4 Material e Métodos 42
4.1 Obtenção dos animais 42
4.2 Obtenção e cultivo das leptospiras 42
4.3 Ensaio de sobrevivência da LPF na presença do soro *in vitro* 42
4.4 Preparação dos inóculos de leptospira 43
4.5 Infecção dos animais 43
4.6 Eutanásia e coleta dos órgãos dos animais 44
4.7 Monitoramento da esplenomegalia 44
4.8 Análise leucocitária 44
4.9 Análise histopatológica 45
4.10 Extração de DNA dos tecidos 46
4.11 PCR quantitativo (qPCR) 47
4.12 Análise estatística 48
5 Resultados 49
5.1 Ensaio de sobrevivência *in vitro* das leptospiras 49
5.2 Ensaio de sobrevivência dos camundongos 50

5.3 Variação do peso corporal durante a infecção por LPF 51
5.4 Quantificação de leucócitos na circulação periférica 52
5.5 Proporção de MN e PMN na circulação periférica 53
5.6 Desenvolvimento de esplenomegalia 54
5.7 Análise de subpopulações celulares no baço 55
5.8 Quantificação de LPF nos órgãos 59
5.9 Análise histopatológica 63
5.9.1 Fígado 64
5.9.2 Baço 67
5.9.3 Pulmão 69
5.9.4 Rim 71
6 Discussão 74
7 Resumo dos resultados e conclusão 83
Referências* 85

1 Introdução

1.1 Sistema Complemento

A entrada de agentes agressores no organismo desencadeia a primeira linha de defesa do hospedeiro denominada imunidade inata, a qual consiste em uma resposta imediata de células e moléculas ao estímulo, a partir de mecanismos previamente estabelecidos a esses elementos e que, ao final dessa resposta, não estabelece memória imunológica, diferentemente da resposta adaptativa ou adquirida. Entre os principais elementos da imunidade inata estão: as barreiras físicas e químicas, as células efetoras (macrófagos, neutrófilos, células *Natural Killer* e células dendríticas e as proteínas que formam o Sistema Complemento (SC). Tais elementos são responsáveis pela ativação da resposta imunológica que ocorre após o reconhecimento de padrões moleculares presentes apenas em microrganismos, os chamados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), por receptores de reconhecimento de padrões (RRPs), como os *Toll-like receptors* (TLRs). Após o reconhecimento, são desencadeados mecanismos capazes de combater diversos tipos de patógenos, como a fagocitose, ativação do SC e a produção de citocinas, incluindo quimiocinas. (Cruvinel et al., 2010).

O SC foi descoberto em 1889 como um componente termo lábil presente no sangue com capacidade de lisar hemácias de espécies não humanas, além de possuir características bactericidas (Buchner, 1889). É constituído por proteínas solúveis e de membrana que fazem parte da resposta inata, porém também participa como um mecanismo efetor da resposta humoral. As proteínas solúveis do SC são encontradas na sua forma não ativada e, após uma série de ativações enzimáticas por três vias distintas, disparam uma cascata na superfície do patógeno com o objetivo de eliminar a infecção por meio de opsonização e posterior fagocitose, pela ação das anafilotoxinas que atraem células inflamatórias e pela formação do seu complexo de ataque à membrana (MAC) que pode causar a lise osmótica do patógeno (Nesargikar et al., 2012; Norris, Remuzzi, 2013). Além da resposta contra infecções por microrganismos, o SC também participa da remoção de imunocomplexos detritos de células necróticas e apoptóticas (Sjöberg et al., 2009).

A ativação do SC pode ocorrer por três vias (**Figura 1**): a Via Clássica, que pode ser ativada a partir da ligação do complexo C1 a imunocomplexos; a Via Alternativa, que se inicia após a hidrólise espontânea da ligação tiól-éster da molécula C3; e a Via das Lectinas, que é ativada pela ligação de lectinas, como a lectina ligadora de manose (MBL – *mannose-binding*

lectin) e ficolinas, a resíduos de carboidratos e N-acetilglicosamina de patógenos, respectivamente (Nangaku, 1998). Apesar das diferentes formas de ativação, as três vias do SC originam C3-convertases e C5-convertases e, ao final de cada uma das vias, poderá haver a formação do MAC, que participa ativamente da destruição de patógenos (Nesargikar et al., 2012).

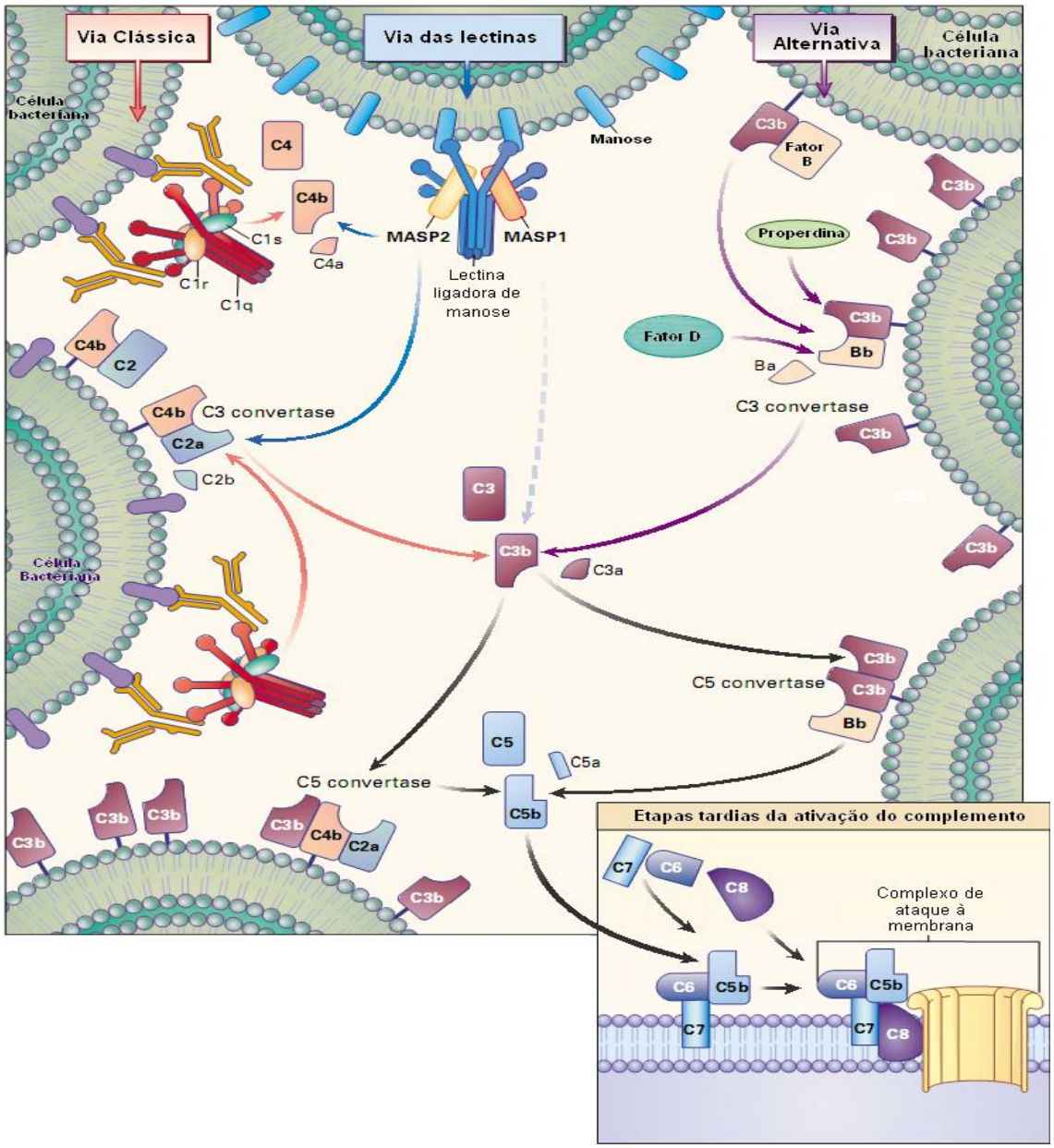


Figura 1 – As três vias de ativação do SC e a formação do MAC. A Via Clássica é ativada a partir da ligação do complexo C1 a um imunocomplexo. A Via das Lectinas é ativada a partir da ligação da MBL ou ficolinas a carboidratos e N-acetilglicosamina de patógenos, respectivamente. A ativação de ambas as vias tem como resultado a clivagem de C4 e C2. A Via Alternativa inicia a partir da hidrólise espontânea da molécula C3. Todas as vias de ativação geram as C3- e C5- convertases, esta última dará início à formação do complexo de ataque à membrana (MAC), responsável pela lise celular (Modificada de Walport, 2001).

1.1.1 Via Clássica

A Via Clássica do SC é iniciada, principalmente, a partir da ligação do complexo C1 a um complexo antígeno-anticorpo (Ehrlich, Morgenroth, 1900). O complexo C1 é formado por uma molécula de C1q, duas de C1r e mais duas de C1s. C1q se liga à porção Fc de anticorpos IgM ou IgG e ativa C1r, que por sua vez, cliva e ativa C1s (Ziccardi, 1983; Reid, 1986), a qual é capaz de clivar as moléculas C4 e C2, ativando-as e dando continuidade a cascata enzimática. A clivagem de C4 dá origem a dois fragmentos, um maior C4b, que permanece ligado covalentemente à superfície do patógeno, e um menor C4a (Law, Dodds, 1990). C2 ligado ao fragmento C4b é clivado por C1s em C2a e C2b (Nagasawa, Stroud, 1977), formando a C3-convertase da Via Clássica (C4bC2a) capaz de clivar várias moléculas de C3 em C3a, uma potente anafilotoxina e C3b, uma opsonina que pode se ligar a C3-convertase e formar a C5-convertase da Via Clássica (C4bC2aC3b) (Takata et al., 1987; Kozono et al., 1990). C5 é clivado em C5a (anafilotoxina) e C5b, a partir do qual iniciar-se-á a formação do MAC (Loos, 1985).

Além de ser ativada pela ligação de C1 a um imunocomplexo, a Via Clássica também é iniciada pelo reconhecimento da Proteína C-reativa (CRP) pela molécula de C1q durante processos inflamatórios quando ligada a um ligante multivalente (Kaplan, Volanakis, 1974). Essa proteína produzida pelo fígado possui uma ligação dependente de Ca^{2+} para fosfocolinas expressa na superfície de diversos microrganismos e membranas celulares biológicas lesionadas. A CRP faz parte da família das pentraxinas e é a principal proteína plasmática de fase aguda, que apresenta rápido aumento no soro durante uma resposta a infecção ou lesão tecidual (Volanakis, Kaplan, 1971). Suas principais funções biológicas constituem o reconhecimento de patógenos e células danificadas do hospedeiro e posterior eliminação pelo recrutamento do SC e de células fagocitárias. A ativação do SC pela CRP é restrita apenas à formação da C3-convertase pela Via Clássica, que ocorre de forma semelhante à ativação por imunocomplexos (Mold et al., 1999).

1.1.2 Via Alternativa

A Via Alternativa foi proposta depois da Via Clássica com o conceito de que o SC poderia ser ativado mesmo na ausência de anticorpos (Pillemer et al., 1954). Esta via é iniciada a partir da hidrólise espontânea da ligação de tiól-éster da cadeia α de C3, resultando na molécula C3(H_2O) (**Figura 2**), a qual é conformacionalmente semelhante ao fragmento C3b, onde o Fator B (FB) pode se ligar e posteriormente ter sua porção N-terminal clivada pelo

Fator D (FD) em dois fragmentos, Ba e Bb. O fragmento Bb permanece ligado a C3(H_2O) formando o complexo C3(H_2O)Bb, a primeira C3-convertase da Via Alternativa (Lanchmann, Hugher-Jones, 1984; Law, Dodds, 1990). O FB também pode se ligar à molécula de C3b, ser igualmente clivado pelo FD e formar a segunda C3-convertase da Via Alternativa (C3bBb) (Götze, 1986; Choy et al., 1992). Ambas C3-convertases sofrem ação do Fator P (properdina) que estabiliza estas enzimas e amplifica a clivagem de C3 (Fearon, Austen, 1975).

Assim como a Via Clássica, a Via Alternativa também forma C5-convertase (C3bBbC3b), capaz de clivar C5 em C5a e C5b, como anteriormente descrito, e dar início à formação do MAC.

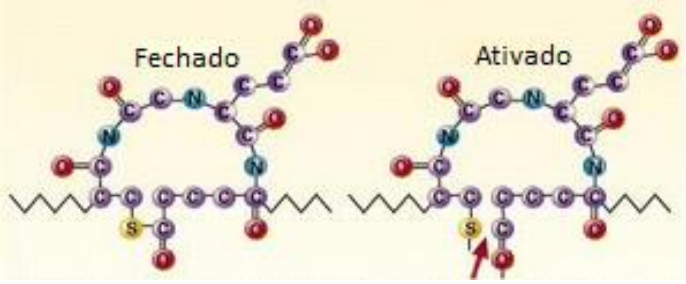


Figura 2 – Ligação tiól-éster. (**A**) C3 nativo com ligação tiól-éster entre moléculas de carbono e enxofre íntegra sinalizada pela seta vermelha. (**B**) Hidrólise da ligação tiól-éster entre moléculas de carbono e enxofre (seta) iniciando a ativação da Via Alternativa. (Adaptado de Walport, 2001).

1.1.3 Via das Lectinas

A última das vias do SC a ser descrita, também ativada sem a presença de anticorpos. Inicia-se a partir da ligação de lectinas, como a *mannose binding lectin* (MBL) e ficolinas, aos resíduos de carboidratos ou resíduos acetilados presentes exclusivamente na superfície de patógenos. A MBL possui estrutura semelhante a C1q e três serino proteases encontram-se associadas à MBL: a serino protease associada à MBL (MASP)-1, MASP-2, e a MASP-3. MASP-1 e MASP-2 possuem estrutura análoga a C1r e C1s e, uma vez que MBL se liga ao carboidrato na superfície do patógeno, MASP-2, que apresenta função homóloga a C1s, sofre uma mudança conformacional e cliva o zimógeno C4 em C4a e C4b (Matsushita, Fujita, 1992; Holmskov et al., 1994; Thiel et al., 1997). A MASP-3, última das MASPs a ser descoberta, também apresenta estrutura semelhante às outras proteases da família das serino-proteases MASP-*like* (C1r, C1s, MASP-1 e MASP-2) e pode ser encontrada associada a MASP-2, formando um grande oligômero. A MASP-3 pode regular a deposição do fragmento C4b ligando-se ao complexo MBL/MASP-2 ou impedindo a formação do mesmo, inibindo a clivagem do fragmento C4 pela MASP-2 (Dahl et al., 2001). Além da função inibitória, a MASP-3 possui função ativadora, onde a protease cliva pró-FD em FD, o qual é capaz de

clivar FB e formar a C3-convertase da Via Alternativa, criando um *link* entre as Vias Aternativa e das Lectinas (Dobó et al., 2016). Da mesma forma que ocorre na Via Clássica, o fragmento C4b se liga covalentemente à superfície do patógeno, permitindo a ligação da proteína C2, a qual também é clivada por MASP-2 em dois fragmentos, o C2a e C2b. O fragmento C2a ligado em C4b forma a C3-convertase (C4b2a), capaz de clivar a proteína C3 em C3a e C3b. O fragmento C3b pode se ligar à C3-convertase já formada na superfície do patógeno e dar origem à C5-convertase (C4b2a3b), que possui a capacidade de clivar moléculas de C5 em dois fragmentos, o fragmento C5a e o C5b, o último com a capacidade de dar início à formação do MAC (Holmskov et al., 1994).

1.1.4 Formação do Complexo de Ataque à Membrana

Ao sofrer a ação da C5-convertase, C5 é clivado gerando os fragmentos C5a e C5b. O fragmento C5b interage com a proteína C6 que, por sua vez, é capaz de interagir com C7 mesmo na fase aquosa. A proteína C8 interage com o complexo, formando C5b-8, o qual fica estabilizado na bicamada lipídica, facilitando a polimerização de moléculas de C9, formando o complexo $C5b6789_{(n)}$ (**Figura 3**) que é capaz de formar poros na membrana celular e causar lise osmótica em diversos patógenos (Podack et al., 1976; Tschopp, Podack, 1981).

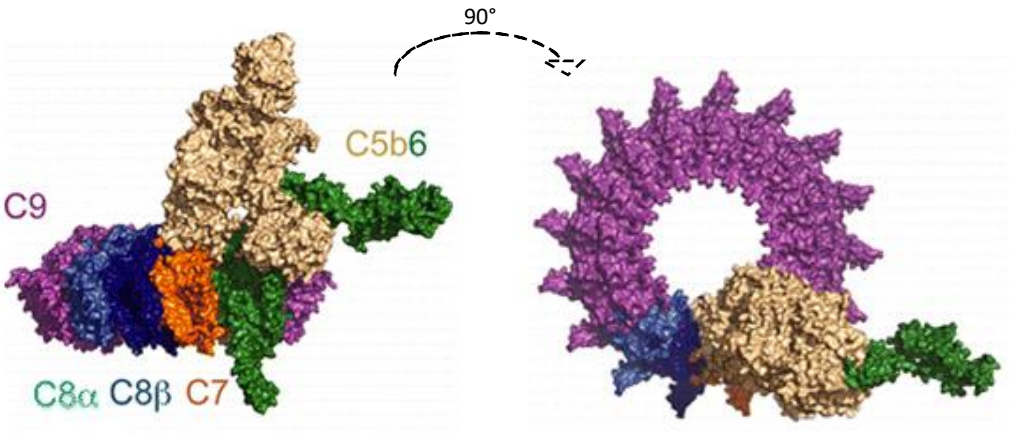


Figura 3 – Representação do Complexo de Ataque à Membrana. Fragmento C5b ligado às proteínas C6, C7, C8 e diversas moléculas de C9, que darão origem ao MAC, formando um poro na superfície celular (Modificado de Bubeck, 2014).

1.1.5 Funções do Sistema Complemento

A fagocitose é importante na eliminação de células apoptóticas e de patógenos, para a homeostasia e resolução de processos inflamatórios, estabilizando o organismo. A opsonização de patógenos ocorre pela deposição de anticorpos, que irão auxiliar no reconhecimento, e por fragmentos do SC como C3b, C4b e iC3b, os quais irão se depositar na superfície dos patógenos ou de células em processo de apoptose e serão reconhecidos por receptores como os receptores do complemento 1, 3 e 4 (CR1, CR3 e CR4) presentes em macrófagos, monócitos e neutrófilos, facilitando a remoção de tais células, assim como de microrganismos (Merle et al., 2015). Células apoptóticas precisam ser eliminadas do organismo de forma silenciosa para garantir a homeostasia. Esse processo de remoção é realizado por fagócitos que degradam e eliminam a célula apoptótica previamente opsonizada por fragmentos do SC sem que seja montada uma resposta imunológica (Ricklin et al., 2010). Além disso, a ligação covalente de C3b pelas três vias do SC na superfície do patógeno irá culminar na ativação da via terminal do SC, na qual será formado um poro de, aproximadamente, 10 nm na superfície alvo. Esse poro promove a entrada de água, saída de componentes intracelulares, como íons, levando a um desequilíbrio osmótico e posterior morte celular (Esser, 1991).

A molécula de C1q pode se ligar a corpúsculos apoptóticos, evitando que antígenos próprios sejam reconhecidos pelo sistema imune, evitando a formação de auto-anticorpos. A deficiência de C1q está relacionada com o desenvolvimento de doenças autoimunes (Roumenina et al., 2011; Macedo, Isaac, 2016). O fragmento iC3b também possui papel importante na remoção das células apoptóticas com propriedade anti-inflamatória via interação com seu receptor CR3 em monócitos, macrófagos, células dendríticas (DC) e células da microglia (Merle et al., 2015).

O acúmulo de imunocomplexos na circulação pode causar deposição nos vasos capilares e inflamação no local. Para que isso não ocorra, o SC atua de duas formas: 1) ligando-se no complexo antígeno-anticorpo evitando que esses complexos se tornem maiores; 2) os fragmentos de C3b podem se ligar sobre a molécula de Ig e bloquear a interação com o antígeno, diminuindo o tamanho do complexo formado. Além disso, os fragmentos C3b e C4b podem se ligar ao CR1 presente nos eritrócitos e essas células conduzirão os complexos até órgãos como fígado e baço, onde os fragmentos do SC potencializarão a fagocitose por macrófagos teciduais residentes (Schifferli et al., 1986; Fearon et al., 1989; Schifferli, Taylor, 1989).

As anafilotoxinas C3a e C5a contribuem para a inflamação e ativação de células como macrófagos, eosinófilos e neutrófilos que expressam C3aR e C5aR1, induzindo a explosão respiratória. Além disso, induzem liberação de histamina por mastócitos e basófilos promovendo a vasodilatação. O fragmento C5a também é o mais potente quimioatraente do SC, sendo capaz de recrutar leucócitos para o sítio inflamatório e induzir a liberação de citocinas, auxiliando na resolução da infecção (da Silva et al., 1967; Till, 1986). O fragmento C4a é capaz de induzir contração do músculo liso e também pode causar eritema e edema quando injetado na pele humana, porém são necessárias elevadas concentrações de C4a para que ocorram tais alterações. Mesmo assim, C4a parece não ter função quimiotática e sugere-se que sua atividade biológica seja devida à presença de outras duas anafilotoxinas na mesma preparação (Gorski et al., 1979). Além disso, ainda não se sabe se o fragmento possui um receptor exclusivo para C4a (Barnum, 2015).

Células T e células apresentadoras de antígenos (APC) expressam receptores de anafilotoxinas em sua superfície. A ligação entre as anafilotoxinas C3a e C5a com seus ligantes C3aR e C5aR1, respectivamente, provoca um aumento da proliferação de células T e da resposta com perfil inflamatório Th1, além do aumento da produção de citocinas e de moléculas coestimuladoras pelas APCs (Noris, Remuzzi, 2013). Além de regular a proliferação de células T, acredita-se que o SC regule fisiologicamente a sobrevivência dessas células e também module a resposta imune adaptativa no caso de infecções, autoimunidade e transplantes. Um estudo mostrou que camundongos deficientes de C3 possuem uma resposta Th1 reduzida em infecção por influenza, um decaimento da expressão de IL-12 e um aumento da resposta Th2 (Pekkarinen et al., 2011). O fragmento C3d ligado covalentemente ao antígeno é capaz de interagir com o CR2 presente nos linfócitos B e células foliculares dendríticas, aumentando a síntese de anticorpos específicos, além de ser importante na resposta de anticorpos dependente de células T (Dierich et al., 1987).

1.1.6 Regulação do Sistema Complemento

A ativação do SC pode ocorrer também sobre células saudáveis do hospedeiro. O produto da hidrólise de C3 na Via Alternativa, por exemplo, não diferencia entre células normais do hospedeiro e microrganismos, podendo causar danos teciduais, caso não seja regulada. A regulação do SC no hospedeiro é realizada por proteínas plasmáticas e proteínas ligadas à membrana celular que controlam a ativação e inibição do SC (**Figura 4**).

A inibição de C1r e C1s na Via Clássica e de MASP-1 e MASP-2 na Via das Lectinas ocorre pela ação do inibidor de C1 (C1INH) (Pangbun, 1986). Na Via Alternativa, Fator I (FI), juntamente com a ação de cofatores, como o Fator H (FH), cliva C3b formando seus produtos de clivagem: iC3b, C3dg e C3d. O FH compete com o fragmento Bb pela ligação a C3b, deixando-o susceptível à ação do FI (Ziccardi, Cooper, 1979). O FI também cliva o fragmento C4b na presença de C4b *binding protein* (C4BP), interrompendo sua função na Via Clássica e na Via das Lectinas (Gigli et al., 1979).

O fator de aceleração de decaimento (DAF/CD55), presente na membrana de leucócitos, neutrófilos e células epiteliais do hospedeiro, dissocia os complexos C3bBb e C4b2a, acelerando o decaimento das C3-convertases de todas as vias de ativação do SC e, consequentemente, impedindo a clivagem de C5 (Medof et al., 1984). Outros reguladores ligados à membrana são as moléculas CR1 (CD35), presentes em algumas células sanguíneas (Fearon, 1979), e a proteína de membrana com atividade de cofator (MCP/CD46), presente em células nucleadas (Seya et al., 1986). CR1 E MCP funcionam como cofatores para o FI clivar os fragmentos C3b e C4b, inativando-as.

O CD59 é uma glicoproteína presente na membrana de células sanguíneas, epiteliais e endoteliais que inibe a formação do MAC, ligando-se ao complexo C5b-8, impedindo que ocorra a ligação e polimerização de moléculas de C9 na membrana da célula saudável do hospedeiro (Meri et al., 1990). A regulação do MAC também pode ser feita pela clusterina, outra glicoproteína plasmática que se liga aos complexos C5b-7, impedindo que o mesmo se ancore na membrana; C5b-8, impedindo a ligação de C9 e em C5-9, impedindo a polimerização e formação do poro na membrana (Tegla et al., 2011). A clusterina está frequentemente colocalizada com uma outra glicoproteína, a vitronectina (ou S-proteína) (Tandon et al., 1992), que possui a capacidade de inativar o MAC ao se ligar a C5b-7, C5b-8 e C5b-9, formando os complexos solúveis SC5b-7, SC5b-8 e SC5b-9, respectivamente (Tegla et al., 2011).

O SC possui apenas um regulador positivo conhecido, a properdina, que possui a função de estabilizar a C3- e C5-convertase, aumentando a afinidade de C3b pelo FB, diminuindo a clivagem do fragmento C3b pelo FI, estabilizando a ativação da Via Alternativa (Fearon, Austen, 1975).

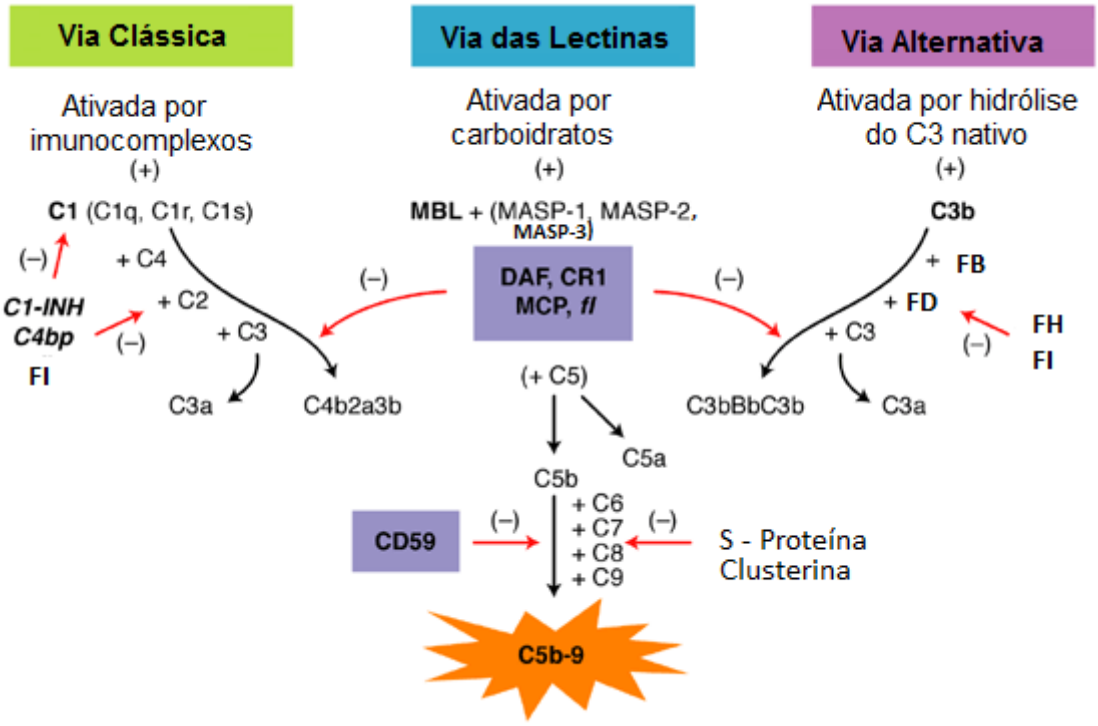


Figura 4 – Reguladores do SC. C1-INH: inibidor de C1. C4BP: proteína ligante de C4b. FI: Fator I. MBL: lectina ligante de manose. DAF: fator de aceleração de decaimento. CR1: receptor de complemento 1. MCP: proteína de membrana com atividade de co-fator. CD59: inibidor de lise de membrana. Clusterina e S-Proteína. FH: Fator H. Masp-1,2 e 3 (*Mannose binding lectin-associated serine protease*). (Modificada de Francis et al., 2003).

1.1.7 Proteína C3

A proteína C3 possui massa de aproximadamente 190 kDa e está presente em concentrações relativamente elevadas no soro humano (cerca de 1,2 mg/ml) (Sahu, Lambris, 2001). É sintetizada nos hepatócitos, principalmente (Bruijn, Fey, 1985), mas também pode provir de outras células, como monócitos/macrófagos, neutrófilos, basófilos, células endoteliais e epiteliais, mioblastos e adipócitos (Botto, 2000).

Estruturalmente, a proteína C3 contém 1.663 aminoácidos e é formada por uma cadeia α, com peso molecular de 75 kDa, e uma cadeia β, de 115 kDa, ligadas covalentemente por uma ponte dissulfeto (Botto, 2000) (**Figura 5**). O gene *C3* está localizado no cromossomo 19 e possui 41 éxons, podendo conter cada um 52 a 213 pb, dos quais 25 éxons codificam para cadeia α e 16 codificam para cadeia β (Sahu, Lambris, 2001).

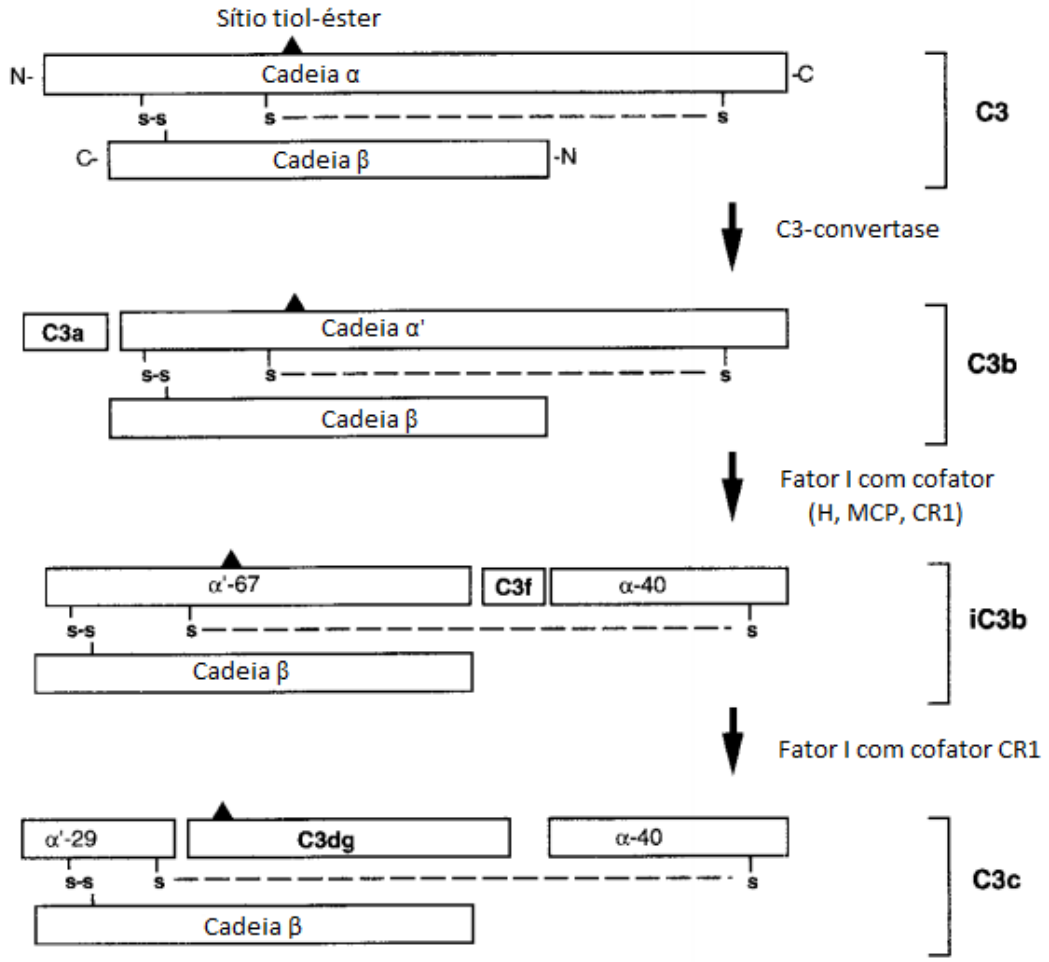


Figura 5 – Representação esquemática da estrutura geral da proteína C3 do SC e de seus fragmentos. A proteína C3 é formada por duas cadeias, uma cadeia maior α e uma menor β, as quais estão ligadas covalentemente por uma ponte dissulfeto (SS). Foi representada na figura (seta) a porção da cadeia α onde a C3-convertase age, liberando o fragmento menor C3a. O fragmento C3b, que permanece ligado à membrana do patógeno, é formado pelas cadeias α' e β. C3b ainda pode ser clivado pelo FI e formar o fragmento iC3b e C3f. iC3b ainda pode ser clivado em C3c e C3dg (Modificada de Botto, 2000).

Após ativação, as C3-convertases geradas por qualquer uma das vias clivam a proteína C3 na ligação Arg-/-Ser da sua cadeia α, formando os fragmentos C3a e C3b. O fragmento C3a é um polipeptídeo de 77 aa, com estrutura de quatro hélices estabilizadas por três pontes de dissulfeto, possui uma sequência C-terminal conservada, a qual é importante para interação com seu receptor C3aR que pertence à família dos receptores acoplados à proteína G com sete domínios transmembranares. Uma vez ligado a seu receptor, C3a induz a transdução de sinais intracelulares via proteína G heterotrimérica e fosforilação de fofoinositídeo 3-quinase (PI3K), proteína quinase B (PKB) e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), estimulando a síntese de quimiocinas (Merle et al., 2015). C3a é uma potente anafilotoxina

que regula a vasodilatação, aumenta a permeabilidade de pequenos vasos sanguíneos e induz contração do músculo liso (da Silva et al., 1967). Nos macrófagos, neutrófilos e eosinófilos C3a tem a função de desencadear a explosão respiratória, age na liberação de grânulos de histamina de mastócitos e basófilos, na liberação de serotonina das plaquetas, e em células B e monócitos modula a síntese de IL-6 e TNF-α (Dinasarapu et al., 2012). A regulação da atividade de C3a é feita pela carboxipeptidase N, uma metaloprotease que cliva o resíduo de arginina na porção carboxi-terminal, dando origem ao fragmento C3a-desArg, o qual não é mais capaz de se ligar ao receptor C3aR, sendo desprovido de função conhecida até o momento (Matthews et al., 2004).

O FI tem função proteolítica e é capaz de clivar a cadeia α' do fragmento C3b, na presença de cofatores como o FH, MCP e CR1, formando iC3b, que permanece ligado à membrana celular, e C3f. O fragmento iC3b, assim como C3b, tem como função opsonizar a membrana do patógeno e, ainda, pode sofrer novamente a ação do FI, também com a presença de cofatores, e é clivada em C3c e C3dg. A última molécula também pode sofrer ação de proteases e ser clivada em dois últimos fragmentos: C3d e C3g (Noris, Remuzzi, 2013).

1.2 Leptospiras

As bactérias do gênero *Leptospira* foram descobertas no início do século XIX (Inada et al., 1916), são membros da família *Leptospiraceae* e pertencem à ordem *Spirochaetales*. São microrganismos aeróbios, crescem lentamente entre 28 °C - 30 °C de temperatura (Faine et al., 1999), são morfologicamente finos (medindo cerca de 6-20 µm x 0,1 µm), helicoidais, com flagelos no seu espaço periplasmático, que conferem motilidade às bactérias, e extremidades em forma de gancho (**Figura 6**) (Adler, Moctezuma, 2010). São constituídas por uma camada porosa que cerca sua membrana citoplasmática e parede celular. Esses poros são necessários para a troca de solutos entre o ambiente onde estão presentes e o espaço periplasmático (Plank, Dean, 2000). Devido à sua morfologia fina, sua visualização pelo microscópio óptico comum é difícil, sendo necessária uma microscopia óptica sob campo escuro para que possa ser observada (World Health Organization, 2003).

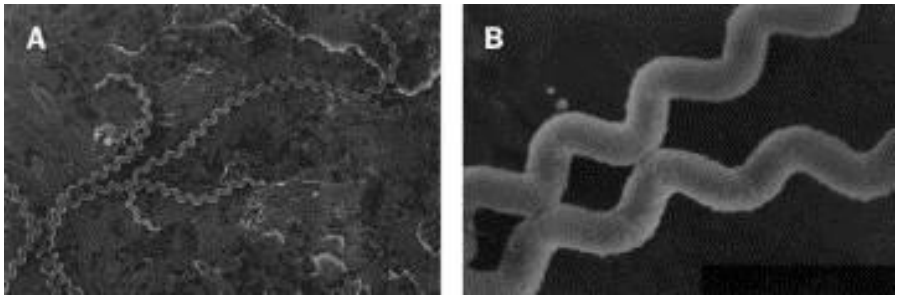


Figura 6 – Morfologia da bactéria Leptospira. A) Bactérias medindo aproximadamente 0,1μm de largura e 6 μm de comprimento com formato fino e espiralado. Esse formato, juntamente com seus flagelos nas extremidades em forma de gancho, confere à bactéria seus movimentos de rotação e translação. B) Ampliação da superfície bacteriana, sendo possível observar seu formato em espiral (Bharti et al., 2003).

Esses microrganismos necessitam de seus hospedeiros naturais vertebrados para sua manutenção e reprodução, mas ao serem liberados pela urina dos mesmos, podem permanecer viáveis por longos períodos, quando em contato com a água ou solo úmido (Plank, Dean, 2000).

O gênero é composto por 22 espécies separadas em não patogênicas (saprófitas), intermediárias e patogênicas (**Tabela 1**) (Picardeau, 2013). As bactérias podem ser classificadas sorologicamente pela composição de lipopolissacarídeos (LPS) expressos na sua superfície, tendo sido identificados mais de vinte sorogrupos e duzentos sorovares, ou com base no seu genoma. Até hoje, foram identificadas dezesseis espécies de *Leptospira* patogênicas e mais seis espécies de *Leptospira* saprófitas, com base em suas características genômicas, sendo que entre as espécies patogênicas, sete delas são as principais causadoras da leptospirose (Ko et al., 2009; Evangelista, Coburn, 2010). A espécie *L. interrogans* é comumente utilizada para se referir às espécies patogênicas e a *L. biflexa* para espécies saprófitas (Ahmed et al., 2006). Seu genoma possui entre 3,9 a 4,6 megabases (Mb) e, dentro das espécies já conhecidas, apenas seis genomas de três espécies foram sequenciados até o momento (Adler, Moctezuma, 2010).

Tabela 1 – Principais espécies patogênicas, intermediárias e saprófitas de bactérias do gênero Leptospira.

Espécie	Referência
Patogênicas	
L. alexanderi	Brenner et al., 1999
L. alstonii	Smythe et al., 2013
L. borgpetersenii	et al., 1987
L. interrogans	Faine e Stallman, 1982
L. kirschneri	Ramadass et al., 1992
L. kmetyi	Slack et al., 2009
L. mayottensis	Bourhy et al., 2014
L. noguchi	Faine e Stallman, 1982
L. santarosai	Yasuda et al., 1987
L. weilii	Yasuda et al., 1987
Intermediárias	
L. broomi	Levett et al., 2006
L. fainei	Perolat et al., 1998
L. inadai	Yasuda et al., 1987
L. licerasiae	Matthias et al., 2008
L. wolffii	Slack et al., 2008
Não patogênicas	
L. biflexa	Faine e Stallman, 1982
L. idonii	Saito et al., 2013
L. meyeri	Yasuda et al., 1987
L. terpstrae	Smythe et al., 2013
L. vanthielii	Smythe et al., 2013
L. wolbachii	Yasuda et al., 1987
L. yanagawe	Smythe et al., 2013

Não é possível diferenciar as espécies de *Leptospira* apenas morfologicamente. Para diferenciação dos sorovares é aplicada a técnica de soroaglutinação microscópica (MAT), empregando anticorpos específicos, onde os sorovares aglutinam de acordo com a suas características antigênicas (WHO, 2003).

No corpo humano, a bactéria penetra por mucosas e pela pele íntegra ou lesionada, podendo ser encontrada em qualquer órgão ou tecido. A infecção pode ser controlada pelo sistema imunológico, mas, mesmo assim, algumas estirpes podem permanecer depositadas nos túbulos renais e serem continuamente liberadas na urina (WHO, 2003).

1.3 Leptospirose

Essa doença foi descrita pela primeira vez por Adolf Weil que a caracterizou como uma síndrome infecciosa aguda, apresentando alterações como esplenomegalia, icterícia e nefrite (Weil, 1886). A leptospirose é uma doença emergente causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*, descobertas como o agente causador em 1916 por Inada et al. É uma doença de distribuição global e a infecção ocorre, em sua maioria, em locais com clima tropical, com condições sanitárias insatisfatórias, enchentes e/ou desastres naturais (Guerra, 2003).

A infecção humana por *Leptospira* pode ocorrer diretamente por meio do contato com tecido, urina ou fluídos de animais infectados, principalmente roedores, mas também por meio de outros animais como gado, cachorros, gatos, e alguns animais selvagens como gambás e morcegos, ou indiretamente, através do contato com água e solo contaminados por *Leptospira* excretada pela urina dos animais infectados (Vijayachari et al., 2008) (**Figura 7**). Esses animais servem como reservatórios para estas espiroquetas, as quais podem permanecer nos túbulos distais dos rins e podem ser eliminadas pela urina desses animais durante anos, muitas vezes assintomaticamente (Rao, 2006; Sehgal, 2006).

Essa infecção foi primeiramente associada a atividades ocupacionais entre fazendeiros, trabalhadores de minas, esgotos, matadouros, pescadores, produtores de leite, militares e veterinários, mas, após medidas protetoras entre esses grupos, percebeu-se que a doença não tinha apenas vínculo ocupacional, sendo associada também às condições precárias de moradia e falta de saneamento básico, além de práticas de esportes aquáticos ou atividades recreativas em águas contaminadas (Bharti et al., 2003).

A doença pode se apresentar de forma bifásica, sendo a primeira fase caracterizada com sintomas pouco específicos. Caso a doença progrida, o indivíduo pode desenvolver o estágio mais grave da leptospirose, denominada Síndrome de Weil (CDC, 2011). As manifestações clínicas da primeira fase da doença são principalmente: febre, dor de cabeça, mialgia, dispneia, náuseas e vômitos, podendo ser confundida com outras patologias como dengue, hepatite, febre amarela, malária, entre outras, dificultando o diagnóstico precoce da doença (Hartskeerl et al., 2011). Nos casos da Síndrome de Weil, o indivíduo apresenta sintomas como icterícia, problemas renais e hepáticos, e hemorragia (Ko et al., 2009; Evangelista, Coburn, 2010; Chirathaworn, Kongpan, 2014). A síndrome de Weil é causada em humanos normalmente pela *Leptospira interrogans* sorogrupo *Icterohemorragiae* no Brasil (Brito et al., 1992), sendo o sorovar *Copenhageni* o mais comum no Brasil (Ko et al.,

1999; Romero, Yasuda, 2006; Faria et al., 2008; Miraglia et al., 2013), tendo o rato como principal reservatório natural (WHO, 2003). Os sorovares podem ser associados aos seus animais reservatórios, às condições ambientais e ocupacionais, como por exemplo, às práticas agrícolas, sendo possível identificar a provável origem de determinada bactéria (Bharti et al., 2003).

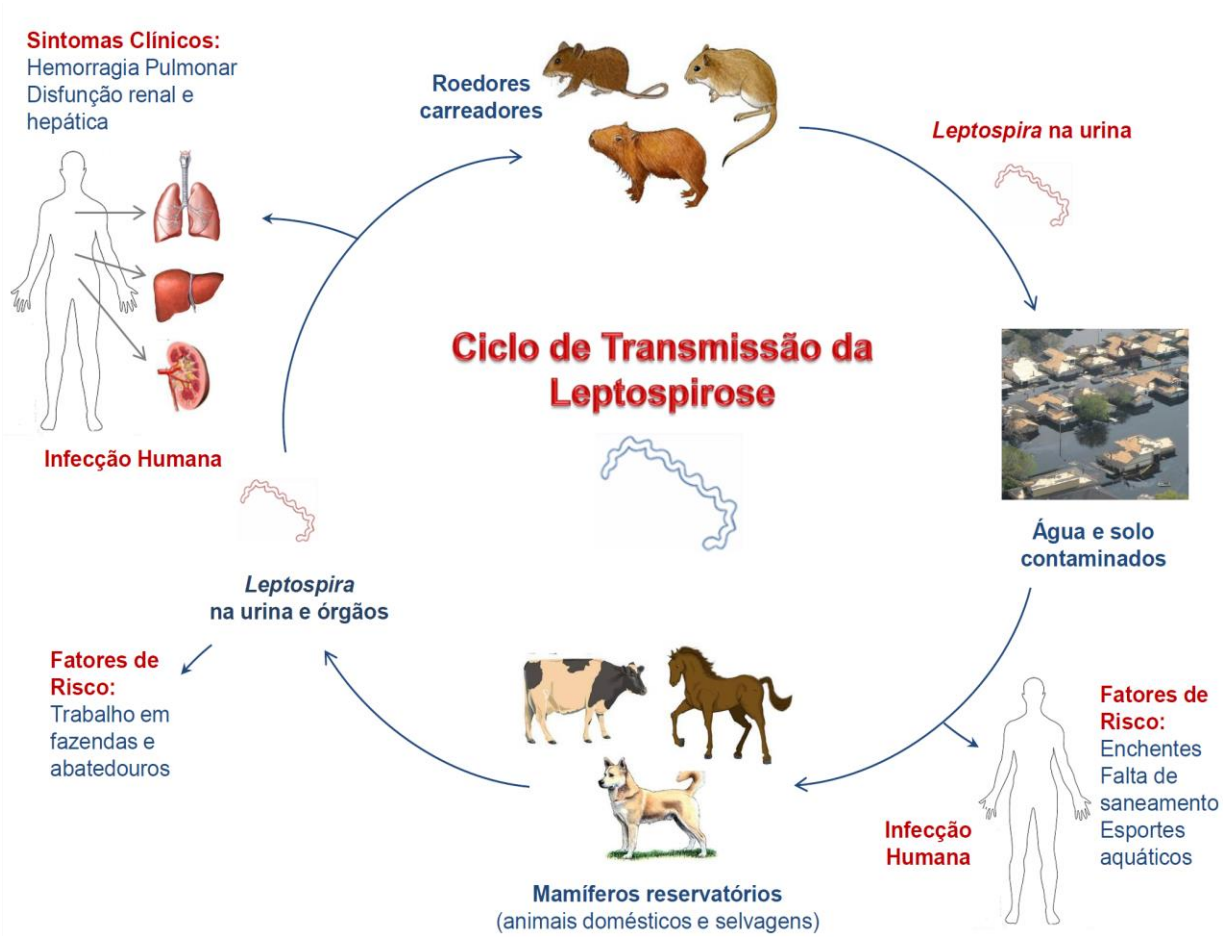


Figura 7 – Ciclo de transmissão da leptospirose. A bactéria permanece sendo eliminada por longos períodos pela urina de seus animais carreadores que podem contaminar o ambiente. Outros animais selvagens ou domésticos podem se infectar na água ou solo contaminados e apresentar a doença ou servir de reservatório para a bactéria, eliminando-a pela urina e contaminando o solo e a água. Os humanos são os hospedeiros acidentais e a contaminação ocorre pelo contato direto ou indireto com a urina desses animais reservatórios. Após a entrada da bactéria pela pele lesada ou mucosas, a bactéria atinge a corrente sanguínea e posteriormente pode atingir órgãos como fígado, pulmão e rins causando a infecção crônica denominada Síndrome de Weil (Fraga et al., 2014a).

O diagnóstico da leptospirose é dificultado pela falta de sintomas específicos, sendo confundida muitas vezes com diversas outras doenças menos graves. Entre os testes para diagnosticar a doença estão: i) pesquisa da bactéria no sangue por microscopia óptica sob campo escuro, porém é um exame pouco sensível e com grandes chances de resultados falsos

positivos; ii) a reação em cadeia usando DNA polimerase (PCR), utilizada para encontrar DNA leptospiral em amostras sanguíneas ou de urina, principalmente no período inicial da doença; iii) teste de *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) por ser mais específico, pois detecta anticorpos IgM anti-leptospira tanto no começo da infecção, quanto IgG em fases tardias. Além da sensibilidade, tem menor custo que outros testes, como PCR, e necessita de volumes pequenos de amostra; e, iv) o teste de aglutinação microscópica (MAT), que é o método laboratorial mais utilizado. O teste consiste em um painel com diversos sorovares da bactéria para que seja detectado no soro de interesse a presença de anticorpos contra *Leptospira.* Apesar de ser um teste confiável, a eficácia do teste é melhor nas fases mais tardias da doença (Yaakob et al., 2015).

O tratamento é feito através de antibióticos como doxiciclina e azitromicina nos casos menos graves e penicilina, doxiciclina ou cefalosporina de terceira geração em casos mais graves. A vacina para leptospira já existe em países como a China, Japão, Vietnã e Cuba que utilizam bactérias inteiras mortas de sorovares locais como forma de prevenção, além de já existirem vacinas para prevenir a contaminação de cães e gado (Adler, Moctezuma, 2010). No entanto, ainda não existe uma vacina mundialmente eficaz contra leptospirose (Chikeka, Dumler, 2015),

1.4 Resposta imune contra leptospiras

Para invadir o hospedeiro e iniciar a infecção, as leptospiras patogênicas possuem proteínas presentes em sua superfície que permitem a interação com componentes da matriz extracelular, como elastina, colágeno e fibronectina, e células como fibroblastos, macrófagos e células endoteliais (Evangelista, Coburn, 2010). As leptospiras patogênicas possuem a capacidade de interagir com o sistema fibrinolítico pela captura de plasminogênio ou pela ativação em plasmina que, uma vez gerada, facilita a migração da bactéria através da barreira endotelial (Vieira et al., 2013; Castiblanco-Valencia et al., 2016). Ao passar da barreira endotelial, as leptospiras caem na circulação sanguínea onde serão reconhecidas inicialmente pelo sistema imune inato. Bactérias Gram-negativas, como é o caso da leptospira, possuem lipopolissacarídeos (LPS) em sua membrana que serão reconhecidos pelas células do sistema imune. No soro está presente a LPS-*binding protein* (LPB) que tem como função se ligar ao LPS permitindo o reconhecimento via CD14, o principal receptor de LPS. A molécula CD14 interage com o *Toll-like receptor-4* (TLR-4), que irá causar a ativação de vias de sinalização, como a via de NF-κB (Miller et al., 2005). Porém, o reconhecimento das leptospiras ocorre

de forma diferente observada na maioria das bactérias Gram-negativas. Nesse caso, a ativação de TLR-4 por meio da molécula CD14 é um processo que ocorre apenas em camundongos, os quais também são capazes de reconhecer leptospiras via TLR-2. Já em humanos, o reconhecimento do LPS de leptospiras acontece somente via TLR-2. Esses processos distintos e as diferentes interações podem ser um dos motivos pelos quais os humanos são, em sua maioria, mais susceptíveis à bactéria enquanto camundongos são mais resistentes à infecção, visto que possuem um reconhecimento mais efetivo (Nahori et al., 2005).

Outros trabalhos mostraram a importância do reconhecimento efetivo de leptospiras patogênicas via TLR-2 e TLR-4 para o hospedeiro. Camundongos C3H/HeJ, os quais naturalmente não expressam TLR-4, são mais susceptíveis a infecção por leptospiras, fato igualmente observado em animais nocautes tanto para *tlr4*, quanto em duplos nocautes para *tlr4* e *tlr2*. Os animais que não possuem um reconhecimento efetivo das leptospiras apresentam uma infecção aguda com sintomas graves como disfunção hepática e renal, e hemorragia pulmonar. Além disso, também foi observada uma desregulação na produção de proteínas pró-inflamatórias, como o aumento de IFN-γ no fígado e a diminuição de IL-6 e TNF-α no fígado e rins, alterando também o controle do número de leptospiras viáveis em seus órgãos-alvo, quando comparados com os animais normais (Viriyakosol et al., 2006; Chassin et al., 2009). A expressão da citocina IL-1β também é afetada em animais nocautes para TLR-2 e TLR-4, que apresentam concentrações menores. A expressão de IL-1β pode ocorrer a partir da ativação da via de NF-κB e também pela ativação do inflamassoma, que irá ativar caspase 1, clivando pró-IL-1β em IL-1β, a qual será secretada durante a resposta imune. As leptospiras se mostraram capazes de induzir a produção de IL-1β via *Nod-like receptor protein 3* (NLRP3), um dos componentes do inflamassoma, após reconhecimento de LPS e lipoproteínas via TLR-2 e TLR-4 (Lacroix-Lamande et al., 2012).

Além de serem importantes para o reconhecimento do LPS das leptospiras, os TLRs também desempenham papel no reconhecimento da hemolisina, uma exotoxina produzida por essas bactérias que é importante para sua virulência por ser capaz de romper hemácias e induzir apoptose em linfócitos e macrófagos (Wang et al., 2008; Zhang et al., 2012). Após o reconhecimento da hemolisina pelas moléculas TLR-2 e TLR-4, é desencadeada a liberação de citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1β e TNF-α por meio das vias de sinalização NF-κB e JNK (Wang et al., 2008).

Para melhor entender a função do sistema imunológico durante a reposta contra as leptospiras, camundongos têm sido empregados no estudo para avaliar alterações em órgãos-

alvo da doença e no sangue. Algumas linhagens de camundongos são conhecidas por serem resistentes à infecção por leptospiras, porém, espécies patogênicas foram capazes de causar lesões hepáticas e renais, além de ser possível observar a presença de bactérias vivas até quatro semanas após a inoculação (da Silva et al., 2009). Os principais danos observados no fígado são a desorganização do padrão celular no tecido, necrose, infiltrados celulares e aumento do número de células de Kupffer. Nos rins a infecção causou danos nos túbulos renais, nefrite e a presença de infiltrados inflamatórios após 28 dias de infecção (Santos et al., 2010).

A resposta imunológica contra leptospiras depende, principalmente, da fagocitose e da produção de anticorpos. A ação dos fagócitos é potencializada quando a bactéria está opsonizada com moléculas de IgG ou com o fragmento iC3b, o que indica o papel importante de anticorpos e da resposta inata, respectivamente, durante a resposta imune contra leptospiras (Banfi et al., 1982; Cinco et al., 2002).

Após serem fagocitadas por células PMNs, as leptospiras são eliminadas pela produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Murgia et al., 2002). Além da fagocitose, neutrófilos são capazes de gerar *neutrophil extracellular trap* (NETs), redes compostas pelo DNA dessas células com propriedades antimicrobianas. A deleção de neutrófilos causou aumento na disseminação bacteriana no sangue 3 dias pós infecção e nos rins 14 dias pós infecção. Apesar da maior disseminação, os animais tratados desenvolveram nefrite nesse órgão da mesma forma que os controles, sugerindo que as leptospiras podem atingir os rins antes da formação da NETs e, posteriormente, são capazes de evadir desse mecanismo (Scharrig et al., 2015).

A importância da resposta humoral foi demonstrada após animais resistentes à infecção receberem tratamento com ciclofosfamida, substância que inibe a atividade dos linfócitos B, onde foi constatado o aumento da susceptibilidade desses camundongos à infecção por *Leptospiras* (Adler, Faine, 1976). A importância da produção de anticorpos para o hospedeiro também foi mostrada pela imunização passiva de camundongos com anticorpos anti-LPS de leptospiras, conferindo proteção nesses animais (Jost et al., 1986).

1.5 Sistema Complemento na resposta contra leptospirose

Em 2005, Meri et al mostraram que as espécies patogênicas *L. interrogans* e *L. borgpeterseni* incubadas com o soro humano normal (SHN) eram mais resistente à ação do SC, enquanto a espécie saprófita *L. bilfexa* era sensível, com deposição mais acentuada de C5, C6, C8 e C5b-C9 na sua superfície, quando comparados com as espécies patogênicas. Nesse estudo, foi demonstrado que as leptospiras patogênicas são capazes de se ligar ao FH, um

inibidor da ação da C3-convertase, capaz de inativar os fragmentos de C3. Além disso, nosso grupo demonstrou que estirpes patogênicas de *Leptospira* são capazes de se ligar ao C4BP por intermédio da proteína LcpA, presente na superfície de espécies patogênicas (Barbosa et al., 2009; Barbosa et al., 2010). Essa aquisição dos reguladores do SC pelo patógeno causa uma diminuição da ativação do SC, que acaba depositando menos componentes da Via Terminal (C5b-C9) e, consequentemente, ocorre menor formação do MAC na membrana externa do patógeno. Tal fenômeno é observado apenas em espécies patogênicas e não em espécies com patogenicidade atenuada por passagens seguidas em meio de cultura, como a *L. interrogans* sorovar Pomona, e nem em espécies saprófitas, como a *L. biflexa*. As espécies patogênicas são capazes de clivar também o fragmento C4b e sobreviver melhor, quando incubadas com SHN (Barbosa et al., 2009). Esta bactéria também se liga ao FHL-1 e FHR-1, sendo que o segundo fator parece ser mais vantajoso para a bactéria, uma vez que consegue inibir a C5-convertase e diminuir a deposição de C5b na membrana do patógeno e diminuir a ação do MAC. Esses reguladores também interagem com as proteínas *Leptospiral immunoglobulin-like A* e *B* (LigA e LigB), importantes para a virulência da leptospira, e, uma vez ligados, essas proteínas permanecem atuando na clivagem de C4b pelo C4BP e C3b pelo FH (Castiblanco-Valencia et al., 2012). A ligação do C4BP pelas proteínas Lig, ocorre principalmente pelos domínios CCP4, CCP7 e CCP 8, que se ligam na porção C-terminal da LigA e pelos fragmentos CCP7 e CCP8 na poção C-terminal da LigB e na LcpA (Breda et al., 2015).

As leptospiras patogênicas também são capazes de secretar proteases que irão clivar proteínas do SC, inativando suas vias de ativação. Essas proteases foram capazes de clivar as proteínas C3, C2, C4 e FB, os fragmentos C3b e iC3b (Fraga et al., 2014b) e as proteínas do MAC C5b, C6, C7, C8 e C9 (Amamura, 2016).

As LigA e LigB ainda são capazes de se ligar ao plasminogênio e, uma vez que essa ligação ocorra, o plasminogênio é convertido para sua forma proteolítica, a plasmina. Essa protease é capaz de degradar fibrinogênio, a proteína C5 e o fragmento C3b do SC. Essa ligação é especialmente importante para uma melhor disseminação bacteriana no hospedeiro (Castiblanco-Valencia et al., 2016).

Esses trabalhos demonstram *in vitro* a importância do SC na leptospirose, porém não há trabalhos que mostrem a importância dessa resposta *in vivo*. Nosso grupo começou a empregar modelos murinos com deficiência de C5 para observar como ocorreria a resposta. Nesse trabalho foi demonstrada a importância da proteína C5 do SC principalmente nos dias

iniciais da infecção. Os camundongos B6.C5$^{-/-}$ apresentaram uma quantidade maior de bactérias no fígado do que os camundongos selvagens, porém foram encontradas lesões mais graves nos camundongos B6.C5$^{+/+}$. A proliferação de células T dos camundongos selvagens apresentou mecanismo dependente de C5, sendo prejudicada na ausência da proteína. Além disso, as enzimas aminotransferase de alanina (ALT) e aminotransferase de aspartato (AST) e o ácido úrico apresentaram níveis séricos distintos entre os grupos (Castro, 2014).

A partir desses resultados, fomos investigar se C3 influenciaria de forma diferente na resposta contra a leptospira. A escolha pela proteína C3 é devido a sua importância na resposta imunológica e por participar das três vias do SC, sendo seus fragmentos importantes para a resposta inflamatória, participando da opsonização, atração de citocinas e quimiocinas e da resposta de anticorpos. Para isso, empregamos camundongos da linhagem C57BL/6 deficientes de C3 (B6.C3$^{-/-}$), que possuem falhas nas três vias de ativação do SC, e comparando com camundongos selvagens (B6.C3$^{+/+}$), e avaliamos características inflamatórias.

2 Objetivos

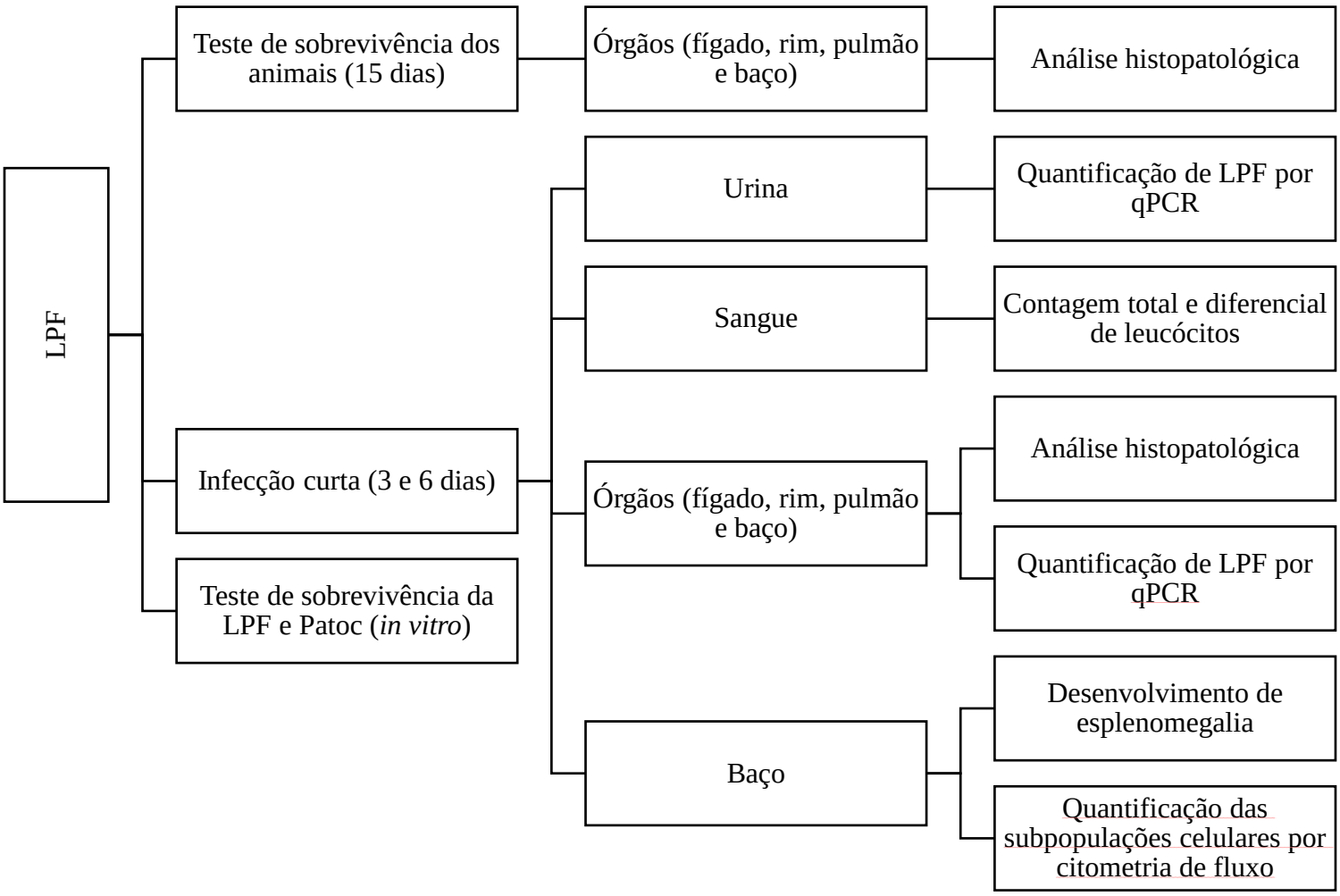
2.1 Objetivo Geral

Verificar a importância do componente C3 do SC para a resposta imunológica contra leptospiras em modelo murino *in vivo*. Para isso, serão utilizados camundongos C57BL/6 selvagens e deficientes de C3, infectados com *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm (LPF).

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar a capacidade de eliminação da LPF *in vitro* pelo soro dos camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$.
- ✓ Avaliar a sobrevida de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ após infecção com diferentes inóculos de LPF.
- ✓ Quantificar o número de leucócitos circulantes periféricos durante a infecção.
- ✓ Determinar por citometria de fluxo os principais tipos celulares presentes no baço durante a resposta imunológica contra a infecção nos dois grupos experimentais.
- ✓ Monitorar o desenvolvimento da esplenomegalia nas duas linhagens.
- ✓ Quantificar a presença de leptospiras no fígado, rim, urina, pulmão e baço de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ por PCR quantitativo.
- ✓ Investigar as alterações histopatológicas do fígado, rim, pulmão e baço das duas linhagens de camundongos durante a infecção por leptospiras.

3 Delineamento experimental



4 Material e Métodos

4.1 Obtenção dos animais

Camundongos C57BL/6 B6.129S4-C3^{tm1Crr}/J (B6.C3$^{-/-}$) foram obtidos do *The Jackson Laboratory* e ficaram mantidos no Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, em condições análogas àquelas dos outros animais selvagens C57BL/6J (B6.C3$^{+/+}$) obtidos do Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e utilizados nesse projeto. Os camundongos utilizados foram machos com idade entre 6 a 8 semanas. Também foram utilizados hamsters do Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Prof. Marcos Bryan Heinemann da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. O trabalho foi executado conforme aprovado pela Comissão de Ética do Uso de Animais no certificado 074/2015/CEUA.

4.2 Obtenção e cultivo das leptospiras

No presente estudo foram utilizadas bactérias *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm (LPF; patogênica) e *L. biflexa* sorovar Patoc (Patoc; não patogênica), fornecidas pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann, situado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. As bactérias foram mantidas em condições aeróbicas a 29°C, em meio de cultura *Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris* (EMJH) (BD Difco™, Franklin Lakes, New Jersey, Estados Unidos) com 10% de soro de coelho, ao qual foi adicionado 0,015% de L-aspargina (Inlab, Diadema, São Paulo, Brasil), 0,001% de piruvato de sódio (Inlab), 0,001% de cloreto de cálcio (Sigma, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos), 0,001% de cloreto de magnésio (Merck, Whitehouse Station, New Jersey, Estados Unidos), 0,03% de peptona (BD Difco™) e 0,02% de extrato de carne (BD Difco™).

4.3 Ensaio de sobrevivência da LPF na presença do soro *in vitro*

Culturas de LPF e Patoc foram centrifugadas por 20 min a 2800 *g* a 21 °C e o sedimento formado foi ressuspendido em 1 ml de PBS. As bactérias foram contadas em câmara de Petroff-Hausser em microscopia óptica sob campo escuro. Incubamos 1 x 10^8 bactérias com 40% de soro, que foi anteriormente aliquotado e mantido a -80 °C, de

camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ por 2 h a 37 °C sob agitação suave. Como controle positivo, usamos 40% de SHN incubado com a espécie patogênica ou não patogênica nas mesmas condições utilizadas para o soro dos camundongos. Soros dos animais B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ e SHN foram também inativados pelo calor a 56 °C por 1 h para inativar o SC, sendo o número de leptospiras restantes nesses controles considerado 100% de sobrevivência. Após a incubação, foram contadas as bactérias que não estavam fragmentadas e que mantinham o formato e motilidade característicos.

4.4 Preparação dos inóculos de leptospira

As bactérias cultivadas em meio EMJH por sete dias foram centrifugadas durante 20 min em 4487 *g* a 20 °C antes de retirar o meio de cultura. O sedimento foi ressuspendido em 1 ml de PBS 1 x pH 7,4. A suspensão foi diluída a 1:500 para contagem das bactérias em câmara de Petroff-Hausser em microscópio óptico com condensador de campo escuro. Os inóculos foram ajustados para 1,5 x 10^8 bactérias em 200 µl. Como controle, foram utilizados inóculos contendo unicamente PBS 1 x pH 7,4 estéril.

4.5 Infecção dos animais

Os animais foram inoculados via intraperitoneal com 1,5 x 10^8 LPF, e sacrificados no terceiro e sexto dia. Para cada tempo de infecção, foram utilizados animais B6.C3$^{-/-}$ e B6.C3$^{+/+}$ e mais um grupo de cada linhagem foram inoculados apenas com PBS estéril e eutanasiados no sexto dia como grupo controle.

Para o ensaio de sobrevivência dos animais, os camundongos foram inoculados com 1,5 x 10^8, 3 x 10^8 e 6 x 10^8 em 200 µl. Os animais foram monitorados durante 15 dias e ao final dos 15 dias foram eutanasiados.

Para cada experimento foi antecipadamente inoculado um hamster em paralelo para confirmar a virulência da bactéria, uma vez que o hamster é um animal sensível à infecção por leptospiras, sendo acompanhado até o dia da sua morte. Para a infecção do hamster foi preparada uma alíquota contendo o mesmo inóculo utilizado nos camundongos e a inoculação foi realizada no Laboratório de Zoonoses Bacterianas na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela Dra Gisele Oliveira de Souza.

4.6 Eutanásia e coleta dos órgãos dos animais

Os camundongos foram anestesiados com 125 mg/kg de ketamina e 12,5 mg/kg de xilazina antes da obtenção de sangue pelo plexo retro-orbital, através de capilares para micro-hematócrito heparinizados. O sangue foi separado para dois diferentes propósitos: a primeira parte foi mantida em líquido de Türk (4,76 mM de ácido acético e 6,25 mM de azul de metileno) sendo posteriormente designada para contagem total de leucócitos periféricos e a segunda parte foi coletada em tubo contendo EDTA 10% pH 8,0 a qual foi utilizada para contagem diferencial das populações leucocitárias.

Após coleta total do sangue, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical para posterior coleta de órgãos (rins, fígado, pulmão e baço). Parte dos órgãos coletados foi mantida em solução formalina 3,7% em PBS pH 7,4 e designada para análise histopatológica. Outras duas amostras dos órgãos foram separadas: uma primeira para dosagem de citocinas e a segunda para quantificação de LPF por PCR quantitativo (qPCR).

Antes dos pulmões dos animais serem coletados, estes órgãos foram perfundidos com 10 ml de solução de NaCl 0,9%, injetada via intra-cardíaca.

4.7 Monitoramento da esplenomegalia

Após a eutanásia dos animais, o baço foi coletado e pesado. O peso obtido de cada órgão foi normalizado em relação ao peso total do camundongo no dia da eutanásia.

4.8 Análise leucocitária

Para contagem total dos leucócitos na circulação periférica, o sangue foi diluído 20 x (380 µl de líquito de Türk + 20 µl de sangue) em líquido de Türk e, posteriormente, inserido em câmara de Neubauer.

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada após extensão sanguínea em lâminas e coloração com o kit Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil), onde foram contadas as 100 primeiras células encontradas, determinando a proporção entre células mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN).

No baço, os linfócitos, monócitos e PMN foram marcados com anticorpos específicos conjugados com fluorocromos (**Tabela 2** – Biolegend, San Diego, CA) para analisar por citômetro de fluxo LSRFortessa™ (BD, Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, Estados Unidos) a proporção entre essas células. Foram utilizados 2 ml de tampão de lise (155 mM de NH_4Cl, 10 mM de $NaHCO_3$ e 0,1 mM de EDTA) para retirar as hemácias e as amostras foram

incubadas por 2 min à temperatura ambiente. As amostras foram lavadas com 1 ml de PBS com 2% de soro bovino fetal (SBF) inativado a 56 °C por 30 min, centrifugadas a 600 *g*, 4 °C por 5 min e o sobrenandante foi descartado. Foi adicionado o *FcR Blocking Reagent* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Renânia do Norte-Verstfália, Alemanha) na diluição de 1:100, as amostras foram incubadas por 20 min a 4 °C e, posteriormente, foram adicionados os anticorpos (Tabela 2) na diluição de 1:100 e incubadas por 30 min a 4 °C. Então, as amostras foram lavadas com PBS-SBF 2% e foi feita a leitura no citômetro de fluxo. A análise dos dados foi realizada pelo *software* FlowJo (Treestar, Ashland, Oregons, Estados Unidos).

Tabela 2 – Tipos celulares marcados e anticorpos conjugados com fluorocromos utilizados.

Célula	Fenótipo	Anticorpo	Fluorocromo
Monócitos/Macrófagos	$CD11b^+$	anti-CD11b	APC
Neutrófilos	$Ly6g^+$	anti-ly6g	PE
Linfócitos B	$CD19^+$	anti-CD19	FITC
Linfócitos T $CD8^+$	$CD4^-$ $CD8^+$	anti-CD4 anti-CD8	APC-Cy7 Perc-P
Linfócitos T $CD4^+$	$CD4^+$ $CD8^-$	anti-CD4 anti-CD8	APC-Cy7 Perc-P

APC: aloficocianina; PE: R-ficoeritrina; FITC: isotiocianato de fluoresceína; APC-Cy7: conjugado de aloficocianina e corante de cianina; PercP: complexo proteico perididina-clorofila.

4.9 Análise histopatológica

Após fixação do fígado, rim, pulmão e baço em solução formalina 4%, os órgãos foram enviados ao Laboratório de Histotecnologia do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo onde foram processados para a análise histopatológica. As lâminas foram preparadas com cortes de aproximadamente 3 μm e coradas com hematoxilina-eosina (HE) para serem posteriormente analisadas. As análises foram realizadas pelo Prof. Dr. Thales de Brito do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e pelo Prof. Dr. Bruno Cogliati da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Nas lâminas foram observadas as alterações provocadas pela infecção por LPF no rim, fígado, pulmão e baço de cada animal. Cada animal foi avaliado de acordo com as alterações apresentadas em cada órgão conforme classificação utilizada por Matsui et al (2011) e os parâmetros observados foram classificados em escala onde a ausência de alterações foi classificada como grau 0; presença de alterações leves foram classificadas como grau 1; presença de alterações

moderadas foram classificadas como grau 2; e a presença de alterações graves foram classificadas como grau 3. Para os critérios de classificação das alterações histopatológicas hepáticas foram considerados os seguintes parâmetros: a) infiltrado de leucócitos lobular e/ou portal; b) necrose celular; c) edema; e d) células mitóticas. No pulmão, as alterações consideradas foram: a) edema; b) hemorragia alveolar; e c) inflamação do septo alveolar. Nos rins, as alterações consideradas foram: a) nefrite intersticial; b) congestão; e c) hemorragia. No baço, as alterações consideradas foram: a) hiperplasia folicular; e b) presença de hemossiderina.

4.10 Extração de DNA dos tecidos

A extração de DNA do fígado, rim, pulmão, baço e urina dos animais foi realizada de acordo com o *kit Illustra Tissue & Cells Genomic Prep Mini Spin* (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Após coleta da urina, a amostra foi mantida em refrigeração a -80 ºC e descongeladas no gelo no momento da extração. O volume da urina foi paronizado para todos os animais, onde foi coletado 50 µl de urina de cada animal para iniciar a extração de DNA. Para a extração de DNA dos órgãos, foram pesados aproximadamente 20 a 25 mg de cada órgão que foram posteriormente lavados com 1 ml de PBS 1 x e centrifugados por 2 min a 16000 *g*. O sobrenadante foi descartado e os tecidos foram homogeneizados em 50 µl de PBS 1 x e centrifugados por 10 s a 2000 *g*. As amostras foram incubadas a 56 °C por 1 h em 50 µl de tampão de lise tipo 1 (fornecido pelo fabricante) e 10 µl de proteinase K, para eliminação de proteínas, e após essa incubação, foram tratadas com RNase A durante 15 min em temperatura ambiente para eliminação do RNA. A purificação das amostras foi realizada com 500 µl de tampão de lise tipo 4 (fornecido pelo fabricante), uma solução caotrópica, por 10 min em temperatura ambiente, e após esse período, foram transferidas para uma mini coluna e centrifugadas por 1 min a 11000 *g*, onde o DNA ficou ligado à membrana de sílica. Para lavagem, as amostras foram centrifugadas por 1 min a 11000 *g* com mais 500 µl de tampão de lise 4 e posteriormente com 500 µl de tampão de lavagem tipo 6 (fornecido pelo fabricante) por 3 min a 11000 *g*. Após a lavagem, o DNA foi eluído com 200 µl o tampão de eluição tipo 5 (fornecido pelo fabricante) durante 1 min a 11000 *g*. A concentração do DNA coletado foi medida no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

4.11 PCR quantitativo (qPCR)

A quantidade de LPF nos órgãos dos animais foi estimada por reação em cadeia da polimerase (qPCR), ensaio realizado no Laboratório de Microbiologia Oral da Prof. Dra. Márcia Pinto Alves Mayer do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Primeiramente foi realizada a curva padrão a partir do gene *16SrRNA* de leptospiras obtida por PCR convencional. Foi utilizado 1 µl de DNA molde da *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm, 5 µl de tampão 10x, 10 mM de dNTP, 50 mM de $MgCl_2$, 25 pmols/µl de *primers* universais *16SrRNA* [5´ GAGAGTTTGATYMTGGCTCAG 3´] e [5´ GAAGGAGGTGWTCCARCCGCA 3´] e 1 U/µl de Platinum *Taq* Polimerase (Invitrogen). O volume final utilizado foi 50 µl e a reação foi feita em termociclador convencional (MJ Research, Waltham, MA, EUA). Para desnaturação da fita dupla de DNA, as amostras foram aquecidas a 94 °C por 15 min e posteriormente foram submetidas a 25 ciclos a 94 ºC por 30 s, 56 °C por 30 s e 72 °C por 45 s e um último ciclo de 10 min a 72 °C. Para observar as bandas do produto amplificado, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE (Tris 80 mM, ácido acético glacial 40 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,5). O gel foi corado com GelRed Nucleic Acid (Biotium) e o resultado foi visualizado sob luz UV. O produto gerado possuía aproximadamente 1500 pb (**Figura 8**) e foi purificado utilizando o *kit* QIAquick Gel Extraction (Qiagen, North Rhine-Westphalia, Alemanha) e o DNA foi quantificado por espectrofotômetro Nanodrop nd-1000 (Thermo Fisher Scientific). As amostras amplificadas da curva padrão foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% e o produto gerado de aproximadamente 1500 pb foi purificado.

Os produtos purificados e quantificados que foram gerados a partir do PCR convencional foram diluídos em série (na razão 10) e a curva padrão utilizada foi feita com concentrações de 10 a 10^8 cópias de DNA.

A quantificação foi realizada em microplacas de 96 poços (Life Technologies) contendo 1 µl de cada ponto da curva padrão e do branco, e 50 ng de DNA dos tecidos (fígado, rim, pulmão e baço) dos animais infectados e não-infectados. Em cada amostra ou ponto da curva padrão, foram adicionados 10 µl de SYBR *Green master mix* (Life Technologies), 20 pmols/µl dos *primers* para o gene *16SrRNA* (*primer forward*: 5´ TAGTGAACGGGATAGATAC 3´ e *reverse*: 5´ GGTCTACTTAATCCGTTAGG 3´)' em um volume final de 20 µl por reação. As amostras foram amplificadas no Termociclador Step

One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA) localizado no laboratório da Prof. Márcia Pinto Alves Mayer localizado no Instituto de Microbiologia do Instituto de Ciência Biomédicas da Universidade de São Paulo na seguinte programação: desnaturação inicial a 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 min seguido de dois ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por um min, e uma etapa final de 0,5 – 95 °C (rampa) por 15 s.

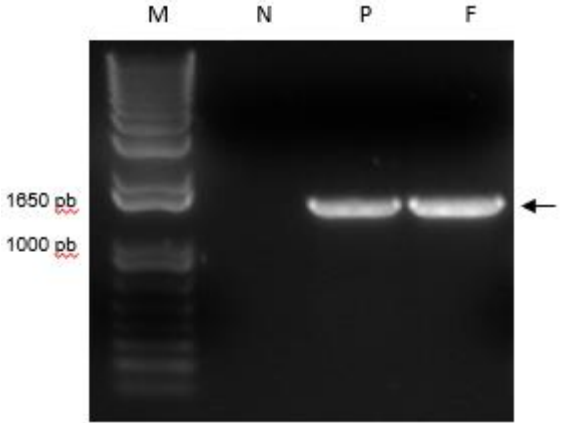


Figura 8 - Amplificação do gene *16S rRNA* por PCR. Produtos do gene *16S rRNA* de leptospira (1500 pb) amplificados por PCR a partir de DNA genômico de *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I e *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm. Foram utilizados os *primers* universais para o gene *16S rRNA.* M – Marcador de tamanho em pares de bases (pb) (*1 kb plus DNA ladder*, Invitrogen), N – Controle negativo sem DNA, P – Patoc, F - Fromm.

4.12 Análise estatística

Os resultados obtidos no modelo de infecção de três e seis dias com 1,5 x 10^8 LPF entre os camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ foram submetidos ao teste ANOVA *two-way*, seguido por comparações múltiplas pelo método de Tukey, quando necessário. Em todas as análises foi considerado nível de significância de pelo menos 5%.

5 Resultados

5.1 Ensaio de sobrevivência *in vitro* das leptospiras

Trabalhos anteriores demonstraram que as espécies não patogênicas de leptospiras são eliminadas rapidamente pelo SHN, enquanto as patogênicas conseguem sobreviver por um período maior nas mesmas condições (Meri et al., 2005; Barbosa et al., 2009). Sabendo-se da importância do SC para a eliminação de bactérias e sendo C3 o seu principal e mais abundante componente, investigamos primeiramente o papel dessa proteína na eliminação de uma espécie não patogênica (*L. biflexa* sorovar Patoc) e uma patogênica (*L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpre Pomona Fromm em contato com o soro dos camundongos selvagens e deficientes. Ao incubar ambas as espécies de leptospiras em condições semelhantes, foi observado que o soro de camundongos B6.C3$^{+/+}$ comporta-se semelhantemente ao SHN, eliminando a espécie de leptospira não patogênica rapidamente, enquanto a espécie patogênica não foi eliminada, confirmando a resistência da LPF ao SC também no soro de camundongo. Entretanto, o soro dos animais B6.C3$^{-/-}$ apresenta resultados diferentes, quando incubado com a espécie não patogênica. No período de 2 h, o soro dos animais deficientes não foi capaz de eliminar a bactéria não patogênica, apresentando resposta semelhantemente ao controle com SHN inativado (dados não mostrados). Na ausência da proteína C3 do SC a espécie não-patogênica mostrou uma resistência ao soro semelhante a LPF, enquanto a espécie patogênica sobreviveu no soro tanto dos animais B6.C3$^{+/+}$ quanto dos animais B6.C3$^{-/-}$ (**Figura 9**).

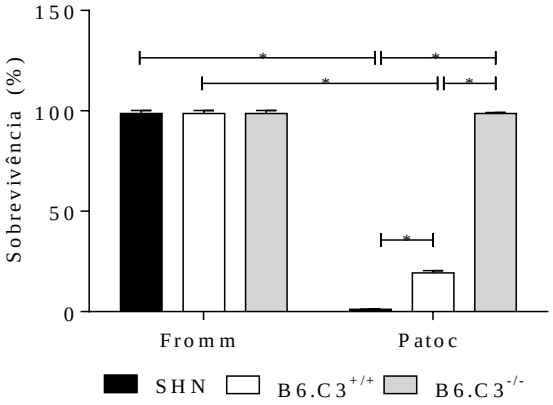


Figura 9 – **Sobrevivência de espécies de leptospiras patogênica e não-patogênica na presença de soro dos camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$.** Porcentagem de sobrevivência da *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm (patogênica) e da *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I (não patogênica) incubadas por 2 h à 37 º C com 40% de soro dos animais B6.C3$^{+/+}$, B6.C3$^{-/-}$ e com soro humano normal (SHN) como controle positivo. Paralelamente, alíquotas dos soros B6.C3$^{+/+}$, B6.C3$^{-/-}$ e do SHN foram inativadas a 56º C e incubadas com as leptospiras sob as mesmas condições como controle negativo (100% de sobrevivência). Os dados são referentes a três experimentos distintos. ANOVA: Foi detectada diferença significativa entre os soros e estirpes ($p < 0,001$). Tukey: * indica diferença significativa e corresponde a $p < 0,05$.

5.2 Ensaio de sobrevivência dos camundongos

Nos ensaios *in vivo*, primeiramente foi avaliada a sobrevivência dos camundongos selvagens e deficientes de C3 infectados com LPF. Para isso, foram inoculados nos camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ doses diferentes de 1,5 x 10^8, 3 x 10^8 e 6 x 10^8 LPF por grupo de camundongos. Os animais foram observados por 15 dias e, ao final do experimento, todos os animais sobreviveram (**Tabela 3**). A partir deste resultado, escolhemos a menor dose para os experimentos de curta duração com três e seis dias. A dose de 1,5 x 10^8 já havia sido utilizada em outro trabalho de nosso grupo com camundongos deficientes de C5 infectados com LPF e devido a isso, inoculamos os camundongos desse projeto com a mesma dose (Castro, 2014).

Tabela 3 – Sobrevivência dos animais B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ inoculados com diferentes doses de LPF após 15 dias.

Dose inoculada	% de sobrevivência			
	B6.C3$^{+/+}$	n	B6.C3$^{-/-}$	n
1,5 x 10^8 LPF	100	4	100	4
3 x 10^8 LPF	100	7	100	5
6 x 10^8 LPF	100	5	100	5

Sobrevivência dos animais B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ inoculados com diferentes doses de LPF.

5.3 Variação do peso corporal durante a infecção por LPF

Um dos sintomas observados em pacientes com leptospirose é a perda de peso. Devido a isso, o peso corporal dos animais foi monitorado antes da infecção e no momento da eutanásia para observar a variação do peso corporal causada pela infecção. Os animais apresentaram variação de peso positiva durante o terceiro e sexto dias de infecção. Entretanto, a variação de peso apresentou diferença significativa entre os camundongos inoculados apenas com PBS e os camundongos infectados com LPF por três dias, porém, apesar dessa diferença, os grupos não apresentaram perda de peso. Dessa forma, podemos concluir que, apesar da diferença entre os tratamentos, a deficiência de C3 não altera o ganho de peso dos camundongos durante a infecção por LPF (**Figura 10**).

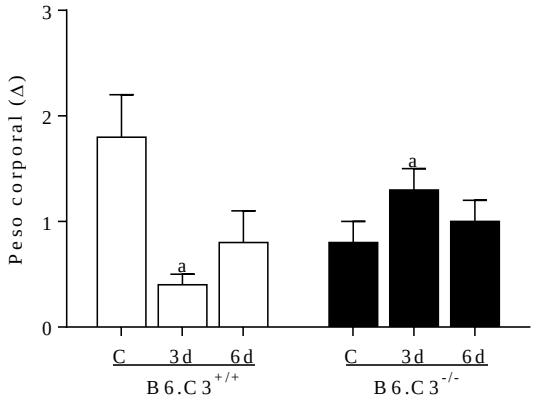


Figura 10 – **Variação do peso corporal dos camundongos infectados com LPF durante três e seis dias.** Variação do peso corporal dos camundongos B6.C3$^{+/+}$ (C n = 9; 3º dia n = 10; 6º dia n = 11) e B6.C3$^{-/-}$ (C n = 9; 3º dia n = 11; 6º dia n = 12) infectados com 1,5 x 10^8 LPF após três e seis dias (d) ou inoculados apenas com PBS (C = controle). O peso dos animais foi aferido no primeiro dia de infecção e no momento anterior ao sacrifício. Cada animal foi pesado individualmente e a variação (Δ) entre o peso corporal inicial e final foi calculada para a construção do gráfico. Os dados são referentes a três experimentos distintos. ANOVA: Não foi detectado efeito de interação significativo entre linhagem e tratamento (p = 0,053); Não foi detectada diferença significativa entre as linhagens (p = 0,221); Foi detectada diferença significativa entre os tratamentos (p = 0,008) Tukey: a indica ≠ C (p < 0,05).

Tabela 4 – Variação do peso corporal dos camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ após três e seis dias de infecção com 1,5 x 10^8 LPF representado por média e erro padrão.

	B6.C3$^{+/+}$			B6.C3$^{-/-}$		
	C	3d	6d	C	3d	6d
Peso corporal (Δ)	1,8±0,4	0,4±0,1[a]	0,8±0,3	0,8±0,2	1,3±0,2[a]	1,0±0,2

ANOVA: Linhagem x Tratamento, p=0,053; Linhagens, p=0,221; Tratamentos, p=0,008 (Tukey: [a] C≠3d, p<0,05). d = dias pós-inóculo.

5.4 Quantificação de leucócitos na circulação periférica

O número de leucócitos circulantes pode variar durante infecções, essa alteração é um indicativo de que o sistema imune está respondendo a alterações sistêmicas causadas por patógenos. A quantidade de leucócitos circulantes periféricos variou entre os grupos infectados com três e seis dias. No terceiro dia de infecção, o aumento do número de leucócitos totais foi observado apenas nos camundongos B6.C3$^{+/+}$, quando comparados com o grupo inoculado apenas com PBS, enquanto os camundongos B6.C3$^{-/-}$ não apresentaram diferenças significativas, quando comparados com o grupo controle no terceiro dia de infecção. O número de leucócitos circulantes diminuiu nos animais B6.C3$^{+/+}$ no sexto dia de infecção, mas o mesmo fato não foi observado entre os animais B6.C3$^{-/-}$. No segundo grupo ocorreu um aumento do número de leucócitos circulantes periféricos, quando comparado com os animais do mesmo grupo no terceiro dia de infecção e com o grupo controle. Os animais B6.C3$^{-/-}$ apresentaram um aumento mais tardio do número de leucócitos circulantes, sendo que apenas no sexto dia foi possível observar diferença estatística entre o número de células totais nesse grupo (**Figura 11**). As diferenças estatísticas encontradas foram distintas entre os grupos. Os camundongos selvagens apresentaram um aumento do número total de leucócitos circulantes no terceiro dia de infecção e os camundongos deficientes apresentaram um aumento do número total de leucócitos circulantes no sexto dia infecção, mostrando um mecanismo dependente da proteína C3.

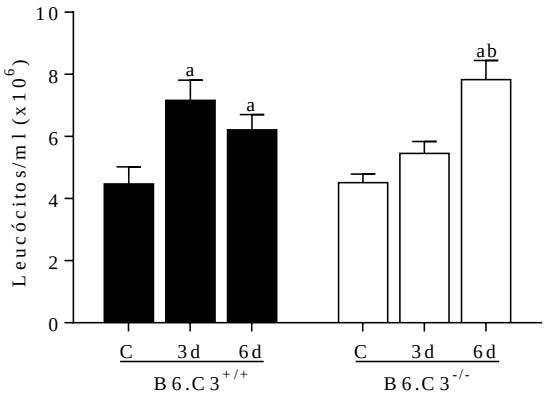


Figura 11 – Contagem de leucócitos circulantes totais em camundongos infectados com LPF por três e seis dias. Quantificação por microscopia óptica de leucócitos/ml de sangue em camundongos B6.C3$^{+/+}$ (C n = 9; 3º dia n = 10; 6º dia n = 11) e B6.C3$^{-/-}$ (C n = 9; 3º dia n = 11; 6º dia n = 12) infectados com 1,5 x 10^8 LPF após três e seis dias (d) ou inoculados apenas com PBS (C = controle). Os dados são referentes a três experimentos distintos. ANOVA: Foi detectado efeito de interação significativo entre linhagem x tratamento ($p = 0,015$). Tukey: a indica ≠ C; b indica ≠ 3 dias ($p < 0,05$).

Tabela 5 – Contagem de leucócitos sanguíneos periféricos por ml de sangue encontrados em camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ infectados com 1,5 x 10^8 LPF por três e seis dias representados em média e erro padrão.

	B6.C3$^{+/+}$			B6.C3$^{-/-}$		
	C	3d	6d	C	3d	6d
Leucócitos totais (x10^6)	4±0,6	7,4±0,6^a	6±0,9	4,5±0,4	5,5±0,6	7,8±0,9^{ab}

ANOVA, Linhagem x Tratamento, p=0,015 (Tukey, ^{a}≠C, ^{b}≠3d, p<0,05). d = dias pós-inóculo.

5.5 Proporção de MN e PMN na circulação periférica

Apesar da diferença na contagem total de leucócitos circulantes entre as duas linhagens nos terceiro e sexto dias, a proporção entre os leucócitos MN e PMN não foi alterada entre os grupos, nem mesmo quando comparada com os animais inoculados somente com PBS (**Figura 12**). Devido a esse resultado contrário ao esperado, investigou-se a proporção de leucócitos presentes no baço dos camundongos de ambos os grupos, por se tratar de um órgão linfoide diretamente ligado à circulação sanguínea e produção de células do sistema imune. Para um resultado mais preciso, empregou-se a contagem de células por meio de citometria de fluxo, onde foi possível avaliar um número maior de células e uma quantidade distinta de leucócitos.

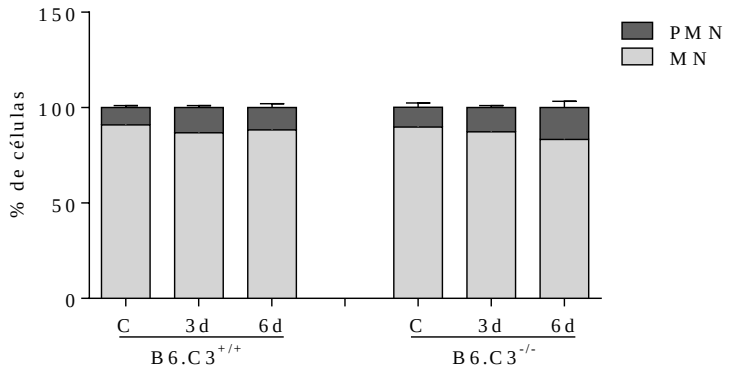


Figura 12 – Proporção de células MN e PMN presentes na circulação sanguínea de camundongos infectados com LPF por três e seis dias. Porcentagem de células mononucleares (MN; cinza claro) e polimorfonucleares (PMN; cinza escuro) em camundongos B6.C3$^{+/+}$ (C n = 9; 3º dia n = 10; 6º dia n = 11) e B6.C3$^{-/-}$ (C n = 9; 3º dia n = 11; 6º dia n = 12) infectados com 1,5 x 10^8 LPF após três e seis dias (d) ou inoculados apenas com PBS (C = controle). Os dados são referentes a três experimentos distintos. ANOVA: Não foi detectado efeito de interação significativo entre linhagem e tratamento (p = 0,426); Não foi detectada diferença significativa entre as linhagens, (p = 0,354) e entre os tratamentos, (p = 0,112).

Tabela 6 – Porcentagem de células mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) encontradas no sangue de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ infectados com 1,5 x 10^8 LPF por três e seis dias representados por média e erro padrão.

	B6.C3$^{+/+}$			B6.C3$^{-/-}$		
	C	3d	6d	C	3d	6d
MN (%)	91±1,1	87±1,1	89±2,0	90±2,2	82±1,0	84±3,2
PMN (%)	9±1,1	13±1,1	11±2,0	10±2,2	12±1,0	16±3,2

ANOVA: Linhagem x Tratamento, p=0,426; Linhagens, p=0,354; Tratamentos, p=0,112. d = dias pós-inóculo.

5.6 Desenvolvimento de esplenomegalia

Alterações no baço devido à infecção por leptospiras são descritas desde os primeiros trabalhos publicados em pacientes com leptospirose, entre elas a esplenomegalia (aumento do tamanho do baço) (Arean, 1962). Sabendo-se dessa informação, o peso do baço nos camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ foi monitorado. Como esperado, os resultados obtidos mostraram que o aumento do baço ocorre durante a infecção. Camundongos de ambos os grupos aumentaram o tamanho do baço, quando comparados com o grupo controle, após o terceiro e sexto dias de infecção, independente da presença de C3. Porém, diferenças estatísticas significativas foram encontradas, quando comparados os dois grupos, onde os camundongos deficientes apresentaram comportamento distinto ao observado no grupo selvagem. Então, apesar do aumento do tamanho do baço encontrado tanto no grupo selvagem quanto no grupo deficiente durante todo o percurso da infecção, o comportamento observado

entre as duas linhagens foi distinto. Essa diferença foi observada durante o sexto dia de infecção, onde, apesar do aumento da massa esplênica em ambos os grupos, os resultados obtidos com os camundongos B6.C3$^{+/+}$ mostraram que a relação entre o peso corporal e o peso do baço desses animais foi menor entre os camundongos deficientes da proteína C3 (**Figura 13**).

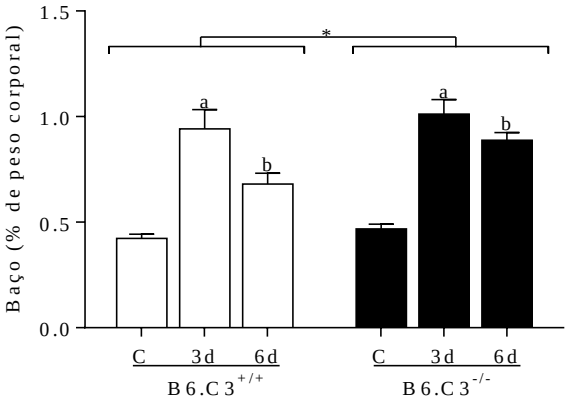


Figura 13 – **Desenvolvimento de esplenomegalia em camundongos infectados com LPF por três e seis dias.** Relação peso corporal/peso (em porcentagem) do baço dos camundongos B6.C3$^{+/+}$ (C n = 9; 3º dia n = 10; 6º dia n = 11) e B6.C3$^{-/-}$ (C n = 9; 3º dia n = 11; 6º dia n = 12) infectados com 1,5 x 10^8 LPF após três e seis dias (d) ou inoculados apenas com PBS (C = controle). O peso corporal e do baço de cada camundongo foi aferido ao final do experimento e calculou-se a relação entre os parâmetros para a construção do gráfico. Os dados são referentes a três experimentos distintos. ANOVA: Não foi detectado efeito de interação entre linhagem x tratamento (p = 0,103). Foi detectada diferença significativa entre as linhagens (p = 0,006) e os tratamentos (p < 0,001). Tukey: a indica ≠C; b indica ≠3 dias (p < 0,05).

Tabela 7 – Relação entre peso corporal e peso do baço dos camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ após três e seis dias de infecção com 1,5 x 10^8 LPF representado por média e erro padrão.

	B6.C3$^{+/+}$			B6.C3$^{+/+}$		
	C	3d	6d	C	3d	6d
Relação peso corporal/baço	0,42 ±0,09	0,95 ±0,07^{a}	0,67 ±0,03^{b}	0,47 ±0,03	1,02±0,10^{a}	0,90±0,04^{*b}

ANOVA, Linhagem x Tratamento, p=0,103; Linhagens, p=0,006 (B6.C3$^{+/+}$≠B6.C3$^{-/-}$); Tratamentos, p<0,001 (Tukey: ^{a}≠C, ^{b}≠3d, p<0,05). d = dias pós-inóculo.

5.7 Análise de subpopulações celulares no baço

A quantificação de subpopulações celulares analisadas no baço dos camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ durante a infecção por leptospiras mostrou uma proliferação de subtipos celulares dependente de C3 (**Figuras 14, 15 e 16**). Com o objetivo de observar o perfil de

resposta de cada um dos grupos, foram analisados por citometria leucócitos envolvidos na resposta inata, na resposta humoral e na resposta celular.

As células que expressam a molécula CD11b (Mac-1/CR3) fazem parte da subfamília de β_2 integrinas e são conhecidas como integrinas leucocitárias, por estarem presentes apenas em leucócitos com função de adesão à outras células ou à matriz extracelular. Essa molécula é expressa em células como monócitos, macrófagos, granulócitos e células dendríticas e possui múltiplas funções, como mediar a diapedese dos fagócitos para o sítio de inflamação, e ligar à fragmentos do SC presentes na superfície de patógenos e facilitar a fagocitose. A ativação dessas células aumenta a expressão de B_2 integrinas na superfície dos fagócitos, incluindo a expressão de CD11b (Elangbam et al., 1997). Devido a importância da fagocitose na resposta contra leptospiras, investigamos a expressão dessa molécula nas células esplênicas. Nossos resultados mostraram que o número de células $CD11b^+$ no baço dos camundongos $B6.C3^{+/+}$ foi maior do que o número das mesmas células nos camundongos $B6.C3^{-/-}$ no terceiro dia de infecção. Os camundongos selvagens apresentaram um aumento significativo do número destas células, quando comparado com o grupo controle, enquanto os animais deficientes de C3 não apresentaram um aumento do número das mesmas células durante toda a infecção. Apesar do aumento do número de macrófagos observado no grupo selvagem no terceiro dia, no sexto dia de infecção o número dessas células apresentou uma grande diminuição, apresentando um número significativamente menor do que o número de macrófagos obtidos nos camundongos $B6.C3^{-/-}$ (**Figura 14A**).

Os camundongos selvagens e deficientes de C3 apresentaram um padrão distinto entre os dois grupos no número de neutrófilos durante toda a infecção. O número de neutrófilos nos animais $B6.C3^{+/+}$ foi semelhante no terceiro e sexto dias de infecção, quando comparados com o grupo controle. Os animais $B6.C3^{-/-}$ mostraram uma diminuição significativa no sexto dia de infecção, quando comparados com os animais selvagens, apesar desse número não ter variado dentre do grupo deficiente durante o período de infecção (**Figura 14B**).

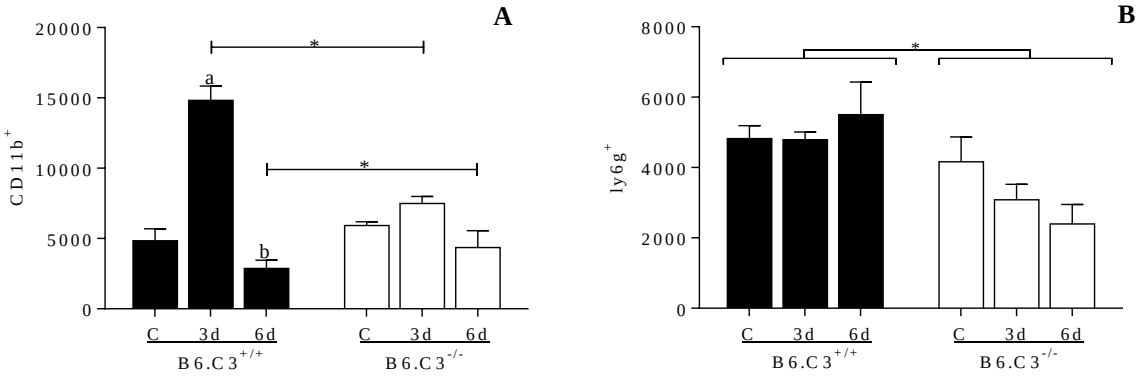


Figura 14 – Número de células CD11b$^+$ e neutrófilos presentes no baço de camundongos infectados com LPF por três e seis dias determinados por citometria de fluxo. (**A**) Contagem de células CD11b$^+$ no baço de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ (C n = 6; 3 dias n = 7; 6 dias n = 7) infectados por três e seis dias (d) com 1,5 x 10^8 LPF ou inoculados apenas com PBS (C = controle). ANOVA: Foi detectado efeito de interação significativo entre linhagem x tratamento (p < 0,001); Tukey: * indica diferenças significativas entre B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$, a indica ≠ C e b indica ≠ 3 dias (p < 0,05). (**B**) Contagem de células ly6g$^+$ presentes no baço de camundongos B6.C3$^{+/+}$ (C n = 6; 3 dias n = 7; 6 dias n = 5) e B6.C3$^{-/-}$ (C n = 6; 3 dias n = 7; 6 dias n = 7) infectados após três e seis dias (d) com 1,5 x 10^8 LPF. ANOVA: Não foi detectado efeito de interação significativo entre linhagem x tratamento (p = 0,103); Foi detectada diferença significativa entre as linhagens (* indica diferenças significativas entre B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$, p < 0,001); Não foi detectada diferença significativa entre os tratamentos (p = 0,412).

A ausência da proteína C3 também interferiu na proporção de linfócitos B durante a infecção. No terceiro dia de infecção houve uma diminuição do número de linfócitos B em ambos os grupos, porém a queda foi mais acentuada nos animais B6.C3$^{-/-}$, quando comparados com os animais B6.C3$^{+/+}$. No sexto dia de infecção, os camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ infectados com LPF voltaram a apresentar níveis basais de linfócitos B. Apesar de não haver diferenças estatísticas dentro de cada linhagem no sexto dia de infecção quando comparadas com o grupo controle, os animais deficientes permaneceram com um número relativamente menor de linfócitos B no baço do que os animais selvagens (**Figura 15**), demonstrando um fenômeno dependente da proteína C3.

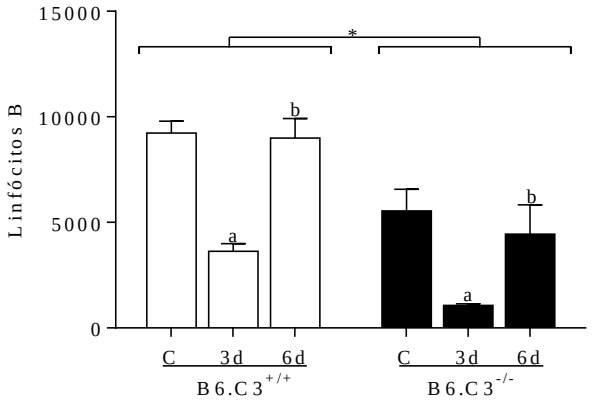


Figura 15 – Número de linfócitos B presentes no baço de camundongos infectados com LPF por três e seis dias determinado por citometria de fluxo. Contagem de células $CD19^+$ presentes no baço de camundongos $B6.C3^{+/+}$ (C n = 6; 3 dias n = 7; 6 dias n = 7) $B6.C3^{-/-}$ (C n = 6; 3 dias n = 7; 6 dias n = 7) infectados após três e seis dias (d) com 1,5 x 10^8 LPF ou inoculados apenas com PBS (C = controle). ANOVA: Não foi detectado efeito de interação significativo entre linhagem x tratamento (p = 0,228). Foi detectada diferença significativa entre as linhagens (* indica $B6.C3^{-/-} \neq B6.C3^{+/+}$, p < 0,001) e os tratamentos (p < 0,001); Tukey: a indica ≠ C, b indica ≠ 3 dias (p < 0,05).

Os camundongos selvagens infectados com LPF apresentaram um número maior de linfócitos T $CD4^+$ no baço do que os animais nocautes no terceiro e sexto dias de infecção. As duas linhagens apresentaram aumento no número de linfócitos T $CD4^+$ no terceiro dia de infecção, revertido no sexto dia, onde foi observada a diminuição na quantidade dessas células nos dois grupos. Apesar desse comportamento, os camundongos deficientes de C3 apresentaram um número significativamente menor desses linfócitos tanto no terceiro quanto no sexto dia de infecção, quando comparados com o grupo selvagem (**Figura 16A**).

Os camundongos selvagens e deficientes de C3 não apresentaram diferenças significativas no número de linfócitos T $CD8^+$ no baço no terceiro de infecção, quando comparados com os respectivos grupos de camundongos não infectados. Apesar desse comportamento, os camundongos deficientes de C3 apresentaram um número significativamente menor desses linfócitos no terceiro de infecção, quando comparados com o grupo selvagem (**Figura 16B**). Ou seja, apesar de não encontrarmos diferenças significativas no número de linfócitos nos camundongos de ambas as linhagens no terceiro dia em comparação com o grupo controle, o número de linfócitos $TCD8^+$ tende a aumentar nos camundongos selvagens, o que não ocorre entre os animais deficientes de C3.

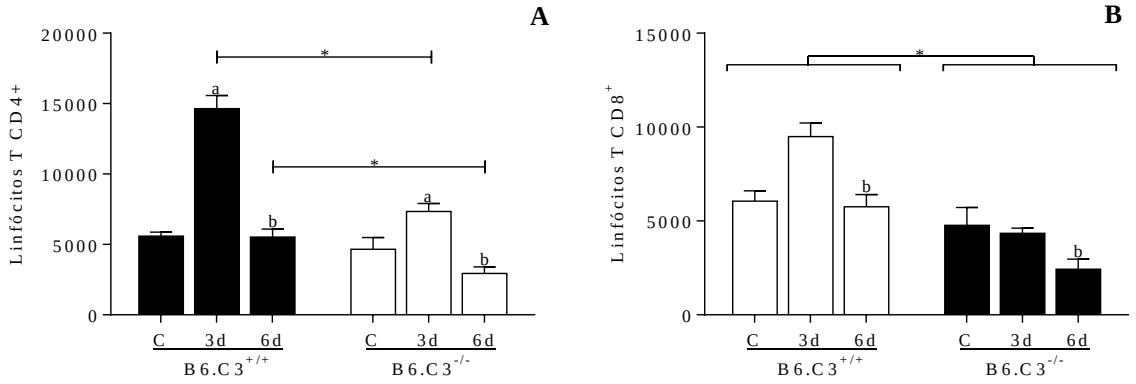


Figura 16 - Número de linfócitos T presentes no baço de camundongos infectados com LPF após três e seis dias determinado por citometria de fluxo. (**A**) Contagem de células CD4+CD8- no baço de camundongos B6.C3$^{+/+}$ (C n = 6; 3 dias n = 7; 6 dias n = 5) e B6.C3$^{-/-}$ (C n = 6; 3 dias n = 7; 6 dias n = 7) infectados após três e seis dias (d) com 1,5 x 10^8 LPF ou inoculados apenas com PBS (C = controle). ANOVA: Foi detectado efeito de interação entre linhagem x tratamento (p = 0,009); Tukey: * indica diferenças significativas entre B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$, a indica ≠ C, b indica ≠ 3 dias (p < 0,05). (**B**) Contagem de células CD4-CD8+ no baço de camundongos B6.C3$^{+/+}$ (C n = 6; 3 dias n = 7; 6 dias n = 7) e B6.C3$^{-/-}$ (C n = 6; 3 dias n = 7; 6 dias n = 7) infectados após três e seis dias (d) com 1,5 x 10^8 LPF ou inoculados apenas com PBS (C = controle). ANOVA: Não foi detectado efeito de interação entre linhagem x tratamento (p = 0,065); Foi detectada diferença significativa entre as linhagens (* indica B6.C3$^{-/-}$ ≠ B6.C3$^{+/+}$) e os tratamentos (p < 0,001) Tukey: b indica ≠ 3 dias (p < 0,05).

Tabela 8 – Quantificação das subpopulações celulares presentes no baço de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ inoculados com 1,5 x 10^8 LPF ou PBS representada por média e erro padrão.

	B6.C3$^{+/+}$			B6.C3$^{-/-}$		
	C	3d	6d	C	3d	6d
[1]Monócitos	4839±844	14821±1018	2875±581^{b}	5923±265	7496±503*	6095±654*
[2]Neutrófilos	4827±363	4788±224	5506±923	4163±705*	3080±443*	2397±554*
[3]Linfócitos	9230±569	3625±919^{a}	5197±570^{b}	5540±1027*	1065±75^{*a}	4438±1387^{*b}
[4]Linfócitos TCD4^{+}	5590±288	14634±944^{a}	6938±571^{b}	4664±827	7349±559^{*a}	2949±464^{*b}
[5]Linfócitos TCD8^{+}	6054±549	9488±727	5761±639	4766±951*	4346±269*	2433±531^{*b}

[1]ANOVA, Linhagem x Tratamento, p<0,001; Tukey: *≠B6.C3$^{+/+}$, ^{a}≠C, ^{b}≠3d, p<0,005. [2]ANOVA, Linhagem x Tratamento, p=0,103; *≠B6.C3$^{+/+}$, p<0,001. [3]ANOVA, Linhagem x Tratamento, p=0,228; *≠B6.C3$^{+/+}$ p<0,001; Tukey: ^{a}≠C, ^{b}≠3d, p<0,001. [4]ANOVA, Linhagem x Tratamento, p=0,009; Tukey *≠B6.C3$^{+/+}$, ^{a}≠C, ^{b}≠3d, p<0,001. [5]ANOVA, Linhagem x Tratamento, p=0,065; *≠B6.C3$^{+/+}$, p<0,001; Tukey: ^{b}≠3d, p<0,05. d = dias pós-inóculo.

5.8 Quantificação de LPF nos órgãos

Ao quantificar o número de LPF por qPCR, observou-se que os animais B6.C3$^{-/-}$ possuem uma diferença no número de bactérias no fígado, baço e rim durante o terceiro dia de infecção, quando comparado com o grupo B6.C3$^{+/+}$. O número de leptospiras nesses órgãos

foi maior nos camundongos nocautes do que nos animais selvagens, indicando uma possível falha na eliminação da bactéria na ausência de C3. No sexto dia de infecção, ocorreu uma diminuição do número de bactérias no fígado e baço das duas linhagens e no rim dos camundongos nocautes.

O fígado dos camundongos apresentou um número elevado de LPF no terceiro dia de infecção, porém os animais deficientes apresentaram um número maior de LPF, quando comparados com os camundongos selvagens. Quando a quantificação foi realizada no sexto dia de infecção, foi observada uma queda significativa nos dois grupos, que apresentaram números semelhantes de LPF nesse órgão (**Figura 17**).

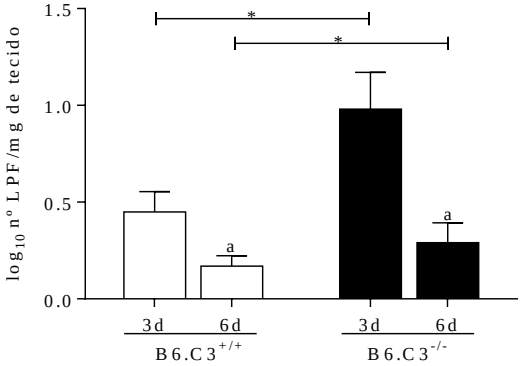


Figura 17 – Quantificação de LPF no fígado de camundongos infectados por três e seis dias. Fígado de camundongos B6.C3$^{+/+}$ (3º dia n = 9; 6º dia n = 8) e B6.C3$^{-/-}$ (3º dia n = 7; 6º dia n = 6) infectados após três e seis dias (d) com 1,5 x 10^8 LPF. Os dados são referentes a três experimentos distintos. ANOVA: Foi detectado efeito de interação significativo entre linhagem x tratamento (p = 0,006); Tukey: * indica B6.C3$^{-/-}$ ≠ B6.C3$^{+/+}$, a indica ≠ 3 dias (p < 0,05).

O mesmo fenômeno observado no fígado dos camundongos foi observado no baço das duas linhagens após três e seis dias de infecção. Ambas as linhagens apresentaram elevada quantidade de LPF no baço no terceiro dia de infecção, que diminuiu no sexto dia. Porém, diferenças significativas foram observadas tanto no terceiro quanto no sexto dia de infecção, onde os camundongos deficientes de C3 permaneceram com números mais elevados de LPF nesse órgão em comparação com os animais selvagens (**Figura 18**).

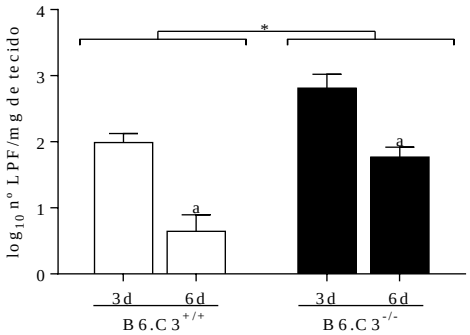


Figura 18 – Quantificação de LPF no baço de camundongos infectados por três e seis dias. Baço de camundongos B6.C3$^{+/+}$ (3º dia n = 9; 6º dia n = 7) e B6.C3$^{-/-}$ (3º dia n = 11; 6º dia n = 11) infectados após três e seis dias (d) com 1,5 x 10^8 LPF ou inoculados apenas com PBS (C = controle não infectado com LPF). Os dados são referentes a três experimentos distintos. ANOVA: Não foi detectado efeito de interação significativo entre linhagem x tratamento (p = 0,441); Foi detectada diferença significativa entre as linhagens (* indica B6.C3$^{-/-}$ ≠ B6.C3$^{+/+}$) e os tratamentos (p < 0,001); Tukey: a indica ≠ 3 dias (p < 0,001).

Ao observamos o pulmão de camundongos infectados, observou-se uma resposta distinta ao que havia ocorrido nos outros órgãos. Os camundongos de ambas as linhagens permaneceram com quantidades semelhantes de bactérias no terceiro dia de infecção e no sexto dia apenas os camundongos nocautes apresentaram uma queda significativa nesse número, quando comparado ao terceiro dia de infecção, fato não observado nos camundongos selvagens (**Figura 19**).

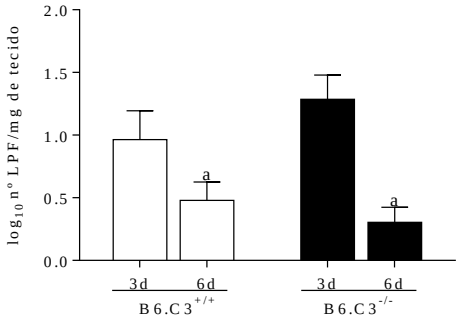


Figura 19 – Quantificação de LPF no pulmão de camundongos infectados por três e seis dias. Pulmão de camundongos B6.C3$^{+/+}$ (3º dia n = 10; 6º dia n = 11) e B6.C3$^{-/-}$ (3º dia n = 11; 6º dia n = 12) infectados após três e seis dias (d) com 1,5 x 10^8 LPF. Os dados são referentes a três experimentos distintos. ANOVA: Não foi detectado efeito de interação entre linhagem x tratamento (p = 0,160); Não foi detectada diferença estatística significativa entre as linhagens (p = 0,675); Foi detectada diferença estatística significativa entre os tratamentos (p < 0,001); Tukey: a indica ≠ 3 dias (p < 0,001).

No terceiro dia de infecção, os camundongos deficientes apresentaram maior quantidade de LPF no rim do que os animais selvagens, mostrando um mecanismo dependente

de C3 para a eliminação precoce da bactéria dos principais órgãos alvo. Ao sexto dia, assim como observado no fígado e baço, o número de LPF foi significativamente menor. Porém, esse fato foi apenas observado nos camundongos deficientes, enquanto os camundongos selvagens apresentaram quantificação semelhante de bactérias no último dia de infecção (**Figura 20**)

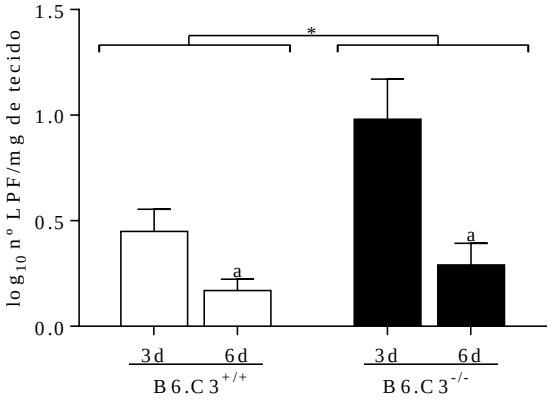


Figura 20 – Quantificação de LPF no rim de camundongos infectados por três e seis dias. Rim de camundongos B6.C3$^{+/+}$ (3º dia n = 10; 6º dia n = 11) e B6.C3$^{-/-}$ (3º dia n = 9; 6º dia n = 11) infectados após três e seis dias (d) com 1,5 x 10^8 LPF ou inoculados apenas com PBS (C = controle não infectado com LPF). Os dados são referentes a três experimentos distintos. ANOVA: Não foi detectado efeito de interação entre linhagem x tratamento (p = 0,110); Foi detectada diferença significativa entre as linhagens (* indica B6.C3$^{-/-}$ ≠ B6.C3$^{+/+}$, p = 0,013); Foi detectada diferença significativa entre os tratamentos. Tukey: a indica ≠ 3 dias (p = 0,001).

As leptospiras são bactérias que colonizam os túbulos renais dos seus hospedeiros, onde podem permanecer por longos períodos, sendo encontradas com frequência principalmente na urina de roedores infectados. O contato direto ou indireto com a urina ou com o ambiente contaminado pode causar a entrada das leptospiras pela pele lesionada ou pelas mucosas, podendo resultar na infecção do hospedeiro. A urina dos camundongos utilizados em nosso projeto foi coletada e, após extração de DNA, analisamos a ocorrência de leptospiras nas amostras. No terceiro dia de infecção foi observado um número significativamente menor de LPF na urina dos camundongos de ambos os grupos, quando comparado com o sexto dia de infecção. Apesar do aumento do número de LPF no sexto dia tanto nos camundongos B6.C3$^{+/+}$ quanto nos camundongos B6.C3$^{-/-}$, os animais deficientes apresentaram um número significativamente maior da bactéria na urina quando comparados com os animais selvagens (**Figura 21**).

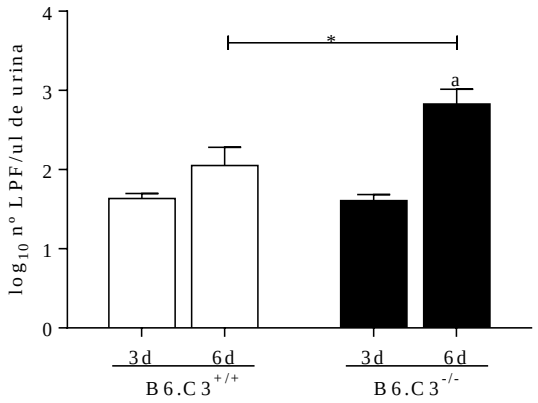


Figura 21 – Quantificação de LPF na urina de camundongos infectados por três e seis dias. Quantificação em $\log_{10}$ de LPF presente na urina de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ (3º dia n = 6; 6º dia n = 6) infectados por três e seis dias com 1,5 x 10^8 LPF ou inoculados apenas com PBS (C = controle). ANOVA: Foi detectado efeito de interação entre Linhagem x Tratamento (p = 0,018). Tukey: * indica B6.C3$^{-/-}$ ≠ B6.C3$^{+/+}$, a indica ≠ 3 dias (p = 0,05).

Tabela 9 – Quantificação de DNA de LPF encontradas por qPCR no fígado, baço, pulmão, rim e urina de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ infectados após três e seis dias com 1,5 x 10^8 representados em média e erro padrão.

	B6.C3$^{+/+}$		B6.C3$^{-/-}$	
	3d	6d	3d	6d
[1]Fígado	2,228 ± 0,196	0,224 ± 0,126^{a}	3,285 ± 0,224*	0,216 ± 0,085^{*a}
[2]Baço	1,988 ± 0,138	0,646 ± 0,250^{a}	2,810 ± 0,210*	1,768 ± 0,153^{*a}
[3]Pulmão	0,964 ± 0,231	0,479 ± 0,147^{a}	1,285 ± 0,194	0,303 ± 0,120^{a}
[4]Rim	0,450 ± 0,104	0,169 ± 0,054^{a}	0,981 ± 0,190*	0,291 ± 0,102^{*a}
[5]Urina	1,635±0,062	2,053±0,228^{a}	1,607±0,078	2,827±0,187^{*a}

Dados em $\log_{10}$. [1]ANOVA, Linhagem x Tratamento, p=0,006; Tukey: *≠B6.C3$^{+/+}$, ^{a}≠3d, p<0,05. [2]ANOVA, Linhagem x Tratamento, p<0,441, *≠B6.C3$^{+/+}$, ^{a}≠3d, p<0,001. [3]ANOVA, Linhagem x Tratamento, p=0,160; ^{a}≠3d, p<0,001. [4]ANOVA, Linhagem x Tratamento, p=0,110; *≠B6.C3$^{+/+}$, p=0,013; ^{a}≠3d, p=0,001. [5]ANOVA, Linhagem x Tratamento, p=0,018; *≠B6.C3$^{+/+}$, ^{a} ≠3d, p<0,05. d = dias pós-inóculo.

5.9 Análise histopatológica

A análise histopatológica foi realizada para observar possíveis alterações morfológicas nos órgãos alvo da LPF no terceiro e sexto dias de infecção. Observamos alterações no fígado e baço dos camundongos durante todo o percurso da infecção, enquanto o rim não apresentou nenhuma alteração até o 6º dia de infecção e o pulmão não apresentou nenhuma alteração causada pela infecção com a LPF.

5.9.1 Fígado

Os animais usados como controle, inoculados unicamente com PBS, permaneceram sem alterações histológicas hepáticas, enquanto os animais infectados com LPF apresentaram infiltrados leucocitários na região lobular e portal e áreas de necrose, alterações que são comuns na infecção por leptospiras em modelos experimentais. Apesar da presença dessas lesões em ambos os grupos, os camundongos selvagens apresentaram áreas de necrose maiores, mais frequentes e com maior grau de alteração, quando comparados com os animais deficientes durante o terceiro dia de infecção, mostrando uma diferença entre os grupos infectados dependente da proteína C3 (**Figura 23B**). Os animais selvagens apresentaram focos de infiltrados leucocitários maiores e mais frequentes, quando comparados com os animais deficientes no terceiro dia de infecção (**Figura 22A, 22D e 23A**).

No sexto dia de infecção, as áreas de necrose foram menos intensas, com grau menor e observadas com maior frequência entre os camundongos selvagens (**Figura 23B**). Durante o percurso da infecção, os animais B6.C3$^{+/+}$ apresentaram uma diminuição do tamanho da área e menor frequência de infiltrados leucocitários, enquanto os camundongos B6.C3$^{-/-}$ apresentaram um padrão diferente dessa resposta, onde a inflamação permaneceu semelhante até o sexto dia de infecção (**Figura 22B, 22E e 23A**).

Posteriormente, foram avaliados os órgãos dos animais utilizados no ensaio de sobrevivência com 15 dias de infecção, afim de observar as alterações presentes em uma fase mais tardia da doença. As áreas de necrose não foram observadas nos grupos estudados e o tamanho dos infiltrados leucocitários foi menor em ambos os grupos, quando comparados com os dias anteriores de infecção. Os camundongos selvagens apresentaram número maior de focos de infiltrados leucocitários quando comparados com os animais deficientes, sendo que, no último grupo, apenas um animal apresentou diversos focos de infiltrado leucocitário no lóbulo hepático. No grupo infectado durante quinze dias ocorreu uma mudança na aparência citoplasmática dos hepatócitos nas duas linhagens. Estas células hepáticas aparecem com vacúolos menores em seu interior, indicando uma possível perda de glicogênio, condizente com a ocorrência de um processo inflamatório no órgão (**Figura 22C e 22F**).

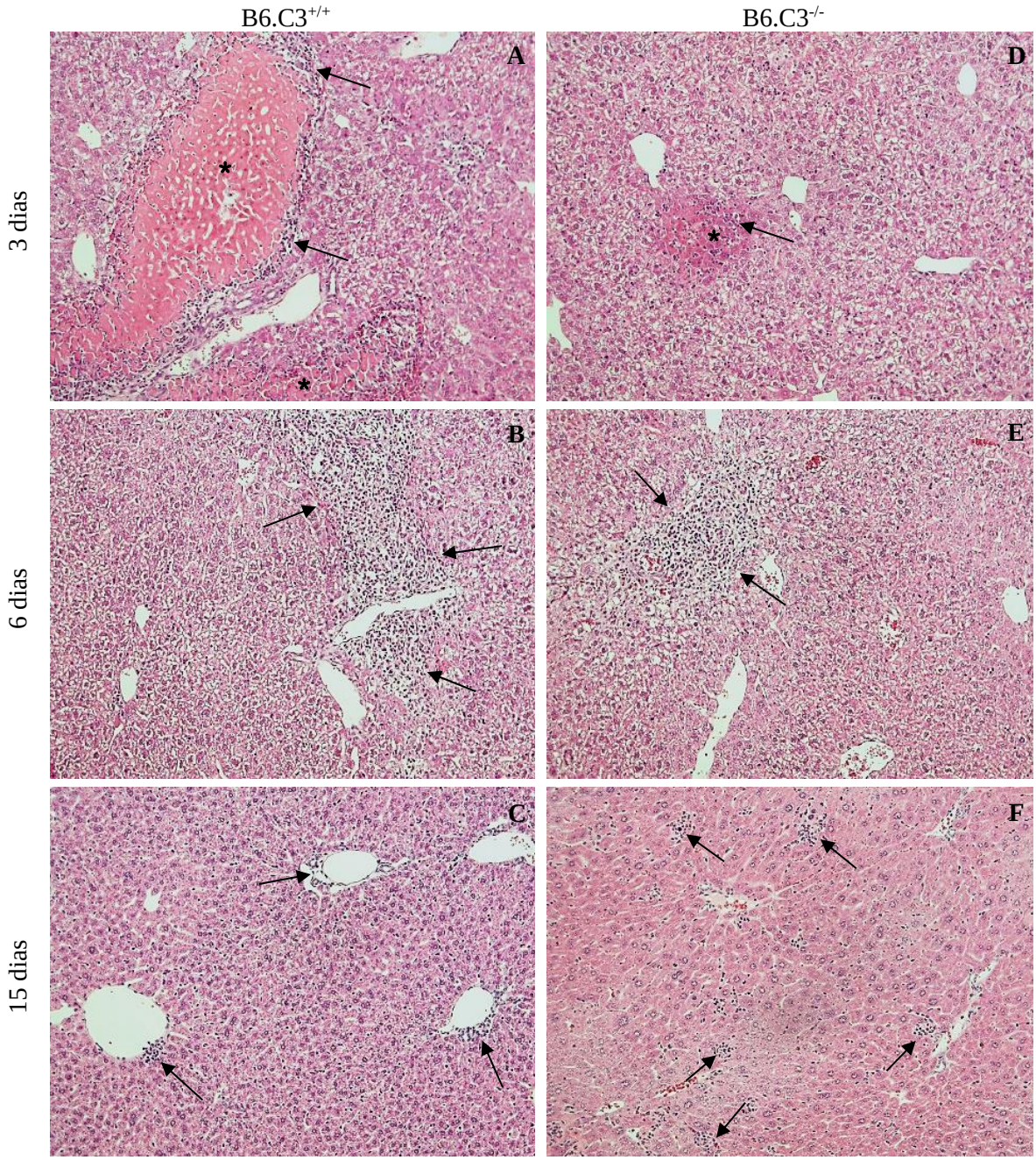


Figura 22 – Lesões observadas no fígado de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ infectados por três, seis e quinze dias com LPF. As imagens A, B e C correspondem ao fígado dos camundongos B6.C3$^{+/+}$ com 1,5 x 10^8 LPF durante três, seis e quinze dias de infecção, respectivamente. As imagens D, E e F correspondem ao fígado dos animais B6.C3$^{-/-}$ inoculados com 1,5 x 10^8 LPF durante três, seis e quinze dias, respectivamente. As setas indicam os infiltrados leucocitários no espaço porta e no lóbulo hepático. O asterisco indica a área de necrose. Coloração com HE. Aumento de 100x.

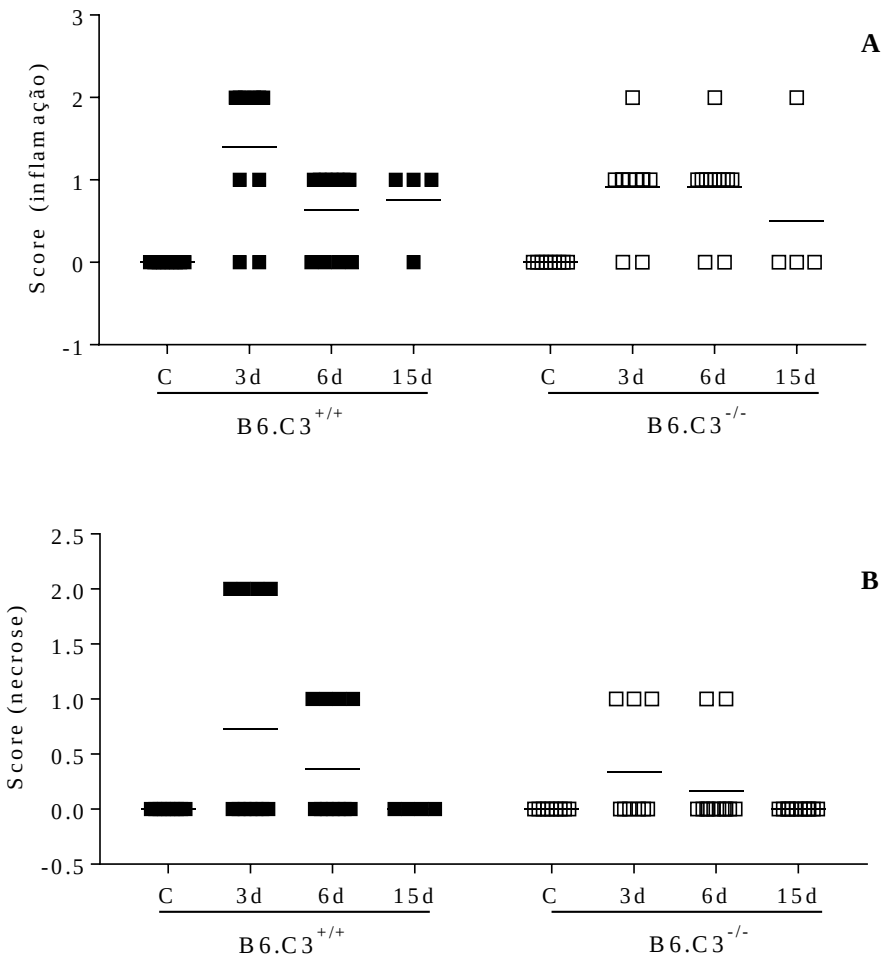


Figura 23 – *Score* das lesões observadas no fígado dos camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ infectados com LPF. (**A**) *Score* dos infiltrados leucocitários e (**B**) da presença de necrose observadas nos camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ infectados com 1,5 x 10^8 LPF por três, seis e quinze dias (d) ou inoculados apenas com PBS (C = controle). As linhas horizontais correspondem ao valor médio do grau de lesão. B6.C3$^{+/+}$ (C n = 9; 3º dia n = 10; 6º dia n = 11) e B6.C3$^{-/-}$ (C n = 9; 3º dia = 11; 6º dia n = 12). Critérios do *score:* 0, ausência de alteração; 1, alteração leve; 2, alteração moderada; 3, alteração grave. Os dados apresentados com três e seis dias de infecção são referentes a três experimentos distintos. Os dados apresentados com quinze dias de infecção são provenientes de experimentos independentes, realizados com inóculos distintos de LPF.

5.9.2 Baço

Assim como foi observado na **Figura 13**, os camundongos selvagens e nocautes desenvolveram esplenomegalia durante a infecção. Após análise histopatológica desse órgão, foi observado um aumento da polpa branca e a expansão clonal das células presentes na mesma região de todos os animais infectados no terceiro, sexto e décimo quinto dias em comparação com os camundongos que não foram infectados com LPF (**Figura 24 e 25A**). Os animais B6.C3$^{+/+}$ apresentaram um aumento da atividade centrofolicular no décimo quinto dia de infecção em comparação com os camundongos B6.C3$^{-/-}$, o que indica uma maior proliferação de linfócitos B nesses animais (**Figura 24C e 24F**).

A presença de hemossiderina já havia sido descrita entre os achados histopatológicos em modelos experimentais com leptospirose (Muensoongnoen et al., 2006). Em nosso modelo, foram encontrados grânulos de hemossiderina na polpa vermelha no baço dos camundongos infectados no terceiro e sexto dia de infecção, que ocorreu com maior frequência e intensidade entre os camundongos selvagens (**Figura 24B e 25B**)

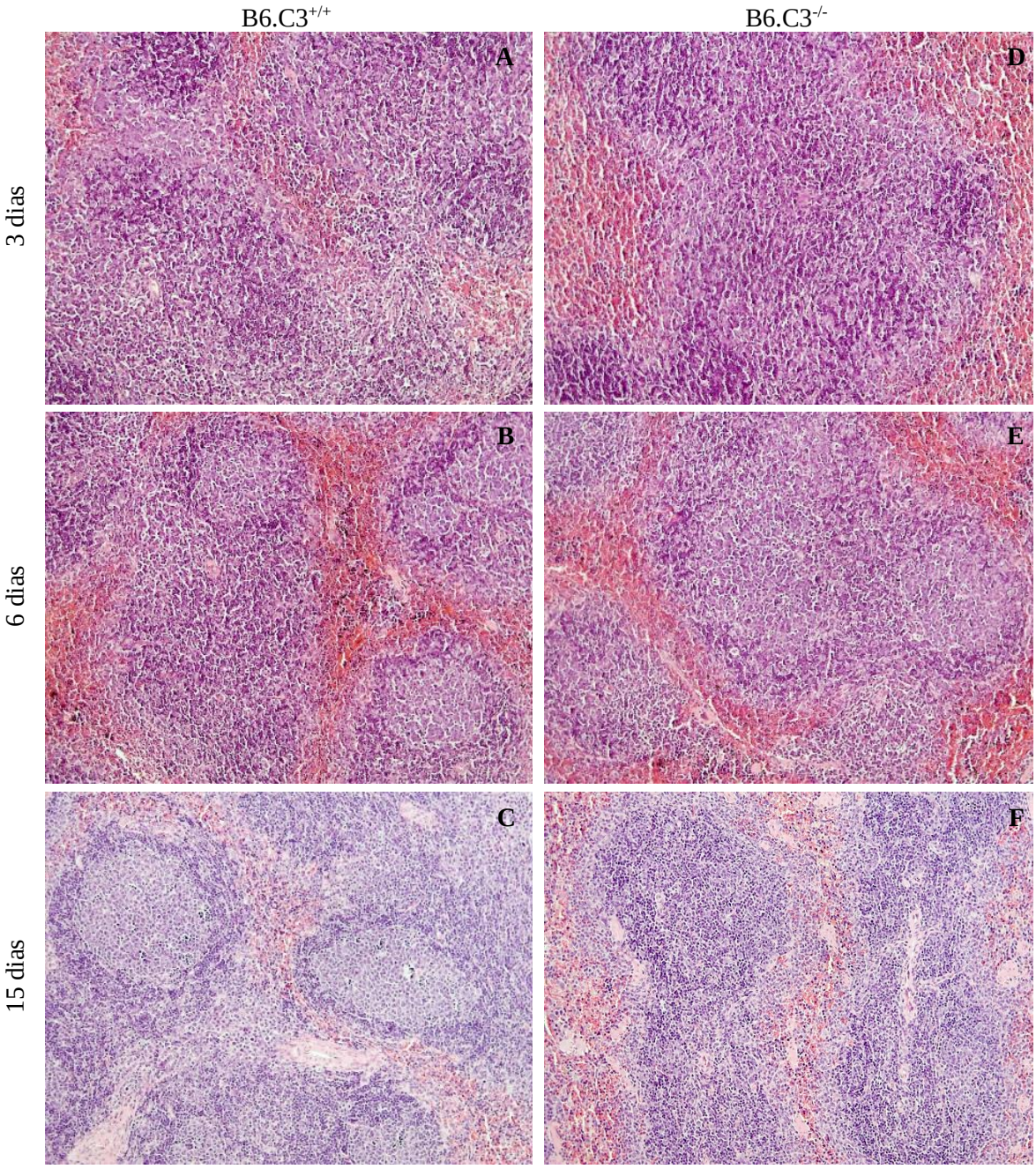


Figura 24 – Alterações observadas no baço dos camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ infectados durante três, seis e quinze dias com LPF. As imagens A, B, C e D correspondem ao baço dos camundongos B6.C3$^{+/+}$ inoculados com 1,5 x 10^8 LPF por três, seis e quinze dias, respectivamente. As imagens E, F e G correspondem ao baço dos animais B6.C3$^{-/-}$ inoculados com 1,5 x 10^8 LPF por três, seis e quinze dias, respectivamente. Coloração com HE. Aumento de 100x.

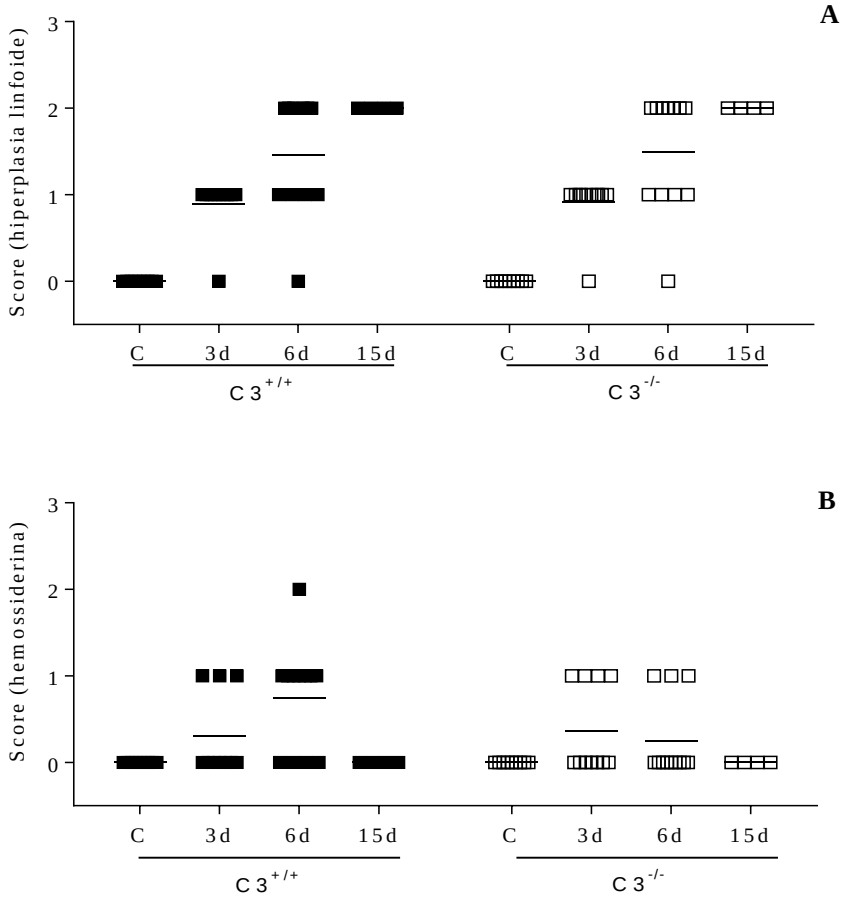


Figura 25 – *Score* das alterações observadas no baço de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ infectados com LPF. (**A**) Grau de hiperplasia lobular nos camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ infectados com 1,5 x 10^8 LPF por três, seis e quinze dias (d) ou inoculados apenas com PBS (C = controle). (**B**) Grau de hemossiderina presente na polpa vermelha do baço dos camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ infectados com 1,5 x 10^8 LPF por três, seis e quinze dias ou inoculados apenas com PBS. As linhas horizontais correspondem ao valor médio de lesão. B6.C3$^{+/+}$ (C n = 9; 3º dia n = 10; 6º dia n = 11; 15º dia n = 4) e B6.C3$^{-/-}$ (C n = 9; 3º dia = 11; 6º dia n = 12; 15º dia n = 4). Os dados apresentados com três e seis dias de infecção são referentes a três experimentos distintos. Os dados apresentados com quinze dias de infecção são provenientes de experimentos independentes, realizados com inóculos distintos de LPF.

5.9.3 Pulmão

Na análise do pulmão dos camundongos selvagens e deficientes, não foram encontradas alterações que pudessem ser atribuídas à infecção por LPF, sendo que o órgão dos animais infectados permaneceu semelhante ao pulmão dos animais controles que receberam apenas o inóculo com PBS (**Figura 26**).

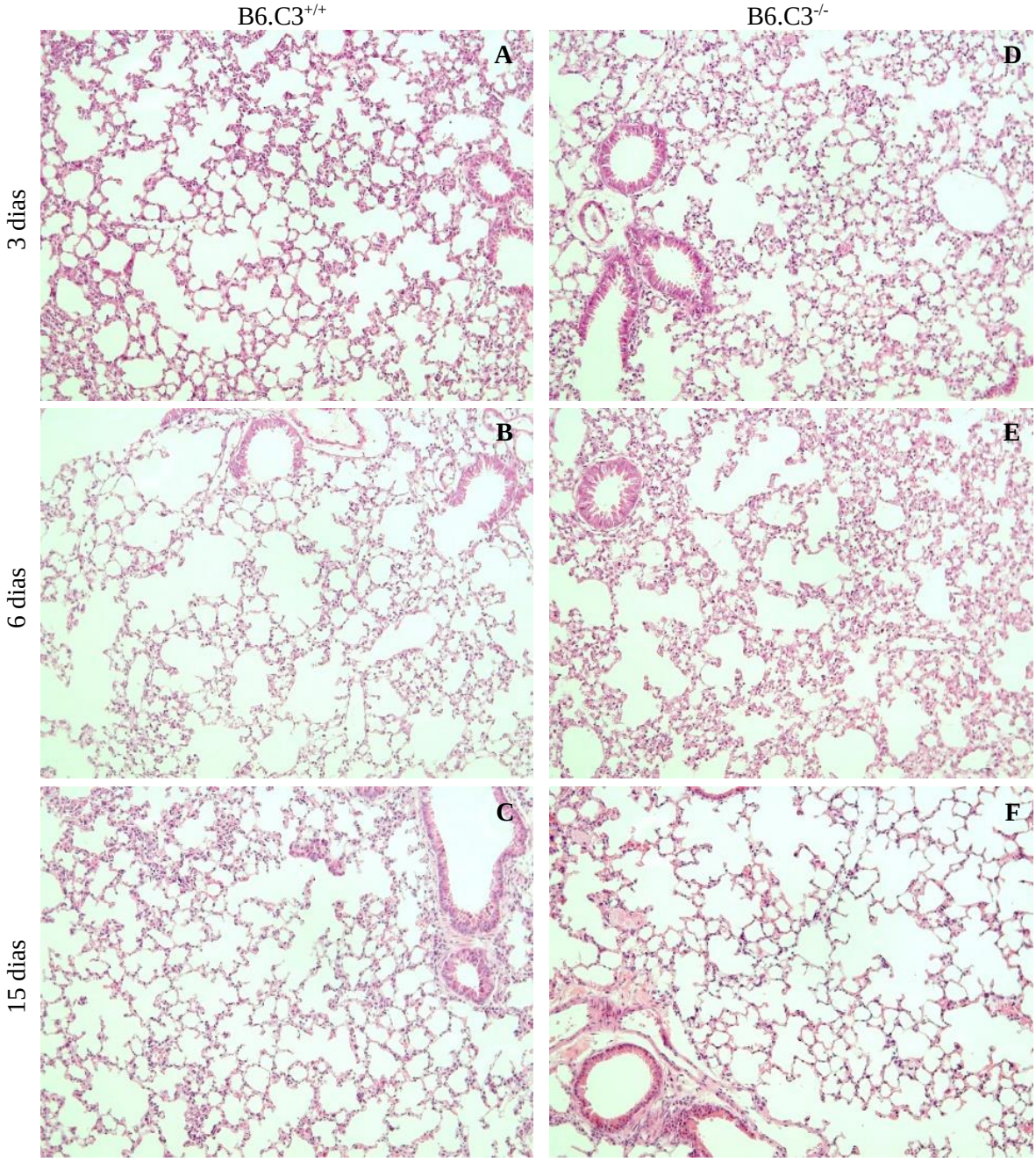


Figura 26 – Análise histopatológica de pulmão de camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ infectados por três, seis dias e quinze com LPF. As imagens A, B e C correspondem a cortes de pulmão dos camundongos B6.C3$^{+/+}$ com 1,5 x 10^8 LPF por três, seis e quinze dias, respectivamente. As imagens D, E e F correspondem a cortes de pulmão dos animais B6.C3$^{-/-}$ inoculados com 1,5 x 10^8 LPF por três, seis e quinze dias, respectivamente. Coloração com HE. Aumento de 100x.

5.9.4 Rim

Ao contrário do esperado, não foram encontradas alterações histopatológicas nos camundongos infectados em nosso modelo curto de infecção de três e seis dias (**Figura 27A, 27B, 27D e 27E**). Pela falta de alterações e por se saber que o rim é um órgão alvo desta bactéria, investigamos se em uma fase mais tardia da infecção seria possível observar alterações renais frequentemente encontradas em camundongos infectados com leptospiras patogênicas. Para isso, foram realizados cortes histológicos dos órgãos dos camundongos selvagens e deficientes empregados no ensaio de sobrevivência que permaneceram infectados por 15 dias com a mesma dose utilizada nos ensaios curtos de infecção. As alterações encontradas ocorreram apenas nos camundongos deficientes, onde foi possível observar a inflamação renal caracterizando uma intersticial (**Figura 27C, 27F e 28**).

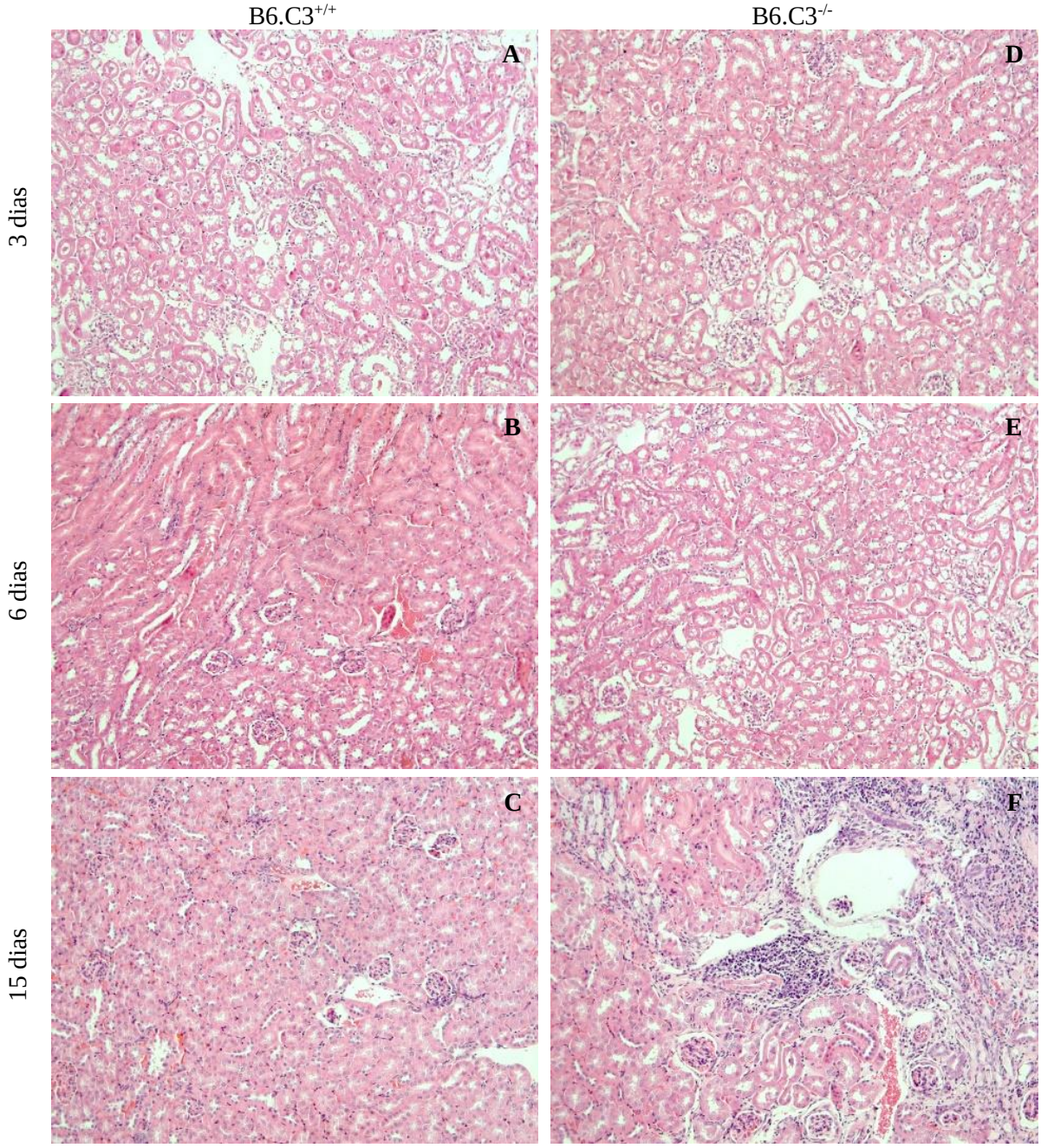


Figura 27 – Lesões observadas no rim dos camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ infectados por três, seis e quinze dias com LPF. As imagens A, B e C correspondem a cortes de rim dos camundongos B6.C3$^{+/+}$ inoculados com 1,5 x 10^8 LPF por três, seis e quinze dias, respectivamente. As imagens D, E e F correspondem a cortes de rim dos animais B6.C3$^{-/-}$ inoculados com 1,5 x 10^8 LPF por três, seis e quinze dias, respectivamente. Coloração com HE. Aumento de 100x.

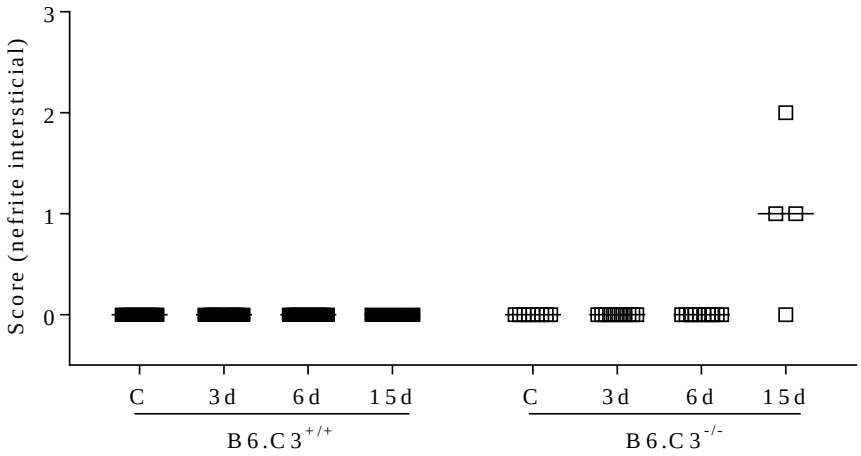


Figura 28 – ***Score*** **de lesão no rim dos camundongos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$ infectados durante três, seis e quinze dias com LPF.** B6. C3$^{+/+}$ (C n = 9; 3º dia n = 10; 6º dia n = 11; 15º dia n = 4) e B6.C3$^{-/-}$ (C n = 9; 3º dia n = 11; 6º dia n = 12; 15º dia n = 4). As linhas horizontais correspondem ao valor médio da lesão. Os dados apresentados com três e seis dias de infecção são referentes a três experimentos distintos. Os dados apresentados com quinze dias de infecção são provenientes de experimentos independentes, realizados com inóculos distintos de LPF.

6 Discussão

Vários pesquisadores, incluindo nosso grupo, têm demonstrado em modelos *in vitro* que as leptospiras patogênicas são capazes de evadir da ação do SC, conferindo uma capacidade maior de sobreviver no hospedeiro. As ações já descritas incluem a degradação de proteínas do SC, como C2, C4, FB, C3 e seus fragmentos por meio de enzimas que são secretadas exclusivamente por leptospiras patogênicas no local da infecção (Fraga et al., 2014b) ou capturadas do hospedeiro como o plasminogênio, que ao se converter em plasmina, cliva C3b e C5 (Castiblanco-Valencia et al., 2016). A ligação de leptospira a proteínas reguladoras das vias de ativação do SC como o C4BP, FH e a vitronectina também é um dos mecanismos de evasão que as leptospiras patogênicas possuem para escapar da resposta imune inata (Meri et al., 2005; Barbosa et al., 2009; Castiblanco-Valencia et al., 2012; Breda et al., 2015; Silva et al., 2015). Neste trabalho, incubamos soro de camundongos selvagens ou deficientes da proteína C3 com uma espécie patogênica e outra não patogênica de leptospiras com o objetivo de observar a eliminação de cada uma das espécies na presença ou ausência do SC. Os resultados obtidos corroboram com aqueles já descritos anteriormente na literatura (Meri et al., 2005; Barbosa et al., 2009), onde observamos que a espécie não patogênica foi facilmente eliminada pelo soro humano normal, enquanto a espécie patogênica mostrou-se resistente à presença do SC mesmo considerando-se que o soro de camundongos apresenta menor concentração de proteína do SC do que o SHN, o soro dos camundongos B6.C3$^{+/+}$ comportou-se de maneira semelhante ao SHN, ou seja, as bactérias patogênicas sobreviveram ao serem incubadas com o soro, e as leptospiras não patogênicas foram eliminadas. Também observamos que, ao incubar a *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I (não patogênica) com o soro dos animais deficientes de C3, a capacidade de eliminação ocorreu de forma semelhante ao soro dos camundongos B6.C3$^{+/+}$, e a bactéria foi capaz de sobreviver por mais tempo no soro, demonstrando a importância do SC na resposta contra leptospiras.

No entanto, apesar da vasta gama de trabalhos publicados que demonstram a importância da relação entre leptospiras e o SC, pouco se sabe sobre como essas bactérias agem *in vivo.* Alguns trabalhos utilizaram animais experimentais para observar a função de outras moléculas do sistema imune durante a resposta contra leptospiras, como por exemplos, as moléculas de TLR-2 e TLR-4. Pesquisadores estudaram o papel dessas moléculas na infecção por leptospiras patogênicas e hoje se sabe que a ausência desses receptores responsáveis pelo reconhecimento bacteriano pode levar os camundongos infectados a óbito (Adler, Faine, 1976; Pereira et al., 1998; Chassin et al., 2009). Camundongos C3H/HeJ são

susceptíveis à infecção por leptospiras devido a uma mutação no gene do receptor que reconhece LPS de bactérias Gram-negativas, o TLR-4. Além de apresentaram maior mortalidade, camundongos dessa linhagem apresentam graves lesões pulmonares e renais compatíveis com as lesões observadas em humanos, que são mais susceptíveis a leptospirose do que os roedores (Pereira et al., 1998). Chassin et al. (2009) realizaram experimentos com camundongos nocaute para *tlr2, tlr4* ou animais que possuíam estes dois genes nocauteados. Os autores observaram que a ausência de um dos receptores ou de ambos aumenta a susceptibilidade de camundongos à infecção por leptospiras.

Ainda pouco se sabe sobre a importância do SC na infecção *in vivo* por leptospiras. Ferrer et al. (2014) realizaram um estudo empregando camundongos deficientes de *decay accelerating factor* (DAF), uma proteína de membrana reguladora que impede a ativação do SC em células próprias saudáveis. Eles observaram que a infecção por leptospiras patogênicas aumenta a susceptibilidade de camundongos C57BL/6 DAF1$^{-/-}$, levando-os a óbito, diferentemente dos camundongos C57BL/6 normais. Além disso, DAF também foi importante para controlar a carga bacteriana no rim dos animais, principalmente na fase aguda da doença.

Devido à falta de trabalhos sobre o assunto e com o objetivo de melhor entender os mecanismos envolvidos na patogênese da leptospirose, nosso grupo empregou camundongos C57BL/6 deficientes da proteína C5, comparando-os com camundongos de mesmo fundo genético selvagem, ou seja, que possuem a proteína C5 do SC. Entre os resultados obtidos, foi possível constatar que os camundongos deficientes de C5 possuem uma porcentagem menor de linfócitos T CD4^{+} e T CD8^{+} na circulação periférica, quando comparados com os camundongos selvagens. Os animais deficientes também apresentaram uma concentração menor de citocinas IL-6 e uma concentração maior de IL-12p40 no rim, um dos órgãos-alvo das leptospiras. A deficiência de C5 também interferiu na concentração das citocinas TNF-α e IL-6 no pulmão dos animais, sendo que os animais controle apresentaram uma concentração menor dessas citocinas nos órgãos, quando comparados com os animais deficientes. Além disso, o fígado dos animais deficientes de C5 apresentou áreas menores de lesão que os controles selvagens e também uma quantidade maior de bactérias no terceiro dia de infecção (Castro, 2014). Após esse trabalho, nosso grupo continuou investigando o papel das proteínas do SC na leptospirose em modelos animais, utilizando agora camundongos C57BL/6 deficientes da proteína C3. Essa proteína possui função importante na imunidade inata e adaptativa, sendo seus fragmentos importantes para a resposta inflamatória, opsonização e fagocitose, e produção de anticorpos (Wessels et al., 1995), entre outras funções importantes.

Sabendo-se disso, nosso objetivo principal foi entender o papel dessa proteína durante a infecção *in vivo* por leptospiras patogênicas.

No presente trabalho, avaliamos se em nosso modelo a falta da proteína C3 seria capaz de aumentar a susceptibilidade dos animais infectados. Assim como também foi constatado com a proteína C5, nosso modelo de infecção não foi capaz de causar mortalidade entre os animais, mesmo em doses elevadas da *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm. Em outros modelos experimentais, a deficiência da proteína C3 acarretou mortalidade de animais infectados com a bactéria encapsulada *S. aureus* (Cunnion et al., 2004), com a bactéria *P. aeruginosa* (Mueller-Ortiz et al., 2004), *E. coli* (Prodeus et al., 1997; Flierl et al., 2008) e *S. pneumoniae* (Rupprecht et al., 2007).

Após verificarmos a sobrevivência dos animais, iniciamos os experimentos com tempo curto de infecção, onde os camundongos selvagens e deficientes de C3 foram infectados com LPF e sacrificados após três e seis dias. Nessa etapa do projeto, avaliamos parâmetros observados na leptospirose humana, como a perda de peso corporal. A diminuição de peso é uma característica da leptospirose observada em humanos infectados (Pischke et al., 2010) e em outros animais, como cachorros (Martinez, Hostutler, 2014), e camundongos C3H/HeJ (Richer et al., 2015). Nosso modelo apresentou uma variação de peso positiva, ou seja, o peso corporal dos animais infectados aumentou semelhantemente ao observado com animais não infectados, mostrando que a LPF não foi capaz de causar a perda de peso ao longo da infecção, mesmo em uma fase mais avançada da doença.

Ao quantificar os leucócitos circulantes dos camundongos selvagens e deficientes de C3, observamos um aumento do número das células circulantes nos primeiros dias de infecção nos camundongos selvagens, enquanto animais deficientes não apresentaram elevação do número de leucócitos totais. Os camundongos deficientes apresentaram maior quantidade de leucócitos totais apenas no sexto dia de infecção, enquanto os animais selvagens apresentam uma queda nesse número de células, provavelmente devido à migração das mesmas para os órgãos-alvo da bactéria. Apesar desse resultado, ao quantificarmos a porcentagem de MN e PMN, não encontramos diferenças entre as proporções dessas populações sanguíneas na fase aguda da doença. O aumento do número de leucócitos foi inversamente proporcional à quantidade de leptospiras encontradas no fígado, baço, pulmão e rim de ambos os grupos no terceiro dia de infecção. Camundongos deficientes de C3 apresentaram maior carga bacteriana em todos os órgãos avaliados, enquanto os camundongos selvagens apresentaram quantidades significativamente mais baixas de LPF. No sexto dia de infecção, quando o número de

leucócitos totais dos camundongos deficientes começa a elevar, podemos observar uma diminuição ou quase ausência da presença de leptospiras encontradas em todos os órgãos, chegando a números próximos a zero. Juntos, esses dados revelam um papel importante da proteína C3 na resposta imune contra as leptospiras patogênicas. A falta de C3 causou um atraso no início da resposta imune, dificultando a eliminação dessas bactérias de seus principais órgãos alvo. A ausência da proteína C3 acarreta falha de processos como opsonização e fagocitose. Fragmentos gerados pelas C3-convertases, como o C3b e iC3b, são importantes opsoninas que potencializam o reconhecimento de fagócitos, auxiliando no combate a infecções. A ausência desses fragmentos acarreta falha da remoção eficiente de patógenos do sangue e de órgãos, e no controle da disseminação sistêmica (Cunnion et al., 2004; Mueller-Ortiz et al., 2004).

Alguns microrganismos são conhecidos por sua alta resistência aos tratamentos já existentes, como o *Enterococcus faecium* e o *Cryptococcus gattii*, que acometem pacientes hospitalizados e imunocomprometidos, e a proteína C3 desempenhou papel importante nessa resposta, uma vez que seus fragmentos foram capazes de controlar a infecção sistêmica (Mershon et al., 2009; Leendertse et al., 2010). Outros modelos importantes foram estudados como, por exemplo, o grupo de Flierl et al. (2008) que induziram sepse em camundongos selvagens e deficientes para C3 e também observaram a redução na capacidade de eliminação bacteriana de *E. coli* nos camundongos deficientes, novamente associada a diminuição da opsonização das bactérias e consequentemente da fagocitose das mesmas. A maior quantidade de bactérias encontradas no fígado dos animais B6.C3$^{-/-}$ não foi proporcional às lesões hepáticas observadas, as quais foram menos graves, quando comparadas com aquelas apresentadas no fígado dos camundongos selvagens. Os dados apresentados demonstram que o número alto de LPF neste órgão na ausência de C3 pode ser causado por uma resposta inflamatória pouco efetiva nos primeiros dias de infecção. Foram observadas lesões mais brandas nos camundongos deficientes de C3, quando comparados com os animais selvagens, que apresentaram grandes áreas de necrose no fígado e focos maiores e mais frequentes de infiltrados leucocitários no terceiro dia de infecção, compatível com o maior número de leucócitos totais desses animais. Além da falha na opsonização, a ausência da proteína C3 implicará consequentemente na menor produção dos fragmentos C3a e C5a, que atuam no recrutamento celular e potencializam a resposta inflamatória em processos infecciosos (Mueller-Ortiz et al., 2006). A falha no recrutamento de células inflamatórias para o local da infecção também pode ter aumentado a sobrevivência da bactéria dentro do fígado desses

animais, juntamente com a falha na fagocitose. Apesar disso, no sexto dia de infecção detectamos baixas quantidades de LPF no fígado de ambos os grupos. Os animais selvagens apresentaram uma resposta inflamatória mais agressiva nesse órgão com mais áreas necróticas causadas pela morte celular devido à inflamação no tecido, e infiltrados leucocitários, apoiando a hipótese apresentada acima. Paralelamente a esse estudo, a aluna Denise Harumi Yamashita está realizando seu mestrado em nosso laboratório e vem estudando a ação da proteína C3 *in vitro* e *in vivo* durante a infecção por LPF. Até agora, foi mostrado que macrófagos peritoneais dos camundongos deficientes de C3 apresentam falhas no processo fagocítico, podendo explicar a elevada presença de leptospiras nos órgãos e maior número de lesões observadas em nosso trabalho nos dias iniciais da infecção. Uma vez incubadas com as células dos camundongos selvagens, a fagocitose de leptospiras patogênicas é potencializada, permitindo concluir que a opsonização é um processo necessário para a defesa do hospedeiro durante a infecção por LPF. Além disso, camundongos deficientes de C3 produziram títulos de anticorpos específicos anti-leptospiras significativamente inferiores aos observados no soro de camundongos selvagens imunizados com LPF. Considerando-se que IgG é uma excelente opsonina, a ausência de C3 afeta a opsonização tanto pela menor produção de anticorpos como de fragmentos C3b, iC3b e C3d gerados em função da ativação do SC.

Outra alteração comumente observada na leptospirose é a esplenomegalia, onde ocorre um aumento do tamanho do baço como consequência da infecção. Ao longo da infecção com a LPF foi observado o desenvolvimento de esplenomegalia tanto nos camundongos deficientes de C3, quanto nos selvagens durante o terceiro dia de infecção. Apesar disso, os animais selvagens infectados com LPF apresentaram o tamanho do baço semelhante ao tamanho do baço dos camundongos controle, infectados apenas com PBS, no sexto dia de infecção, enquanto os animais deficientes ainda apresentaram o tamanho do baço semelhante ao observado no terceiro dia de infecção. Esses dados corroboram com o aumento dos folículos linfoides no baço dos dois grupos observados nas análises histopatológicas. Além desse aumento, foram encontrados elevados números de LPF no baço dos dois grupos no terceiro dia de infecção, sendo significativamente menores no sexto dia em ambos os grupos. Apesar disso, tanto no terceiro quanto no sexto dias, observamos uma maior quantidade de bactérias nos animais deficientes, quando comparados com os camundongos selvagens. Esse fato pode ser explicado pela falha na eliminação bacteriana nos órgãos-alvo causada pela deficiência de C3 e de seus fragmentos, assim como foi observado no fígado.

Posteriormente avaliamos por citometria de fluxo a proporção das sub-populações leucocitárias (monócitos/macrófagos, neutrófilos, linfócitos B, T $CD4^+$ e T $CD8^+$) no baço para observar se o comportamento de cada tipo celular difere durante a infecção dos animais selvagens e deficientes de C3 e obtermos um resultado mais conclusivo, uma vez que tais células são importantes para a resposta inflamatória eficiente contra patógenos. Os linfócitos B são conhecidos pela produção de anticorpos específicos e, além disso, essas células são capazes de interagir com o fragmento C3d, gerado pela clivagem da proteína C3, por meio do CR2 e aumentar a síntese desses anticorpos (Fischer et al., 1996). Nosso grupo mostrou que a deficiência da proteína C5 causou a diminuição de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ no sangue (Castro, 2014), e o papel da proteína C3 na expansão clonal desses linfócitos em infecções bacterianas já foi estudado (Nakayama et al., 2009), mostrando a importância do SC na resposta inflamatória. Além disso, Stefos et al. (2005) observaram a diminuição do número de neutrófilos durante a leptospirose em humanos.

Nossos resultados mostraram que os camundongos B6.$C3^{-/-}$ não apresentam alteração no número de células $CD11b^+$ encontrados no baço, enquanto os camundongos selvagens apresentam um número elevado dessas células no terceiro dia de infecção. O número de células $CD11b^+$ no baço cai para níveis basais no sexto dia de infecção, possivelmente pela migração dessas células do baço para outros órgãos afetados pela leptospirose nesse período. Como anteriormente discutido, a ausência da proteína acarreta falha de mecanismos como a fagocitose, processo realizado por células como os macrófagos, monócitos, PMNs e DCs, as quais expressam a molécula $CD11b^+$ em sua superfície, aumentando essa expressão em processos infecciosos (Elangbam et al., 1997). Dessa forma, podemos concluir que a menor presença dessas células $CD11b^+$ pode causar uma demora na eliminação da LPF nesses camundongos.

Os neutrófilos são importantes fagócitos e participam da resposta imunológica contra as leptospiras, eliminando essas bactérias pela produção de peróxido de hidrogênio (Murgia et al., 2002). Neutrófilos também são importantes na eliminação de leptospiras através da produção de *neutrophill extracellular traps* (NETs) e, além disso, a deleção de neutrófilos tem como consequência uma maior capacidade de disseminação sistêmica das leptospiras patogênicas (Scharrig et al., 2015). Neste projeto foi possível observar que o número de neutrófilos no baço dos camundongos selvagens e deficientes de C3 durante a infecção por leptospiras apresentou um perfil totalmente distinto. Observamos durante o período de infecção, um aumento gradativo dessas células nos camundongos selvagens e uma

diminuição nos camundongos deficientes, sendo que, ao sexto dia, a quantidade dessas células polimorfonucleares foi significativamente menor nos camundongos deficientes quando comparados com os animais selvagens.

Além de participar integralmente da resposta imune inata, o SC também possui papel importante para desencadear a resposta adaptativa, como a ativação de linfócitos B e produção de anticorpos. Nossos resultados apresentaram uma importante queda na expansão de linfócitos B nos camundongos deficientes tanto no terceiro quanto no sexto dia de infecção, quando comparados com os camundongos selvagens. A resposta humoral é importante para a proteção de camundongos infectados com leptospiras (Jost et al., 1986) e a proliferação de linfócitos B está relacionada diretamente com a proteína C3, onde o fragmento C3d, gerado pela clivagem dessa proteína, ligado covalentemente ao antígeno é interage com o CR2 presente nos linfócitos B e células dendríticas foliculares, acarretando aumento da produção de anticorpos específicos (Fischer et al., 1996). Esses dados corroboram com os resultados encontrados em nosso laboratório, onde foi possível observar uma falha da resposta de anticorpos nos camundongos deficientes até 21 dias pós-infecção, onde podemos concluir que a deficiência da proteína C3 causa uma falha na expansão de linfócitos B e consequentemente uma falha na produção de anticorpos específicos contra as leptospiras (Yamashita, 2017).

Além das funções já conhecidas, existem evidências de que o SC, principalmente a molécula C3, possui função na regulação da resposta de linfócitos T. Experimentos envolvendo animais deficientes para C3 e bactérias intracelulares, como a *Listeria monocytogenes*, que necessita de uma resposta imune celular efetiva para o controle da infecção no hospedeiro, mostraram que a proteína C3 possui papel importante para que haja resposta eficiente de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$. C3 mostrou-se importante na expansão clonal dessas células antígeno-específicos contra a *Listeria monocytogenes*, provavelmente pela deficiência do fragmento C3a, que possui receptores em linfócitos T e células dendríticas que auxiliam o recrutamento das mesmas para órgãos linfoides, e da molécula C3b que se liga com a proteína MCP (CD46), presente em células T, causando proliferação destas células (Nakayama et al., 2009). Outros modelos experimentais de infecção também demonstraram o importante papel da proteína C3 na resposta imune celular efetiva, como modelos virais. O vírus da coriomeningite linfocitária necessita de uma resposta eficiente de células T para o controle da infecção no hospedeiro. Tal resposta necessita da proteína C3 para o *priming* e a expansão celular de linfócitos específicos, sendo que, uma vez ausente do camundongo, a proteína deixa de cumprir seu papel na infecção e ocorre uma diminuição na população de

linfócitos T $CD8^+$. Essa ligação entre a proteína C3 e linfócitos T pode ocorrer de algumas formas, uma delas é pela interação direta entre eles modulando a apresentação antigênica ou pela interação com o CD46, que irá aumentar a resposta das células T $CD8^+$ e, uma vez deletada a proteína C3, a expansão e resposta celular será prejudicada (Suresh et al., 2003). A regulação da resposta T pelo SC também se mostrou importante durante a infecção pelo vírus influenza, uma vez que a remoção desse vírus também foi prejudicada nos animais que não possuíam a proteína C3, possivelmente pela diminuição dos linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$. A apresentação de antígenos pelas APCs para os linfócitos depende do encontro dessas células nos órgãos linfoides secundários e a falta do C3 causa uma diminuição do transporte dos antígenos para esses órgãos, prejudicando a resposta inicial dos linfócitos T. A proteína em questão também tem influência na ação desses linfócitos e a falta de C3 acomete a produção de anticorpos IgG, importantes para resolução eficaz dessa infecção (Kopf et al., 2002). Esses resultados corroboram com os dados encontrados neste projeto, quando observamos que os camundongos deficientes de C3 apresentaram quantidades menores de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ esplênicos no terceiro e sexto dia de infecção.

Complicações pulmonares são comumente encontradas durante a leptospirose, sendo, muitas vezes, a causa de óbito entre os pacientes infectados (Marotto et al., 1999; Divate et al., 2002; Segura et al., 2005). Entretanto, lesões pulmonares não foram observadas nos nossos camundongos infectados com LPF tanto deficientes de C3 quanto os selvagens, diferentemente do observado no modelo deficiente de C5, onde a falta da proteína C5 nos camundongos causou espessamento do septo alveolar focal ou disseminado, além de ter sido observado um caso de hemorragia pulmonar entre esses animais (Castro, 2014). Ao quantificarmos a LPF no pulmão dos animais, encontramos quantidades baixas de LPF no órgão durante o terceiro e sexto dias de infecção nos animais deficientes de C3 e nos animais selvagens só detectamos estas bactérias no terceiro dia, indicando que a proteína C3 é importante para a eliminação precoce da LPF no pulmão. Porém, a presença da bactéria nesse órgão não foi suficiente para causar alterações histopatológicas dependentes da LPF em nosso modelo experimental.

Ao analisarmos as lâminas histopatológicas do rim dos animais, ao contrário do que esperávamos, não observamos lesões até o sexto dia de infecção. A falta de lesões pode ser explicada pelo baixo número de leptospiras presentes no rim dos animais deficientes de C3 e também nos animais selvagens durante toda a infecção. O rim é um órgão importante na infecção por leptospiras patogênicas, já que é o local onde a mesma consegue colonizar e

permanecer em seus hospedeiros de manutenção durante longos períodos (Rao, 2006; Sehgal, 2006). Semelhante resultado das análises histopatológicas já havia sido observado nos animais deficientes de C5, que também não apresentaram lesões renais (Castro, 2014), sendo possível que o sorovar utilizado em nosso laboratório precise de um tempo maior para colonizar esse órgão. Baseado nessa hipótese, analisamos cortes histológicos do rim dos camundongos infectados com LPF por quinze dias. Com esse tempo de infecção, foi possível encontrar um processo inflamatório, indicando uma nefrite intersticial exclusivamente no rim dos camundongos deficientes.

As leptospiras são bactérias que colonizam os túbulos renais dos seus hospedeiros, são eliminadas pela urina e podem ser encontradas no ambiente por longos períodos. A partir dessa informação, quantificamos o número de LPF na urina dos camundongos deficientes e selvagens infectados com três e seis dias. Trabalhos anteriores demonstraram em animais C3H/HeJ que as leptospiras possuem um ciclo bifásico no hospedeiro, aparecendo inicialmente na corrente sanguínea dos animais e, após o sexto dia, começam a ser eliminadas na urina (Richer et al., 2015). Entretanto, apesar da excreção pela urina ocorrer a partir do sexto dia de infecção, as leptospiras são capazes de colonizar o rim desses camundongos a partir do terceiro dia de infecção (da Silva et al., 2012). Nossos resultados de quantificação de LFP nos camundongos deficientes corroboram com os dados citados acima, os quais foram realizados em camundongos da linhagem C3H/HeJ, os quais são mais susceptíveis a infecção por leptospiras patogênicas. Em nossas análises encontramos uma quantidade maior de DNA de LPF no terceiro dia de infecção e uma quantidade menor no sexto dia. Apesar dos resultados observados nos camundongos deficientes de C3, os camundongos selvagens apresentaram quantidades semelhantes de LPF na urina no terceiro e sexto dias de infecção, apesar de apresentarem um número maior de LPF no rim ao terceiro dia de infecção. Devido à falha da resposta imune em eliminar a bactéria dos órgãos nos primeiros dias de infecção, as leptospiras podem ser capazes de sobreviver e replicar nos camundongos deficientes, sendo encontradas em maior quantidade na urina desses animais no sexto dia de infecção. Nossos dados sugerem que a LPF é capaz de colonizar esse órgão desses animais, porém são eliminadas pela urina em maior quantidade quando encontramos uma menor quantidade da bactéria no rim.

7 Resumo dos resultados e conclusão

O SC murino é importante para a eliminação de leptospiras não patogênicas mas a ausência de C3 não foi suficiente para causar óbito ou alterar o peso corporal dos camundongos infectados.

A infecção de 1,5 x 10^8 LPFs causou:

1. Aumento do número de leucócitos periféricos circulantes ocorreu no terceiro dia de infecção no grupo B6.C3$^{+/+}$ e não no grupo B6.C3$^{-/-}$, o qual só apresentou um número significativamente maior ao sexto dia de infecção;
2. Ausência da proteína C3 causou falha na remoção bacteriana dos órgãos-alvo nos primeiros dias de infecção;
3. Os camundongos B6.C3$^{-/-}$ excretaram uma quantidade maior de LPF na urina no sexto dia de infecção, quando comparados com os camundongos B6.C3$^{+/+}$;
4. A lesão hepática dos animais B6.C3$^{+/+}$ foi maior do que a observada nos animais B6.C3$^{-/-}$, sendo que o primeiro grupo apresentou mais células necróticas e mitóticas, mostrando que C3 é importante para uma resposta inflamatória inicial efetiva e consequentemente para a eliminação da bactéria;
5. O desenvolvimento de esplenomegalia foi distinto entre os grupos B6.C3$^{+/+}$ e B6.C3$^{-/-}$, onde observamos que ao sexto dia os camundongos deficientes ainda apresentam o baço em tamanho maior quando comparados com os camundongos selvagens;
6. A expansão de células do sistema imune no baço ocorreu distintamente entre as duas linhagens:
    - Os camundongos B6.C3$^{-/-}$ não aumentaram o número de células CD11b^{+} esplênicas durante toda a infecção.
    - O perfil da resposta de neutrófilos esplênicos mostrou um aumento nos camundongos B6.C3$^{+/+}$ enquanto os camundongos B6.C3$^{-/-}$ apresentaram um perfil distinto de proliferação destas células.
    - A expansão de linfócitos B esplênicos foi significativamente menor nos camundongos B6.C3$^{-/-}$, quando comparados com os camundongos B6.C3$^{+/+}$ durante todo período de infecção.

- Os camundongos B6.C3$^{-/-}$ apresentaram quantidades menores de linfócitos T CD4^{+} no terceiro e sexto dias de infecção, quando comparados com os camundongos B6.C3$^{+/+}$.
- A expansão de linfócitos T CD8^{+} apresentou um perfil diferente entre as linhagens, onde os camundongos B6.C3$^{-/-}$ apresentaram números inferiores dessas células;

7. Os camundongos não apresentaram lesões renais no terceiro e sexto dia de infecção e devido a isso, investigamos se em uma fase mais tarde essas lesões seriam visíveis. Encontramos nefrite intersticial apenas nos camundongos deficientes de C3.

Estudos como o nosso são necessários para melhor entender a patogênese da leptospirose para que seja possível o desenvolvimento de métodos terapêuticos mais eficientes. Nossos resultados são capazes de mostrar que a proteína C3 do SC murino é importante para a eliminação da LPF nos primeiros dias de infecção e, consequentemente uma resolução mais rápida da infecção por meio de processos inflamatórios que são potencializados pela presença dos fragmentos da proteína C3, como a opsonização e posterior fagocitose, e o recrutamento de células e mediadores inflamatórios. A ausência de C3 causou uma falha nos primeiros dias da resposta inflamatória em nosso modelo animal e na eliminação da LPF e pode estar, possivelmente, causando o aparecimento de lesões renais em uma fase mais tardia da infecção.

As lesões crônicas observadas nos rins dos camundongos deficientes de C3, nos levam a questionar como o SC estaria atuando durante a fase mais tardia na resposta imunológica adaptativa e levantando novas questões sobre o papel da proteína C3 e seus fragmentos na regulação das células envolvidas durante a resposta, além da sua importância durante processos infecciosos crônicos. Novos experimentos utilizando camundongos deficientes de C3 infectados com LPF são necessários para avaliar em tempos longos de inoculação como esses animais respondem à infecção crônica em comparação com os controles selvagens, abrindo novos caminhos para o estudo do SC na resposta contra leptospiras patogênicas.

Referências*

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, Moctezuma AP. Leptospira and leptospirosis. 2010;140(3-4):287-96.

Ahmed N, Devi SM, Valverde MA, Vijayachari P, Macang'u RS et al. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic Leptospira species. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2006;5:28.

Amamura TA. Clivagem de proteínas do complexo de ataque à membrana do sistema complemento humano por proteases de leptospiras patogênicas. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Arean VM. The pathologic anatomy and pathogenesis o fatal human leptospirosis (Weil's disease). 1962;40(4):393-423.

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 PAE, Vasconcellos SA, Morais ZM, Gonçales AP et al. Immune evasion of Leptospira species by acquisition of human Complement regulator C4BP. Infec Immun. 2009;77(3):1137-43.

Barbosa AS, Monaris D, Silva LB, Morais ZM, Vasconcellos SA. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of Leptospira spp. that binds the human Complement regulator C4BP. Infec Immun. 2010;78(7):3207-16.

Barnum S.R. C4a: An Anaphylatoxin in name only. Innate Immunity. 2015;7:333–9.

Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infect Dis. 2003;3(12):757-71.

Bourhy P, Collet L, Brisse S, Picardeau M. Leptospira mayottensis sp. nov., a pathogenic species of the genus Leptospira isolated from humans. J Syst Evol Microbiol. 2014;64:4061-7.

Breda LCD, Hsieh CL, Castiblanco-Valencia MM, Silva LB, Barbosa AS et al. Fine mapping of the interaction between C4b binding protein and outer membrane proteins LigA and LigB of pathogenic Leptospira interrogans. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(10):1-18.

Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for Leptospira alexanderi sp. nov. and four new Leptospira genomospecies. J Syst Bacteriol. 1999;49:839-58.

Brito T, Prado MJ, Negreiros VA, Nicastri AL, Sakata EE et al. Detection of leptospiral antigen (L. interrogans serovar copenhageni serogroup Icteterohemorragiae) by immunoelectron microscopy in the liver and kidney of experimentally infected guinea-pig. Int J Exp Pathol. 1992;73(5):633-42.

*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

Bruijn MHL, Fey GH. Human complement component C3: cDNA coding sequence and derived primary structure. Proc Natl Acad Sci. 1985;82:708-12.

Bubeck D. The making of a macromolecular machine: assembly of the membrane attack complex. Biochemistry. 2014;53:1908–15.

Buchner H. Uber die natur der bakterientoden substanz in blutserum. Zentrakblatt für Bakteriologie. 1889;6:561.

Carroll MC, Isenman DE. Regulation of humoral immunity by Complement. Immunity. 2012;37:199-207.

Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, Pagotto AH, Serrano SMT, Abreu PAE et al. Plasmin cleaves fibrinogen and the human complement proteins C3b and C5 in the presence of Leptospira interrogans proteins: A new role of LigA and LigB in invasion and complement immune evasion. Immunobiol. 2016;221:679-89.

Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, Silva LB, Monaris D, Abreu PAE et al. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human Complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. J Infect Dis. 2012;205:995–1004.

Castro IA. 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.

Centers for Disease Control and Prevention. Leptospirosis. 2011.

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.

Choy LN, Rosen BS, Spiegelman BM. Adipsin and an endogenous pathway of Complement from adipose cells. J Biol Chem. 1992;267:12736-41.

Chikeka I, Dumler JS. Neglected bacterial zoonoses. Clin Microbiol Infect. 2015;21:404-15.

Chirathaworn C, Kongpan S. Immune responses to Leptospira infection: roles as biomarkers for disease severity. Braz J Infect Dis. 2014;18:77-81.

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

Cruvinel WM, Júnior DM, Araújo JAP, Catelan TT, Souza AWS et al. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. Rev Bras Reumatol. 2010;50(4):434-61.

Cunnion KM, Benjamin DK, Hester CG, Frank MM. Role of Complement receptors 1 and 2 (CD35 and CD21), C3, C4 and C5 in survival by mice of Staphylococcus aureus bacteremia. 2004;143(6):358-65.

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.

da Silva JB, Carvalho E, Cvarrubias AE, Ching AT, Mattaraia VG et al. Induction of TNF-alfa and CXCL-2 mRNAs in different organs of mice infected with pathogenic Leptospira. Microb Pathog. 2012;52(4):206-16.

da Silva JB, Ramos TM, de Franco M et al. Chemokines expression during Leptospira interrogans serovar Copenhageni infection in resistant BALB⁄c and susceptible C3H⁄HeJ mice. Microb Pathog. 2009;47:87–93.

da Silva WD, Eisele JW, Lepow IH. Complement as a mediator of inflammation. 3. Purification of the activity with anaphylotoxin properties generated by interaction of the first four components of complement and its identification as a cleavage product of C'3. J Exp Med. 1967;126(6):1027-48.

Dierich MP, Erdei A, Huemer H, Pitzer A, Stauder R et al. Involvement of Complement in B-cell, T-cell and monocyte/macrophage activation. Immunol Lett. 1987;14(3):235-42.

Dinasarapu AR, Chandrasekhar A, Sahu A, Subramaniam S. Complement C3. USCD Molecule Pages. 2012;1(2):34-48.

Divate SA, Chaturvedi R, Jadhay NN, Vaideeswar P. Leptospirosis associated with diffuse alveolar haemorrhage. J Postgrad Med. 2002;48:131-2.

Dobó J, Szakács D, Oroszlán G, Kortvely E, Kiss B et al. MASP-3 is the exclusive profactor D activator in resting blood: the lectin and the alternative complement pathways are fundamentally linked. Nature Scientific Reports. 2016;6:31877.

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

Elangbam CS, Qualls Jr CW, Dahlgren RR. Cell adhesion molecules – update. Vet Pathol. 1997;34:61-73.

Esser AF. Big MAC attack: complement proteins cause leaky patches. Immunol Today. 1991;12(9):316-9.

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

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

Faine S, Stallman ND. Amended descriptions of the genus Leptospira Noguchi 1917 and the species L. interrogans (Stimson 1907) Wenyon 1926 and L. biflexa (Wolbach and Binger 1914) Noguchi 1918. J Syst Bacteriol. 1982;32:461-3.

Faria MT, Calderwood MS, Athanazio DA, McBride AJA, Hartskeel RA et al. Carriage of Leptospira interrogans among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. Acta Trop. 2008;108(1):1-5.

Fearon DT. Regulation of the amplification C3 convertase of human complement by an inhibitory protein isolated from human erythrocyte membrane. Proc Natl Acad Sci USA. 1979;76(11):5867-71.

Fearon DT, Austen F. Properdin: Binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. J Exp Med. 1975;142:856-63.

Fearon DT, Klickstein LB, Wong WW, Wilson JG, Moore Jr FD et al. Immunoregulatory functions of Complement: structural and functional studies of complement receptor type I (CR1;CD35) and type 2 (CR2;CD21). Prog Clin Biol Res. 1989;297:211-20.

Ferrer MF, Scarrig E, Alberdi L, Cedola M, Prete G et al. Decay-accelerating factor 1 deficiency exacerbate Leptospiral-induced murine chronic nephritis and renal fibrosis. PLoS Neglec Trop Dis. 2014;9(7):e102860.

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.

Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, Day DE, Zetoune FS et al. Functions of the Complement components C3 and C5 during sepsis. FASEB J. 2008;22(10):3483-90.

Fraga TR, Carvalho E, Isaac L, Barbosa A S. Leptospira and leptospirosis. In: Tang YW, Sussman M, Liu D, Poxton, Schwartzman J (Eds.). Molecular Medical Microbiology. 2 ed. London: Elsevier,2014a. v. 3, p.2145.

Fraga TR, Courrol DS, Castiblanco-Valencia MM, Hirata IY, Vasconcellos SA et al. Immune evasion by pathogenic Leptospira strains: the secretion of proteases that drectly cleave Complement proteins. J Infect Dis. 2014b;209:876–86.

Francis K, van Beek J, Canova C, Neal JW, Gasque P. Innate immunity and brain inflammation: the key role of complement. Exp Rev Mol Med. 2003;5:1-19.

Gorski JP, Hugli TE, Mueller-Eberhard HJ. C4a: The third anaphylatoxin of the human Complement system. Proc Natl Acad Sci. 1979;76(10):5299-302.

Götze O. The Alternative pathway of activation. Em: The complement system. Rother K, Till GO, Berlin: Springer; 1986. 154 p.

Gigli I, Fujita T, Nussenzweig V. Modulation of the classical pathway C3 convertase by plasma proteins C4 binding protein and C3b inactivator. Proc Natl Acd Sci USA. 1979;6(12):6596-600.

Guerra MA. Leptospirosis: public health perspectives. Biologicals. 2013;41(5):295-7.

Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis WA. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. Clin Microbiol Infect. 2011;17:494-501.

Holmskov U, Malhotra R, Sim RB, Jensenius JC. Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. Immunol Today. 1994;15(2):67-74.

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

Jost BH, Adler B, Vihn T, Faine S. A monoclonal antibody reacting with a determinant on leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pigs against leptospirosis. J. Med. Microbiol. 1986;22:269-75.

Kaplan MH, Volanakis JE. Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with the choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin. J Immunol. 1974;112:2135–47.

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.

Kopf M, Abel B, Gallimore A, Carroll M, Bachmann MF. Complement component C3 promotes T-cell priming and lung migration to control acute influenza virus infection. Nature Med. 2002;8(4):373-8.

Kozono H, Kinoshita T, Kim YU, Takata-Kozono Y, Tsunawa S et al. Localization of the covalent C3b binding site on C4b within the Complement classical pathway C5 convertase, C4b2a3b. J Biol Chem. 1990;265:14444-9.

Lacroix-Lamande S, d'Andon MF, Michel E, Ratet G, Philpott DJ, Girardin SE, et al. Downregulation of the Na/K-ATPase pump by leptospiral glycolipoprotein activates the NLRP3 inflammasome. J Immunol. 2012;188(6):2805-14.

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

Leendertse M, Willems RJL, Flierman R, de Vos AF, Bontem JM et al. The Complement System Facilitates Clearance of Enterococcus faecium during Murine Peritonitis. J Infect Dis. 2010;201:544–52.

Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Steigerwalt AG. Leptospira broomii sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. J Syst Evol Microbiol. 2006;56:671-3.

Loos M. The Complement System: activation and control. Curr Top Microbiol Immunol. 1985;121:7-18.

Macedo AC, Isaac L. Systemic Lupus Erythe,atpsus and Deficiencies of Early Components of the Complement Classical Pathway. Front Immunol. 2016;7:55.

Marotto PCF, Nascimento CMR, Eluf-Neto J, Marotto MS, Andrade L et al. Acute lung injury in leptospirosis: clinical and laboratory features, outcome, and factors associated with mortality. Clin Infect Dis. 1999;29:1561-3.

Martinez SA, Hostutler RA. Distal renal tubular acidosis associated with concurrent leptospirosis in a dog. J Am Anim Hosp Assoc. 2014;50(3):203-8.

Matthews KW, Mueller-Ortiz SL, Wetsel RA. Carboxypeptidase N: a pleiotropic regulator of inflammation. Mol Immunol. 2004;40:785–93.

Matthias MA, Ricaldi JN, Cespedes M, Diaz MM, Galloway RL et al. Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique Leptospira associated with a Rattus species reservoir in the peruvian Amazon. PLoS NeglecTropl Dis. 2008;2:e213.

Matsui M, Rouleau V, Bruyere-Ostells L, Goarant C. Gene expression. Profiles of immune mediators and histopatgological fingins in animais models of leprospirosis: comparisonbetween susceptible hamster ans resistant mice. Infec Immun. 2011;79(11):4480-92.

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.

Medof ME, Kinoshita T, Nussenzweig V. Inhibition of Complement activation on the surface of cells after incorporation of decay-accelerating factor (DAF) into their membranes. J Exp Med. 1984;160(5):1558-78.

Meri S, Morgan BP, Davies A, Daniels RH, Olavesen MG et al. Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. Immunology. 1990;71(1):1-9.

Meri T, Murgia R, Stefanel P, Meri S, Cinco M. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires. Microb Pathog. 2005;39:139-47.

Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System part II: role in immunity. Front Immunol. 2015;6:257.

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

Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. Nat Rev Microbiol. 2005;3(1):36-46.

Miraglia F, Matsuo M, Morais ZM, Dellagostin OA, Seixas FK et al. Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of Leptospira interrogans serovar Copenhageni isolates from Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013;77(3):195-9.

Mold C, Gewurz H, Du Clos TW. Regulation of complement activation by C-reactive protein. Immunopharmacology. 1999;42:23–30.

Mueller-Ortiz SL, Drouin SM, Wetsel RA. The alternative activation pathway and Complement component C3 are critical for a protective immune response against Pseudomonas aeruginosa in a murine model of pneumonia. Infect Immun. 2004;72(5):2899-906.

Mueller-Ortiz SL, Hollmann TJ, Haviland DL, Wetsel RA. Ablation of the complement C3a anaphylotoxin receptor causes enhanced killing of Pseudomonas aeruginosa in a mouse model of pneumonia. Am J Phys Lung Cell Mol Physiol. 2006;291:157-65.

Muensoongnoen J, Phulsuksombati D, Parichatikanond P, Sangian N, Pilakasiri C et al. A histopathological study of hearts and spleens of hamsters (Mesocricetus auratus) infected with Leptospira interrogans, serovar pyrogenes. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2006;37(4):720-8.

Murgia R, Garcia R, Cinco M. Leptospires are killed in vitro by both oxygen-dependent and -independent reactions. Infect Immun. 2002;70(12):7172-5.

Nagasawa S, Stroud RM. Cleavage of C2 by C1s into the antigenically distinct fragments C2a and C2b: demonstration of binding of C2a to C4b. Proceed Natl Acad Sci USA. 1977;74:2998-3001.

Nahori M, Fournié-Amazouz E, Que-Gewirth NS, Balloy V, Chignard M et al. Differential TLR recognition of Lepstospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. J Immunol. 2005;175:6022-31.

Nakayama Y, Kim S, Kim EH, Lambris JD, Sandor M, Suresh M. C3 promotes expansion of $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells in a Listeria monocytogenes infection. J Immunol. 2009;835(1):2921-31.

Nangaku M. Complement regulatory proteins in glomerular diseases. Kidney International. 1998;54:1419-28.

Nesargikar PN, Spiller B, Chavez R. The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors. Europ J Microbiol Immunol. 2012;103-11.

Noris M, Remuzzi G. Overview of complement activation and regulation. Semin Nephrol. 2013;33(6):479-82.

Panguburn MK. Differences between the binding sites of the complement regulatory proteins DAF, CR1 and factor H on C3 convertases. J Immunol. 1986;136(6):2216-21.

Pekkarinen PT, Vaali K, Junnikkala S, Rossi L.H, Tuovinen H et al. A functional complement system is required for normal T helper cell differentiation. Immunobiol. 2011;216:737–43.

Pereira MM, Andrade J, Marchevsky RS, Santos RR. Morphological characterization of lung and kidney lesions in C3H/HeJ mice infected with Leptospira interrogans serovar icterohaemorrhagiae:

defect of CD4+ and CD8+ T-cells are prognosticators of the disease progression. Exp Toxicol Pathol. 1998;50(3):191-8.

Perolat P, Chappel RJ, Adler B, Baranton G, Bulach D.M et al. Leptospira fainei sp. nov., isolated from pigs in Australia. J Syst Bacteriol. 1998;48:851-8.

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

Pillemer L, Blum L, Lepow IH, Ross OA, Todd EW, Wardlaw AC. The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. Science. 1954;120:279–85.

Pischke S, Ehmer U, Schedel I, Gratz WF, Wedemeyer H et al. Of guinea pigs and men – an unusual case of jaundice. Z Gastroenterol. 2010;48(1):33-7.

Plank R, Dean D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of Leptospira spp. in humans. Microb Infect. 2000;2(10):1265-76.

Podack ER, Kolb WP, Müeller-Eberhard HJ. The C5b-9 complex subunit composition of the classical and alternative pathway-generated complex. J Immunol. 1976;116(5):1431-4.

Prodeus AP, Zhou X, Maurer M, Galli SJ, Carroll MC. Impaired mast cell-dependent natural immunity in complement C3-deficient mice. Nature. 1997;390:172-5.

Ramadass P, Jarvis BDW, Corner RJ, Penny D, Marshall RB. Genetic characterization of pathogenic Leptospira species by DNA hybridization. J Syst Bacteriol. 1992;42:215-9.

Rao M. Preventive measures for leptospirosis: Rodent control. Ind J Med Microbiol. 2006;24:325-8.

Reid, KB. Activation and control of the Complement System. Essays Biochem. 1986;22:27-68.

Richer L, Potula H, Melo R, Vieira A, Gomes-Solecki. Mouse model for sublethal Leptospira interrogans Infection. Infect Immun. 2015;83(12):4693-9.

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

Romero EC, Yasuda PH. Molecular characterization of Leptospira sp. strains isolated from human subjects in São Paulo, Brazil using a polymerase chain reaction-based assay: a public health tool. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101(4):373-8.

Roumenina LT, Sène D, Radanova M, Blouin J, Halbwachs-Mecarelli L et al. Functional Complement C1q abnormality leads to impaired immune complexes and apoptotic cell clearance. J Immunol. 2011;1950(187):4369–73.

Rupprecht TA, Angele B, Klein M, Heesemann J, Pfister H et al. Complement C1q and C3 are critical for the innate immune response to Streptococuus pneumoniae in the central nervous system. J Immunol. 2007;178:1861-9.

Sahu A, Lambris JD. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. Immunol Rev. 2001;180:35-48.

Saito M, Villanueva SY, Kawamura Y, Iida K, Tomida J et al. Leptospira idonii sp. nov., isolated from environmental water. J Syst Evol Microbiol. 2013;63:2457-62.

Santos CS, Macedo JO, Bandeira M, Chagas-Junior AD, McBride AJ et al. Different outcomes of experimental leptospiral infection in mouse strains with distinct genotypes. J Med Microbiol. 2010:59:1101:1106.

Scharrig E, Carestia A, Ferrer MF, Cedola M, Pretre G, Drut R, et al. Neutrophil extracellular traps are involved in the innate immune response to infection with Leptospira. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(7):e0003927.

Schifferli JA, Ng YC, Petters DK. The role of complement and its receptors in the elimination of immune complexes. N Engl J Med. 1986;315(8):448-95.

Schifferli JA, Taylor RP. Physiological and pathological aspects of circulating immune complexes. Kidney Int. 1989;35(4):993-1003.

Segura ER, Ganoza CA, Campos K, Ricaldi JN, Torres S et al. Clinical spectrum of pulmonary involvement in Leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of Leptospiral Burden. Clin Infect Dis. 2005;40:343-51.

Sehgal S.C. Epidemiological patterns of leptospirosis. Ind J Med Microbiol. 2006;24:310-1.

Seya T, Turner JR, Atkinson JP. Purification and characterization of a membrane protein (gp45-70) that is cofactor for cleavage of C3b and C4b. J Exp Med. 1986;163(4):837-55.

Sjöberg AP, Trouw LA, Blom AM. Complement activation and inhibition: a delicate balance. Trends Immunol. 2009;30(2):83-90.

Slack AT, Kalambaheti T, Symonds ML, Dohnt MF, Galloway RL et al. Leptospira wolffii sp. nov., isolated from a human with suspected leptospirosis in Thailand. J Syst Evol Microbiol. 2008;58:2305-8.

Slack AT, Khairani-Bejo S, Symonds ML, Dohnt MF, Galloway RL et al. Leptospira kmetyi sp. nov., isolated from an environmental source in Malaysia. J Syst Evol Microbiol. 2009;59:705-8.

Smythe L, Adler B, Hartskeerl RA, Galloway RL, Turenne CY, Levett PN. Classification of Leptospira genomospecies 1, 3, 4 and 5 as Leptospira alstonii sp. nov., Leptospira vanthielii sp. nov., Leptospira terpstrae sp. nov. and Leptospira yanagawae sp. nov., respectively. J Syst Evol Microbiol. 2013;63:1859-62.

Stefos A, Georgiadou SP, Gioti C, Loukopoulos A, Ioanno M et al. Leptospirosis and pancytopenia : two case reports and review of the literature. J Infect. 2005;51:1131-43.

Suresh M, Molina H, Salvato MS, Mastellos D, Lambris JD, Sandor M. Complement component 2 is required for optimal expansion of CD8 T Cells during a systemic viral infection. J Immunol. 2003;170:788-94.

Takata Y, Kinoshita T, Kozono H, Takeda J. Hong K, Inoue K. Covalent association of C3b with C4b within C5 convertase of the classical complement pathway. J Exp Med. 1987;165:1494-507.

Tandon N, Morgan BP, Wetman AP. Expression and function of membrane attack complex inhibitory proteins on thyroid follicular cells. Immunol. 1992;75(2):372-7.

Tegla CA, Cudrici C, Patel S, Trippe R III, Rus V et al. Membrane attack by complement: the assembly and biology of terminal complement complexes. Immunol Res. 2011;51(1):45-60.

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.

Till GO. Chemotactic factor. In The Complement System. Rother K, Till GO. Berlin: ed. Springer; 1986. 354p.

Tschopp J, Podack ER. Membranolysis by the ninth component of human complement. Biochem Biophys Res Commun. 1981;100(3):1409-14.

Vieira ML, Alvarez-Flores MP, Kirchgatter K, Romero EC, Alves IJ, de Morais ZM, Vasconcellos SA, et al. Interaction of Leptospira interrogans with human proteolytic systems enhances dissemination through endothelial cells and protease levels. Infect Immun. 2013;81(5):1764-74.

Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AN. Leptospirosis: an emerging global public health problem. J Biosci. 2008;33(4):557-69.

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

Volanakis JE, Kaplan MH. Specificity of C-reactive protein for choline phosphate residues of pneumococcal C-polysaccharide. Proc Soc Exp Biol Med. 1971;136:612-4.

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

Wang H, Wu Y, Ojcius DM, Yang F, Zhang C et al. Leptospiral hemolysins induce proinflammatory cytokines through Toll-Like Receptor 2-and 4-mediated JNK and NF-kB signaling pathways. PLoS One. 2008;7(8):e42266.

Weil, A. Ueber eine eigentümliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende, acute Infectionskrankheit. Dtsch Arch Klin Med. 1886;39:209-32.

Wessels MR, Butko P, Minghe M, Warren HB, Lages AL, Carroll MC. Studies of group 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 USA. 1995;92:11490-4.

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

Yaakob Y, Rodrigues KF, John DV. Leptospirosis: recent incidents and available diagnostics – a review. 2015;70(6):351-5.

Yamashita DHS. Participação do componente central C3 do Sistema Complemento na atividade de macrófagos infectados por *Leptospira spp.* [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Yasuda PH, Steigerwalt AG, Sulzer KR, Kaufmann AF, Rogers F, Brenner DJ. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with proposals for seven new Leptospira species. J Syst Bacteriol. 1987;37:407-15.

Ziccardi RJ, Cooper RN. Active disassembly of the first complement component, C1 by C1 inactivator. J Immunol. 1979;123(2):788-92.

Ziccardi RJ. The first component of human complement (C1): activation and control. Spinger Semmin Immunopathol. 1983;6:213-30.

Zhang YX, Geng Y, Yang JW, Guo XK, Zhao GP. Cytotoxic activity and probable apoptotic effect of Sph2, a sphigomyelinase hemolysin from Leptospira interrogans strain Lai. BMB Rep 2012;41: 119-25.