

**TIAGO FRANCISCO DA SILVA**

**Avaliação da Fagocitose de Leptospira por Macrófagos de  
Camundongos Deficientes de C3 do Sistema Complemento**

São Paulo

2021

**TIAGO FRANCISCO DA SILVA**

**Avaliação da Fagocitose de *Leptospira* por Macrófagos de  
Camundongos Deficientes de C3 do Sistema Complemento**

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

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia

## **Avaliação da Fagocitose de *Leptospira* por Macrófagos de Camundongos Deficientes de C3 do Sistema Complemento**

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.

**Pós-graduando:** Tiago Francisco da Silva

**Orientadora:** Dr<sup>a</sup> Lourdes Isaac  
Laboratório de Complemento – Departamento de Imunologia

**Coorientadora:** Dr<sup>a</sup> Ana Paula Lepique  
Laboratório de Imunomodulação – Departamento de Imunologia  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Universidade de São Paulo

Versão original.

São Paulo

2021

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO  
(CIP)

Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de  
São Paulo

Da Silva, Tiago Francisco  
Avaliação da Fagocitose de Leptospira por Macrófagos de  
Camundongos Deficientes de C3 do Sistema Complemento  
/ Tiago Francisco da Silva –São Paulo, 2021.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lourde Isaac  
Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências  
Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração:  
Imunologia.

Linha de Pesquisa: Sistema Complemento.

Versão do título para o inglês: Evaluation of Leptospira Phagocytosis by C3  
Deficient Mice Macrophages of the Complement System.

1. Sistema Complemento; 2. Macrófagos; 3. C3; 4. Leptospira;  
5. Leptospirose.

I. Isaac, Lourdes, orientadora.  
II. Lepique, Ana Paula, coorientadora.  
III. Título

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Tiago Francisco da Silva

Título da Dissertação: **Avaliação da Fagocitose de Leptospira por Macrófagos de Camundongos Deficientes de C3 do Sistema Complemento**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lourde Isaac

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, 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: .....

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da fagocitose de *Leptospira* por macrófagos peritoneais de camundongos C3 deficientes", protocolada sob o CEUA nº 9308301118, sob a responsabilidade de **Lourdes Isaac** e equipe; *Tiago Francisco da Silva* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 28/02/2019.

We certify that the proposal "Evaluation of *Leptospira* phagocytosis by peritoneal macrophages of C3 deficient mice", utilizing 30 isogenics mice (30 males), 30 Genetically modified mice (GMO) (30 males), protocol number CEUA 9308301118, under the responsibility of **Lourdes Isaac** and team; *Tiago Francisco da Silva* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 02/28/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **40 meses**

Depto/Setor: **Imunologia**

Origem: **Biotério de matrizes de Camundongos do ICB**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

Idade ou peso: **4 a 8 semanas**

Linhagem: **C57 Black/6j**

**N amostral:** 30

Origem: **Biotério de matrizes de Camundongos do ICB**

Espécie: **Camundongo geneticamente modificado (OGM)**

sexo: **Machos**

Idade ou peso: **4 a 8 semanas**

Linhagem: **C57BL/6j C3 -/- (deficiente de C3)**

**N amostral:** 30

São Paulo, 29 de abril de 2021



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



Dr. Alexandre Ceroni  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Ilmo(a). Sr(a).  
Responsável: Lourdes Isaac  
Área: Imunologia

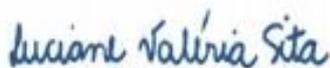
Título da proposta: "Avaliação da fagocitose de *Leptospira* por macrófagos peritoneais de camundongos C3 deficientes".

**Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais ICB** (ID 000328)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo), no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 26/agosto/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Com o objetivo de melhorar o projeto proposto, solicitamos a ampliação das metodologia com uso dos animais, agora empregando a retirada de células mesenquimais da medula para diferenciação em macrófagos. Juntamente a nova metodologia, para que todos os métodos sejam concluídas se faz necessário a ampliação do N amostral."

Comentário da CEUA: "A CEUA aprova a inclusão de 30 camundongos C57 Black/6j e 30 camundongos C57BL/6j C3 -/-, Machos, 4 a 8 semanas, provenientes do Biotério de matrizes de Camundongos do ICB no projeto CEUA Nº 9308301118. ".



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Ilmo(a). Sr(a).  
Responsável: Lourdes Isaac  
Área: Imunologia

Título da proposta: "Avaliação da fagocitose de *Leptospira* por macrófagos peritoneais de camundongos C3 deficientes".

**Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais ICB (ID 000635)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo), no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 07/fevereiro/2020) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Se faz necessária uma nova inclusão de camundongos para um maior N amostra, para que seja possível a realização dos ensaios *in vivo* propostos para a análise dos órgãos dos animais após infecção com *Leptospira*. Com isso, solicitamos a inclusão de 30 camundongos C57 Black 6 e 30 camundongos C57 Black 6 C3-/-, aumentando assim de 60 camundongos C57 Black 6 e 60 camundongos C57 Black 6 C3-/-, para 90 cada um. Os animais receberão uma dose de leptospira patogênica (10.000.000 de bactérias) na cavidade peritoneal, após 3, 6, 9 e 15 dias os mesmos serão sacrificados (Isoflurano - anestésico inalatório) para avaliação dos órgãos pós infecção. Camundongos são resistentes a leptospirose, com isso a infecção não causa morte aos camundongos."

Comentário da CEUA: "".



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



Dr. Alexandre Ceroni  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Complemento do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, em São Paulo, SP, Brasil. Recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Processo 2019/01435-7.

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

## **AGRADECIMENTOS**

Durante minha curta trajetória acadêmica até aqui, eu tive a sorte de ser orientado por mulheres incríveis, e não poderia deixar de agradecer a cada uma delas. Obrigado Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Karina Alves de Toledo que despertou em mim esse amor pela pesquisa durante minha iniciação científica. A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lourdes Isaac que me deu essa oportunidade e me ensinou muito, espero sempre ser lembrado e convidado para as maravilhosas confraternizações em sua casa. Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Paula Lepique obrigado pelas críticas construtivas e toda sua gentileza e disposição.

Agradeço a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Morais Freitas e ao Dr<sup>o</sup> Iuri Cordeiro Valadão por toda colaboração e gentileza, trabalhar com pessoas incríveis como você me ajudou a crescer e superar todas as dificuldades.

Agradeço a todos do laboratório de Complemento, Claudia Cunha, Elena Santiesteban, Leonardo Midon, Milena Carneiro e Thais Amamura por todo companheirismo e ajuda no dia a dia, vocês tornaram meus dias mais leves.

Não poderia deixar de agradecer a todas as amigadas que construí no ICB, obrigado Igor Santiago e Caio Bonfim, por me aceitarem em Florianópolis, certamente foi uma experiência que vou guardar comigo. Obrigado Lillian Nunes e Letícia Savério pelas conversas e grande ajuda nos momentos que eu mais precisa e principalmente obrigado Nayara Pereira, por ser essa pessoa incrível.

Agradeço a imortal Henrietta Lacks (Loretta Pleasant) e aos irreverentes Arron Swartz e Alexandra Elbakyan, por suas histórias e contribuição a ciência.

Agradeço a minha família pelo apoio, compreensão e incentivo, vocês são a demonstração que nem todos tem a oportunidade de demonstrar todo o seu potencial. Eu espero um dia fazer por alguém tudo o que vocês fazem por mim, e deixar as coisas um pouquinho diferentes, é só ir ao ICB e comparar o corpo docente com o de funcionários para perceber que nem todos tem as mesmas oportunidades.

A todas as pessoas que não foram citadas mas de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento do meu mestrado, meus sinceros agradecimentos.

Por fim, meu agradecimento e respeito a quem mais contribui para este trabalho, os animais que deram suas vidas para que essa pesquisa fosse realizada

De rima epidêmica à tese acadêmica  
Nome da década, cada passo, uma polêmica  
Dos cabeça de escravo até a militância anêmica  
Minha trajetória é real, a de vocês é cênica  
Cínica, cômica, quer alvoroço  
Precisa dos preto com grilhão no pescoço  
Pois o gueto só é real se tiver roendo osso  
Cadê os neguim que devia 'tá no fundo do poço?

**Inácio da Caatinga - Emicida**

## Resumo

Da Silva, Tiago Francisco. **Avaliação da Fagocitose de *Leptospira* por Macrófagos de Camundongos Deficientes de C3 do Sistema Complemento**. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências com ênfase em Imunologia). Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A leptospirose é uma zoonose importante para a saúde pública, causada por bactérias espiroquetas do gênero *Leptospira*. A resposta imune inata contra essas bactérias depende em grande parte da fagocitose e da ativação do Sistema Complemento. Este sistema é composto por diversas proteínas solúveis ou presentes na superfície celular, que atuam tanto na imunidade inata quanto na adaptativa. C3 é a proteína mais abundante desse sistema e a sua importância fica evidenciada especialmente em pacientes deficientes, pois são muito suscetíveis a repetidas infecções.

Diversos estudos têm mostrado que a proteína C3 desempenha um papel fundamental no combate a infecções, responsável pela geração de opsoninas que facilitam a eliminação de microrganismos, entre estes as leptospirosas, mas o papel de C3 para a diferenciação e resposta intracelular em leucócitos ainda é pouco entendido.

Para entender melhor a importância de C3 para o desenvolvimento de células da imunidade inata, este trabalho buscou comparar diversos parâmetros celulares importantes para a fagocitose de leptospirosas em macrófagos de camundongos C57Bl/6 (selvagens) e C57Bl/6 C3<sup>-/-</sup> (deficientes de C3).

Inicialmente, as populações celulares presentes no exsudado peritoneal foram avaliadas por citometria de fluxo. Observamos aumento do número de macrófagos residentes (F4/80<sup>high</sup>) e menor número de macrófagos diferenciados a partir de monócitos (F4/80<sup>low</sup>) em camundongos deficientes de C3, demonstrando que talvez o recrutamento celular destas células esteja sendo afetado, implicando em menor afluxo destas células inflamatórias para o sítio inflamatório.

Como o citoesqueleto de macrófagos desempenha um papel crucial para a função fagocítica, e tendo em vista sua importância para a migração e formação de invaginações e invaginações que permitem o englobamento de partículas, analisamos a presença e distribuição de  $\alpha$ -tubulina e F-actina em macrófagos peritoneais e diferenciados da medula óssea. A ausência de C3 afetou de maneira significativa a morfologia e tamanho dessas células, uma vez que na ausência de C3 os macrófagos apresentaram menor intensidade de marcação com anti- $\alpha$ -tubulina e redução do tamanho celular (área), evidenciada pelo uso de faloidina (reage com F-actina). Em seguida, a presença das seguintes moléculas de superfície celular foi quantificada por citometria de fluxo:

CD11a/CD18, CD11b, CD11c, CD64, CD197, CD206, CD282, CD284, CD36, CD80, MHC II e CD21/CD35. A presença dos seguintes receptores CD282 (TLR2), CD64 (Fc $\gamma$ R1) e CD36 (*scavenger receptor*) foi aproximadamente 20 % menor em macrófagos diferenciados da medula óssea de camundongos deficientes de C3, quando comparada com os macrófagos de camundongos selvagens. Entretanto, a presença desses mesmos receptores foi semelhante em macrófagos peritoneais dos dois grupos de camundongos. Por outro lado, a presença do receptor de Complemento 4 (CR4; CD11c/CD18) foi seis vezes mais elevada em macrófagos peritoneais e diferenciados da medula óssea de B6.C3<sup>-/-</sup>.

Avaliamos também a fagocitose de Zimosan e *E. coli* K12 que foi maior em macrófagos B6.C3<sup>-/-</sup>, o que pode estar vinculado as alterações que observamos na morfologia celular e na expressão de determinados receptores de membrana.

Surpreendentemente, a fagocitose *in vivo* de *L. interrogans* por macrófagos da cavidade peritoneal foi maior em camundongos deficientes de C3. No entanto, ainda há necessidade de se acertar melhor as condições experimentais.

Por fim, medimos a ação de ROS e ativação de MAPK em macrófagos de ambos os grupos de camundongos, após estímulo com 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). Tais parâmetros foram menos intensos em macrófagos de B6.C3<sup>-/-</sup>, confirmando a importância de C3 para a sinalização celular, e merece ser mais amplamente estudado no futuro.

Em conjunto, nossos resultados sugerem que a presença de C3 durante o desenvolvimento ontogenético de camundongos C57Black/6 pode influenciar determinados parâmetros morfológicos e funcionais de macrófagos, células estas de fundamental importância para a resposta imune inata e adquirida.

## ABSTRACT

Da Silva, Tiago Francisco. **Evaluation of *Leptospira* Phagocytosis by Macrophages of C3 Deficient Mice in the Complement System**. 2021. Dissertation (Master of Science with an emphasis on Immunology). Institute of Biomedical Sciences. University of São Paulo, São Paulo, 2021.

Leptospirosis is an important zoonosis for public health, caused by the spirochete bacteria of the genus *Leptospira*. The innate immune response against these bacteria depends largely on phagocytosis and activation of the Complement System. This system is composed by several proteins that are either soluble or present on the cell surface, participating in both innate and adaptive immunity. C3 is the most abundant protein in this system and its importance is especially confirmed in C3 deficient patients, as they are very highly susceptible to severe and recurrent infections.

Several studies have shown that the C3 protein plays a fundamental role in the control of infections, responsible for generating opsonins which facilitate microorganism killing, including leptospire. However, the role of C3 in leukocyte differentiation and intracellular response has not been investigated so far.

To better understand the importance of C3 for the development of macrophages, this study aimed to compare several important cell parameters for phagocytosis of leptospire on macrophages of C57Bl/6 (wild) and C57Bl/6 C3<sup>-/-</sup> mice (C3 deficient).

Initially, the cell populations in the peritoneal exsudate were assessed by flow cytometry. Higher number of resident macrophages (F4/80<sup>high</sup>) and lower number of macrophages differentiated from monocytes (F4/80<sup>low</sup>) were observed in C3 deficient mice, when compared to wild mice, suggesting that monocyte recruitment to the inflammatory site maybe is impaired.

The cytoskeleton plays a crucial role in phagocytosis and is important for migration and formation of cell evaginations and invaginations which allow particle internalization. Considering that, the presence and distribution of  $\alpha$ -tubulin and F-actin in peritoneal macrophages and bone marrow derived macrophages was analyzed. The absence of C3 significantly interfered in macrophage morphology and size, since they stained less with anti- $\alpha$ -tubulin and reduced cell size (area), evidenced by the use of phalloidin (reacts with F-actin). Then, the presence of the following cell surface molecules was quantified by flow cytometry: CD11a /CD18, CD11b, CD11c, CD64, CD197, CD206, CD282, CD284, CD36, CD80, MHC II and CD21/CD35. The presence of the following receptors CD282 (TLR2), CD64 (Fc $\gamma$ R1) and CD36 (scavenger receptor) was approximately 20% less in bone marrow differentiated macrophages from C3 deficient

mice, when compared to macrophages from wild mouse strain. However, the presence of these same receptors was similar in peritoneal macrophages from both groups of mice. On the other hand, the presence of the Complement 4 receptor (CR4; CD11c / CD18) was six times higher in peritoneal macrophages and differentiated from the bone marrow of B6.C3<sup>-/-</sup>.

We also evaluated the phagocytosis of Zimosan and *E. coli* K12, which was higher in B6.C3<sup>-/-</sup> macrophages, which may be linked to the cell morphology changes and expression of certain membrane receptors.

No significant difference in the *in vitro* phagocytosis of leptospire by murine macrophages was observed. However, it is still necessary to improve the experimental conditions. Surprisingly, the *in vivo* phagocytosis of *L. interrogans* by peritoneal macrophages was higher in C3 deficient mice.

Finally, we measured ROS and MAPK activation in macrophages, after 12-O-tetradecanoylforbol-13-acetate (TPA) treatment. Both were less intense in B6.C3<sup>-/-</sup> macrophages compared to B6.C3<sup>+/+</sup> macrophages, confirming the importance of C3 for cell signaling which remains to be further investigated.

Taken together, our results suggest that C3 may influence morphology and macrophage functions during ontogeny of C57Black/6 mice, which is of great importance for innate and acquired immune responses.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

7AAD - 7-amino actinomicina D

### A

AKT - proteína quinase B

AP-1 - Ativador de proteína-1

### B

BAFFR - receptor fator de ativação de células B

BCL-2 - Linfoma de células B 2

BCR - Receptor de antígeno da célula B

BM - Medula óssea

BSA - Albumina sérica bovina

### C

C1-INH - inibidor de C1

C3(H<sub>2</sub>O) - C3 hidrolisado

C4BP – *C4b-binding protein*

cAMP - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

CCR7 - Receptor de quimiocinas C-C tipo 7

CEFAP - centro de facilidades de apoio à pesquisa

CEUA - comitê de ética no uso de animais da USP

CFSE – Éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína.

CH2/3 - Domínio constante H 2/3 de imunoglobulinas

CR - Receptores de Complemento

CRDs - Domínios de reconhecimento de carboidratos

CRIg – Receptor de complemento da superfamília das imunoglobulinas

### D

DAF/CD55 - fator de aceleração do decaimento

DAMPs - padrões moleculares associados ao dano tecidual

DAPI - 4',6'-diamino-2-fenil-indol

DMEM - *dulbecco's modified eagle medium*

DNA - ácido desoxirribonucleico

### E

*E. Coli* - *Escherichia coli*

EDTA - ácido tetra-acético etilenodiamino

EGTA - ácido tetra-acético etilenoglicol

EMJH - *Ellinghausen-McCullough-Johnson Harris*

ERK 1/2- quinase regulada por sinal extracelular 1/2

## **F**

FACS - separador celular ativado por fluorescência

FB – Fator B

FcγR1 – Receptor para imunoglobulina G 1

FH – Fator H

FITC - isotiocianato de fluoresceína

## **G**

GMCSF - fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos

GTP - trifosfato de guanosina

GVB – Tampão veronal de gelatina

## **I**

ICAM-1 - Molécula de adesão intracelular

IFN-γ - interferon gama

Ig - imunoglobulina

IkBα - *inhibitor of nuclear factor kappa B*

IL - interleucina

## **J**

JNK - c-Jun N-terminal quinase

## **K**

KdA - quilodalton

## **L**

LDL - lipoproteínas de baixa densidade

LPF - *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm

LPS – lipopolissacarídeo

LTβR - receptor beta de linfotoxina

Ly6G - Antígeno linfocitário 6 complexo locus G6D

## **M**

MØ - Macrófagos

MAC - complexo de ataque à membrana

MAP - proteína ativada por mitogênio

MAPK – proteína quinase ativada por mitogênio

MASP 1/2/3 – Serinoproteases 1/2/5 associadas a *MBL*

MBL – Lectina de ligação à manose.

MCP/CD46 - proteína de membrana com atividade de co-fator

MCSF - fator estimulador de colônias de macrófagos

MFI - intensidade mediana de fluorescência

MHC II - moléculas de complexo de histocompatibilidade de classe II

MOI - multiplicidade de infecção

MR – Receptor de manose

mTORC – Alvo de mamífero do complexo 1 de rapamicina

Myd88 – Fator de diferenciação mieloide 88

## **N**

NF- $\kappa$ B - Fator Nuclear *kappa* B

NIK - quinase indutora de NF- $\kappa$ B

NLR – Receptor tipo Nod

## **P**

PAMPS - padrões moleculares associados a patógenos

PBS – solução fostato salina

PBS-T - solução fostato salina com Tween 20

PBS-TX – solução fostato salina com Triton X

PCR – reação em cadeia empregando DNA polimerase

PDK1 - quinase-1 dependente de fosfoinosítídeo

PFA – paraformaldeído

PI3K - fosfoinosítídeo 3-quinase

PIP2 - fosfatidilinositol 4,5 bifosfato

PIP3 - fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato

PKB - serina-treonina quinase Akt

PKC – Proteína quinase C

PRR - receptores de reconhecimento de padrões

## **R**

RANK - Receptor ativador do fator nuclear *kappa* B

RHD – Domínio de homologia *rel*

RLR – Receptor tipo Rig

*rRNA* - ácido ribonucleico ribossômico

ROS - espécies reativas de oxigênio

## **S**

SBF - soro fetal bovino

SC – Sistema Complemento

SDS - dodecil- sulfato de sódio

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio

SRs - Receptores *scavenger*

SRC – Repetição de consenso curto

SSC – Dispensação lateral

## **T**

TAD – Domínio de ativação da transcrição

TCR - receptor de antígeno da célula T

TGF- $\beta$  - fator de transformação de crescimento

TEMED - Tetrametiletilenodiamina

THP-1 – Leucemia monocítica humana 1

TIR - toll/interleukin-1 receptor

TLR - receptores de Toll

TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral alfa

TNFR - receptores de fatores de necrose tumoral

TPA - 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato

## **V**

VCAM-1 - proteína 1 de adesão celular vascular

## **W**

WT – Camundongos selvagens (Wild type)

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Principais vias de ativação do Sistema Complemento.....	29
<b>Figura 2</b> – Esquema das vias de sinalização.....	38
<b>Figura 3</b> – Genotipagem de amostras de DNA de camundongos, 9após eletroforese em gel de agarose.....	53
<b>Figura 4</b> – Avaliação da presença de C3 no soro de camundongos B6.C3 <sup>+/+</sup> e B6.C3 <sup>-/-</sup> .....	54
<b>Figura 5</b> – Avaliação da atividade hemolítica mediada pela Via Alternativa no soro de camundongos B6.C3 <sup>+/+</sup> e B6.C3 <sup>-/-</sup> .....	54
<b>Figura 6</b> – Figura 6. Quantificação de populações celulares no exsudato peritoneal.....	55
<b>Figura 7</b> – Marcação de componentes da estrutura do citoesqueleto de macrófagos murinos.....	57
<b>Figura 8</b> – <i>Script</i> para análises de parâmetros no ImageJ.....	57
<b>Figura 9</b> – Delineamento celular para análises do citoesqueleto de macrófagos.....	58
<b>Figura 10</b> – Avaliação da estrutura do citoesqueleto de macrófagos murinos.....	58
<b>Figura 11</b> – Exemplo de citometria de fluxo para análise da expressão de proteínas de superfície de macrófagos.....	59
<b>Figura 12</b> – Análise por citometria de fluxo dos controles de isotipos de anticorpos.....	60
<b>Figura 13</b> – Análise da presença de marcadores Moleculares de superfície de macrófagos peritoneais.....	60
<b>Figura 14</b> – Análise da presença de marcadores moleculares de superfície de macrófagos diferenciados da medula óssea.....	61
<b>Figura 15</b> – Experimentos representativos de fagocitose de Zimosan e <i>E. coli</i> .....	62
<b>Figura 16</b> – Avaliação da fagocitose de Zimosan-FITC por macrófagos de camundongos.....	63
<b>Figura 17</b> - Avaliação da fagocitose de <i>E. coli</i> K12 por macrófagos murinos.....	64

<b>Figuras 18</b> – Experimento representativo da fagocitose de Leptospiras.....	<b>65</b>
<b>Figura 19</b> – Avaliação da fagocitose de leptospiras marcadas com CFSE por macrófagos murinos.....	<b>66</b>
<b>Figura 20</b> - Quantificação de leptospiras fagocitadas <i>in vitro</i> por macrófagos empregando qPCR.....	<b>67</b>
<b>Figura 21</b> - Deposição de fragmentos ativados de C3 sobre leptospiras.....	<b>69</b>
<b>Figura 22</b> – Avaliação da produção de ROS por macrófagos derivados de medula óssea por citometria de fluxo.....	<b>70</b>
<b>Figura 23</b> – Microscopia de fluorescência para identificar a presença intracelular de NF- $\kappa$ B e MAPK fosforilados.....	<b>71</b>
<b>Figura 24</b> – Quantificação da ativação intracelular de NF- $\kappa$ B e MAPK fosforilados.....	<b>71</b>
<b>Figura 25</b> – Fagocitose de <i>L. interrogans in vivo</i> .....	<b>72</b>
<b>Figura Suplementar 1.</b> Quantificação de Leptospiras fagocitas.....	<b>88</b>
<b>Figura Suplementar 2.</b> Avaliação da internalização nos ensaios de fagocitose.....	<b>89</b>

## **LISTA DE TABELA**

<b>Tabela 1</b> – Reagentes e sequência de <i>primers</i> para PCR Convencional.....	<b>42</b>
<b>Tabela 2</b> – Anticorpos conjugados usados para marcação celular.....	<b>46</b>

## SUMÁRIO

<b>1 Introdução.....</b>	<b>25</b>
1.1 Sistema Complemento .....	25
1.1.1 Via Clássica .....	25
1.1.2 Via Alternativa .....	26
1.1.3 Via das Lectinas .....	27
1.1.4 Complexo de Ataque à Membrana .....	27
1.2 Proteína C3 .....	29
1.3 Macrófagos .....	30
1.3.1 Fagocitose.....	31
1.3.2 Receptores Celulares.....	32
1.4 Sinalização Celular.....	33
1.5 Leptospirose .....	38
1.5.1 <i>Leptospira ssp.</i> .....	39
<b>2 Hipótese de Trabalho.....</b>	<b>40</b>
<b>3 Objetivos e Delineamento Experimental.....</b>	<b>41</b>
3.1 Objetivo Específicos.....	41
3.2 Delineamento Experimental.....	41
<b>4 Material e métodos .....</b>	<b>42</b>
4.1 Camundongos .....	42
4.2 Confirmação da deficiência de C3 dos animais B6.C3 <sup>-/-</sup> .....	42
4.2.1 Reação em cadeia empregando DNA Polimerase – PCR convencional.....	42
4.2.2 Análise por Western blot.....	43
4.2.3 Avaliação da atividade hemolítica.....	44
4.3 Obtenção e Cultivo de Macrófagos Murinos .....	45
4.4 Diferenciação em macrófagos a partir de células da medula óssea .....	45
4.5 Obtenção dos soros dos camundongos B6.C3 <sup>+/+</sup> e B6.C3 <sup>-/-</sup> .....	46
4.6 Quantificação da população celular no exsudato peritoneal.....	46
4.7 Avaliação de moléculas do Citoesqueleto.....	47
4.8 Avaliação da presença de moléculas de membrana em macrófagos murinos.....	47
4.9 Fagocitose de Zimosan.....	47
4.10 Fagocitose de <i>E. coli</i> K12.....	48
4.11 Obtenção e Cultivo de <i>Leptospira ssp.</i> .....	48
4.12 Fagocitose de Leptospiras por macrófagos .....	49
4.13 Extração do DNA de Leptospiras .....	50
4.14 qPCR .....	50
4.15 Avaliação do estresse oxidativo.....	51
4.16 Avaliação das vias de sinalização.....	51
4.17 Avaliação da fagocitose de <i>L. interrogans in vivo</i> .....	52
4.18 Citometria de fluxo.....	52
4.19 Análise estatística.....	52
<b>5 Resultados .....</b>	<b>53</b>
5.1 Confirmação da deficiência de C3 dos animais B6.C3 <sup>-/-</sup> .....	53
5.2 Quantificação diferencial de leucócitos no exsudato peritoneal.....	54
5.3 Avaliação de moléculas do citoesqueleto .....	56
5.4 Avaliação da expressão de moléculas celulares de macrófagos murinos.....	59
5.5 Fagocitose de Zimosan-FITC.....	62

5.6 Fagocitose de <i>E. coli</i> K12.....	64
5.7 Fagocitose de <i>Leptospira</i> spp. ....	64
5.8 Avaliação da fagocitose de Leptospiras por qPCR.....	67
5.9 Produção de ROS em macrófagos de camundongos na ausência de C3.....	69
5.10 Avaliação da ativação intracelular de NF- $\kappa$ B e MAPK.....	70
5.11 Fagocitose <i>L. interrogans</i> em modelo <i>in vivo</i> .....	72
<b>6 Discussão .....</b>	<b>74</b>
<b>7 Conclusões e Considerações Finais.....</b>	<b>79</b>
<b>8 Referências .....</b>	<b>81</b>
<b>9 Anexo.....</b>	<b>88</b>

## 1. Introdução

### 1.1 Sistema Complemento

Jules Bordet propôs a existência de um fator presente no soro fresco capaz de complementar a ação dos anticorpos na eliminação de bactérias. Por seus estudos nessa área e em Microbiologia, recebeu o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1919. Atualmente sabemos que ao invés de um único fator, um conjunto de mais de 40 proteínas solúveis ou associadas à membrana celular compõe o Sistema Complemento. Este sistema é parte importante da Resposta Imune Inata e da Resposta Imune Adquirido, correspondendo a aproximadamente 3 g de proteína por litro de plasma e 15% da fração globulina [Nesargikar et. al., 2012; Walport, 2001].

O Sistema Complemento pode ser ativado por pelo menos três vias: a Via Clássica, Via Alternativa e a Via das Lectinas. Uma vez ativado, este sistema pode desempenhar diversas funções biológicas, entre elas: *a)* a geração de opsoninas (C3b, iC3b, principalmente) que facilitam a fagocitose; *b)* lise mediada pela formação do Complexo de Ataque à Membrana (MAC) que pode se instalar sobre a superfície do parasita; *c)* geração de mediadores pró-inflamatórios como C3a e C5a que promovem o recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório [Dias da Silva et al., 1967]; e, com poder de causar desgranulação de mastócitos e basófilos. As proteínas do Sistema Complemento podem atuar como uma ponte entre a resposta inata e adquirida, uma vez que o fragmento C3d é um forte ativador de linfócitos B, intensificando a produção de anticorpos (resposta humoral) por essas células [Carroll, 1998].

#### 1.1.1 Via Clássica

A Via Clássica recebeu este nome por ter sido a primeira via de ativação estudada, embora esta seja a via evolutivamente mais recente entre as três, tendo em vista a sua ativação dependente da resposta imune adaptativa. Sua ativação geralmente é iniciada pela ligação de C1q do complexo C1 com domínios CH<sub>2</sub> de duas IgG ou com domínios CH<sub>3</sub> de uma única IgM, quando estas imunoglobulinas estão ligadas especificamente a antígenos. O complexo C1 é formado pelas subunidades C1q, duas moléculas C1r e duas moléculas C1s. C1r e C1s são zimógenos, e uma vez ativados, podem funcionar como serinoproteases. Após a ligação de C1q ao imunocomplexo, as unidades C1r passam a ser ativadas, o que propicia também a ativação das subunidades C1s, e esta por sua vez será capaz de clivar C4, encontrada na forma solúvel no plasma. A proteína

C4 (210 kDa) é composta por três cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , e uma vez clivada por C1s ativado, gera dois fragmentos: um maior (C4b) e um menor (C4a). C4b pode se ligar covalentemente à superfície celular ou a outras proteínas solúveis, enquanto o fragmento C4a é uma anafilotoxina que atua em diversas funções pró-inflamatórias como quimiotaxia de monócitos e neutrófilos (recrutando estas células até o sítio de infecção), além de propiciar liberação de histamina por mastócitos e basófilos, gera um aumento na produção de radicais livres dependentes do metabolismo de  $O_2$  em neutrófilos e induz contração do músculo liso [Gorski et al., 1979].

O fragmento C4b se liga a outra proteína solúvel denominada C2. Esta ligação permite a clivagem desta proteína pela ação de C1s, gerando dois fragmentos: C2a e C2b. O fragmento C2a permanece ligado a C4b, formando assim o complexo enzimático C4b2a, conhecido como a C3-convertase da Via Clássica. Este complexo tem a capacidade de clivar C3 – proteína-chave para o funcionamento de todas as vias do Sistema Complemento – gerando dois fragmentos: C3a e C3b. C3a é uma anafilotoxina e vários fragmentos C3b podem se ligar ao complexo C4b2a, formando a C5-convertase da Via Clássica (C4b2a3b<sub>n</sub>), com capacidade para clivar uma proteína chamada C5 em fragmentos C5a e C5b. C5a também é uma anafilotoxina, e C5b, dando assim início ao final da cascata de ativação que é conhecida como Via Terminal Comum.

### 1.1.2 Via Alternativa

Quase 50 anos após a descrição da Via Clássica, Pillemer et al. (1954) propuseram a existência de uma nova via de ativação do Sistema Complemento: a Via da Properdina, hoje conhecida como Via Alternativa. Eles chegaram a essa conclusão tendo em vista que o Sistema Complemento poderia ser ativado mesmo na ausência de anticorpos, agindo diretamente sobre fungos e bactérias.

A Via Alternativa recebeu este nome por ter sido a segunda a ser descrita, embora seja filogeneticamente mais antiga e mais usada do que a Via Clássica. O início da ativação dessa via é resultado da hidrólise espontânea da ligação tiol-éster da proteína C3, gerando uma nova espécie química chamada C3(H<sub>2</sub>O), com conformação estrutural similar ao fragmento C3b. C3b resultante da ação da C3-convertase também pode dar início a Via Alternativa.

Com a clivagem da ligação tiol-éster em C3(H<sub>2</sub>O) ou o fragmento C3b poderão se ligar covalentemente na superfície do patógeno. C3(H<sub>2</sub>O) ou C3b enquanto ativados podem se ligar a uma proteína plasmática chamada Fator B (FB). Esta interação permite a ação

de uma serinoprotease plasmática denominada Fator D – que clivará o FB – resultando na formação das C3-convertases da Via Alternativa [C3(H<sub>2</sub>O)Bb e C3bBb]. Com a clivagem de C3 pela C3-convertase, há geração de novos fragmentos C3a e C3b. C3a, como já mencionado acima, é uma anafilotoxina, enquanto C3b pode se ligar na própria C3-convertase, gerando assim a C5-convertase da Via Alternativa [C3(H<sub>2</sub>O)BbC3b<sub>n</sub> ou C3bBbC3b<sub>n</sub>] dando início à formação da Via Terminal Comum. A Properdina regula positivamente a C3-convertase da Via Alternativa, melhorando a estabilidade e meia vida deste complexo enzimático.

Como esta ativação pode ocorrer de forma constante e espontânea, a regulação desta via se torna muito importante para impedir que a cascata seja ativada sobre células próprias (descrito mais adiante), além de evitar o consumo exacerbado de C3, o que prejudicaria a ativação das vias do Sistema Complemento, quando necessário.

### 1.1.3 Via das Lectinas

Aproximadamente quarenta anos após a descrição da Via Alternativa, a Via das Lectinas foi descrita. Esta via é ativada a partir do reconhecimento de carboidratos e moléculas acetiladas presentes em abundância na superfície de muitas bactérias e fungos. A cascata é iniciada a partir da ligação de colectinas circulantes como “*Mannose Binding Lectin*” (MBL) ou ficolinas.

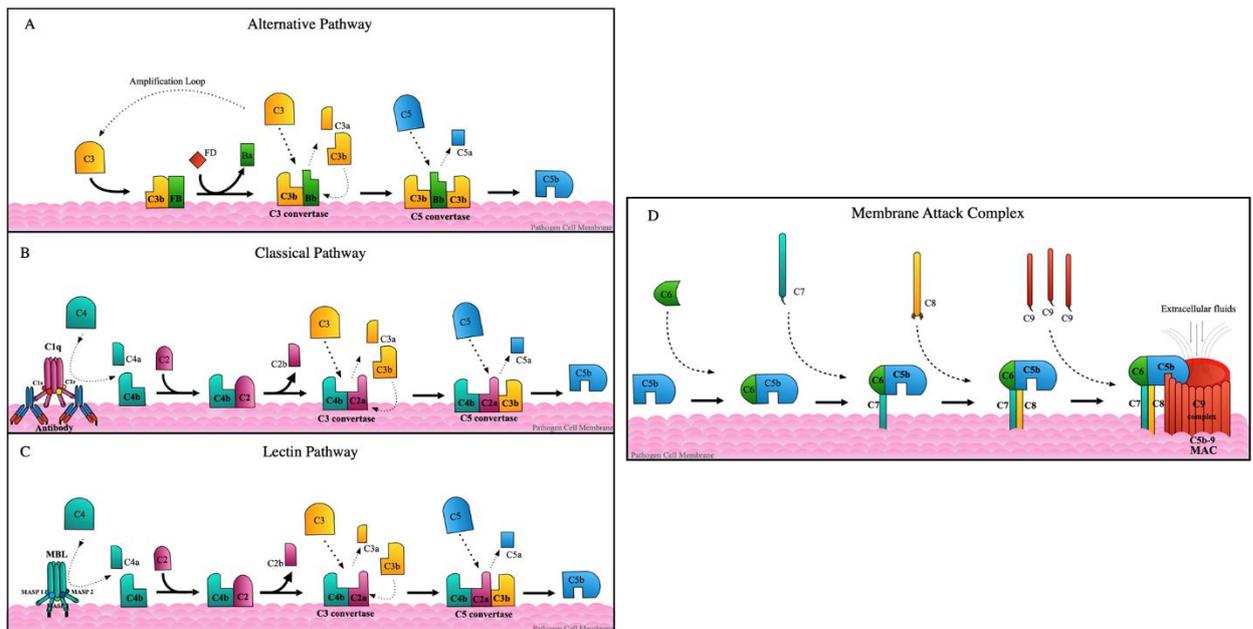
Em alguns aspectos, a Via das Lectinas guarda semelhança com a Via Clássica: MBL e ficolinas são estruturalmente semelhantes a C1q. Após ligação da MBL (ou de ficolinas) com polissacarídeos microbianos, as serinoproteases “MBL-associated serinoproteases” (MASPs) poderão clivar as proteínas C4 e C2, resultando na formação da C3-convertase (C4b2a) que igualmente atua na Via Clássica. As serinoproteases MASP-1 e MASP-2 são homólogas a C1r e C1s respectivamente, presentes no complexo C1. Outra serinoprotease chamada MASP-3 é descrita como reguladora da atividade de C4 e C2, já que esta atua como competidora de MASP-2 diminuindo sua ação [Dahl et al., 2001; Dobó et al., 2016].

### 1.1.4 Complexo de Ataque à Membrana

A C5-convertase cliva C5, gerando C5a e C5b, iniciando a formação da Via Terminal Comum seguida pela ligação da proteína C6, inserção na membrana das proteínas C7 e C8 e, por fim, diversas proteínas C9 (Poli-9), formando o MAC (C5b6789<sub>n</sub>) sobre a membrana microbiana [Morgan, 1989].

O Sistema Complemento atua como um dos mais importantes componentes da resposta imune do hospedeiro. Dentre suas funções, a lise mediada pelo MAC é evidenciada como um evento fundamental para uma resposta imune eficiente, sobretudo pela sua participação na eliminação de patógenos e células danificadas. Diversos organismos evoluíram produzindo uma parede celular mais resistente à ação de tal complexo, evitando a perfuração de sua membrana, mas a resposta do MAC ainda é fundamental para o combate de vários patógenos, como, por exemplo, bactérias do gênero *Neisseria*, onde a imunodeficiência em alguma proteína formadora do MAC pode gerar infecções graves para tal patógeno (meningite e gonorreia), enquanto indivíduos com ação normal do MAC são resistentes e normalmente eliminam estas bactérias [Walport, 2001].

Como mencionado acima (**item 1.1.2**), diversas proteínas do próprio Sistema Complemento atuam como reguladoras, sendo importantes para evitar que sejam gerados quadros inflamatórios crônicos e respostas contra células próprias, além do consumo exacerbado principalmente da proteína C3. Fator H (FH) e a Proteína Ligante de C4b (C4BP) são proteínas solúveis reguladoras que atuam sobre as C3-convertases, a primeira sobre a Via Alternativa e a segunda sobre as demais vias (Via Clássica e Via das Lectinas), tendo maior afinidade com os fragmentos C3b e C4b, respectivamente. Tanto FH quanto C4BP têm a capacidade de agir como cofator da enzima Fator I, que por sua vez pode clivar C3b e C4b em fragmentos menores. O Receptor de Complemento (CR) CR1 e a Proteína de Membrana com atividade de co-fator (MCP ou CD46) também atuam sobre as convertases associadas à membrana, sendo também cofatores do Fator I. O Fator de Aceleração do Decaimento (DAF ou CD55) presente na membrana pode atuar inibindo as C3-convertases de todas as vias [Nicholson-Weller et al., 1981, 1983]. Além destas, o Inibidor de C1 (C1-INH) atua controlando a ativação do complexo C1. A Via Terminal Comum pode ser regulada pela proteína de membrana CD59 e por proteínas solúveis como a Vitronectina e Clusterina.



**Figura 1. Principais vias de ativação do Sistema Complemento.** Representação esquemática da ativação do Sistema Complemento sobre a membrana de uma bactéria. A) Via Alternativa; B) Via Clássica; C) Via das Lectinas; e em D) Via Terminal Comum. Esta figura foi preparada pela bióloga Milena Carvalho Carneiro.

## 1.2 Proteína C3

A proteína C3 é importante em muitas funções geradas pelo Sistema Complemento e sua deficiência resulta em infecções graves e repetitivas com alta taxa de mortalidade [Ulbrich et. al, 2001; Reis et al., 2006; Ricklin et al., 2016].

Os fragmentos de C3, C3b e principalmente iC3b são opsoninas importantes para a fagocitose realizada por células fagocitárias. Outro fragmento de C3 importante é C3d gerado após clivagem da proteína C3 pelo Fator I, este é reconhecido pelo Receptor de Complemento 2 (CR2 ou CD21) presente em linfócitos B e células dendríticas foliculares; na ausência desta proteína a produção de anticorpos é prejudicada [Carter & Fearon, 1992; Hebell et al., 1991, Pekkarinen et al., 2015].

Assim como a maioria das proteínas do Sistema Complemento, C3 é sintetizado principalmente no fígado por hepatócitos, além de leucócitos, fibroblastos, células epiteliais e por outras células [Alper et. al, 1969]. A sua síntese pode ser estimulada por padrões moleculares de microrganismos como o LPS de bactérias Gram-negativas e citocinas como a Interleucina 6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral (TNF)- $\alpha$ , já o Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) inibe a síntese de C3 [Katz & Strunk, 1989].

A proteína C3 humana é codificada por um gene de cópia única no braço curto do cromossomo 19, contendo 41 exons. Os 16 primeiros éxons codificam para a região dos aminoácidos da cadeia  $\beta$  e os 25 restantes para a cadeia  $\alpha$ . [Vik et. al; 1991]. A proteína

madura possui 185 kDa e em um indivíduo adulto saudável a presença no soro varia entre 1,0 e 1,6 mg/ml, sendo o mais abundante componente do Sistema Complemento. Como já explicado acima, C3 ao ser clivado pela C3-convertase na sua cadeia  $\alpha$ , gera um fragmento com 77 aminoácidos (C3a), e outro conhecido como C3b formado pela cadeia  $\alpha'$  (resultante da clivagem da cadeia  $\alpha$ ) e pela cadeia beta (70 kDa). A cadeia  $\alpha'$  pode ser novamente clivada pelo Fator I em iC3b e C3dg. Assim, como C3b e iC3b, esses fragmentos permanecem ligados covalentemente à superfície do microrganismo.

### 1.3 Macrófagos

Os macrófagos pertencem ao Sistema Mononuclear Fagocítico. Estas células participam de forma essencial tanto da imunidade inata quanto da adquirida. Os macrófagos são encontrados em basicamente todos os tecidos, e são originados a partir de um progenitor eritro-mielóide proveniente do saco vitelínico, responsável pela maioria dos macrófagos que residem nos tecidos [Hoeffel & Ginhoux, 2018]. Além disto, os macrófagos podem ter origem estimulada a partir da migração e diferenciação de monócitos circulantes do sangue periférico para o tecido. Durante o desenvolvimento dos monócitos, o progenitor mieloide pode se desenvolver primeiramente em monoblasto, pró-monócito e finalmente em monócitos que saem da medula óssea e migram para a corrente sanguínea [Gordon & Taylor, 2005]. O mesmo progenitor mieloide pode dar origem a outros PBMCs como neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastócitos e células dendríticas. A maturação de macrófagos permite que estes desempenhem diversas funções, como processamento e apresentação de antígenos, expressão de várias citocinas e proteínas da fase inflamatória aguda, atuam também eliminando células apoptóticas, senescentes ou danificadas e uma de suas principais funções é a fagocitose [Wynn et al. 2013]. Os macrófagos participam também do reparo de tecidos lesionados, do crescimento de novos vasos sanguíneos e síntese da matriz extracelular [Gordon, 2003].

Os macrófagos são células plásticas, capazes de responder à estímulos do ambiente e podendo assumir uma gama de fenótipos. Na literatura, o que normalmente é encontrado é a divisão de macrófagos em M1 e M2 (M2a, M2b, M2c) onde as células M1 podem ser ativadas na presença de IFN- $\gamma$ , LPS e Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos-Macrófagos (GM-CSF), entre outros. A subpopulação M1 apresenta características pró-inflamatórias, microbicidas, antitumorais, boa capacidade de apresentação de antígenos e combate a patógenos intracelulares (citotóxica). Já a subpopulação de macrófagos M2 pode ser ativada por IL-4 (M2a), IL-13, TGF- $\beta$ ,

imunocomplexos (M2b), Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos (M-CSF) e IL-10 (M2c) [Martinez & Gordon, 2014], entre outros, sendo estes macrófagos considerados importantes para a resposta imunorreguladora, antiinflamatória, e para o remodelamento tecidual, angiogênese, cicatrização e desenvolvimento tumoral [Saqib et. al., 2018; Cho et. Al., 2014; Martinez & Gordon, 2014]. De fato, as populações M1 e M2 são os extremos de um gradiente, onde fenótipos variáveis podem ser encontrados, dependendo da integração de sinais feita pelas células, no ambiente onde as mesmas estão expostas.

### 1.3.1 Fagocitose

O naturalista ucraniano chamado Elie Metchnikoff cunhou o termo conhecido hoje como fagocitose, a partir de estudos com larva de estrelas-do-mar. Metchnikoff espetou a larva com acúleo de uma roseira e notou que 24h depois o acúleo estava cercado por células [Nathan, 2008]. Com seus trabalhos Metchnikoff ajudou a entender o que compreendemos hoje como fagocitose e o importante papel de macrófagos na proteção contra agentes externos.

A fagocitose é importante para o controle de infecções, uma vez que microrganismos podem ser reconhecidos principalmente por receptores presentes na superfície de fagócitos onde poderão ser eliminados. A capacidade dos receptores de interagir com moléculas estranhas de patógenos permite o desencadeamento de atividade microbicida de fagócitos, possibilitando a ingestão e remoção de grandes partículas, incluindo agentes infecciosos [Allen & Aderem, 1996], dificultando assim o desenvolvimento de doenças parasitárias.

Para melhorar a resposta celular, diversas opsoninas facilitam o reconhecimento de partículas que precisam ser fagocitadas. Anticorpos da classe IgG e fragmentos C3b e iC3b do Sistema Complemento estão entre as principais opsoninas ao se ligarem à superfície de microrganismos, permitindo assim a eliminação dos mesmos. Este é um importante mecanismo para combate de diversas infecções, embora determinadas bactérias, fungos e parasitas possam ser reconhecidos diretamente por fagócitos. No contato com moléculas alteradas ou estranhas e partículas, os fagócitos emitem prolongamentos citoplasmáticos conhecidos como pseudópodes que internalizam as partículas, formando subsequentemente uma vesícula chamada fagossomo. Posteriormente, esta vesícula se funde aos lisossomos, gerando o fagolisossomo cujo

conteúdo contribui para a eliminação dos microrganismos internalizados [Straus W, 1964; Ehrenreich & Cohn, 1967; Stossel et al., 1972].

Com a fagocitose diversas reações intracelulares são ativadas para eliminação das partículas, sendo a destruição intracelular mediada por enzimas proteolíticas liberadas pelos lisossomos e por radicais livres produzidos pela explosão respiratória, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS) como ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxilas ( $OH^\cdot$ ) [Bedard et al., 2007]. Há também a formação de óxido nítrico (NO), um importante agente microbicida.

### 1.3.2 Receptores Celulares

Os macrófagos possuem diversos tipos de receptores localizados tanto na membrana plasmática quanto intracitoplasmáticos, possibilitando a interação com diferentes alvos, como por exemplo: 1) receptores para opsoninas derivadas do Sistema Complemento (CR) e para anticorpos IgG ( $Fc\gamma R$ ); 2) receptores de reconhecimento (PRR) para os mais diversos Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPS) ou ao dano tecidual (DAMPs), tais como *Toll-Like Receptor* (TLR), *Nod-like receptor* (NLR), *Rig-Like Receptor* (RLR), receptor para C1q, receptor para MBL, entre outros; 3) receptores para carboidratos como o receptor de manose (CD206); e, 4) receptores tipo *Scavenger* que podem reconhecer diversos lipopeptídeos e LPS [Sastry & Ezekowitz, 1993; Taylor et al., 2005].

#### 1.3.2.1 Receptor do tipo Toll

Dentre os PRRs, os TLRs foram os primeiros identificados e os melhores caracterizados até o momento. Em humanos há 10 diferentes TLRs descritos até o momento (TLR1-TLR10), enquanto em camundongos 12 foram observados (TLR1-TLR9, TLR11-TLR13), podem ser encontrados tanto na membrana plasmática como associados a compartimentos intracelulares como retículo endoplasmático, lisossomos, endossomos, entre outros [Kawasaki & Kawai, 2014]. Os receptores TLRs podem reconhecer diversos PAMPs como lipídios, proteínas, lipoproteínas, ácidos nucleicos, entre outros. Cada receptor possui um domínio transmembrana e uma região citoplasmática curta conhecida como domínio Toll/Receptor IL-1 (TIR), que se comunica com moléculas acessórias para desencadear a sinalização celular.

Assim como outras bactérias Gram-negativas, as leptospiras são ricas em LPS, cuja presença é predominantemente detectada por receptores semelhantes ao TLR-4

(CD284). Entretanto, há diferenças na composição do lipídeo A responsável pela atividade endotóxica do LPS dessas bactérias, permitindo que elas sejam reconhecidas por macrófagos humanos apenas pelo TLR-2 (CD282), conhecido ligante para ácido lipoteicóico presente nas bactérias Gram-negativas. Já o LPS das leptospiras é reconhecido por macrófagos murinos tanto pelo TLR-2 quanto pelo TLR-4, resultando em ativação e sinalização celular [Chassin et al. 2009; Werts, 2010].

Após a interação TLR2/4-LPS, ocorre a sinalização intracelular que pode culminar com a ativação de fatores de transcrição de genes importantes para o processo inflamatório desencadeado pela presença de leptospiras [Werts, 2010].

### 1.3.2.2 *Receptor Scavenger*

Na década de 1970, Brown e Goldstein descreveram os receptores *Scavenger* (SRs), identificados pela capacidade de reconhecer e ligar em diferentes formas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), promovendo a diferenciação de macrófagos em células espumosas. Esta diferenciação pode gerar condições crônicas como a aterosclerose.

Os SRs são capazes de reconhecer vários ligantes comuns, tais como lipoproteínas, células apoptóticas, éster de colesterol, fosfolípidios, proteoglicanos, ferritina e carboidratos [Zani et al., 2015].

Existem diversas classes de SR (A-J) [Prabhudas et al., 2014] conhecidas como supergrupo de SR. Cada classe possui semelhanças em sua sequência primária, mas entre as classes a semelhança é muito pouca ou nenhuma.

A classe SR-A possui 5 membros (SR-A1, SR-A3-6), SR-A1 (CD204, MSR1) é considerada um importante receptor de LDL, que, quando alteradas e ligadas ao receptor, ocasionam a formação de células espumosas, dando início à patogênese da aterosclerose - principal causa de infarto. SR-A1 também é um receptor de células apoptóticas e de microrganismos.

A classe SR-B é composta por 3 membros (SR-B1-3). SR-B1 (CD36) é expressa por monócitos, macrófagos, plaquetas e endotélios selecionados. SR-B1 foi bem descrita pelo reconhecimento de LDL oxidada e células apoptóticas [Taylor et al., 2005]. Em macrófagos, o CD36 desempenha diversas funções biológicas como migração, sinalização e processo inflamatório, além de ter sido observada sua ligação com eritrócitos infectados com o parasita causador da malária *Plasmodium falciparum* [Asch et al., 1987; Ockenhouse & Chulay, 1988].

### 1.3.2.3 Receptor de Manose

O receptor de manose (MR, CD206, MRC1) é uma glicoproteína transmembrana de 180 kDa, pertencente à família dos receptores de lectinas do tipo C. É expresso pela maioria dos macrófagos teciduais, células dendríticas e células endoteliais linfáticas. Em sua região extracelular, há um domínio N-terminal rico em cisteína (CR) que se liga em glicoproteínas contendo açúcares sulfatados. Este mesmo receptor apresenta também oito domínios de reconhecimento de carboidratos (CRDs) que se ligam a manose e fucose [Stahl & Ezekowitz, 1998; Azad et al., 2014].

O CD206 é capaz de interagir com diversos microrganismos como bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, leveduras, parasitas e micobactérias.

### 1.3.2.4 Receptor de Complemento

Três grupos de receptores de Complemento **transmembranar do tipo 1** presentes na membrana de células imunes são bem descritos: Receptor de Complemento 1 (CR1 - CD35) e CR2 (CD21) que possuem domínios *short-consensus repeat* (SRC); CR3 (CD11b/CD18) e CR4 (CD11c/CD18), membros da família das integrinas; e, o receptor semelhante CR1g, da superfamília das imunoglobulinas [Dustin, 2016].

CR1 possui alta afinidade com os fragmentos C3b e C4b, promovendo assim a fagocitose de partículas opsonizadas pelos mesmos. CR1 também interage com imunocomplexos com C3b e C4b depositados, promovendo a remoção dos mesmos da circulação. CR1 é expresso principalmente em células derivadas da medula óssea, entre elas neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, linfócitos e eritrócitos [Klickstein et al., 1997]. CR1 atua como co-fator para Fator I, atuando assim como regulador da C3-convertase, tendo em vista a clivagem do fragmento C3b em iC3b interrompendo a alça de amplificação da Via Alternativa [Jacobson & Weis, 2008] (**Figura 1**).

CR2 tem a capacidade de se ligar aos fragmentos iC3b, C3d e C3dg [Boackle, 2018]. Em primatas, CR2 é expresso na superfície de linfócito B e em células foliculares dendríticas atuando em sinergismo com BCR, aumentando a secreção de anticorpos de alta afinidade e geração dos centros germinativos em linfócitos B.

CR3 ( $\alpha_M/\beta_2$ ) é o maior receptor de iC3b, além de possuir a capacidade de se ligar com a molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1 - CD54) que é importante para a transmigração de leucócitos [Diamond et. al., 1990]. CR3 é expresso em células mieloides e linfócitos T ativados.

CR4 ( $\alpha_x/\beta_2$ ) possui menor afinidade a iC3b em comparação com CR3 [Chen et. al., 2012], e também foi observada a sua capacidade de interagir com ICAM-1, ICAM-2 e VCAM-1 [Dustin, 2017]. CR4 é expresso por células dendríticas, macrófagos teciduais e linfócitos T efetores.

CR3 e CR4 têm importante papel na fagocitose, quando interagem com uma variedade de proteínas do citoesqueleto como F-actina, vinculina, paxilina, entre outras. [Allen & Aderem, 1996]. Além disto, foi demonstrado que ambos receptores atuam sobre a ativação das células juntamente com CD14 após indução com LPS [Dedvedev et al., 2021].

CR1g é expresso em células de Kupffer e macrófagos peritoneais, em células de Kupffer o receptor é importante por interagir com iC3b para eliminação de microrganismos circulantes além de promover a autofagia induzida pela infecção de bactérias intracelulares [Helmy et. al., 2006; Kim et. al., 2016].

#### 1.4 Sinalização Celular

Os receptores celulares de superfície têm a função de traduzir sinais bioquímicos do ambiente em atividades celulares, desde que o estímulo atinja o limiar necessário para a sinalização.

Após a ativação dos receptores de uma célula, eles podem desencadear em uma ou mais cascatas de sinalização. Tipicamente, receptores ativados ligam-se e ativam proteínas efetoras, que por sua vez ativam outras proteínas, direta ou indiretamente, e iniciando-se assim uma ou mais cascatas de sinalização. A ativação direta pode ser feita por interação que leve à mudança de conformação da proteína efetora ou por modificação covalente como fosforilação. A ativação indireta pode ser feita por segundos mensageiros, como cAMP ou  $Ca^{+2}$ , que uma vez produzidos ou liberados na célula, ligam-se a proteínas e enzimas de vias de sinalização, ativando-as. Os efeitos da sinalização celular são variados e dependem do sinal que a iniciou, da célula que recebe o sinal, e das condições do microambiente, como disponibilidade de nutrientes. A sinalização celular, disparada por receptores de membrana é essencial para diversas funções como migração, proliferação, secreção de moléculas, e até morte celular. No caso de macrófagos, podemos destacar geração de espécies reativas de oxigênio, secreção de citocinas, secreção de metaloproteinases, e fagocitose. Uma parte dessas atividades depende de transcrição de novos genes, implicando que a ativação de fatores de transcrição também é essencial na sinalização celular.

Entre os fatores de transcrição importantes para a biologia de macrófagos, um dos mais estudados é o Fator Nuclear *kappa* B (NF- $\kappa$ B), que possui papel fundamental para a inflamação, ativação de linfócitos, formação e sobrevivência dos órgãos linfoides secundários [Ghosh & Hayden, 2008; Alcamo et. al., 2002; Bogdanova et. al., 2018]. Outra importante via de sinalização que foi analisada neste projeto é a via da *Mitogen Activated Protein* (MAP) quinase (MAPK), responsável pela ativação de diversos fatores de transcrição como AP-1 [Allen & Aderem, 1996].

#### 1.4.1 Fator Nuclear *kappa* B (NF- $\kappa$ B)

Essa é uma família de fatores de transcrição que se liga a elementos consenso *kappa* B no promotor de diversos genes, em homo ou heterodímeros. Existem cinco proteínas NF- $\kappa$ B que possuem em comum um domínio de ligação ao DNA chamado RHD (*Rel Homology Domain*) [Gilmore, 2006; Liu et. al., 2017]. NF- $\kappa$ B1 (p50) e NF- $\kappa$ B2 (p52) possuem o domínio RHD, sendo capazes de ligar a DNA, mas não são capazes de transativação, embora sejam capazes de inibir transcrição. Já RelA (p65), RelB e c-Rel possuem tanto o domínio RHD quanto o de transativação, TAD (do inglês *transcription activation domain*) [Gilmore, 2006]. Para que a transativação da transcrição ocorra ambos os domínios são necessários, sendo assim, a proteína NF- $\kappa$ B1 forma heterodímeros com RelA (ou c-Rel) conhecidos como heterodímeros canônicos NF- $\kappa$ B. A ativação de NF- $\kappa$ B pode ser iniciada de diversas formas, pela sinalização de PRRs, citocinas e até mesmo TCR (receptor de antígeno da célula T) e BCR (receptor de antígeno da célula B) [Zhang & Sun, 2015; Liu et. al., 2017]. A sinalização por NF- $\kappa$ B é dividida em canônica e não canônica ou alternativa. A via canônica se caracteriza pela degradação da proteína inibidora I $\kappa$ B $\alpha$  após ubiquitinação de I $\kappa$ B $\gamma$  (ou NEMO), e ativação de I $\kappa$ B $\beta$  (estas três unidades formam o complexo enzimático trimérico IKK). I $\kappa$ B sequestra NF- $\kappa$ B no citoplasma através do bloqueio do peptídeo de sinalização nuclear (NLS – nuclear *localization sequence*). Quando I $\kappa$ B é degradado, a sequência de localização nuclear é exposta e o dímero é transportado para o núcleo, o que permite sua atividade. Já a ativação não canônica não envolve a degradação de I $\kappa$ B $\alpha$ , mas sim o processamento de NF- $\kappa$ B2 (p100) pela quinase indutora de NF- $\kappa$ B (NIK), que fosforila p100 permitindo quebra de p100 na subunidade p52, e eliminando os domínios de ankirina, o que permite que o dímero seja transportado para o núcleo, onde pode ligar a DNA. A via não-canônica parece ser ativada por sinais específicos, tal como a

superfamília dos receptores TNFR, estes são LT $\beta$ R, BAFFR, CD40 e RANK [Liu et. al., 2017].

NF- $\kappa$ B possibilita a transcrição de centenas de genes envolvidos na regulação do processo inflamatório, entre estes genes estão envolvidos a secreção de diversas citocinas e quimíocinas, e permitindo a sobrevivência da célula, angiogênese, proliferação e diferenciação dos linfócitos T, entre alguns transcritos pela ativação do NF- $\kappa$ B estão IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-12, BCL-2 ICAM-1 entre outros [Liu T. et. al., 2017].

#### 1.4.2 Fosfoinosítídeo 3-quinase (PI3K)

PI3K é uma enzima que pode ser recrutada para a membrana celular pela ativação de diversos receptores (entre eles os receptores de tipo Toll) por citocinas, fatores de crescimento, insulina e outros ligantes. Após ativação, PI3K catalisa a fosforilação de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol 3,4, 5 trifosfato (PIP3). PIP3 atua como um local de ancoragem para a serina-treonina quinase Akt (também conhecida como PKB, do inglês *Protein kinase B*) e dois ativadores adicionais, quinase-1 dependente de fosfoinosítídeo (PDK1) e alvo de mamífero do complexo 2 de rapamicina (mTORC2). Essas enzimas fosforilam a Akt nos resíduos Thr308 e Ser473, causando sua ativação [Ouyang et. al., 2000; Ozaita et. al., 2007].

A ativação de Akt está diretamente relacionada com a ativação de diversas proteínas que atuam como fatores de transcrição, entre estas proteínas estão eNOS [Fulton et. al., 1999], IKK [Ozes et. al., 1999], mTORC, que podem promover reprogramação metabólica em células cancerosas, síntese de proteínas, sobrevivência e proliferação celular [Lien et. al., 2016]. Em macrófagos, a via de Akt participa da polarização em fenótipos M1 ou M2 [Ruckerl et. al., 2012; Byles et. al., 2013; Vergadi et. al., 2017].

Existem três isoformas distintas descritas de Akt, Akt1/PKB $\alpha$ , Akt2/PKB $\beta$  e Akt3/PKB $\gamma$  [Franke, 2008]. Onde Akt1/PKB $\alpha$  seja a isoformas mais predominante e encontrada em todos os tecidos, ela está frequentemente associada no tecido nervoso com maior expressão em neurônios em regeneração [Cho et. al., 2001], Akt2/PKB $\beta$  associada a tecidos responsivos a insulina [Jones et. al., 1991; Konishi et al., 1994] e Akt3/PKB $\gamma$  me expresso no cérebro e testículo [Nakatani et. al., 1999].

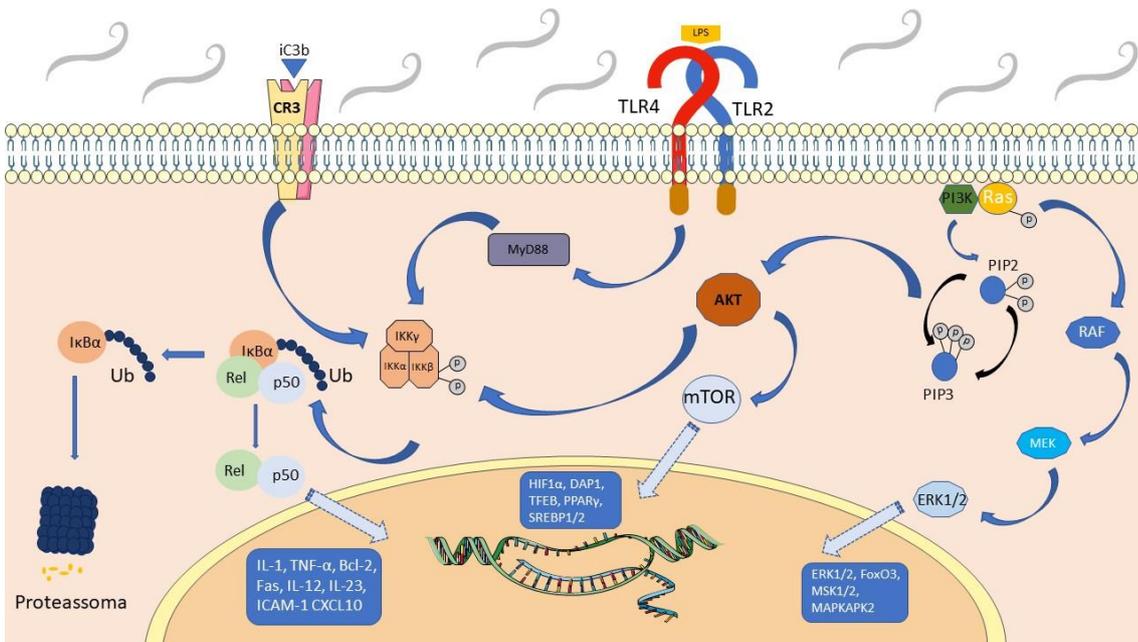
#### 1.4.3 Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK/ERK)

As proteínas que pertencem ao grupo das MAPK são proteínas citoplasmáticas que atuam sobre a transdução de sinais após algum estímulo, entre as proteínas descritas

encontram-se a família de quinase regulada por sinal extracelular (ERK), a família de quinase p38 e a família de quinase N-terminal c-Jun (JNK) [Roskoski et. al., 2012].

ERK é ativada principalmente por fatores de crescimento e influencia na adesão, crescimento e divisão celular [Roskoski et. al., 2012]. A ativação canônica da via é iniciada pela fosforilação de proteínas da família Ras por receptores transmembranas, gerando a ligação de Ras com trifosfato de guanosina (GTP), esta ligação permite a fosforilação de uma quinase específica denominada Raf, ativações sucessivas da via Ras → Raf → MEK, culminando na ativação e consequentemente transmigração de ERK [Roskoski et. al., 2012].

A ativação da via de MAPK tem efeitos diversos nas células, desde proliferação, até funções específicas de cada linhagem. No caso de macrófagos, as diferentes proteínas da via de MAPK estão envolvidas em modulação de fenótipo, reorganização do citoesqueleto, entre outras funções [Yoon & Seger 2006; Asano et. al., 2011].



**Figura 2. Esquema das vias de sinalização.** Demonstração esquemática das vias de ativação desencadeadas após a excitação dos receptores por seu respectivo ligando, TLR2/TLR4 (LPS), CR3 (iC3b) e o Receptor de Tirosina Quinase. Esta figura foi criada usando *Servier Medical Art*, licenciada sob uma *Creative Commons Attribution 3.0 Unported License*: <https://smart.servier.com>.

### 1.5 Leptospirose

A leptospirose é uma importante zoonose bacteriana causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*. Este gênero inclui espécies patogênicas, intermediárias e saprofíticas [Ko et al., 2009; Adler & Moctezuma, 2010]. A estimativa para o surgimento de novos casos desta doença chega aproximadamente a 1 milhão por ano, com mortalidade próxima de 60 mil casos anuais. [Costa et al., 2015].

A doença é encontrada especialmente em locais com clima tropical e ameno, devido à capacidade deste patógeno sobreviver em ambientes quentes e úmidos. As leptospiros têm como hospedeiro diversos animais como cães, gatos, suínos, bovinos, entre outros, mas os roedores são vistos como os principais hospedeiros de manutenção e transmissores para infecções em humanos especialmente em centros urbanos [Steneroden et al., 2011]. As leptospiros patogênicas muitas vezes geram um quadro clínico assintomático, tendo o ser humano como hospedeiro acidental. Esta infecção ocorre principalmente após contato com água ou solo contaminados pela urina de animais infectados com leptospiros [Levett, 2001].

A maior incidência de leptospirose é observada em países em desenvolvimento e carentes de infraestrutura básica necessária como tratamento de água e esgoto em grandes centros urbanos. Com isso, a urina de animais contaminados pode se misturar com focos de água facilitando assim a transmissão de leptospiros a partir do contato com feridas ou pelas mucosas. Durante períodos chuvosos os riscos são maiores, principalmente em casos de enchentes.

Uma vez tendo penetrado no hospedeiro, as leptospiros se locomovem para a circulação sanguínea, podendo gerar diversos problemas sistêmicos com diferentes manifestações clínicas. A doença pode ser dividida em fase aguda ou crônica. Durante a fase aguda os pacientes podem apresentar febre, fadiga, calafrios, fortes dores de cabeça, mal-estar, fotofobia, dor retro orbital, tosse, dores articulares e manchas pelo corpo. Tais sintomas são muito comuns em diversas doenças, dificultando o diagnóstico preciso nesta fase. Em casos mais graves a doença pode ocasionar icterícia acompanhada de esplenomegalia, insuficiência respiratória, dores abdominais, diarreia, insuficiência renal, conjuntivite, erupções cutâneas e hemorragia pulmonar [Levett, 2001; Adler & Moctezuma, 2010]. O quadro mais grave da doença é conhecido como Síndrome de Weil, pela descrição inicial do quadro sintomático de pacientes pelo médico Adolf Weil em 1886.

#### 1.5.1 *Leptospira* ssp.

As leptospiros possuem um envoltório celular com dupla membrana, sendo a membrana interna revestida por uma espessa camada de peptidoglicano e a membrana externa por lipopolissacarídeo (LPS), proteínas, lipoproteínas e lipídeos [Haake, 2000; Evangelista & Coburn, 2010]. São bactérias finas e móveis e no espaço periplasmático apresentam flagelos que impulsionam seu movimento em dois sentidos: rotação e translação;

possuem como característica sua forma típica helicoidal com extremidades em formato de gancho. Medem entre 0,1-0,2  $\mu\text{m}$  de largura e 6-20  $\mu\text{m}$  de comprimento (amplitude helicoidal de aproximadamente 0,1-0,15  $\mu\text{m}$  e de 0,5  $\mu\text{m}$  de comprimento) [Levett, 2001].

As leptospirosas, como diversos outros patógenos, desenvolveram diversos mecanismos para evadir o Sistema Complemento do hospedeiro, como a secreção de proteases [Fraga et al., 2014], a produção de biofilmes [Ristow et al., 2008] e aquisição de proteases e proteínas reguladoras do Complemento como FH e C4BP [Castiblanco-Valencia et al., 2012; Fraga et al., 2016; Barbosa & Isaac, 2018], além disso, as leptospirosas podem evadir a resposta imune através de algumas proteínas de membrana com ação inibitória como a LipL21 [Ratet et al., 2017]. Certas espécies patogênicas exibem também a capacidade de escapar do fagossomo [Toma et al., 2011].

Estudos anteriores demonstraram que os macrófagos têm um papel fundamental no combate das leptospirosas por meio da fagocitose [Chen X et al., 2017], sendo esses fagócitos as principais células no combate durante a resposta imune inata. A fagocitose de leptospirosas por macrófagos é muitas vezes mediada por proteínas do Sistema Complemento [Isogai et al., 1986], dentre estas, se destaca o papel de C3 para geração de opsoninas que auxiliam no combate da infecção, demonstrando assim a importância destes mecanismos no controle de leptospirose.

## **2. Hipótese de Trabalho**

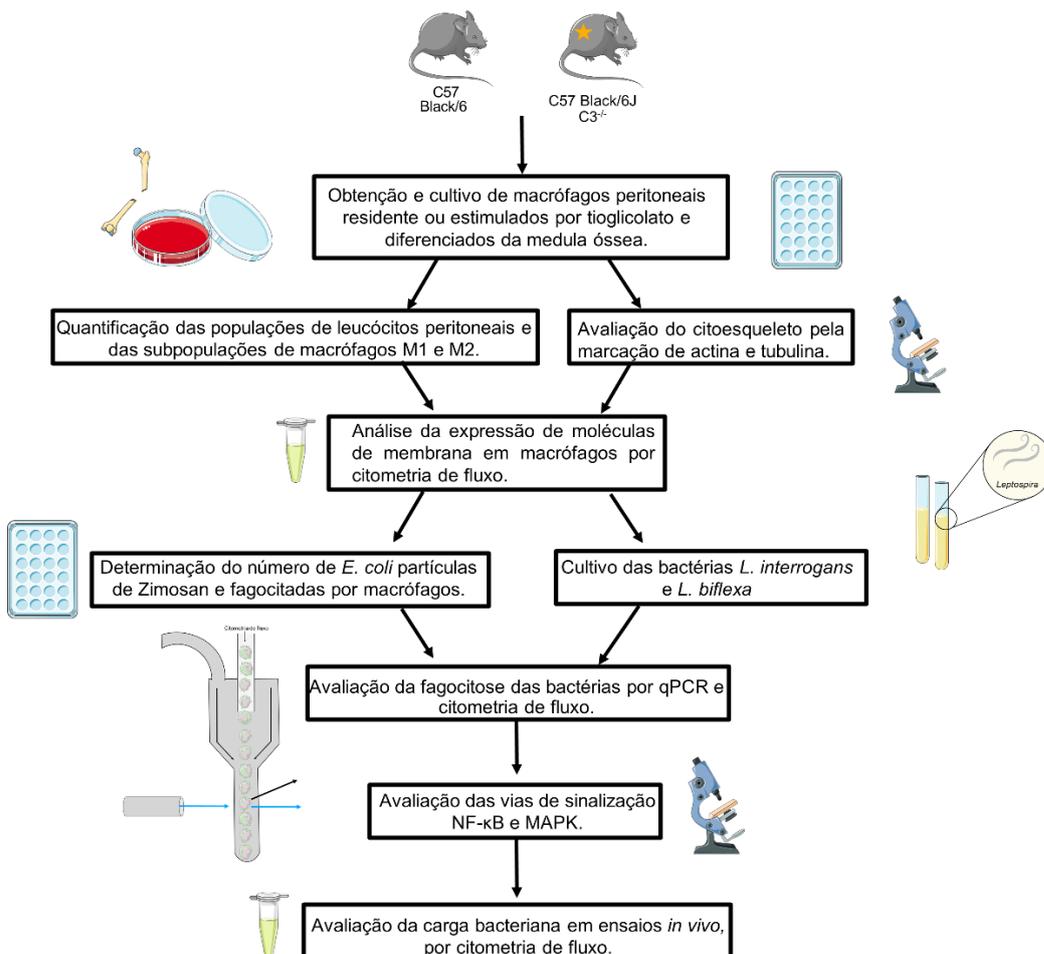
A nossa hipótese é que a deficiência da proteína C3 interfira em parâmetros celulares importantes para o mecanismo de fagocitose desempenhado por macrófagos murinos, tendo como possíveis alvos destas alterações geradas pela deficiência de C3 mecanismos de migração celular, a expressão de receptores na membrana ou a sinalização destes macrófagos.

### 3. Objetivos e Delineamento Experimental

#### 3.1 Objetivos Específicos

1. Quantificar as populações celulares de linfócitos B, neutrófilos e macrófagos no exsudato peritoneal.
2. Avaliar possíveis diferenças no citoesqueleto, comparando a presença de  $\alpha$ -tubulina e F-actina em macrófagos dos dois grupos de camundongos;
3. Investigar o papel do C3 para a expressão de moléculas que participam direta ou indiretamente da fagocitose de *L. interrogans*, *L. biflexa* e *E. coli* por macrófagos murinos. Para tanto, compararemos macrófagos de camundongos C57 Black/6J (selvagens; B6.C3<sup>+/+</sup>) com macrófagos de camundongos deficientes de C3 (B6.C3<sup>-/-</sup>);
4. Avaliar a expressão e ativação de *NF- $\kappa$ B*, MAPK (Erk 1/2) e PI3K durante a infecção *in vivo* por leptospiros por macrófagos de camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> e B6.C3<sup>-/-</sup>;
5. Quantificar da carga bacteriana e a fagocitose de leptospiros marcadas por macrófagos peritoneais durante uma infecção *in vivo* em camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> e B6.C3<sup>-/-</sup>.

#### 3.2 Delineamento Experimental



## 4. Material e Métodos

### 4.1 Camundongos

Para este trabalho foram utilizados macrófagos de camundongos machos C57Black6 (B6) selvagens (B6.C3<sup>+/+</sup>) e deficientes de C3 (B6.C3<sup>-/-</sup>) de 6 a 8 semanas da vida com mesmo fundo genético. Os camundongos B6.C3<sup>-/-</sup> foram adquiridos do *The Jackson Laboratory* e mantidos no Biotério de Camundongos do Instituto de Ciências Biomédicas do Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro (12/12 h), tendo água e comida esterilizada à vontade. **Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da USP – CEUA Protocolo 9308301118.**

### 4.2 Confirmação da deficiência de C3 dos animais B6.C3<sup>-/-</sup>

#### 4.2.1 Reação em cadeia empregando DNA Polimerase – PCR convencional

Para confirmar que a deficiência de C3 nos animais B6.C3<sup>-/-</sup>, macrófagos foram obtidos como descrito nos **itens 4.3 e 4.4**, e, após cultivo, 400 µl de Trizol (Sigma-Aldrich) foram adicionados às placas para lisar as células aderentes. Em seguida, as amostras foram processadas, seguindo o *kit Illustra Tissue & Cells Genomic Prep Mini Spin*, conforme instruções do fabricante, após as etapas de lise (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK para purificação. A concentração de DNA nas amostras foi quantificada por espectrofotômetro (Nano Drop 2000 – Thermo Fisher Scientific), seguido por congelamento a -20 °C até o momento do uso.

Para confirmação do genótipo, empregamos PCR convencional (**Tabela 1**), nas seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 95 °C por 1 min; 35 ciclos de 95 °C por 1min, 56 °C por 1 min e 72 °C por 1 min; e uma etapa final de 72 °C por 5min.

**Tabela 1– Reagentes e sequência de *primers* para PCR Convencional**

PCR		Sentido 5' → 3'
<b>Reagentes</b>		
Água	39,5 µl	
Tampão 10 x	5,0 µl	
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1,5 µl	
dNTP10mM	1,0 µl	
C3 Comum <i>Forward</i> 100 µM	0,5 µl	ATC TTG AGT GCA CCA AGC C
C3 Selvagem <i>Reverse</i> 100 µM	0,5 µl	GGT TGC AGC AGT CTA TGA AGG
C3 Mutante <i>Reverse</i> 100 µM	0,5 µl	GCC AGA GGC CAC TTG TGT AG
<i>Taq</i> DNA polimerase 50 U/µl	0,5 µl	
DNA 100 ng/µl	1,0 µl	
<b>Volume final</b>	<b>50,0 µl</b>	

#### 4.2.2 Análise por *Western blot*

Para avaliar a presença ou ausência de C3 nos soros dos camundongos empregados, um pequeno volume de sangue foi retirado e o soro foi separado (misturando o soro de pelo menos 3 camundongos de cada grupo) e diluído em três diferentes concentrações 1:100, 1:250 e 1:500 em PBS. Em seguida, o tampão da amostra 5X (Tris-HCl 50 mM pH 6,8; azul de bromofenol 0,1%; glicerol 10%;  $\beta$ -mercaptoetanol 100 mM; e, SDS 2%) foi adicionado por 5 min a 96 °C para redução das ligações dissulfeto e separação das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  da proteína C3. As amostras foram então submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS (SDS-PAGE) em concentração de 5% para o gel de empilhamento (tampão Tris-HCl, pH 6,8: Tris-HCl 0,5 M e SDS 0,1%; solução de acrilamida 30% contendo 29% de acrilamida e 1% de N,N'-metilenobisacrilamida; 10% de persulfato de amônio e TEMED: N,N,N',N'-tetrametilenodiamina). O gel de separação a 12% foi preparado com tampão Tris-HCl, pH 8,8: 1,5 M de Tris-HCl e 0,1% de SDS; solução de acrilamida a 30%; 10% de persulfato de amônio e de TEMED. A corrida foi efetuada a 120 V em tampão de corrida (25 mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS pH 8,3) à temperatura ambiente até as amostras percorrerem todo o gel. Em seguida, as amostras foram transferidas do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose empregando o sistema Mini-Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, CA., Estados Unidos), por 1 h a 350 mA em tampão de transferência (25 mM de Tris-HCl pH 8,3, 192 mM de glicina, 0,02% de SDS e 20% de etanol). Após transferência, a membrana foi incubada por 16-18h a 4 °C com PBS-T (0,05% de Tween 20 diluído em PBS) contendo 10% de leite desnatado. Por fim, a membrana foi incubada em agitação por 1 h em temperatura ambiente com o anticorpo primário anti-C3 de camundongos (Complement Technology) diluído em PBS-T (1:500) com 10% de leite para evitar ligações inespecíficas. Após este período, a membrana foi lavada em PBS-T por três vezes para retirada dos anticorpos que não se ligaram especificamente e o anticorpo secundário (anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase; diluição 1:10.000) foi adicionado nas mesmas condições (por 1 h em agitação, diluído em PBS-T contendo 10% de leite). Ao término da incubação, a membrana foi lavada novamente por três vezes com PBS-T. Em seguida, a solução de revelação de membrana (*kit* Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate-Pierce, Illinois, IL., Estados Unidos) foi adicionada, como descrito pelo fabricante e a

membrana foi exposta a um filme fotográfico (Hyper film – GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido).

#### 4.2.3 Avaliação da atividade hemolítica

Para avaliar a atividade da Via Alternativa do Sistema Complemento, hemácias de coelho foram utilizadas (Faculdade de Medicina da USP) devido à incapacidade destas células de se ligarem ao FH de camundongos. O FH é uma das principais proteínas reguladoras da Via Alternativa do SC, sendo assim a cascata de ativação das proteínas progride até a lise celular, permitindo avaliar a capacidade de ação do SC do soro dos camundongos. O sangue de coelho foi colhido e diluído em volumes iguais de solução de Alsever (20g/L dextrose, 8g/L Citrato de Sódio, 4g/L Cloreto de Sódio) para evitar a coagulação, logo após coleta, o sangue com a solução de Alsever foi armazenado a 4°C até o momento de uso (até 2 meses).

Para a análise 1-2 ml da suspensão foi lavada a  $1157 \times g$  por 10 min a 4 °C em tampão GVB-EGTA-Mg<sup>2+</sup> (VBS 5X: 41,9g/L de NaCl, 1g/L de barbiturato de sódio, 2,3g/L de ácido barbitúrico, pH 7,2; GVB: 1g gelatina dissolvida em 200 ml de VBS 5X para 1L; GVB-EGTA-Mg<sup>2+</sup>: 5 ml de EGTA 0,5M, 2,5 ml de Cloreto de Magnésio 0,2 M, 20 ml de GVB – diluído em água ultra pura até o volume final de 100 ml). Após a última lavagem, as hemácias foram ressuspensas no tampão GVB-EGTA-Mg<sup>2+</sup> para uma concentração final de 3% de hemácias.

O soro dos animais B6.C3<sup>+/+</sup> e B6.C3<sup>-/-</sup> foi obtido, misturado (por grupo) e diluído separadamente em diferentes concentrações 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 em PBS. Em seguida, 100 µl das diluições foram transferidas para poços de placas de 96 poços (Costar); em seguida, 50 µl das hemácias diluídas a 3% foram transferidas para cada poço. Como controles foram utilizados 100µl de H<sub>2</sub>O ou do tampão contendo 15µl de EDTA 0,5 M.

Por fim, as placas foram transferidas para estufa a 37 °C por 1h; ao final deste período 15 µl de EDTA 0,5M foram adicionados em cada poço para interromper a reação; a placa foi então centrifugada a  $514 \times g$  por 7 min em temperatura ambiente e o sobrenadante transferido para uma nova placa e a liberação de hemoglobina foi quantificada em espectrofotômetro a 405 nm.

#### 4.3 Obtenção e cultivo de macrófagos murinos

Camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> e B6.C3<sup>-/-</sup> receberam uma dose de 1 ml de tioglicolato (Sigma-Aldrich) 4% na região peritoneal (a solução de tioglicolato foi fervida por 15 min antes da injeção) ou receberam apenas PBS estéril como controle negativo. Após 48h, estes animais foram eutanasiados com isoflurano (anestésico inalatório - todo o procedimento ocorreu seguindo as normas submetidas e aceitas pelo CEUA USP). Após a morte do animal, a cavidade peritoneal foi exposta e seu interior lavado com PBS e aspirado para coleta do exsudato peritoneal. As células obtidas foram centrifugadas a 289 x g por 10 min a 4 °C e o sedimento foi ressuspenso em DMEM (Gibco) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB - Interlab) inativado previamente a 56 °C por 1 h. Em seguida, as células foram contadas e mantidas em placas de cultura (Costar) em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> por duas horas para adesão. Após este período, as placas foram lavadas com PBS para retirada de células não aderentes como neutrófilos e linfócitos B. A maioria das células que permaneceram aderidas correspondem em macrófagos. Um novo volume fresco de DMEM contendo 10% de SFB foi adicionado a cada placa. As culturas foram mantidas na estufa nas mesmas condições por 16-18 h até sua utilização. Além de macrófagos peritoneais, também usamos neste estudo macrófagos derivados da medula óssea. Para tanto, a tíbia e fêmur também foram retirados dos mesmos animais para obtenção de células da medula óssea.

#### 4.4 Diferenciação em macrófagos a partir de células da medula óssea

Após eutanásia, o fêmur e tíbia foram retirados dos camundongos, em seguida um pequeno corte nas extremidades de cada osso foi realizado e com o auxílio de uma seringa e o interior de cada osso foi lavado com PBS para obtenção das células ali contidas. Após coleta, as células foram centrifugadas a 289 x g por 10 min a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e 1ml de tampão para lise das hemácias (155mM NH<sub>4</sub>Cl, 10mM NaHCO<sub>3</sub> e 0,1mM EDTA - pH 7,2) foi adicionado por 1 min. Em seguida, 3 ml de PBS foram adicionados e as células centrifugadas novamente a 289 x g por 10 min a 4 °C. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi ressuspenso em DMEM com 10% SFB e 30% do sobrenadante das células L929. Este sobrenadante foi obtido após cultivo de 7 dias de 1x10<sup>6</sup> de células L929 (fibroblastos murinos) como fonte de M-CSF em meio DMEM com 10% de SFB mantidos na estufa a 37 °C em concentração de 5% de CO<sub>2</sub>, após este período o sobrenadante foi filtrado e armazenado a -20 °C até o momento do uso [Weischenfeld and Porse, 2008].

#### 4.5 Obtenção dos soros dos camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> e B6.C3<sup>-/-</sup>

Camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> e B6.C3<sup>-/-</sup> foram anestesiados com 200µl de solução de PBS contendo 10% Cetamina e 5% Xilazina (Syntec) via intra-peritoneal. Após confirmação do efeito anestésico, o sangue dos animais foi retirado a partir de uma incisão na região submandibular. O sangue foi centrifugado a 1700 x g por 10 min a 4 °C para separação do soro, sendo este alicotado e armazenado a -80 °C até o momento de uso. Após eutanásia, o sangue dos animais não infectados também foi retirado por punção cardíaca.

#### 4.6 Quantificação da população celular no exsudato peritoneal

Células do exsudato peritoneal de camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> e B6.C3<sup>-/-</sup> foram coletadas como descrito anteriormente. As células foram marcadas com anticorpos monoclonais (Biolegend – **Tabela 2**) anti-F4/80 (macrófagos), anti-CD19 (linfócitos B) e anti-Ly6G (neutrófilos). Para quantificação de macrófagos M1 e M2, a população celular F4/80<sup>+</sup> foi selecionada e a população positiva para CD206 foi dividida para quantificar as populações M1 (CD206<sup>low</sup>) e M2 (CD206<sup>high</sup>). Após as marcações, as populações foram analisadas por citometria de fluxo para quantificação e comparação do número total de células obtidas e frequência entre os dois grupos de animais.

**Tabela 2. Anticorpos conjugados usados para marcação celular**

Células e Receptores	Anticorpo	Fluorocromo
Macrófago	F4/80	APC/Cy7
CCR7	Anti-CD197	PerCP-Cy5.5
Receptor de Manose	Anti-CD206	APC
<i>Toll Like Receptor 2</i>	Anti-CD282	PE
<i>Toll Like Receptor 4</i>	Anti-CD284	APC
<i>Scavenger Receptor-B</i>	Anti-CD36	PerCP-Cy5.5
Receptor de Complemento 1 e 2	Anti-CD35/21	PerCP-Cy5.5
Receptor de Complemento 3	Anti-CD11b	FITC
Receptor de Complemento 4	Anti-CD11c	PE/Cy7
FcγRI	Anti-CD64	Pacific Blue
MHC classe II	Anti-I-A <sup>b</sup>	Alexa Fluor 488
B7	Anti-CD80	PerCP-Cy5.5
LFA - 1	Anti-CD11a	PerCP-Cy5.5
Neutrófilo	Anti-Ly6g	PE
Linfócito B	Anti-CD19	PE/APC

#### 4.7 Avaliação da presença de proteínas do citoesqueleto

Os macrófagos foram obtidos como descrito anteriormente e  $2 \times 10^5$  foram cultivados em placas de 24 poços (TPP) e no dia seguinte os poços foram lavados com PBS e as células fixadas com PFA 4% contendo 5mM EGTA por 10 min. Em seguida, o PFA foi aspirado e as células foram lavadas em PBS por duas vezes, e uma última vez com PBS-TX (0,1-0,5% de Triton X) durante 10 min para permeabilizar as células. Para impedir ligações inespecíficas, as células foram bloqueadas por 30 min em 2,5% de BSA (albumina sérica bovina) diluída em PBS-TX em um volume final de 50  $\mu$ l. Após bloqueio, o anticorpo primário anti- $\alpha$ Tubulin (sc-8035, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), diluído 100x em PBS-TX, foi incubado à temperatura ambiente no escuro. No dia seguinte, os macrófagos foram lavados 3 x com PBS-TX e o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor 568; diluição 1:500) juntamente com Faloidina (Alexa Fluor 488; diluído 1:100) foram acrescentados por 1h. Por fim, uma nova lavagem foi feita em PBS-TX e uma última em água ultrapura, a solução de montagem contendo 4', 6-diamidino-2-fenilindol - DAPI - (ProLong Gold antifade Mountant– Invitrogen) foi acrescentada para corar os núcleos das células. As imagens foram geradas por *High Content Imaging InCell Analyzer 2200* GE (CEFAP – USP) e analisadas pelo *software ImageJ* para avaliação do citoesqueleto.

#### 4.8 Avaliação da presença de moléculas de membrana em macrófagos murinos

Os macrófagos de camundongos foram obtidos como já descrito acima. As células aderentes foram soltas das placas com o auxílio de solução de EDTA 5mM diluída em PBS; as placas ficaram sobre gelo por 10 min para facilitar a retirada celular. Em seguida, os macrófagos foram lavados por duas vezes com PBS contendo 2% de SFB a 289 x g por 10 min a 4°C. Após as lavagens, o sedimento foi ressuscitado no PBS com 2% de SFB juntamente com diferentes anticorpos (**Tabela 2**) visando à avaliação da expressão de diversas moléculas presentes na superfície de macrófagos. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo.

#### 4.9 Fagocitose de Zimosan

Zimosan-FITC (Thermo Fisher Scientific) é obtido da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, comumente utilizado como ativador da Via Alternativa do Sistema Complemento e aqui usado conjugado com FITC (isotiocianato de fluoresceína; Zimosan-FITC). Suspensões de Zimosan-FITC foram tratadas com

diferentes concentrações de soros dos animais B6.C3<sup>+/+</sup> B6.C3<sup>-/-</sup> como fonte de opsoninas por 30 min em agitador a 37 °C a 200 rpm no escuro. Após este período, as suspensões de Zimosan-FITC foram lavadas com PBS a 289 x g por 10 min a 4 °C para retirada de proteínas que não se ligaram à parede do fungo. Em seguida, as partículas de Zimosan-FITC foram incubadas com os macrófagos [peritoneais ou diferenciados da medula óssea de camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> e B6.C3<sup>-/-</sup> - concentração de MOI 0,5 (ou seja 1 partícula de Zimosan para cada 2 macrófagos) e MOI 1] por 1 h em estufa a 37 °C, sob tensão de 5% de CO<sub>2</sub> em placas de 35 mm de diâmetro para cultivo de células (Kasvi). Por fim, os poços foram lavados para retirada do excesso de Zimosan-FITC não endocitado e as células foram soltas das placas com o auxílio de solução EDTA 5mM por 10 min a 0 °C, para posterior análise por citometria de fluxo.

#### 4.10 Fagocitose de *E. coli* K12

Suspensões de *E. coli* E-2861 cepa K-12 conjugadas com FITC (Thermo Fisher Scientific) foram utilizadas em diferentes concentrações tendo sido previamente tratadas com PBS ou com soro de B6.C3<sup>+/+</sup> ou B6.C3<sup>-/-</sup> por 30 min em agitador a 37 °C a 200 rpm no escuro. Após este período, as bactérias foram lavadas com PBS a 289 x g por 10 min a 4 °C para retirada de proteínas séricas que não se ligaram à membrana. Em seguida, as bactérias foram ressuspendidas e incubadas com macrófagos peritoneais (residentes ou após estímulo com tioglicolato) ou macrófagos diferenciados da medula óssea de camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> ou B6.C3<sup>-/-</sup>, por 1 h a 37 °C em concentração de 5% de CO<sub>2</sub> em placas de 35 mm de diâmetro para cultivo de células (Kasvi). Por fim, as células foram retiradas das placas com auxílio de solução de EDTA 5mM e analisadas por citometria de fluxo.

#### 4.11 Obtenção e cultivo de *Leptospira* ssp.

As culturas de *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm (LPF - patogênica) e *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I (Patoc - saprofítica) foram gentilmente cedidas pelo Professor Dr. Marcos Bryan Heinemann (Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária – USP). As bactérias patogênicas foram obtidas a partir de macerado do fígado de hamsters infectados com doses letais de LPF. Os órgãos foram retirados logo após a morte desses animais, garantindo assim a virulência da suspensão de LPF a ser empregada.

Após obtenção da cepa patogênica e saprofítica, as bactérias foram mantidas por 7 dias em estufa bacteriológica a 29 °C sob condições aeróbicas em 10 ml de meio de cultura EMJH (líquido – BD Difco ® – EUA, suplementado com 0,015% de L-asparagina, 0,001% de piruvato de sódio, 0,001% de cloreto de cálcio, 0,001% de cloreto de magnésio e 10% de meio de enriquecimento para cultura de leptospira - Difco). Após uma semana, 2 ml do cultivo bacteriano foram transferidos para novos tubos com acréscimo de 8 ml de meio novo para repique das bactérias. Ao final de duas passagens, depois de retirada das bactérias do macerado dos órgãos dos animais, as bactérias foram congeladas a -80 °C com 10% de glicerol e armazenadas até o momento de uso.

Para preparação das bactérias, as suspensões de leptospiros patogênicos e saprofíticos foram descongeladas, lavadas com PBS e centrifugadas a 5432 x g por 20 min a 25 °C para retirada do glicerol. Em seguida, o sedimento foi ressuscitado em 10 ml de meio EMJH e as bactérias foram mantidas separadamente em estufa a 29 °C em condição aeróbica por 7 dias para crescimento. Após este período, as bactérias foram transferidas para tubos Falcon e lavadas por 3x em PBS a 5432 x g por 20 min a 25 °C. Ao final o sedimento foi ressuscitado em 1 ml de PBS e um volume de 4 µl da ressuspensão diluído 60x foi utilizado para contagem das bactérias em câmara de Petroff-Hausser em microscópio de campo escuro (microscópio óptico Olympus BX51 - Olympus, Shinjuku, Tóquio, Japão).

#### 4.12 Fagocitose de *Leptospira* por macrófagos

As bactérias em cultura foram lavadas 3x com PBS 1X a 5432 x g por 20 min a 25 °C, quando então a suspensão foi então transferida para novos tubos *Eppendorf* e incubadas com 10% de soro dos camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> ou de B6.C3<sup>-/-</sup>, ou apenas com PBS 1X como controle negativo por 30 min em agitador a 37 °C e 200 rpm para opsonização. Em seguida uma nova centrifugação foi feita e o sedimento foi ressuscitado em DMEM sem antibiótico e sem SFB. Após lavagem, as bactérias foram transferidas para placas de 24 poços (Costar) que continham 5x10<sup>5</sup> de macrófagos obtidos de camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> ou B6.C3<sup>-/-</sup>, tanto da cavidade peritoneal quanto diferenciados a partir da medula óssea. As bactérias foram incubadas com culturas de macrófagos (MOI 25, 50 ou 100) em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> por 30 min. Ao término deste período, os poços foram lavados com PBS e 50 nM de gentamicina diluída em DMEM sem SFB foi adicionado em volume de 200 µl por 1h em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> para matar as bactérias que não foram englobadas. Por fim, os poços foram lavados com PBS

e 400 µl de Trizol (Sigma-Aldrich) foram adicionados e logo em seguida as placas foram mantidas a 20 °C até o momento da extração de DNA total para quantificação da presença de leptospiros por PCR quantitativo (qPCR).

Além da quantificação por qPCR, a fagocitose de leptospiros foi também avaliada por citometria de fluxo. Para tanto, as bactérias foram incubadas a 37° C em agitador a 200 rpm por 30 min com 10µM de CSFE (Sigma-Aldrich) como descrito por Liu *et. al* (2014). Em seguida, as leptospiros foram lavadas com PBS e incubadas com os soros de B6.C3<sup>+/+</sup>, B6.C3<sup>-/-</sup> ou apenas meio como controle, por 30 min. Posteriormente as bactérias foram lavadas e incubadas com os macrófagos e, ao final da incubação, as culturas de macrófagos foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% por 10 min e as amostras analisadas por citometria de fluxo.

#### 4.13 Extração do DNA de leptospiros

O DNA de *L. interrogans* e *L. biflexa* foi extraído para quantificação do número de bactérias fagocitadas pelos macrófagos provindos dos diferentes grupos de camundongos. Após o ensaio de fagocitose, o antibiótico gentamicina foi acrescentado para matar as bactérias não fagocitadas e 400 µl de Trizol foram adicionados para lisar a cultura de células aderentes. Em seguida, as placas foram congeladas (como descrito anteriormente). Para o protocolo de extração foi utilizado o *kit IllustraTissue & Cells Genomic Prep Mini Spin*, conforme instruções do fabricante, após as etapas de lise (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK).

Para quantificação absoluta, o DNA de 1x10<sup>9</sup> leptospiros (contadas em câmara de Petroff-Hausser) foi extraído e quantificado para construção de curva padrão, seguindo diluição logarítmica na base 10. A partir disto, o DNA amplificado das amostras foi comparado com os valores obtidos a partir da construção da curva padrão e a quantificação do número de bactérias das amostras foi então determinada.

#### 4.14 qPCR

A concentração máxima utilizada foi 50 ng de DNA. A reação de amplificação foi realizada em microplacas (*MicroAmp™ Optical 96-Well* - Life Technologies) onde 20 pmol/µl de cada sequência de oligonucleotídeos para a região específica do gene *16S rRNA* de *Leptospira* [*forward*: 5'- TAGTGAACGGGATTAGATAC- 3' e *reverse*: 5'- GGTCTACTTAATCCGTTAGG-3'] 10 µl de *Syber Green Master Mix* (Life Technologies) e 3 µl de DNA total das amostras de macrófagos incubados com

leptospiras em um volume final de 20 µl. As condições experimentais feitas em sequência foram: desnaturação inicial a 95 °C por 10 min; seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 s; 60 °C por 1 min; dois ciclos de 95 °C por 15 s; 60 °C por 1 min; e uma etapa final a 0,5 – 95 °C (rampa) por 15 s. As amostras foram amplificadas no Termociclador QuantStudio 3 Real-Time PCR Systems (Thermo Fisher Scientific). Como controle endógeno da reação, o gene 18S [*forward*: 5'–GGACAGGATTGACAGATTGATAGC–3' e *reverse*: 3'–TGCCAGAGTCTCGTTCG TTA – 5'] de mamíferos foi amplificado. A confirmação da especificidade da reação foi avaliada pela construção da curva de *melting* que indicou a presença de um único pico de dissociação. Os dados obtidos foram considerados confiáveis apenas quando onde o controle negativo (sem DNA) não foi amplificado ou demonstrava uma amplificação tardia (após 30 ciclos), além disto, paralelamente, a eficiência da reação foi avaliada com o uso de diferentes concentrações de DNA bacteriano. Eficiência próxima de 100% e o R<sup>2</sup> mínimo de 0,95 foram requisitos necessários para que os dados fossem considerados nas análises.

#### 4.15 Avaliação do estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são reconhecidas sinalizadoras da resposta celular e desempenham um papel crucial na eliminação de microrganismos. Com o objetivo de avaliar a ação de ROS dos macrófagos utilizamos a marcação com iodoacetamida (conjugada com FITC). Iodoacetamida tem a capacidade de se ligar a resíduos de cisteína reduzidas por ROS, sendo assim, os macrófagos foram estimulados com 10 ng/ml de LPS ou TPA por 30 min para ativação das células. Após este período, as células foram lavadas com PSB 1X por três vezes para retirada do excesso de TPA ou LPS e 5mM de EDTA foi utilizado para que as células aderidas em placas se soltassem e ficassem em suspensão. Em seguida, as células foram centrifugadas a 289 x g por 10 min a 4 °C e o sedimento foi marcado com Iodoacetamida-FITC (Sigma-Aldrich) diluído 20.000X por 30 min sobre o gelo. Por fim, as células foram centrifugadas a 289 x g por 10 min a 4 °C para retirada da Iodoacetamida-FITC livre; as células foram ressuspensas em PBS para quantificação da fluorescência por citometria de fluxo.

#### 4.16 Avaliação das vias de sinalização

Os macrófagos diferenciados da medula óssea ( $5 \times 10^5$  células/poço) foram ativados previamente com 10 ng/ml de LPS, 10 ng/ml de TPA ou PBS por 30 min. Em seguida as células foram e fixadas com 1% de PFA por 10 min. Após fixação as células foram

permeabilizadas com metanol 90% por 1 min, os poços foram lavados com PBS 1x por três vezes, em seguida o bloqueio foi feito com a utilização de FC Block por 10 min e os anticorpos primários anti-phospho p44/42 (MAPK) e anti-phospho p65 NF-κB (Cell Signaling Technology) foram acrescentados por 20 min. Após a marcação os poços foram lavados com PBS e o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho conjugado com FITC) foi utilizado por 30 min. Por fim, as células foram analisadas em microscopia de fluorescência.

#### 4.17 Avaliação da fagocitose de *L. interrogans in vivo*

As bactérias virulentas foram lavadas com PBS 1x três vezes e coradas com CSFE (como descrito no capítulo 4.10), em seguida, foram incubadas ou não com 10% ou 20% de soro de camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> para opsonização por 30 min, posteriormente as bactérias foram lavadas novamente por três vezes com PBS 1x para retirada do excesso de proteínas do soro e  $1 \times 10^8$  (dose sub-letal) de bactérias viáveis suspensas em volume final de 200 µl de PBS foram injetadas na cavidade peritoneal de camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> ou B6.C3<sup>-/-</sup>. Após 1h, os animais foram eutanasiados, a suspensão de células peritoneais obtida e fagocitose foi quantificada por citometria de fluxo.

#### 4.18 Citometria de fluxo

As amostras preparadas anteriormente foram transferidas para tubos de citometria em volume final de 200 µl já ressuspensas em PBS com 2% de SBF e analisadas em citômetro FACS Canto II (ICB-USP) pelo software *FACS Diva*. Os dados obtidos foram analisados em *FlowJo*. Utilizamos também citômetro *Flow Sight* – Amnis (IB-USP) para geração de imagens que foram analisadas em *software IDEAS*. Todos os anticorpos utilizados estão indicados na **Tabela 2**.

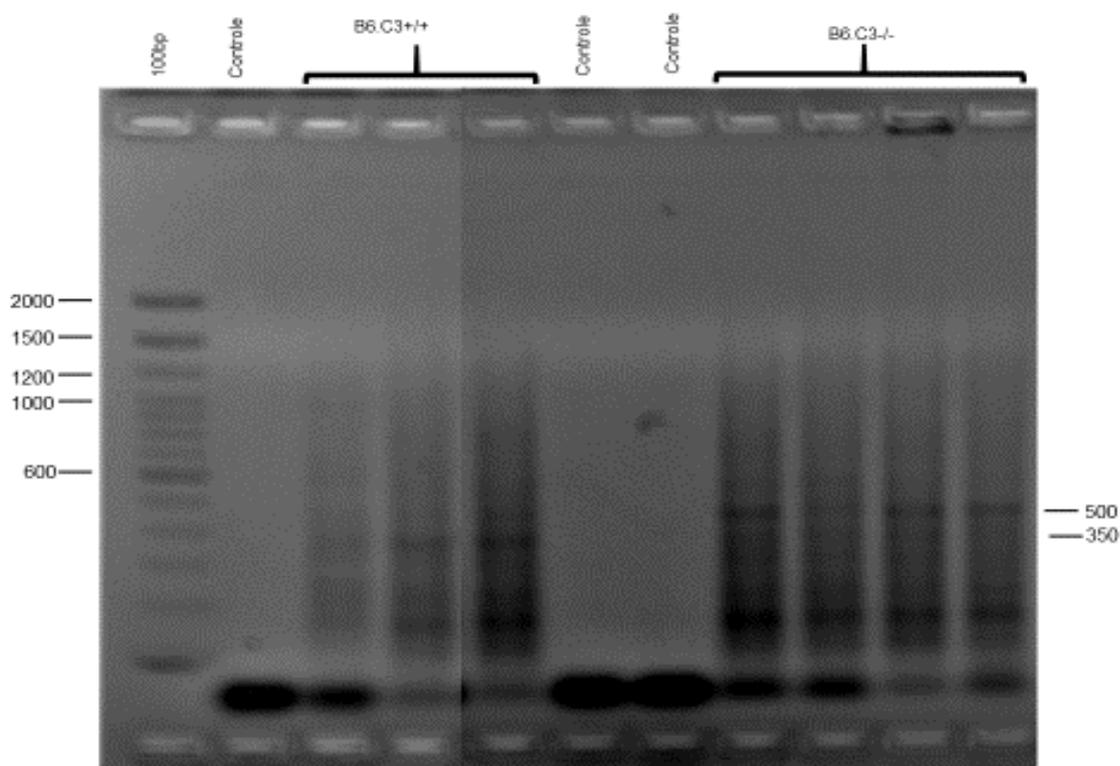
#### 4.19 Análise estatística

Todos os dados obtidos foram analisados em *software* GraphPad Prism seguindo o teste *t*-Student ou Anova *Two-way*, com a utilização do teste de Tukey como pós teste. Foram aplicados os valores de \* $p < 0,5$ ; \*\* $p < 0,1$ ; \*\*\*  $p < 0,01$ ; e \*\*\*\* $p < 0,001$ . ΔMFI foi obtido a partir da divisão de cada amostra pela média do controle de cada dia do experimento (como referência foram considerados os valores obtidos da análise dos camundongos B6.C3<sup>+/+</sup>).

## 5. Resultados

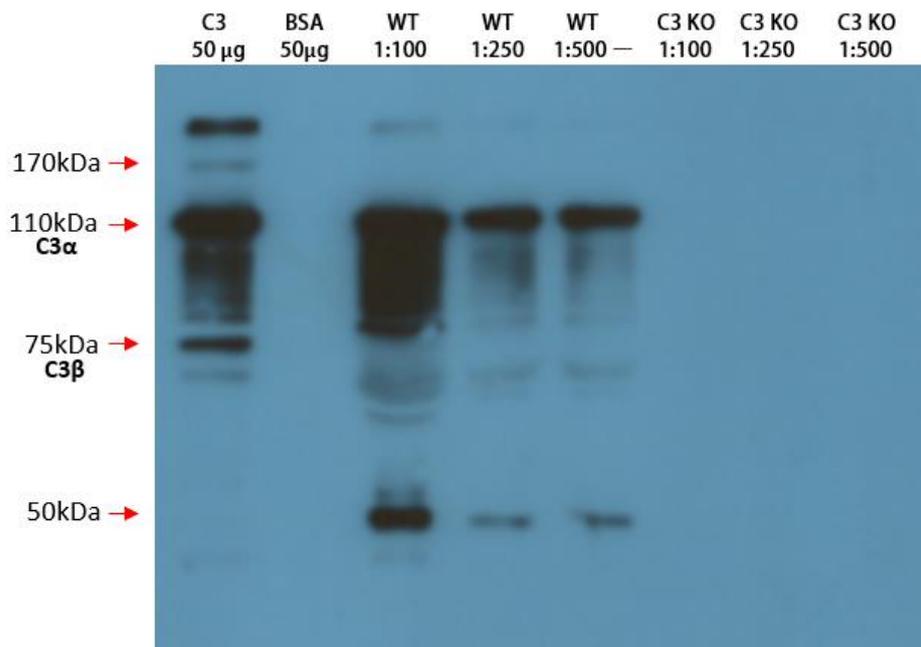
### 5.1 Confirmação da deficiência de C3 dos animais B6.C3<sup>-/-</sup>

Para confirmar o genótipo dos camundongos empregados neste estudo, amostras de DNA foram extraídas de culturas de macrófagos oriundos de B6.C3<sup>+/+</sup> e B6.C3<sup>-/-</sup>. Os produtos podem apresentar 3 padrões distintos: a) uma banda com 500 pb (homozigose; B6.C3<sup>-/-</sup>); b) uma banda com 350 pb (homozigose B6.C3<sup>+/+</sup>); c) duas bandas, sendo uma de 350 pb e a outra de 500 pb (heterozigose B6.C3<sup>+/-</sup>). Observamos que amostras de DNA de todos os animais deficientes de C3 amplificaram um produto de 500 pb, enquanto amostras de DNA de B6.C3<sup>+/+</sup> amplificaram um produto de 350 pb, como esperado (**Figura 2**).

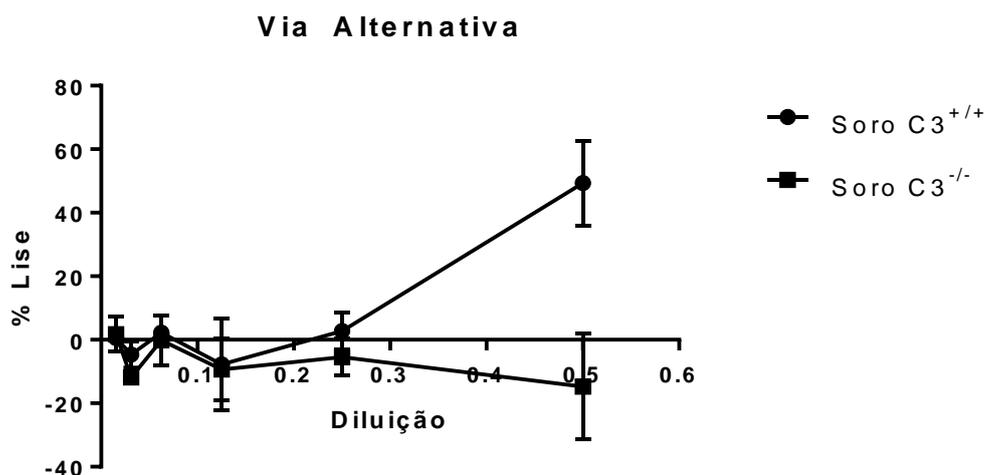


**Figura 3. Genotipagem de amostras de DNA de camundongos, após eletroforese em gel de agarose.** Amostras de DNA de camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> e B6.C3<sup>-/-</sup> foram obtidas a partir de macrófagos peritoneais ou diferenciados da medula óssea. Os produtos amplificados por PCR convencional foram analisados após eletroforese em gel de agarose 1%. O tamanho das bandas resultantes foi comparado com o marcador de 100pb. Como controle negativo, a PCR também foi realizada sem adição de DNA.

Para confirmar por outro método a ausência da secreção de C3 nos camundongos deficientes, o sangue foi coletado e a presença da proteína no soro de camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> e B6.C3<sup>-/-</sup> foi avaliada por Western Blot usando anticorpos primários específicos anti-C3 murino. Duas bandas equivalentes às cadeias C3 $\alpha$  (110 kDa) e C3 $\beta$  (70 kDa) foram visualizadas apenas quando o soro de B6.C3<sup>+/+</sup> foi empregado (**Figura 4**).



**Figura 4. Avaliação da presença de C3 no soro de camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> e B6.C3<sup>-/-</sup>.** O sangue de camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> e B6.C3<sup>-/-</sup> foi diluído em diferentes concentrações. As proteínas foram reduzidas na presença de tampão de amostra para observação das cadeias α (110 kDa) e β (70kDa) de C3.

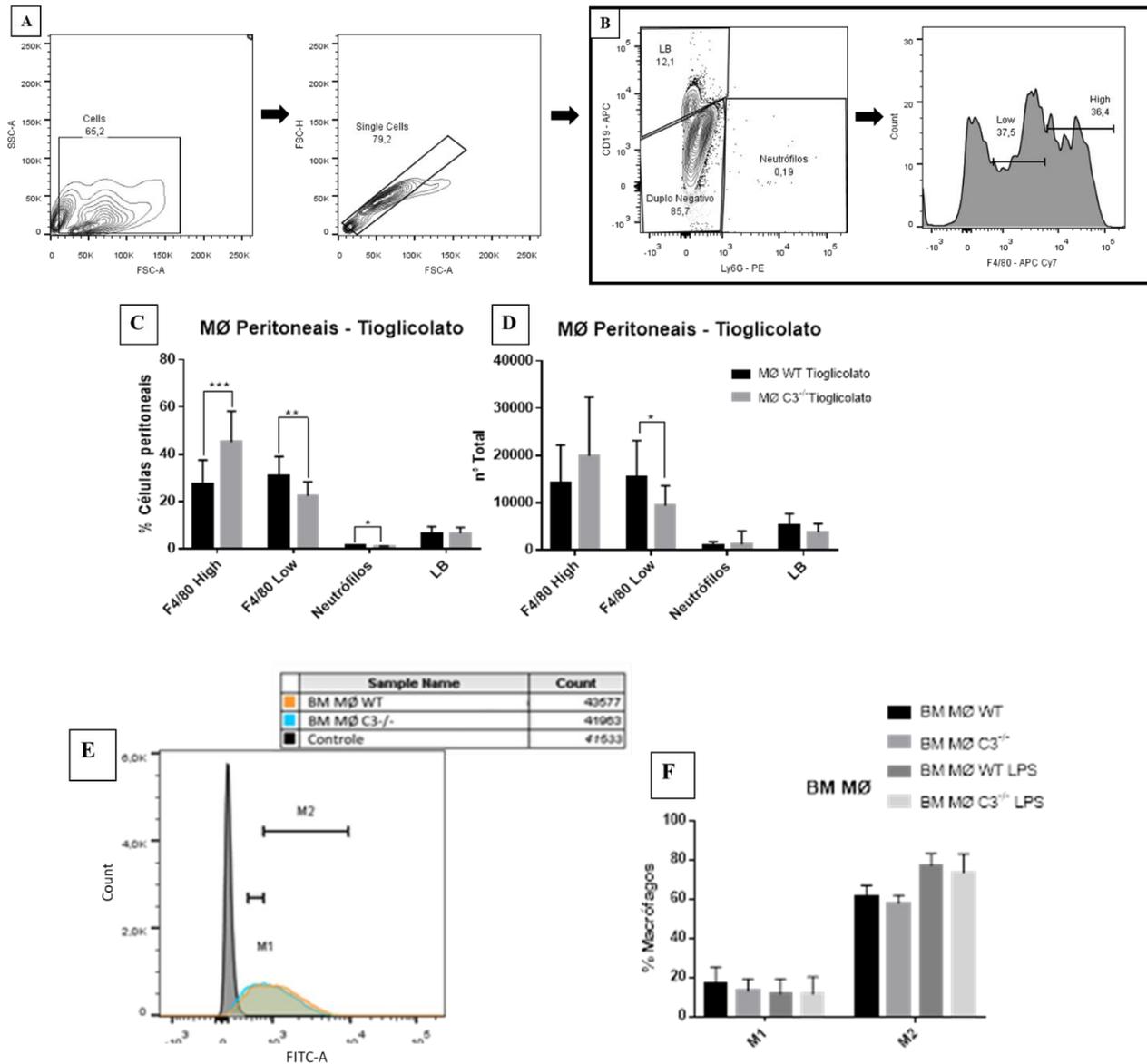


**Figura 5. Avaliação da atividade hemolítica mediada pela Via Alternativa no soro de camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> e B6.C3<sup>-/-</sup>.** Diluições em PBS de soro de camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> ou B6.C3<sup>-/-</sup> foram incubadas com 3% de hemácias de coelho para avaliação da formação do MAC, após ativação da Via Alternativa. A lise foi quantificada pela hemoglobina liberada, medida a 405nm. Como controle positivo (100% de lise) e controle negativo (0% de lise) a suspensão de hemácias foi lisada com água e apenas com o tampão respectivamente.

Para avaliar a ação da Via Alternativa, um ensaio hemolítico empregando hemácias de coelho foi realizado e a liberação de hemoglobina quantificada por absorvância no comprimento de onda de 405nm. Aproximadamente 50% de lise das hemácias foi observada com a diluição 1:2 (0,5) de soro de camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> enquanto esta atividade lítica não foi observada com soro dos camundongos B6.C3<sup>-/-</sup> (**Figura 5**).

## 5.2 Quantificação diferencial de leucócitos no exsudato peritoneal

Para avaliar se a deficiência de C3 poderia influenciar a população de leucócitos no exsudato peritoneal, camundongos selvagens e deficientes de C3 receberam uma dose de tioglicolato (4%), e após 48h os animais foram anestesiados e sacrificados e as células peritoneais obtidas foram quantificadas por citometria de fluxo.



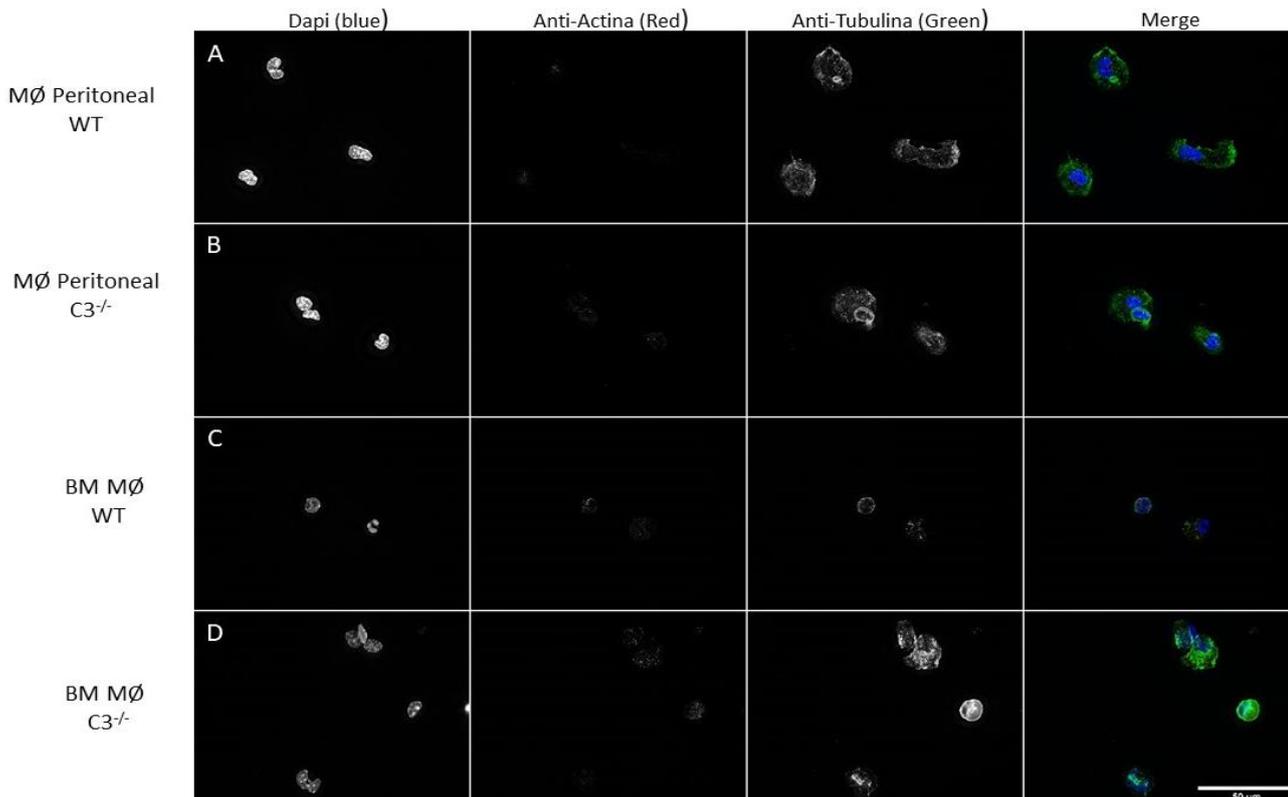
**Figura 6. Quantificação de populações celulares no exsudato peritoneal.** Leucócitos peritoneais oriundos de camundongos previamente estimulados com tioglicolato foram ressuspensos em 200 µl de PBS (2% SFB) e adquiridos em citômetro. **A:** Representação de *gates*, onde inicialmente foi selecionada a população celular pelo tamanho e complexidade, dentro desta um segundo gráfico foi construído e foi selecionado *single cells* (células individuais) onde os *doublets* foram excluídos. **B:** População de células individuais, representando separadamente as populações Ly6G<sup>+</sup> e CD19<sup>+</sup> (dotplot) dentro da população duplo negativa foi construída as separações para F4/80<sup>high</sup> e F4/80<sup>low</sup> (histograma) e). **C-D:** Frequência e número total de células (respectivamente) positivas para Ly6G (neutrófilos), CD19 (LB – linfócito B) ou F4/80 (macrófagos); **E:** Histograma construído a partir das células F4/80 positivas e selecionadas como macrófagos M1 (CD206<sup>low</sup>) e M2 (CD206<sup>high</sup>); **F:** quantificação de macrófagos M1 e M2 após diferenciação da medula óssea. n=8. A análise da frequência e o número total de células foram avaliados por *FlowJo* e os dados obtidos analisados no *software* GraphPad Prism, empregando o teste *t*-Student.

\*  $p < 0,5$ ; \*\*  $p < 0,1$ ; \*\*\*  $e, p < 0,01$ .

A frequência de neutrófilos presentes em camundongos deficientes de C3 ( $0,68\% \pm 0,15$ ) foi inferior àquela observada em camundongos selvagens ( $1,2\% \pm 0,15$ ). Também foi observada uma menor frequência de macrófagos expressando relativamente pouco o marcador F4/80 (F4/80<sup>low</sup>) em camundongos B6.C3<sup>-/-</sup> ( $22,39\% \pm 1,57$ ) em comparação com camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> ( $30,97\% \pm 2,32$ ). Já a frequência de macrófagos que expressam com maior intensidade o marcador F4/80 (F4/80<sup>high</sup>) na superfície foi superior em camundongos B6.C3<sup>-/-</sup> ( $45,25\% \pm 3,46$  - B6.C3<sup>+/+</sup>  $27,45\% \pm 2,89$ ). O número total de macrófagos F4/80<sup>low</sup> na superfície foi menor em camundongos B6.C3<sup>-/-</sup> ( $15488 \pm 2057$ ) do que em B6.C3<sup>+/+</sup> ( $9399 \pm 1089$ ). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre o número total de linfócitos B, neutrófilos e macrófagos F4/80<sup>high</sup>. Avaliamos também o fenótipo para macrófagos M1 e M2 a partir da marcação de CD206, mas não observamos nenhuma diferença estatisticamente significativa (**Figura 6**).

### 5.3 Avaliação de moléculas do citoesqueleto

A avaliação do citoesqueleto se faz necessária pelo papel crucial desta estrutura na fagocitose de microrganismos por macrófagos. Os parâmetros área, perímetro, circularidade, solidez, largura, altura e intensidade mediana de fluorescência (MFI) de  $\alpha$ -Tubulina das populações de macrófagos dos diferentes camundongos foram analisados (**Figura 10**). Macrófagos peritoneais de B6.C3<sup>-/-</sup> são mais circulares e apresentam morfologia mais sólidas (menos invaginações) em comparação com macrófagos peritoneais de B6.C3<sup>+/+</sup>. Além disso, macrófagos peritoneais de B6.C3<sup>-/-</sup> estimulados por LPS exibem maior área e maior razão largura/altura celular, quando comparados com aqueles oriundos de B6.C3<sup>+/+</sup>. Quando avaliamos macrófagos diferenciados diretamente da medula óssea, não observamos tais diferenças, no entanto a presença de  $\alpha$ -Tubulina é mais intensa em B6.C3<sup>-/-</sup> tanto com ou sem tratamento com LPS, demonstrando que estas células exibem mais este filamento, quando em comparação com macrófagos B6.C3<sup>+/+</sup> diferenciados da medula óssea (**Figuras 10f**).



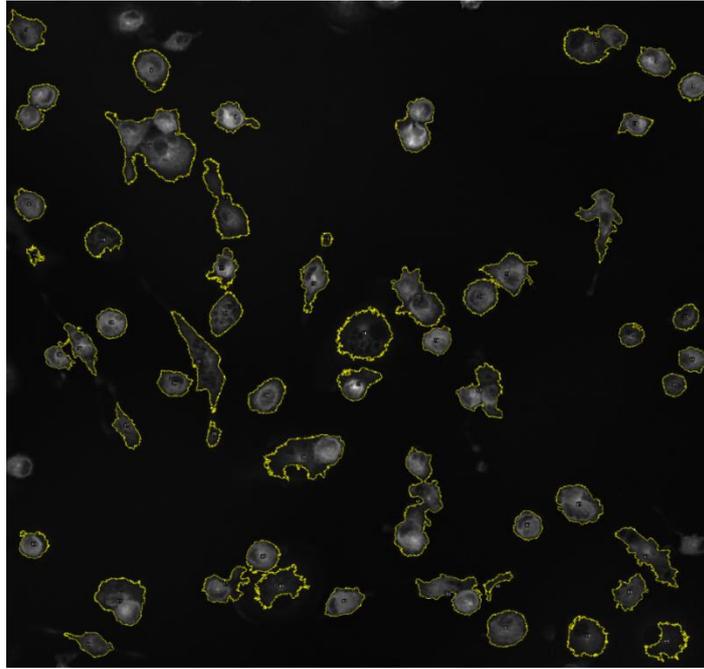
**Figura 7. Marcação de componentes da estrutura do citoesqueleto de macrófagos murinos.** Marcação individual de certos parâmetros celular que compõem a estrutura do citoesqueleto celular. **A-B)** Macrófagos peritoneais retirados do exsudato peritoneal previamente estimulado com tioglicolato; **C-D)** Macrófagos diferenciados da medula óssea.  $2 \times 10^5$  células por poço. DAPI (Azul); faloidina (vermelho); tubulina (verde).

```

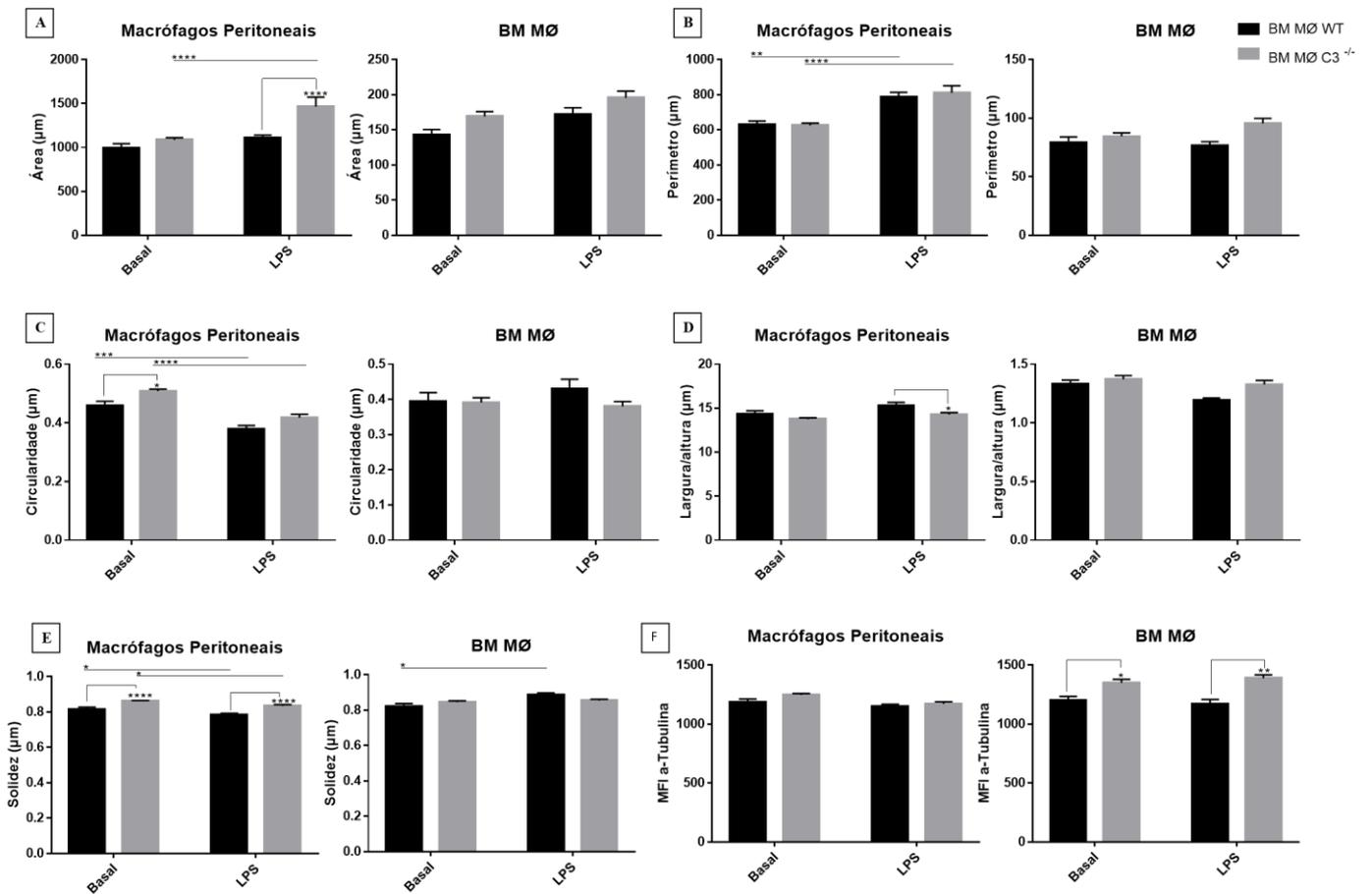
1 // This macro processes all the images in a folder and any subfolders.
2
3 extension = ".tif";
4 dir1 = getDirectory("Choose Source Directory ");
5 dir2 = getDirectory("Choose Destination Directory ");
6 setBatchMode(true);
7 n = 0;
8 processFolder(dir1);
9
10 function processFolder(dir1) {
11     list = getFileList(dir1);
12     for (i=0; i<list.length; i++) {
13         if (endsWith(list[i], "/" ))
14             processFolder(dir1+list[i]);
15         else if (endsWith(list[i], extension))
16             processImage(dir1, list[i]);
17     }
18 }
19 function processImage(dir1, imgName) {
20     open(dir1 + imgName);
21     dotindex = lastIndexOf(imgName, ".");
22     basename = substring(imgName, 0, dotindex);
23     if (matches(imgName, "-FITC - FITC.*")) {
24         print(n++, basename);
25         run("Duplicate...", "");
26         rename(basename);
27         run("Set Measurements...", "area mean standard modal min centroid center perimeter bounding fit shape feret's integrated median skewness kurtosis area_fraction stack limit display redirect="+imgName+" decimal=5");
28         setAutoThreshold("Default");
29         run("Threshold...");
30         setThreshold(700, 65535);
31         setOption("BlackBackground", true);
32         run("Convert to Mask");
33         run("Fill Holes");
34         run("Analyze Particles...", "size=20-Infinity show=Nothing display exclude clear add");
35         saveAs("Results", dir1 + basename + ".xls");
36         selectWindow(imgName);
37         roiManager("Show None");
38         roiManager("Show All");
39         saveAs("Tiff", dir1 + "flatten_"+basename+".tif");
40         run("Close");
41     }
42 }
43

```

**Figura 8. Script para análises de parâmetros no ImageJ.** Para avaliar os dados em grande escala, foi construído o script acima para análise de diversas imagens obtidas por microscopia InCell



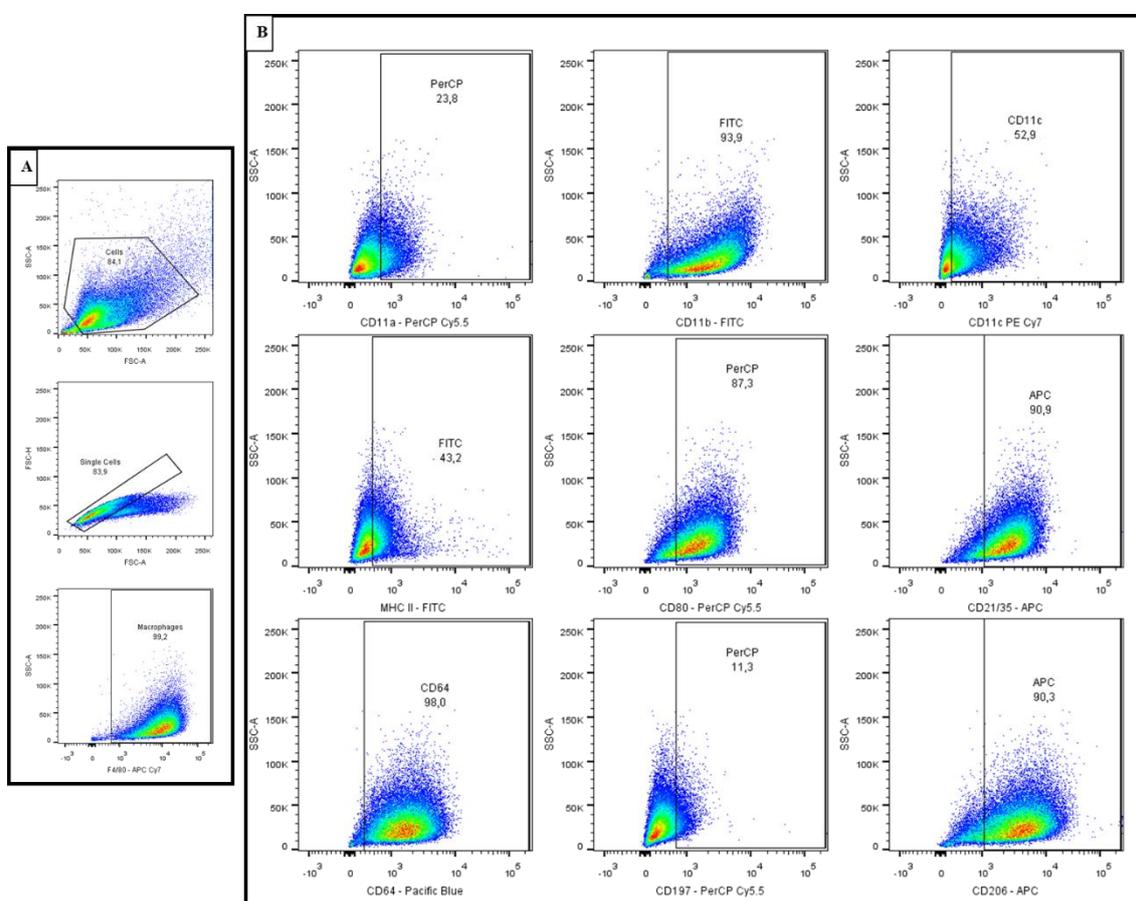
**Figura 9. Delineamento celular para análises do citoesqueleto de macrófagos.** Aplicação do *script* construído, buscando delinear a margem celular mais próxima do real.



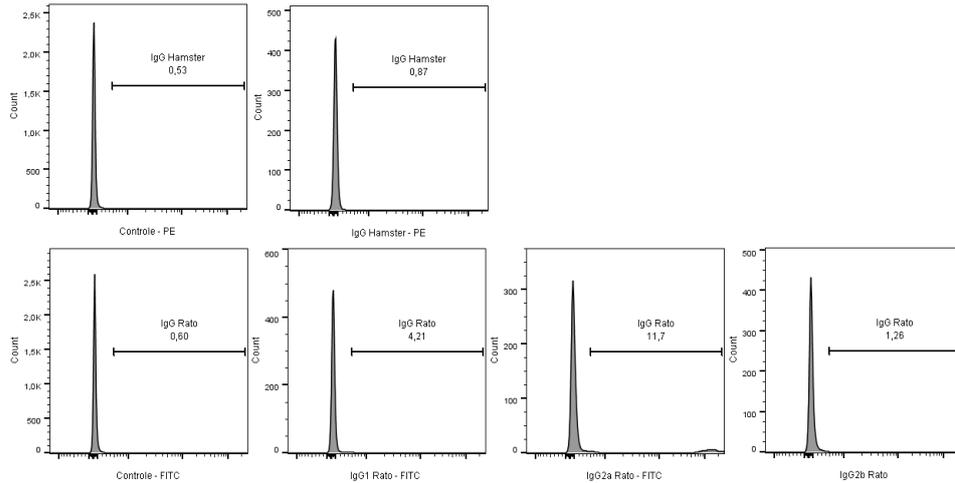
células; E) Solidez das células; F) Intensidade média da fluorescência de  $\alpha$ -tubulina. (n= 8). As imagens foram processadas em *software* ImageJ e os dados obtidos foram estatisticamente analisados empregando o teste *One-way* ANOVA no *software* GraphPad Prism. \* $p < 0,5$ ; \*\* $p < 0,1$ ; \*\*\* $p < 0,01$  e \*\*\*\* $p < 0,001$ .

#### 5.4 Avaliação da expressão de moléculas celulares de macrófagos murinos

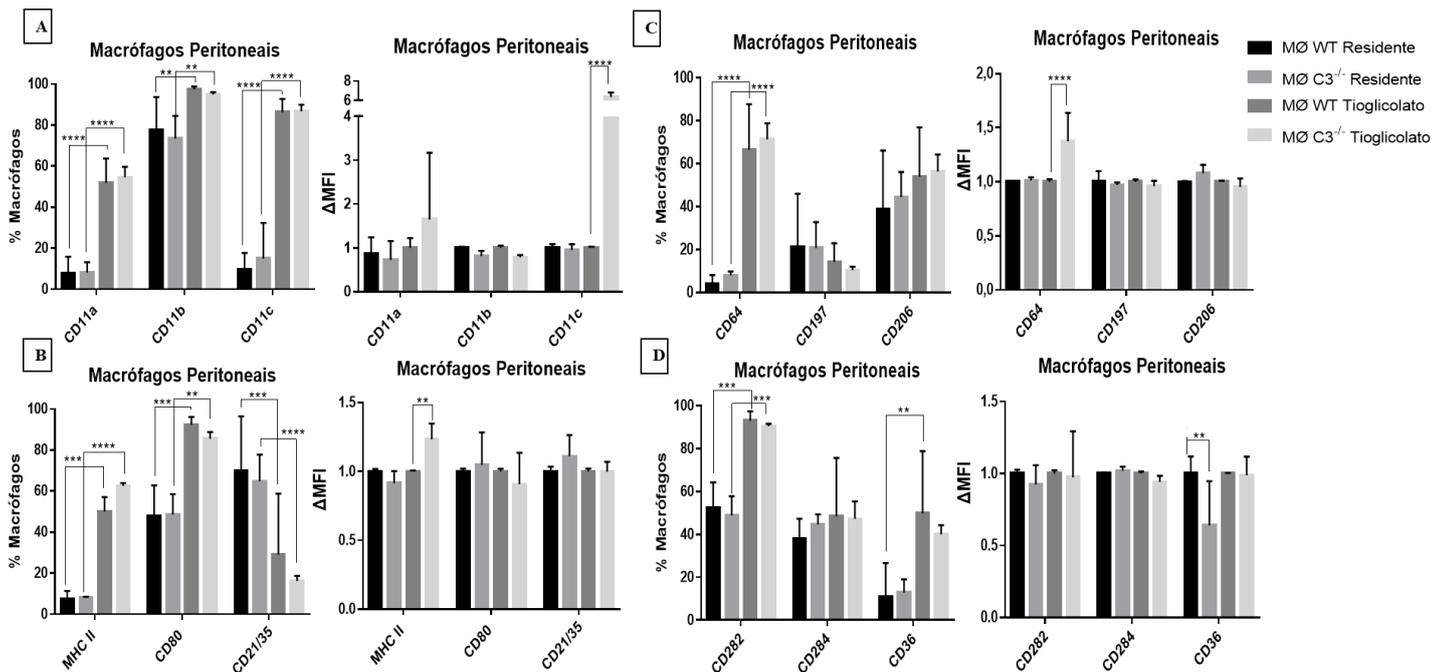
Para avaliar se a presença de moléculas que participam da fagocitose em macrófagos murinos seria afetada pela ausência de C3, utilizamos diversos anticorpos (**Tabela 2**), que reconhecem proteínas e superfície sabidamente envolvidas em adesão, comunicação célula/célula e fagocitose. Nós comparamos a expressão das proteínas em macrófagos peritoneais residentes ou recrutados por tratamento por tioglicolato (**Figura 13**), e ainda macrófagos peritoneais residentes ou derivados de medula óssea, estimulados ou não com LPS **Figura 14**.



**Figura 11. Exemplo de citometria de fluxo para análise da expressão de proteínas de superfície de macrófagos.** Macrófagos peritoneais e diferenciados da medula de camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> e B6.C3<sup>-/-</sup> ( $5 \times 10^5$ ) foram incubados com os anticorpos da Tabela 2 e avaliados por citometria de fluxo. Gráficos representativos das análises feitas em *software* FlowJo. **A:** Identificação de população de interesse seguida por eliminação de *doublets* e seleção de macrófagos (F4/80<sup>+</sup>). **B:** Seleção da população positiva para o anticorpo (eixo X) pela complexidade (SSC – eixo Y), as células foram incubadas com três anticorpos diferentes, demonstrados em linha. Para seleção das células positivas macrófagos não marcados foram utilizados determinando a fluorescência basal.



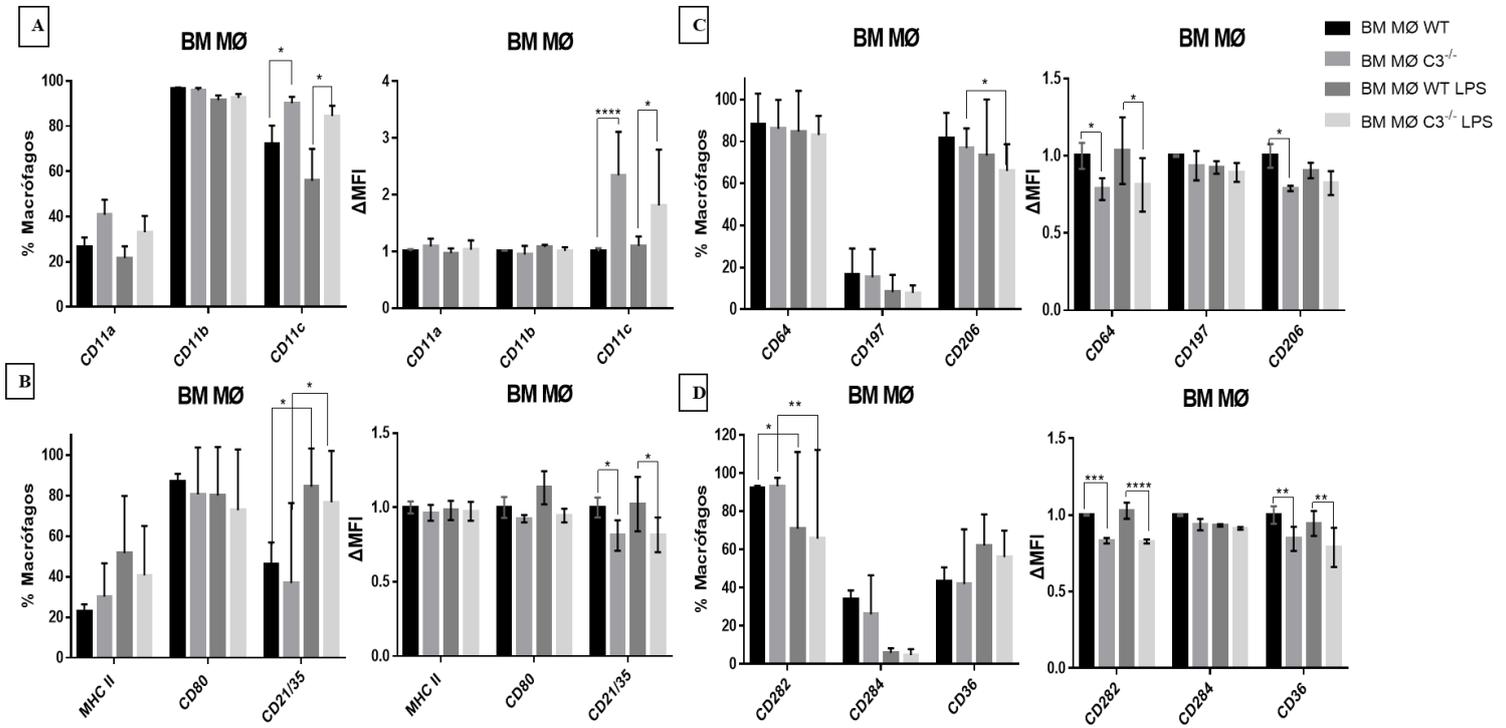
**Figura 12. Análise por citometria de fluxo dos controles de isotipos de anticorpos.** Macrófagos peritoneais e diferenciados da medula de camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> e B6.C3<sup>-/-</sup> ( $5 \times 10^5$ ) foram incubados com anticorpos com o mesmo isotipo dos utilizados na Tabela 2. Gráficos representativos de um único experimento.



**Figura 13. Análise da presença de marcadores moleculares de superfície de macrófagos peritoneais murinos.** A população de macrófagos foi confirmada a partir da marcação positiva com anti-F4/80. As figuras à esquerda indicam a frequência de macrófagos positivos para os marcadores empregados. As figuras à direita representam a razão de MFI obtidos a partir a divisão das amostras pela média da duplicata do grupo controle (macrófagos B6.C3<sup>+/+</sup>) de cada experimento ( $n = 8$ ). A análise dos dados foi realizada empregando o teste ANOVA *Two-way* no *software* GraphPad Prism. \* $p < 0,5$ ; \*\* $p < 0,1$ ; \*\*\* $p < 0,01$  e \*\*\*\* $p < 0,001$ .

Foram avaliados macrófagos peritoneais residentes, peritoneais estimulados com tioglicolato ou derivados diretamente da medula óssea.

Observamos aumento na frequência nas células que apresentam CD11a, CD11b, CD11c, MHC II, CD80, CD64, CD282 e CD36 na membrana quando comparamos os macrófagos estimulados com tioglicolato aos residentes. Macrófagos de camundongos B6.C3<sup>-/-</sup> aumentaram cerca de seis vezes a presença de CD11c na membrana após estímulo *in vivo* com tioglicolato quando comparados aos macrófagos de camundongos B6.C3<sup>+/+</sup>. Aumento também em cerca de 20% em CD64 (FcγR1) e diminuição de CD36 (SR-B1) foram observados na mesma proporção em macrófagos de camundongos B6.C3<sup>-/-</sup> (Figura 14). Macrófagos de camundongos B6.C3<sup>-/-</sup> estimulados com tioglicolato, apresentaram mais proteínas de Classe II do MHC do que quando derivados de camundongos selvagens.



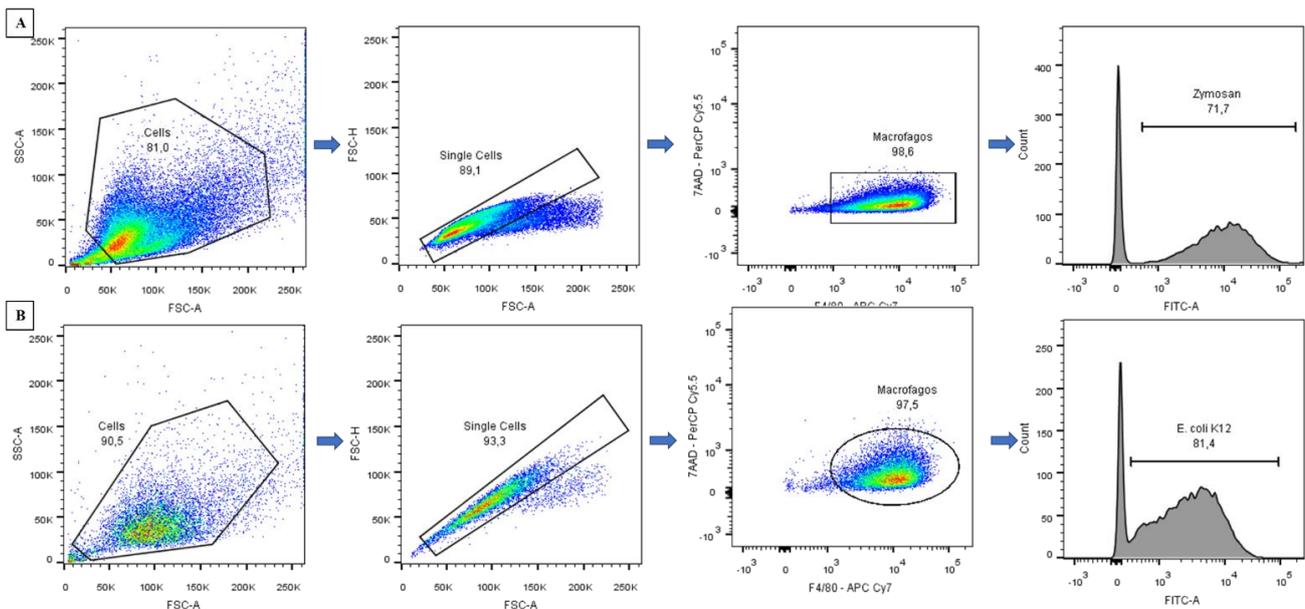
**Figura 14. Análise da presença de marcadores moleculares de superfície de macrófagos diferenciados da medula óssea.** Os macrófagos diferenciados da medula óssea (BM MØ) foram obtidos de camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> e B6.C3<sup>-/-</sup>, cultivados com PBS ou estimuladas com 2 ng/ml de LPS por 24h antes das marcações com a utilização de anticorpos específicos indicados na Tabela 2. A população de macrófagos foi confirmada a partir da marcação positiva com anti-F4/80. As figuras à esquerda indicam a frequência de macrófagos positivos para os marcadores empregados. As figuras à direita representam a razão de MFI obtidos a partir a divisão das amostras pela média da duplicata do grupo controle (macrófagos B6.C3<sup>+/+</sup>) de cada experimento (n= 8). A análise dos dados foi realizada empregando o teste ANOVA *Two-way* no *software* GraphPad Prism. \**p*<0,5; \*\**p*<0,1; \*\*\**p*<0,01 e \*\*\*\**p*<0,001.

Macrófagos diferenciados diretamente da medula óssea foram estimulados com LPS (2 µg/ml por 24 h) ou incubados apenas com DMEM e marcados com anticorpos específicos (Tabela 2) e a presença de moléculas de membrana foi avaliada por

citometria de fluxo. Diferentemente do observado com macrófagos peritoneais estimulados pelo tioglicolato, há menor presença de CD282 e maior de CD21/35 em macrófagos diferenciados da medula óssea após estímulo com LPS. De forma similar ao observado com macrófagos peritoneais estimulados pelo tioglicolato, a expressão de CD11c foi cerca de duas vezes maior em macrófagos B6.C3<sup>-/-</sup> com ou sem o estímulo com LPS; a frequência de macrófagos expressando CD11c na membrana também foi cerca de 10% aumentada na ausência de C3. Os receptores CD21/35 (~10%), CD282, CD64 e CD36 (~20%) (**Figura 14**) foram encontrados relativamente em menor presença nos macrófagos diferenciados diretamente da medula óssea de B6.C3<sup>-/-</sup>.

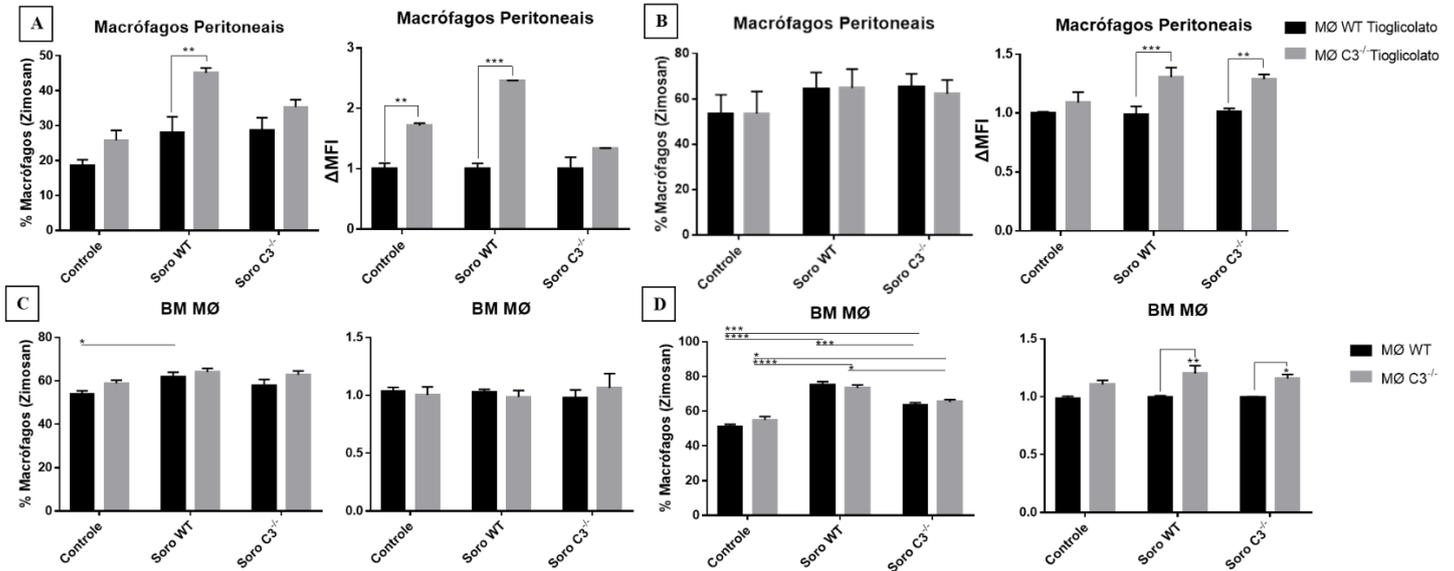
### 5.5 Fagocitose de Zimosan-FITC

Para avaliar a capacidade de macrófagos de camundongos deficientes de C3 de fagocitarem partículas de Zimosan-FITC foi analisada por citometria de fluxo. Com o objetivo de enriquecer esta análise, diferentes condições foram avaliadas: 1) estímulo prévio para os macrófagos (LPS para os diferenciados da medula óssea e tioglicolato para os obtidos do exsudato da cavidade peritoneal; e, 2) opsonização da partícula, feita pela incubação com soro dos animais selvagens, com o soro dos camundongos deficientes de C3; ou apenas meio de cultura. Todos os ensaios foram realizados considerando os resultados obtidos com macrófagos de camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> como 100% (**Figuras 15 e 16**).



**Figura 15. Experimento representativo de fagocitose de Zimosan e *E. coli*.** Macrófagos peritoneais oriundos de camundongos previamente estimulados com tioglicolato ou diferenciados da medula óssea (BM MØ) foram incubados com (A) Zimosan-FITC ou (B) *E. coli* K12-FITC. Foi utilizado anti-F4/80

conjugado com FITC para marcação de macrófagos e 7AAD para marcação de células mortas. No primeiro gráfico foi selecionada a população geral de células excluindo os detritos celulares, dentro desta população no gráfico a esquerda foi selecionada as células únicas (*Single Cells*) excluindo os *doublets*, no terceiro gráfico foi selecionada a população F4/80<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup> representando os macrófagos vivos e no gráfico mais a direita representado em histograma demonstra a marcação com Zimosan-FITC ou E. coli-FITC.

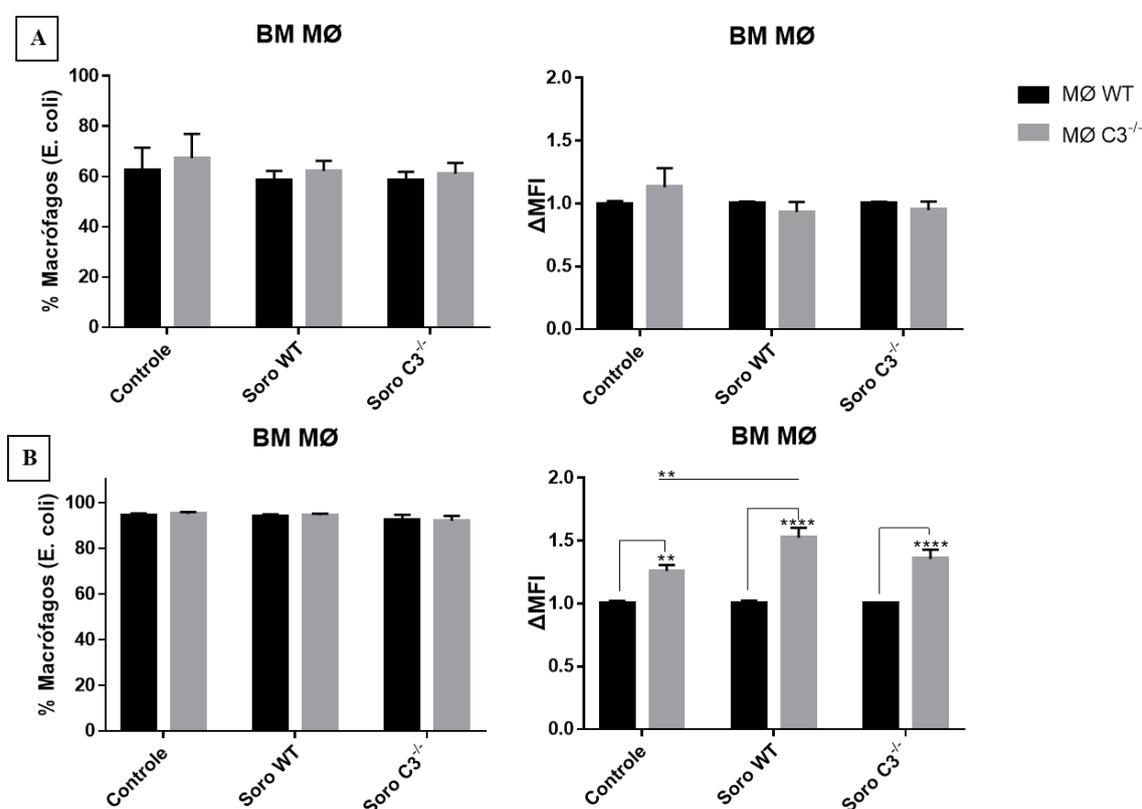


**Figura 16. Avaliação da fagocitose de Zimosan-FITC por macrófagos de camundongos.** Macrófagos peritoneais oriundos de camundongos previamente estimulados com tioglicolato ou diferenciados da medula óssea (BM MØ) foram obtidos de camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> e B6.C3<sup>-/-</sup> (n=6). **A:** MOI de 0,1 (1 partícula para 10 macrófagos); **B e C:** MOI de 0,5; **D:** MOI de 1. Esquerda: frequência de macrófagos que fagocitaram Zimosan-FITC; Direita: razão da intensidade média de fluorescência. A análise dos dados foi realizada empregando o teste ANOVA *two-way* no *software* GraphPad Prism. \*  $p < 0,5$ ; \*\*  $p < 0,1$ ; \*\*\*  $p < 0,01$ ; e \*\*\*\*  $p < 0,001$ .

Não foi observada diferença estatística significativa, quando comparamos a frequência de macrófagos que fagocitaram Zimosan-FITC, exceto na utilização do MOI 0,1 em macrófagos peritoneais estimulados com tioglicolato e com a partícula opsonizada. Quando aumentamos a dose de Zimosan-FITC (MOI 0,5) a frequência de macrófagos que fagocitaram aumentou de ~30% para ~60%. A quantidade de partículas englobadas foi calculada pela razão do MFI obtido, o que apresentou um aumento em macrófagos peritoneais de camundongos B6.C3<sup>-/-</sup> estimulados previamente com tioglicolato (**Figura 16a e 16b**), mas o mesmo fenômeno não foi observado quando utilizamos macrófagos diferenciados da medula óssea, embora quando ao aumentar a quantidade de partículas de Zimosan (MOI 1) observamos resultado similar ao MOI 0,5 para macrófagos peritoneais estimulados com tioglicolato, ou seja, macrófagos B6.C3<sup>-/-</sup> fagocitaram mais Zimosan-FITC que macrófagos B6.C3<sup>+/+</sup> quando as partículas foram incubadas com os soros (B6.C3<sup>+/+</sup> ou B6.C3<sup>-/-</sup>).

## 5.6 Fagocitose de *E. coli* K12

Para avaliar a possível diferença na capacidade de fagocitose de macrófagos de camundongos deficientes de C3, quando comparados com camundongos selvagens, suspensões de *E. coli* não patogênica foram utilizadas. Não observamos nenhuma diferença estatisticamente significativa entre a capacidade fagocítica entre macrófagos B6.C3<sup>-/-</sup> e B6.C3<sup>+/+</sup> para o englobamento de *E. coli* em concentração 1:1. Mas, quando aumentamos a quantidade de bactérias por células (MOI 10), os macrófagos diferenciados da medula óssea de camundongos B6.C3<sup>-/-</sup> demonstraram uma maior capacidade de fagocitose (Figura 17).

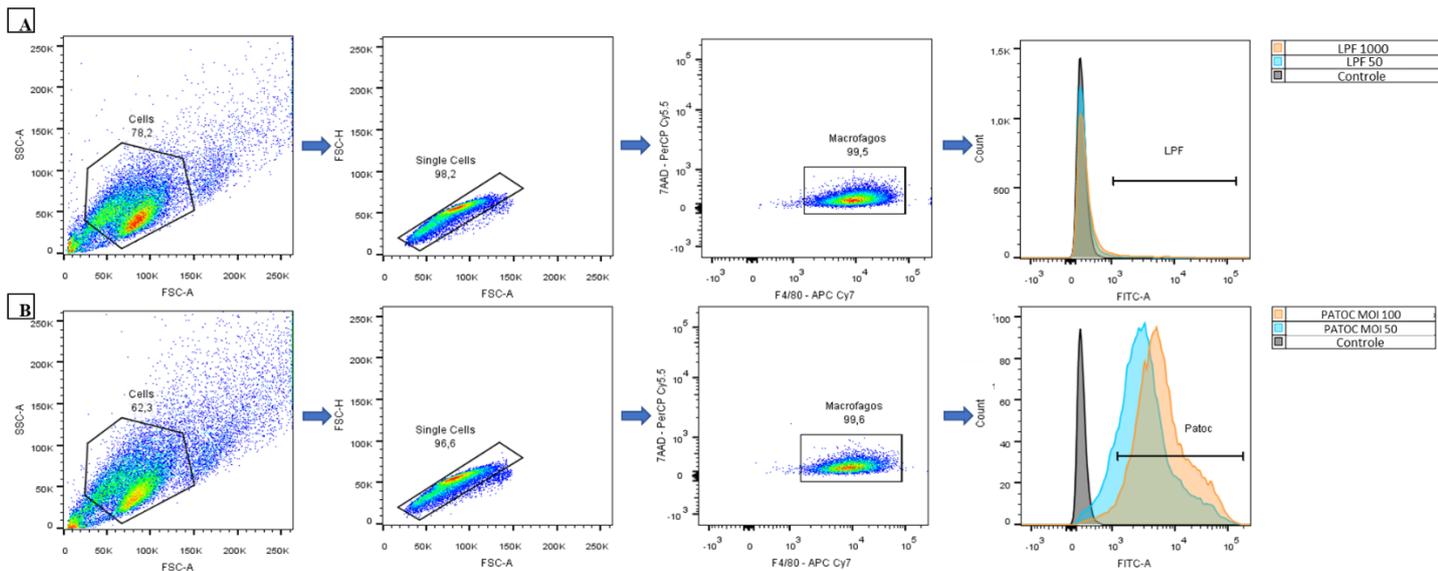


**Figura 17. Avaliação da fagocitose de *E. coli* K12 por macrófagos murinos.** Macrófagos diferenciados da medula óssea (BM MØ) foram obtidos camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> e B6.C3<sup>-/-</sup>; Esquerda, indicam a frequência de macrófagos positivos para fagocitose de leptospiros; Direita, representam a razão de MFI; **A**, MOI 1(1 bactéria por macrófago); **B**, MOI 10 (10 bactérias por macrófago) (n= 6). A análise dos dados foi realizada empregando o teste ANOVA *two-way* no *software* GraphPad Prism. \**p*<0,5; \*\**p*<0,1; \*\*\**p*<0,01 e \*\*\*\**p*<0,001.

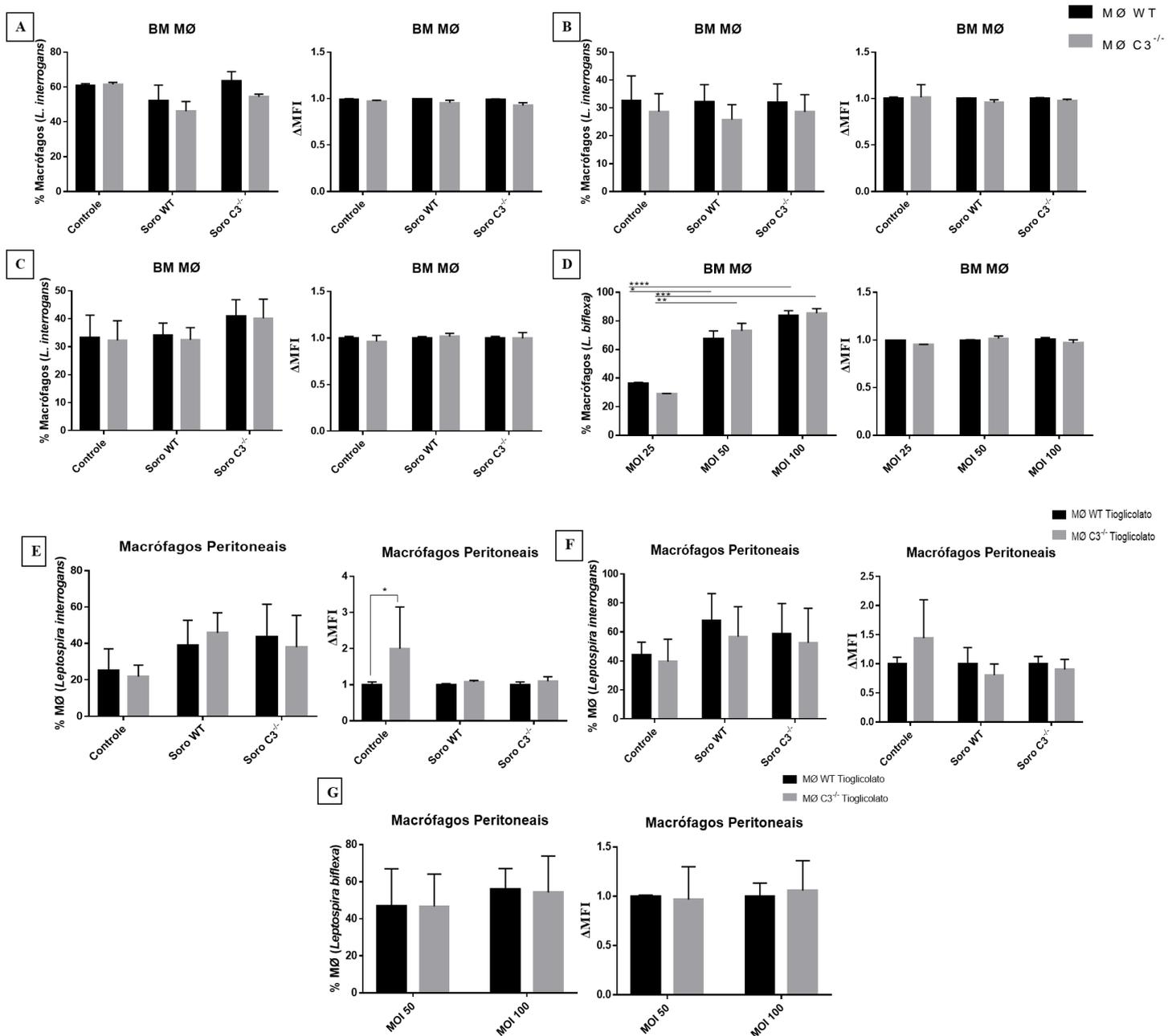
## 5.7 Fagocitose de *Leptospira* spp.

Com o intuito de reproduzir os resultados obtidos anteriormente por nosso grupo, a fagocitose de leptospiros saprófitas (*L. biflexa*) e patogênica (*L. interrogans*) foi avaliada por citometria de fluxo. Entretanto, não se observou diferença significativa

entre esses dois grupos de camundongos (**Figura 19**). Observamos que leptospiras saprófitas (*L. biflexa* Patoc) foram mais fagocitadas, quando comparadas com patogênicas (*L. interrogans*) nas mesmas concentrações (**Figura Suplementar 1**), pois são mais suscetíveis à lise mediada pelo Sistema Complemento. Faz-se necessária a repetição destes experimentos, tendo em vista que a opsonização resultante da incubação das bactérias com o soro dos animais B6.C3<sup>+/+</sup> não aumentou a capacidade fagocítica da reação, o que é controverso com os dados já bem descritos na literatura.



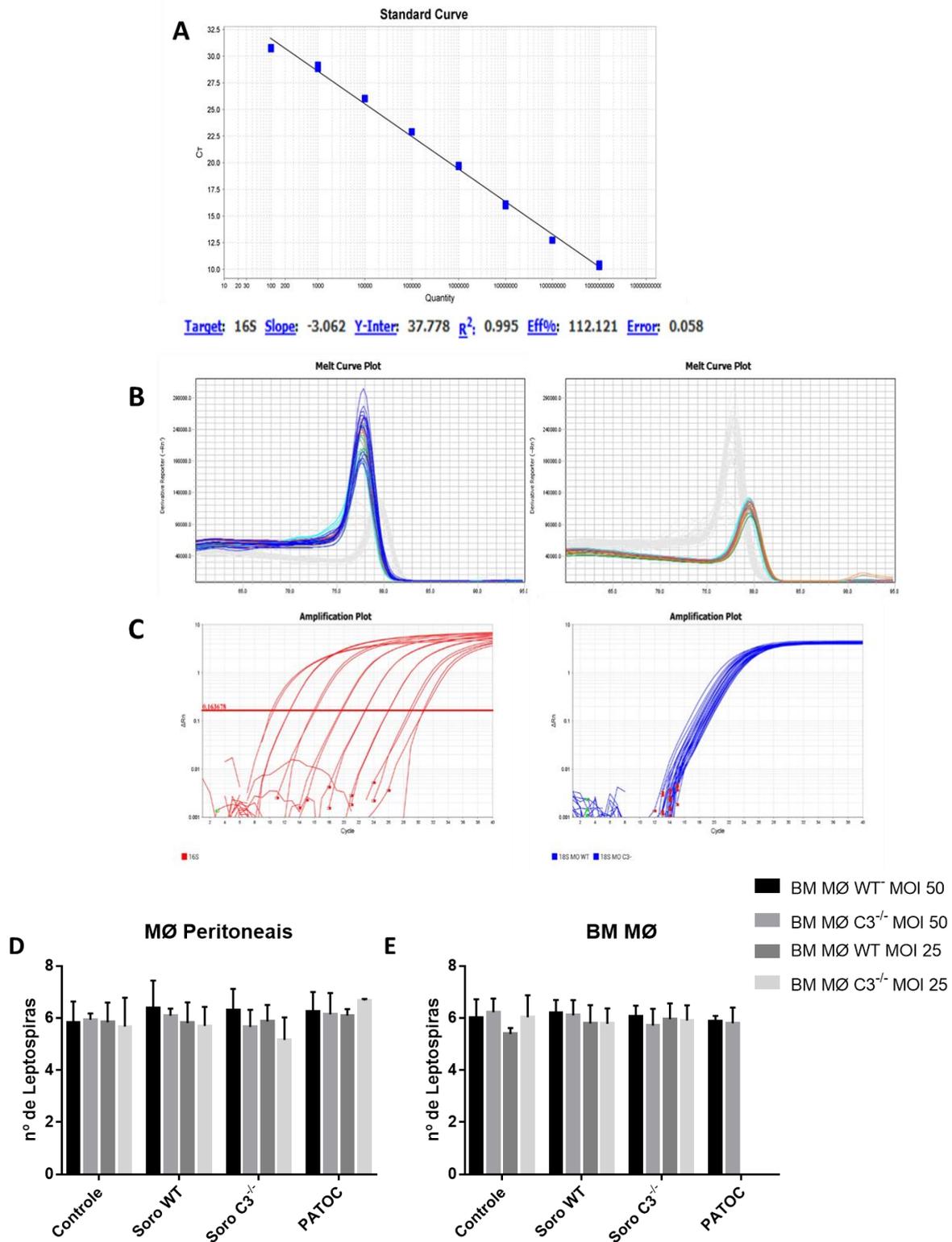
**Figura 18. Experimento representativo de fagocitose de Leptospiras.** Macrófagos peritoneais estimulados com tioglicolato e diferenciados da medula óssea (BM MØ) foram obtidos de camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> e B6.C3<sup>-/-</sup> e incubados com *L. interrogans* (parte superior) e *L. biflexa* (parte inferior) coradas com CFSE empregando MOI 50 e MOI 100. As setas representam a demonstração da população selecionada.



**Figura 19. Avaliação da fagocitose de leptospiras marcadas com CFSE por macrófagos murinos.** Macrófagos peritoneais estimulados com tioglicolato e diferenciados da medula óssea (BM MØ) foram obtidos de camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> e B6.C3<sup>-/-</sup>. **A-D**, representam BM MØ; **E-H**, representam macrófagos peritoneais; Esquerda indicam a frequência de macrófagos positivos para fagocitose de leptospiras; Direita representa a razão de MFI; **A** MOI 25; **B** e **E**, MOI 50; **C** e **F**, MOI 100; **D** e **G**, avaliação da fagocitose de *L. biflexa* MOI 50 e MOI 100. (n= 8). A análise dos dados foi realizada empregando o teste ANOVA two-way no software GraphPad Prism. \* $p < 0,5$ ; \*\* $p < 0,1$ ; \*\*\* $p < 0,01$  e \*\*\*\* $p < 0,001$ .

## 5.8 Avaliação da fagocitose de Leptospiras por qPCR

Para confirmar os resultados obtidos anteriormente por nosso grupo, avaliamos novamente a fagocitose de leptospiras patogênicas e não patogênicas por macrófagos murinos empregando qPCR (**Fig.20**).



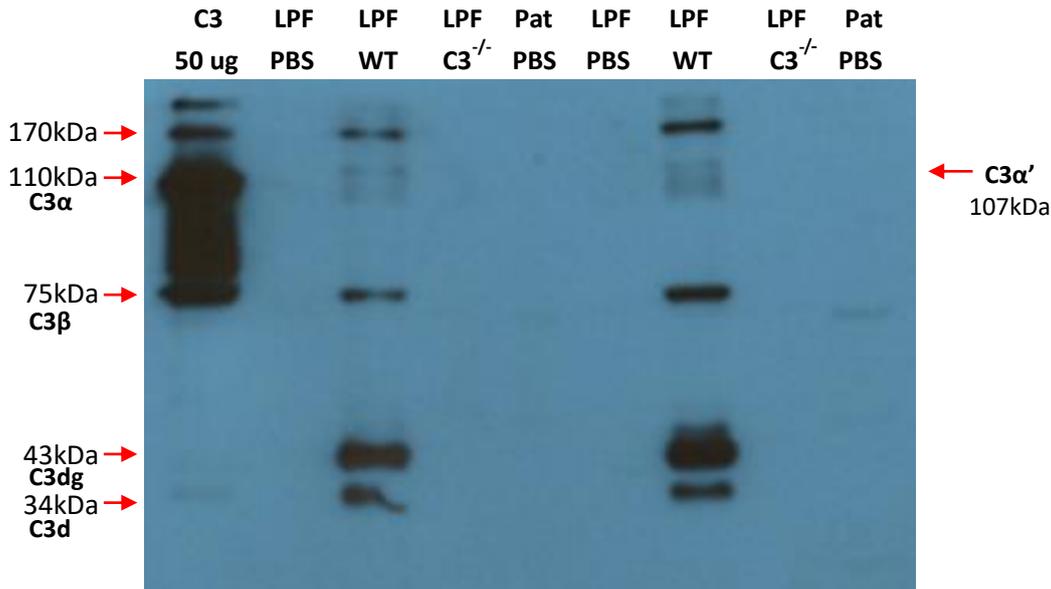
**Figura 20. Quantificação de leptospiras fagocitadas *in vitro* por macrófagos empregando qPCR.** Macrófagos peritoneais ou diferenciados diretamente da medula óssea foram incubados com *L.*

*interrogans* ou *L. biflexa*. Em seguida, o antibiótico gentamicina foi adicionado à cultura para eliminar as bactérias não fagocitadas. O DNA total das culturas foi então extraído para quantificação do número de bactérias por qPCR. (A) Curva padrão feita com suspensões diluídas (base 10) contendo  $10^9$  até  $10^2$  de *L. interrogans*; (B) Curva de dissociação para análise de amplificação específica utilizando os *primers* 16S (direita) e 18S (esquerda); (C) Amplificação em escala logarítmica para as amostras com 16S (*Leptospira*; direita) e 18S (camundongo; esquerda); (D) Quantificação de leptospiros fagocitados por macrófagos peritoneais, e (E) por BM MØ. Os números estão representados em  $\log_{10}$  do número de leptospiros/ 50 ng de DNA (D e E). (n= 9). Estão representados resultados obtidos de três experimentos independentes. A análise dos dados foi realizada empregando o teste ANOVA *two-way* no *software* GraphPad Prism. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

Para quantificação do número absoluto de bactérias fagocitadas, uma curva padrão foi realizada com um valor inicial conhecido de bactérias ( $10^9$ ), a partir desse valor a extração do DNA foi feita e a curva padrão foi estabelecida diluindo-o exponencialmente (base 10) (Figura 20A). A curva de *melting* (Figura 20B – 16S esquerda e 18S direita) foi determinada para comprovar a amplificação de um único alvo. A curva de amplificação das amostras (Figura 20C - 16S esquerda e 18S direita) foi realizada para avaliar a confiabilidade da reação. Uma vez tendo acertado tais parâmetros, fomos quantificar o número de leptospiros fagocitados por macrófagos em cultura.

Diferente do esperado, para condições empregadas não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (com ou sem soro) para a fagocitose de leptospiros, sendo assim, decidimos confirmar se fragmentos derivados da ativação de C3 foram depositados sobre as leptospiros. Para tanto, incubamos os soros (B6.C3<sup>+/+</sup> ou B6.C3<sup>-/-</sup>) com as suspensões de leptospiros; em seguida as bactérias foram lavadas para retirar as proteínas que se não se ligaram covalentemente à membrana bacteriana, seguindo-se análise por Western Blot. Conforme observado na Figura 21, há ativação do Sistema Complemento, onde a cadeia alfa de C3 nativo (115 kDa) foi claramente convertida em um produto menor (C3 alfa': ~107kDa), presente no fragmento C3b (cadeia alfa'; ~107kDa/ cadeia beta (75 kDa) e posteriormente clivada em fragmentos menores de ~40 kDa (parte do iC3b e C3c) e 38 kDa (C3dg). Isto confirma que a *L. interrogans* foi capaz de ativar a Via Alternativa e/ou Via das Lectinas.

Em resumo, ainda se faz necessário acertar as condições experimentais para avaliação correta da fagocitose de leptospiros, seguindo os resultados já bem descritos na literatura.

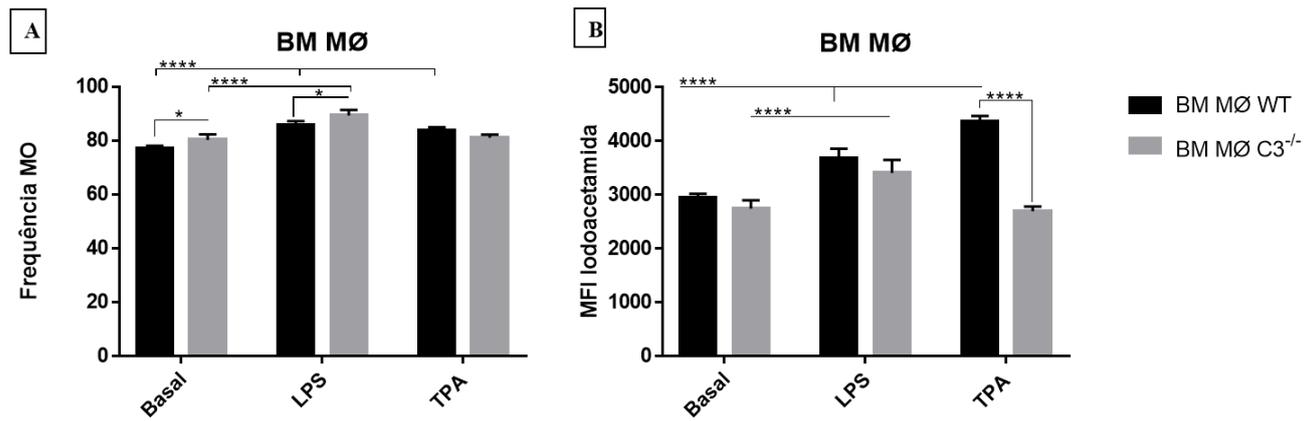


**Figura 21. Deposição de fragmentos ativados de C3 sobre leptospiros.** *L. interrogans* (LPF) foram tratadas previamente com PBS, ou 10% de soro de camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> (LPF WT) ou B6.C3<sup>-/-</sup> (LPF C3<sup>-/-</sup>) por 30 min, utilizamos também *L. biflexa* (Pat), previamente tratada apenas com PBS. Em seguida as suspensões foram lavadas e congeladas com Tampão de Amostras (Western Blot) até o momento do ensaio. Como controle, empregou-se 50 µg/ml de C3 purificado (Complement Technologies Inc.).

### 5.9 Produção de ROS em macrófagos de camundongos na ausência de C3

Com o objetivo de avaliar se a ausência de C3 poderia afetar a produção de ROS por macrófagos, empregamos iodoacetamida-FITC (**Figura 22**). Iodoacetamida é um agente alquilante capaz de se ligar ao grupo tiol do aminoácido cisteína; este é exposto quando o aminoácido sofre redução, sendo considerado um marcador para a ação pós-traducional de ROS [Landar et. al., 2006]. Isto reflete a ativação e efeito de espécies reativas de oxigênio nos macrófagos, sendo assim, podemos determinar com este experimento a efetiva ação de ROS, que é fundamental para a eliminação de antígenos após internalização.

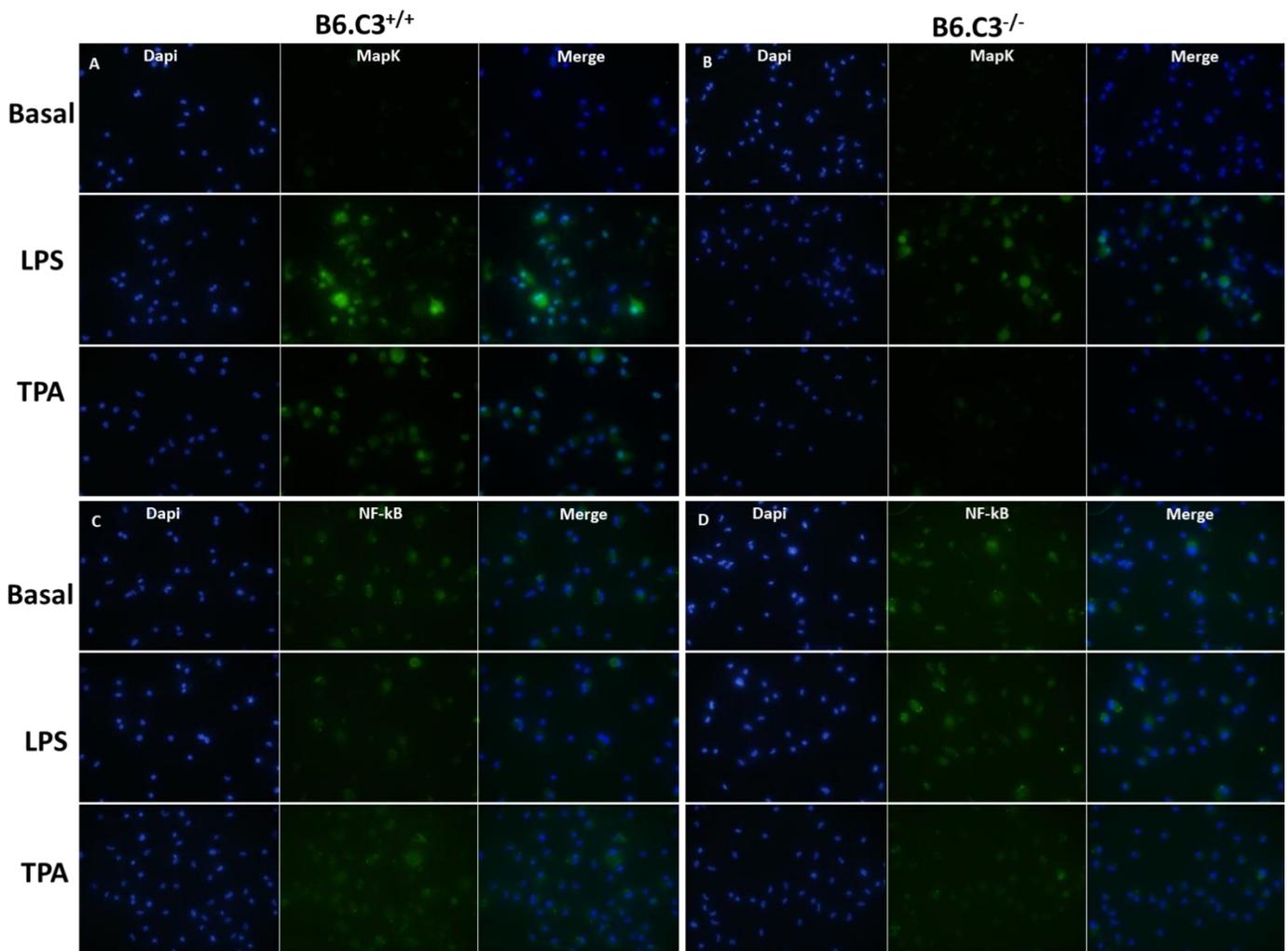
Quando analisamos a média de fluorescência de iodoacetamida-FITC, observamos um aumento de cisteína reduzida em macrófagos derivados da medula óssea de B6.C3<sup>-/-</sup> apenas quando estimulados por LPS (**Figura 22B**), enquanto macrófagos de B6.C3<sup>+/+</sup> responderam tanto ao estímulo com LPS quanto com TPA, quando comparados com respectivo nível basal (PBS).



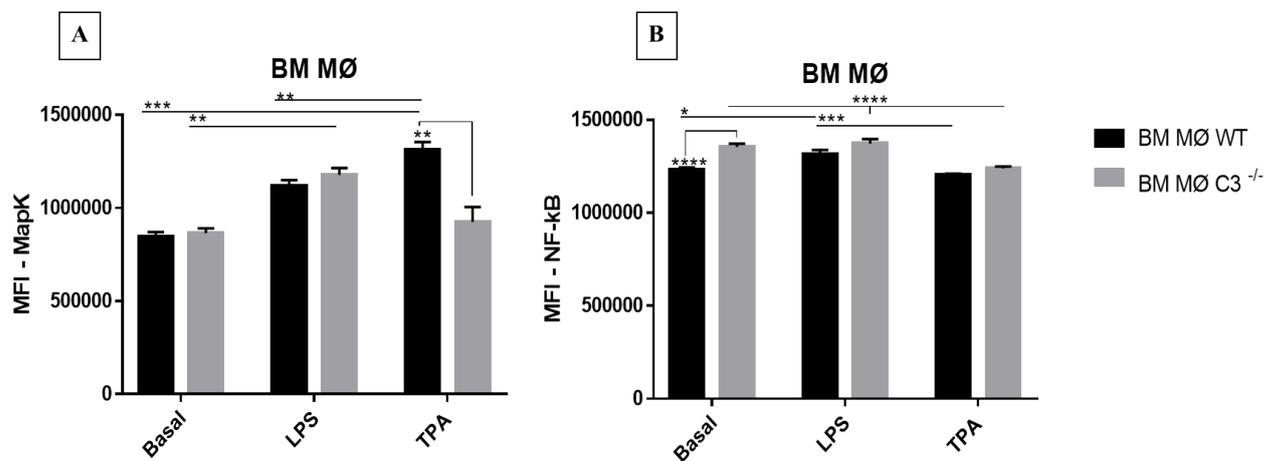
**Figura 22. Avaliação da produção de ROS por macrófagos derivados de medula óssea por citometria de fluxo.** Macrófagos diferenciados da medula óssea (BM) de camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> (MO WT) e de B6.C3<sup>-/-</sup> (MO C3<sup>-/-</sup>) ( $5 \times 10^5$ ) foram estimulados apenas com PBS (Basal) ou com PBS contendo 10 ng/ml de LPS ou de TPA por 30 min. Macrófagos foram marcados com iodoacetamida-FITC e os dados obtidos estão indicados pela frequência de células marcadas (**A**) e pela média da intensidade de fluorescência (MFI) (**B**). A análise dos dados foi realizada empregando o teste ANOVA *two-way* no *software* GraphPad Prism \* $p < 0,5$ ; \*\* $p < 0,1$ ; \*\*\* $p < 0,01$  e \*\*\*\* $p < 0,001$ . (n = 5). Foram realizados três experimentos independentes.

#### 5.10 Avaliação da ativação intracelular de NF- $\kappa$ B e MAPK

Para analisar possíveis alterações na resposta celular após reconhecimento do antígeno, decidimos analisar duas das principais vias de sinalização intracelular (NF- $\kappa$ B e MAPK), responsáveis pela transcrição de genes de citocinas e de outros sinais celulares imunes importantes para a resposta imunológica (**Figura 23**).



**Figura 23. Microscopia de fluorescência para identificar a presença intracelular de NF-κB e MAPK fosforilados.** Macrófagos diferenciados da medula óssea de camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> e B6.C3<sup>-/-</sup> ( $5 \times 10^5$ ) foram estimulados com PBS ou 10 ng/ml de LPS ou de TPA por 30 min. Em seguida, as células foram permeabilizadas e marcadas com anticorpos (verde) anti-phospho p44/42 MAPK (A e C) e anti-phospho p65 NF-κB (B e D). As células foram analisadas por microscopia de fluorescência, empregando-se Dapi (azul) para marcação do núcleo das células.



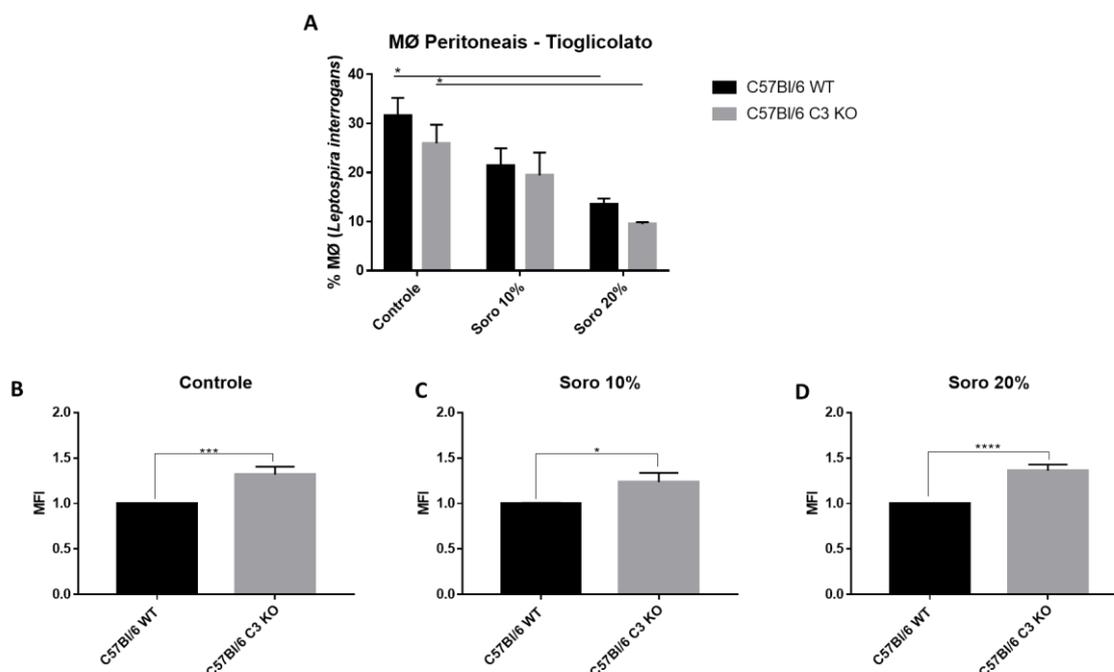
**Figura 24. Quantificação da ativação intracelular de NF-κB e MAPK fosforilados.** As células foram marcadas com anti-phospho p44/42 MAPK (A) e anti-phospho p65 NF-κB (B), em seguida as imagens obtidas por microscopia de fluorescência foram analisadas em *software* ImageJ, para obtenção da

intensidade média de fluorescência (MFI) e os valores obtidos foram analisados empregando o teste ANOVA *two-way* no *software* GraphPad Prism. \* $p < 0,5$ ; \*\* $p < 0,1$ ; \*\*\* $p < 0,01$  e \*\*\*\* $p < 0,001$ .  $n = 5$ . Resultados aqui indicados são provenientes de um único experimento, a partir de uma mistura de suspensões celulares obtidas de cinco animais.

Observamos menor ativação de MAPK em macrófagos B6.C3<sup>-/-</sup> estimulados com TPA, considerado um ótimo ativador desta via, tendo em vista a já bem descrita ligação com PKC, sugerindo um possível papel de C3 na ativação da via da MAPK. Observamos também um aumento na fosforilação basal de NF- $\kappa$ B nos macrófagos deficientes de C3. Tais observações demonstram que vias de ativação de macrófagos, especialmente a via da MAPK pode estar alterada na ausência de C3, podendo afetar a transcrição de determinados genes em situação inflamatória, resultando em menor produção de citocinas incluindo quimíocinas, fatores de sobrevivência e fatores mitogênicos que são bem descritos como consequência da ativação da família das MAP quinases [Morrison DK, 2012].

### 5.11 Fagocitose *L. interrogans* em modelo *in vivo*

Com o objetivo de avaliar os efeitos da deficiência da proteína C3 *in vivo* durante a infecção por *Leptospira*, suspensões contendo  $1 \times 10^8$  *L. interrogans* foram inoculadas na cavidade peritoneal de camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> e B6.C3<sup>-/-</sup> e o número de bactérias fagocitadas por macrófagos foi quantificado por citometria de fluxo (**Figura 25**).



**Figura 25. Fagocitose de *L. interrogans* *in vivo*.**  $1 \times 10^8$  de *L. interrogans*-CSFE opsonizadas com PBS, 10% ou 20% de soro de camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> foram inoculadas na cavidade peritoneal de camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> ou B6.C3<sup>-/-</sup>. ( $n = 10$ ), previamente estimulados com tioglicolato. Frequência (A) e intensidade

média de fluorescência (**B**, **C** e **D**). A análise dos dados foi realizada empregando o teste ANOVA *two-way* no *software* GraphPad Prism. \* $p < 0,5$ ; \*\* $p < 0,1$ ; \*\*\* $p < 0,01$  e \*\*\*\* $p < 0,001$ . MFI foi calculado a partir da razão entre a média do MFI do grupo C57BL/6 WT controle pelo MFI de cada amostra de um mesmo experimento.

Observamos uma redução na frequência de macrófagos que internalizaram ao menos uma bactéria, quando soros dos camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> foram empregados tanto na concentração de 10% quanto 20%. Uma possível explicação para a redução da média de fluorescência quando os soros foram utilizados seja uma representação da morte das bactérias devido à ação das proteínas do Sistema Complemento, melhora da fagocitose pela opsonização que com isso resulta em uma rápida eliminação das bactérias. Quando comparamos o número de bactérias fagocitadas por macrófagos B6.C3<sup>+/+</sup> com B6.C3<sup>-/-</sup> notamos um aumento média de fluorescência nas células derivadas de camundongos deficientes de C3, este fenômeno foi persistente independente da inserção ou não de opsonização decorrente do soro como fonte de C3, o que demonstra que possíveis mecanismos de compensação desenvolvidos por essas células devido a deficiência de C3 estão de alguma forma otimizando a fagocitose contra leptospiros *in vivo* resultando no aumento da captura de *L. interrogans* por macrófagos B6.C3<sup>-/-</sup>. No entanto, conforme mencionado anteriormente, ainda precisaremos melhorar as condições experimentais e repetir esses experimentos *in vivo*. Nós confirmamos a internalização de leptospiros em todos os ensaios realizados de fagocitose (*in vivo* e *in vitro*) utilizando o citômetro *Flow Sight* (Amnis) que permite a obtenção de imagens intracelulares durante a própria aquisição de dados por citometria de fluxo (**Figura Suplementar 2**).

## 6. Discussão

Diversos trabalhos já demonstraram que a fagocitose de microrganismos fica prejudicada na ausência da proteína C3 [Scieszka et al., 1991; Gavin et al. 2019], mas nenhum estudo demonstrou se esta deficiência poderia de alguma forma alterar diretamente a capacidade intrínseca de macrófagos fagocitarem. Tendo em vista este cenário, diversos experimentos foram realizados neste projeto buscando comparar determinados parâmetros celulares em macrófagos de camundongos normais e deficientes de C3.

Macrófagos são células heterogêneas encontradas em quase todos os tecidos [Mosser & Edwards, 2008], por isso optamos pela utilização de macrófagos diferenciados a partir da medula óssea, além daqueles obtidos da cavidade peritoneal, já que essas células se desenvolvem de maneira mais uniforme. Optamos também pela utilização de modelo de macrófagos estimulados e não estimulados, seja pela injeção de tioglicolato na cavidade peritoneal ou pela incubação com LPS ou TPA.

Inicialmente o número de macrófagos no exsudado peritoneal foi analisado, para investigar se a diferenciação de monócitos em macrófagos estaria afetada pela ausência de C3. Camundongos B6.C3<sup>-/-</sup> possuem uma prevalência de macrófagos F4/80<sup>high</sup>, caracterizados como macrófagos residentes que não dependem da diferenciação de novos monócitos circulantes para renovação [Davies et al., 2013]. Em outras palavras, na ausência de C3, o estímulo inflamatório representado pela injeção de tioglicolato de alguma forma recrutou menos macrófagos para a cavidade peritoneal. Estes resultados estão em acordo com o menor número relativo de macrófagos F4/80<sup>low</sup> em camundongos B6.C3<sup>-/-</sup>. Este fenômeno pode ser resultado de uma menor geração de fatores quimiotáticos como C3a e C5a, e/ou de certas quimíocinas responsáveis pelo recrutamento celular, ou uma alteração nos monócitos que resultaria em uma menor migração destas células para o tecido. Nosso grupo já demonstrou que em um modelo de infecção com leptospiros, macrófagos de camundongos deficientes de C3 produzem menos TNF- $\alpha$  - citocina com papel importante no processo inflamatório - sendo que macrófagos são a maior fonte desta citocina, sinalizando que a deficiência de C3 poderia interferir na resposta celular dependente de macrófagos [Yamashita et al., 2017].

A morfologia do citoesqueleto dos macrófagos também foi avaliada, uma vez que desempenha um papel crucial na migração celular e no englobamento de partículas,

permitindo a formação de evaginações e invaginações. Para tanto, a presença intracelular de F-actina e  $\alpha$ -tubulina nos macrófagos de camundongos deficientes de C3 foi avaliada e comparada com camundongos selvagens. Observamos diversas diferenças nos parâmetros analisados, embora não saibamos ainda avaliar se tais diferenças são de importância biológica. Constatamos um aumento na circularidade e morfologia mais sólida (menos invaginações) em macrófagos de B6.C3<sup>-/-</sup> peritoneais estimulados com tioglicolato; enquanto macrófagos de B6.C3<sup>-/-</sup> diferenciados da medula óssea exibem maior presença de  $\alpha$ -tubulina. Estas diferenças também podem ser observadas na estrutura do citoesqueleto e morfologia entre os animais pode estar vinculada a migração destas células, tendo em vista que os filamentos de tubulina são fundamentais para o deslocamento dos macrófagos até o sítio inflamatório [Nogales, 2000; Rotsch et al., 2012; Li & Yang, 2015].

Os padrões moleculares associados ao patógeno (PRRs) e os receptores para opsoninas como certas moléculas do Sistema Complemento e anticorpos são cruciais para a resposta imune desempenhada por macrófagos, sendo assim, diversos PRRs e receptores de opsoninas foram avaliados. Além destes, a capacidade de apresentarem moléculas que participam da apresentação de antígenos também foi avaliada pela quantificação da presença de moléculas de MHC de classe II, assim como a molécula coestimuladora B7-1 (CD80).

A maior diferença observada foi na avaliação de moléculas CD11c, onde a presença foi cinco a seis vezes mais intensa em macrófagos de camundongos B6.C3<sup>-/-</sup> em comparação com os macrófagos de camundongos B6.C3<sup>+/+</sup>. CD11c é uma integrina que juntamente com CD18, forma dímeros que compõem o CR4 (p150,95;  $\alpha_X\beta_2$ ). CR4 reconhece fragmentos de C3, possuindo maior afinidade com o fragmento iC3b, além disso, CR4 pode se ligar ao fibrinogênio e ICAM-1 auxiliando na adesão celular [Diamond et al., 1993]. CR3 e CR4 podem reconhecer os fragmentos de C3 e, assim, facilitar a fagocitose de microrganismos. No entanto, alguns estudos mostraram que em células humanas este papel parece ser desenvolvido majoritariamente por CR3, enquanto CR4 está mais envolvido com adesão celular [Lukácsi et al., 2017].

Além de CD11c, observamos um aumento em macrófagos peritoneais B6.C3<sup>-/-</sup> estimulados para a presença das moléculas de MHC de classe II e CD64 (Fc $\gamma$ RI). Acreditamos que o aumento da presença de CR4 e CD64 sejam mecanismos compensatórios, onde um dado receptor poderia ser super expressado na ausência de seu ligante, buscando desta forma aumentar a resposta, ou seja, na ausência dos fragmentos

de C3, outras moléculas aumentariam sua presença na tentativa de suprir alguma deficiência causada. O aumento da presença de moléculas de MHC II em macrófagos de camundongos deficientes de C3 já foi demonstrado para a ativação de linfócitos T alorreativos. Embora fosse demonstrado que não houve aumento da expressão gênica de MHC, apenas o aumento da presença da molécula na superfície foi observado [Zhou et al., 2006].

Constatamos menor presença de diversas moléculas na membrana de macrófagos de camundongos B6.C3<sup>-/-</sup> diferenciados da medula óssea com ou sem a ativação com LPS, quando comparado com macrófagos de B6.C3<sup>+/+</sup>. Observamos menor presença de CR1. Diferentemente dos macrófagos peritoneais, quando diferenciados da medula, a presença de CD64 foi menor em B6.C3<sup>-/-</sup>, e uma pequena redução de CD206 (receptor de manose) foi observada na ausência de LPS. No entanto, quando os macrófagos foram ativados, este fenômeno não foi observado. CD282 (TLR2) e CD36 (SR-B1) também foram menos expressos em B6.C3<sup>-/-</sup> na ausência ou presença de LPS. Ambas as moléculas são importantes para a interação dos macrófagos com diversos microrganismos. O papel de TLR2 é bem descrito na interação com Zimosan, *E. coli* e leptospiras, enquanto SR-B1 foi observado na ligação de macrófagos com eritrócitos infectados com *Plasmodium falciparum* [Asch et al., 1987; Ockenhouse & Chulay, 1988]. Há indícios que C3 possui ação nuclear [Kremlitzka et al., 2019] podendo interagir com o DNA e com isso afetar a expressão de alguns genes. Isto pode ser um indício que a ausência de C3 poderia prejudicar diretamente a expressão de algumas moléculas. Este fenômeno pode ser justificado de forma indireta, já que a ação da opsonização feita pelos fragmentos de C3 é importante para a eliminação de células apoptóticas.

Nosso grupo tem buscado entender os mecanismos de interação entre leptospiras e o Sistema Complemento, para tanto o modelo de camundongos deficientes de C3 ou C5 tem sido utilizado [Yamashita et al., 2017]. Com as alterações geradas em macrófagos de camundongos B6.C3<sup>-/-</sup> observadas até o momento, decidimos avaliar se estas modificações poderiam implicar na fagocitose desempenada por estes macrófagos, tendo em vista que, em trabalho realizado anteriormente em nosso laboratório, foi demonstrado que macrófagos peritoneais de camundongos deficientes de C3 (C57/B6 C3<sup>-/-</sup>) apresentavam menor capacidade *in vitro* de fagocitose de leptospiras patogênicas e não patogênicas. Além disso, na ausência de C3, a produção de anticorpos anti-

leptospira foi bastante prejudicada, quando comparada à de camundongos selvagens igualmente tratados [Yamashita et al., 2017].

Buscando replicar os resultados obtidos anteriormente em nosso laboratório, a fagocitose de diversas partículas foi avaliada. Inicialmente utilizamos Zimosan-FITC, incubado previamente com soros retirados de camundongos selvagens ou deficientes de C3. Diferentemente do esperado para a fagocitose de leptospiras, os macrófagos peritoneais de camundongos B6.C3<sup>-/-</sup> demonstraram uma melhor capacidade de englobar a partícula de Zimosan-FITC, tanto na presença quanto na ausência de opsoninas. Estes experimentos foram repetidos, no entanto os resultados ainda não foram quantificados.

Para avaliar se a diferença de fagocitose observada entre os macrófagos B6.C3<sup>+/+</sup> e B6.C3<sup>-/-</sup> seria um fenômeno específico para leptospiras ou se poderia ser replicado em outros exemplos de bactérias, avaliamos a fagocitose de *E. coli* K12. Observamos aumento da fagocitose de *E. coli* em macrófagos B6.C3<sup>-/-</sup> para MOI 10, mas em MOI 1 este efeito não foi observado. Estes experimentos também serão repetidos, pois esperávamos que macrófagos de camundongos selvagens fossem capazes de fagocitar *E. coli* em maior número quando opsonizadas com soro normal.

Menor fagocitose de *L. interrogans*-CFSE foi observada em macrófagos diferenciados da medula óssea de camundongos deficientes de C3, quando comparados com tais células vindas de camundongos selvagens. Esta diferença foi encontrada apenas quando MOI 25 foi empregada, nas concentrações MOI 50 e 100 a diferença estatística na fagocitose de *L. interrogans* (patogênica) e *L. biflexa* (não patogênica) não foi observada por citometria de fluxo. Surpreendentemente também não observamos diferença na fagocitose quando por qPCR (Figura 19), sendo assim, se faz importante averiguar os nuances de cada técnica para que assim o real fenômeno possa ser comprovado.

Sabemos que a ausência de C3 interfere na diferenciação e maturação de células dendríticas [Reis et al., 2008] e com os dados observados até o momento esta deficiência poderia também influenciar o funcionamento de macrófagos. Para ampliar o nosso entendimento sobre a influência de C3 optamos por avaliar a resposta destas células a partir da ativação de vias de sinalização já amplamente conhecidas. Constatamos que a ativação com TPA foi prejudicada nas células deficientes de C3, tanto para a oxidação de cisteína, quanto para a forma ativa da MAPK, o que demonstra uma desregulação na ativação desta célula que pode resultar na não eliminação do

patógeno. TPA foi demonstrado como um promotor gênico importante para o câncer de pele em camundongos e por ter a capacidade de se ligar a PKC, gerando uma gama de respostas celulares [Fürstenberger, G. et al., 1981], a redução da ativação das vias das MAPK e da ação de ROS quando ativadas com o TPA poderia influenciar na resposta imune em macrófagos, resultando em uma piora ao combate a certas infecções, além disto, TPA é uma molécula similar ao PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) que é comumente utilizada para diferenciação de monócitos de linhagem humana THP-1 em macrófagos, sendo assim, se faz importante entender se a diferenciação dos monócitos em macrófagos não é prejudicada em camundongos B6.C3<sup>-/-</sup>.

Para enriquecer o entendimento do efeito de C3 durante resposta imunológica desempenhada por macrófagos, também avaliamos a fagocitose *in vivo* de *L. interrogans* (patogênica) em camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> e B6.C3<sup>-/-</sup>. Ficou demonstrado que a fagocitose *in vivo* foi melhorada nos macrófagos de camundongos B6.C3<sup>-/-</sup> em comparação com os macrófagos B6.C3<sup>+/+</sup> (Figura 25), o que associamos ao possível efeito de compensação desenvolvido por estas células devido à ausência da síntese de C3 nestes animais, o que levaria estas células ao refinamento de outros mecanismos de reconhecimento e fagocitose das bactérias, resultando na melhora da capacidade fagocítica mesmo quando as bactérias foram apresentadas opsonizadas pelos fragmentos de C3. A compensação da fagocitose em macrófagos B6.C3<sup>-/-</sup> pode estar associada a alterações no citoesqueleto e na expressão de receptores de membrana como CR4 observado anteriormente neste trabalho. Notamos resultados inesperados nos ensaios de fagocitose, pois quanto utilizamos soro como fonte de C3 para gerar opsoninas e aumentar a fagocitose, não ocorreu este fenômeno nem em macrófagos B6.C3<sup>+/+</sup>, como já bem descrito na literatura. Confirmamos com relativa frequência o genótipo dos animais e presença de C3 no soro dos camundongos B6.C3<sup>+/+</sup> e ausência nos camundongos B6.C3<sup>-/-</sup>, além de confirmar a ativação e deposição de proteínas do Sistema Complemento. Futuramente pretendemos repetir estes experimentos para solucionar este problema nos ensaios de fagocitose.

Diversas células podem sintetizar C3, incluindo macrófagos, mas as células hepáticas são as principais produtoras [Alper et. al, 1969]. Por macrófagos também secretarem C3 existe a possibilidade de que a diferença na fagocitose encontrada anteriormente entre macrófagos de camundongos B6.C3<sup>-/-</sup> e B6.C3<sup>+/+</sup> poderia ser justificada pela capacidade destes macrófagos B6.C3<sup>+/+</sup> produzirem C3 e desta forma ativar o Sistema Complemento para gerar opsoninas que melhorariam a fagocitose, mas Zhou et al.

(2006) demonstraram que a capacidade de produção de C3 por macrófagos murinos é muito baixa e não altera de forma significativa a atividade dos macrófagos.

Com os resultados obtidos neste trabalho fica evidente que a deficiência de C3 é responsável por diversas alterações em macrófagos, e tais modificações precisam ser melhor estudadas e consideradas em possíveis trabalhos futuros sobre o papel do Sistema Complemento de forma mais ampla durante a resposta imune.

## 7. Conclusões e considerações finais

Com os dados obtidos neste estudo podemos concluir que:

- a) C3 é importante para o recrutamento e diferenciação de monócitos circulantes para macrófagos na cavidade peritoneal de camundongos;
- b) C3 influencia a morfologia de macrófagos peritoneais estimulados com tioglicolato e na sua ausência mais filamentos de  $\alpha$ -Tubulina são gerados em macrófagos diferenciados da medula óssea;
- c) A expressão de receptores celulares foi alterada pela deficiência de C3, em destaque o aumento da presença de CR4 na superfície que é um receptor de fragmentos de C3, podendo este ser talvez um mecanismo de compensação desenvolvido por macrófagos;
- d) A fagocitose *in vitro* de Zimosan e *E. coli* foi maior em macrófagos desenvolvidos na ausência de C3; no entanto a fagocitose de leptospiros não foi alterada;
- e) Após ativação com TPA, a ação de ROS e a ativação de MAPK *in vitro* foram relativamente menores em macrófagos diferenciados diretamente da medula óssea de camundongos deficientes de C3.
- f) A fagocitose de *L. interrogans* foi mais intensa quando inoculadas na cavidade peritoneal de camundongos deficientes de C3, quando comparada com camundongos selvagens de mesmo fundo genético.

Infelizmente neste trabalho ainda não conseguimos reproduzir os resultados obtidos anteriormente por nosso grupo, que demonstraram menor fagocitose de leptospiros por macrófagos deficientes de C3. Neste projeto observamos que a fagocitose de Zimosan, *E. coli* e de *L. interrogans* por macrófagos de camundongos B6.C3<sup>-/-</sup> foi maior em comparação com quando realizada por macrófagos de B6.C3<sup>+/+</sup>. Sendo assim, se faz

ainda necessário aprimorar os protocolos empregados antes de repetir esses experimentos.

Embora as alterações na capacidade fagocítica dos macrófagos ainda sejam um ponto em aberto, observamos neste trabalho distinções entre as populações celulares na cavidade peritoneal dos dois tipos de camundongos, onde os camundongos deficientes de C3 apresentaram maior população de macrófagos residentes após estímulo com tioglicolato em comparação com macrófagos de B6.C3<sup>+/+</sup>. Estes macrófagos residentes possuem um perfil distinto dos estimulados, o que poderia resultar na alteração da resposta celular entre os dois grupos de animais. Além disso, observamos alteração na sinalização das células, onde após a ativação com TPA os macrófagos B6.C3<sup>-/-</sup> em comparação com macrófagos B6.C3<sup>+/+</sup> demonstraram menor produção de ROS e ativação da via MAPK responsável pela transcrição de diversos genes como a secreção de citocinas pró inflamatórias e fatores mitogênicos.

Em conjunto, nossos resultados sugerem que a presença de C3 durante o desenvolvimento ontogenético de camundongos C57Black/6 pode influenciar determinados parâmetros morfológicos e funcionais de macrófagos, células estas de fundamental importância para a resposta imune inata e adquirida.

## 8. Referências

- Adler B, de la Peña Moctezuma A. Leptospira and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 2010 Jan 27;140(3-4):287-96. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.012. Epub 2009 Mar 13. PMID: 19345023.
- Alcamo E, Hacohen N, Schulte LC, Rennert PD, Hynes RO, Baltimore D. Requirement for the NF-kappaB family member RelA in the development of secondary lymphoid organs. *J Exp Med.* 2002 Jan 21;195(2):233-44. doi: 10.1084/jem.20011885. PMID: 11805150; PMCID: PMC2193608.
- Allen LA, Aderem A. Mechanisms of phagocytosis. *Curr Opin Immunol.* 1996 Feb;8(1):36-40. doi: 10.1016/s0952-7915(96)80102-6. PMID: 8729444.
- Alper CA, Johnson AM, Birtch AG, Moore FD. Human C'3: evidence for the liver as the primary site of synthesis. *Science.* 1969 Jan 17;163(3864):286-8. doi: 10.1126/science.163.3864.286. PMID: 4883617.
- Asano E, Maeda M, Hasegawa H, Ito S, Hyodo T, Yuan H, Takahashi M, Hamaguchi M, Senga T. Role of palladin phosphorylation by extracellular signal-regulated kinase in cell migration. *PLoS One.* 2011;6(12):e29338. doi: 10.1371/journal.pone.0029338. Epub 2011 Dec 28. PMID: 22216253; PMCID: PMC3247243.
- Asch AS, Barnwell J, Silverstein RL, Nachman RL. Isolation of the thrombospondin membrane receptor. *J Clin Invest.* 1987 Apr;79(4):1054-61. doi: 10.1172/JCI112918. PMID: 2435757; PMCID: PMC424283.
- Azad AK, Rajaram MV, Schlesinger LS. Exploitation of the Macrophage Mannose Receptor (CD206) in Infectious Disease Diagnostics and Therapeutics. *J Cytol Mol Biol.* 2014 Jan 10;1(1):1000003. doi: 10.13188/2325-4653.1000003. PMID: 24672807; PMCID: PMC3963702.
- Barbosa AS, Isaac L. Complement Immune Evasion by Spirochetes. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2018;415:215-238. doi: 10.1007/82\_2017\_47. PMID: 28939965.
- Bedard K, Lardy B, Krause KH. NOX family NADPH oxidases: not just in mammals. *Biochimie.* 2007 Sep;89(9):1107-12. doi: 10.1016/j.biochi.2007.01.012. Epub 2007 Feb 20. PMID: 17400358.
- Boackle, SA. *CR2. The Complement FactsBook. 2018. 423-434.* doi:10.1016/b978-0-12-810420-0.00040-7.
- Bogdanova D, Takeuchi A, Ozawa M, Kanda Y, Rahman MA, Ludewig B, Kinashi T, Katakai T. Essential Role of Canonical NF-κB Activity in the Development of Stromal Cell Subsets in Secondary Lymphoid Organs. *J Immunol.* 2018 Dec 15;201(12):3580-3586. doi: 10.4049/jimmunol.1800539. Epub 2018 Nov 5. PMID: 30397032.
- Byles V, Covarrubias AJ, Ben-Sahra I, Lamming DW, Sabatini DM, Manning BD, Horng T. The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization. *Nat Commun.* 2013;4:2834. doi: 10.1038/ncomms3834. PMID: 24280772; PMCID: PMC3876736.
- Carroll MC. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:545-68. doi: 10.1146/annurev.immunol.16.1.545. PMID: 9597141.
- Carter RH, Fearon DT. CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science.* 1992 Apr 3;256(5053):105-7. doi: 10.1126/science.1373518. PMID: 1373518.
- Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, Silva LB, Monaris D, Abreu PA, Strobel S, Józsi M, Isaac L, Barbosa AS. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. *J Infect Dis.* 2012 Mar 15;205(6):995-1004. doi: 10.1093/infdis/jir875. Epub 2012 Jan 30. PMID: 22291192.
- Chassin C, Picardeau M, Goujon JM, Bourhy P, Quellard N, Darche S, Badell E, d'Andon MF, Winter N, Lacroix-Lamandé S, Buzoni-Gatel D, Vandewalle A, Werts C. TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, *Leptospira interrogans*. *J Immunol.* 2009 Aug 15;183(4):2669-77. doi: 10.4049/jimmunol.0900506. Epub 2009 Jul 27. PMID: 19635914.

- Chen X, Li SJ, Ojcius DM, Sun AH, Hu WL, Lin X, Yan J. Mononuclear-macrophages but not neutrophils act as major infiltrating anti-leptospiral phagocytes during leptospirosis. *PLoS One*. 2017 Jul 11;12(7):e0181014. doi: 10.1371/journal.pone.0181014. PMID: 28700741; PMCID: PMC5507415.
- Chen X, Yu Y, Mi LZ, Walz T, Springer TA. Molecular basis for complement recognition by integrin  $\alpha X\beta 2$ . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Mar 20;109(12):4586-91. doi: 10.1073/pnas.1202051109. Epub 2012 Mar 5. PMID: 22393018; PMCID: PMC3311339.
- Cho DI, Kim MR, Jeong HY, Jeong HC, Jeong MH, Yoon SH, Kim YS, Ahn Y. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Exp Mol Med*. 2014 Jan 10;46(1):e70. doi: 10.1038/emm.2013.135. PMID: 24406319; PMCID: PMC3909888.
- Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB 3rd, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, Birnbaum MJ. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science*. 2001 Jun 1;292(5522):1728-31. doi: 10.1126/science.292.5522.1728. PMID: 11387480.
- Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, Stein C, Abela-Ridder B, Ko AI. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Sep 17;9(9):e0003898. doi: 10.1371/journal.pntd.0003898. PMID: 26379143; PMCID: PMC4574773.
- Coxon A, Rieu P, Barkalow FJ, Askari S, Sharpe AH, von Andrian UH, Arnaout MA, Mayadas TN. A novel role for the beta 2 integrin CD11b/CD18 in neutrophil apoptosis: a homeostatic mechanism in inflammation. *Immunity*. 1996 Dec;5(6):653-66. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80278-2. PMID: 8986723.
- Dahl MR, Thiel S, Matsushita M, Fujita T, Willis AC, Christensen T, Vorup-Jensen T, Jensenius JC. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity*. 2001 Jul;15(1):127-35. doi: 10.1016/s1074-7613(01)00161-3. PMID: 11485744.
- Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol*. 2013 Oct;14(10):986-95. doi: 10.1038/ni.2705. Epub 2013 Sep 18. PMID: 24048120; PMCID: PMC4045180.
- Diamond MS, Garcia-Aguilar J, Bickford JK, Corbi AL, Springer TA. The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. *J Cell Biol*. 1993 Feb;120(4):1031-43. doi: 10.1083/jcb.120.4.1031. PMID: 7679388; PMCID: PMC2200080.
- Diamond MS, Staunton DE, de Fougerolles AR, Stacker SA, Garcia-Aguilar J, Hibbs ML, Springer TA. ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol*. 1990 Dec;111(6 Pt 2):3129-39. doi: 10.1083/jcb.111.6.3129. PMID: 1980124; PMCID: PMC2116396.
- Dias Da Silva W, Lepow IH. Complement as a mediator of inflammation. II. Biological properties of anaphylatoxin prepared with purified components of human complement. *J Exp Med*. 1967 May 1;125(5):921-46. doi: 10.1084/jem.125.5.921. PMID: 4960742; PMCID: PMC2138204.
- Dobó J, Szakács D, Oroszlán G, Kortvely E, Kiss B, Boros E, Szász R, Závodszy P, Gál P, Pál G. MASP-3 is the exclusive pro-factor D activator in resting blood: the lectin and the alternative complement pathways are fundamentally linked. *Sci Rep*. 2016 Aug 18;6:31877. doi: 10.1038/srep31877. PMID: 27535802; PMCID: PMC4989169.
- Donius LR, Handy JM, Weis JJ, Weis JH. Optimal germinal center B cell activation and T-dependent antibody responses require expression of the mouse complement receptor Cr1. *J Immunol*. 2013; 191(1):434-47. DOI: 10.4049/jimmunol.1203176 [PubMed: 23733878].
- Dustin ML. Complement Receptors in Myeloid Cell Adhesion and Phagocytosis. *Microbiol Spectr*. 2016 Nov;4(6):10.1128/microbiolspec.MCHD-0034-2016. doi: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0034-2016. PMID: 27809953; PMCID: PMC5580235.

- Ehrenreich BA, Cohn ZA. The uptake and digestion of iodinated human serum albumin by macrophages in vitro. *J Exp Med.* 1967 Nov 1;126(5):941-58. doi: 10.1084/jem.126.5.941. PMID: 6062005; PMCID: PMC2138411.
- Evangelista KV, Coburn J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol.* 2010 Sep;5(9):1413-25. doi: 10.2217/fmb.10.102. PMID: 20860485; PMCID: PMC3037011.
- Fraga TR, Barbosa AS, Isaac L. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. *Scand J Immunol.* 2011 May;73(5):408-19. doi: 10.1111/j.1365-3083.2010.02505.x. PMID: 21204903.
- Fraga TR, Courrol Ddos S, Castiblanco-Valencia MM, Hirata IY, Vasconcellos SA, Juliano L, Barbosa AS, Isaac L. Immune evasion by pathogenic *Leptospira* strains: the secretion of proteases that directly cleave complement proteins. *J Infect Dis.* 2014 Mar;209(6):876-86. doi: 10.1093/infdis/jit569. Epub 2013 Oct 26. PMID: 24163418.
- Fraga TR, Isaac L, Barbosa AS. Complement Evasion by Pathogenic *Leptospira*. *Front Immunol.* 2016 Dec 21;7:623. doi: 10.3389/fimmu.2016.00623. PMID: 28066433; PMCID: PMC5174078.
- Franke TF. PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene.* 2008 Oct 27;27(50):6473-88. doi: 10.1038/onc.2008.313. PMID: 18955974.
- Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature.* 1999 Jun 10;399(6736):597-601. doi: 10.1038/21218. Erratum in: *Nature* 1999 Aug 19;400(6746):792. PMID: 10376602; PMCID: PMC3637917.
- Fürstenberger G, Berry DL, Sorg B, Marks F. Skin tumor promotion by phorbol esters is a two-stage process. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Dec;78(12):7722-6. doi: 10.1073/pnas.78.12.7722. PMID: 6801661; PMCID: PMC349342.
- Gavin C, Meinke S, Heldring N, Heck KA, Achour A, Iacobaeus E, Höglund P, Le Blanc K, Kadri N. The Complement System Is Essential for the Phagocytosis of Mesenchymal Stromal Cells by Monocytes. *Front Immunol.* 2019 Sep 20;10:2249. doi: 10.3389/fimmu.2019.02249. PMID: 31616424; PMCID: PMC6763726.
- Ghosh S, Hayden MS. New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2008 Nov;8(11):837-48. doi: 10.1038/nri2423. PMID: 18927578.
- Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene.* 2006 Oct 30;25(51):6680-4. doi: 10.1038/sj.onc.1209954. PMID: 17072321.
- Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005 Dec;5(12):953-64. doi: 10.1038/nri1733. PMID: 16322748.
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003 Jan;3(1):23-35. doi: 10.1038/nri978. PMID: 12511873.
- Gorski JP, Hugli TE, Müller-Eberhard HJ. C4a: the third anaphylatoxin of the human complement system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Oct;76(10):5299-302. doi: 10.1073/pnas.76.10.5299. PMID: 291947; PMCID: PMC413129.
- Haake DA. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology (Reading).* 2000 Jul;146 ( Pt 7)(Pt 7):1491-1504. doi: 10.1099/00221287-146-7-1491. PMID: 10878114; PMCID: PMC2664406.
- Hebell T, Ahearn JM, Fearon DT. Suppression of the immune response by a soluble complement receptor of B lymphocytes. *Science.* 1991 Oct 4;254(5028):102-5. doi: 10.1126/science.1718035. PMID: 1718035.
- Helmy KY, Katschke KJ Jr, Gorgani NN, Kljavin NM, Elliott JM, Diehl L, Scales SJ, Ghilardi N, van Lookeren Campagne M. CR1g: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell.* 2006 Mar 10;124(5):915-27. doi: 10.1016/j.cell.2005.12.039. PMID: 16530040.
- Hoeffel G, Ginhoux F. Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages. *Cell Immunol.* 2018 Aug;330:5-15. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.01.001. Epub 2018 Jan 12. PMID: 29475558.

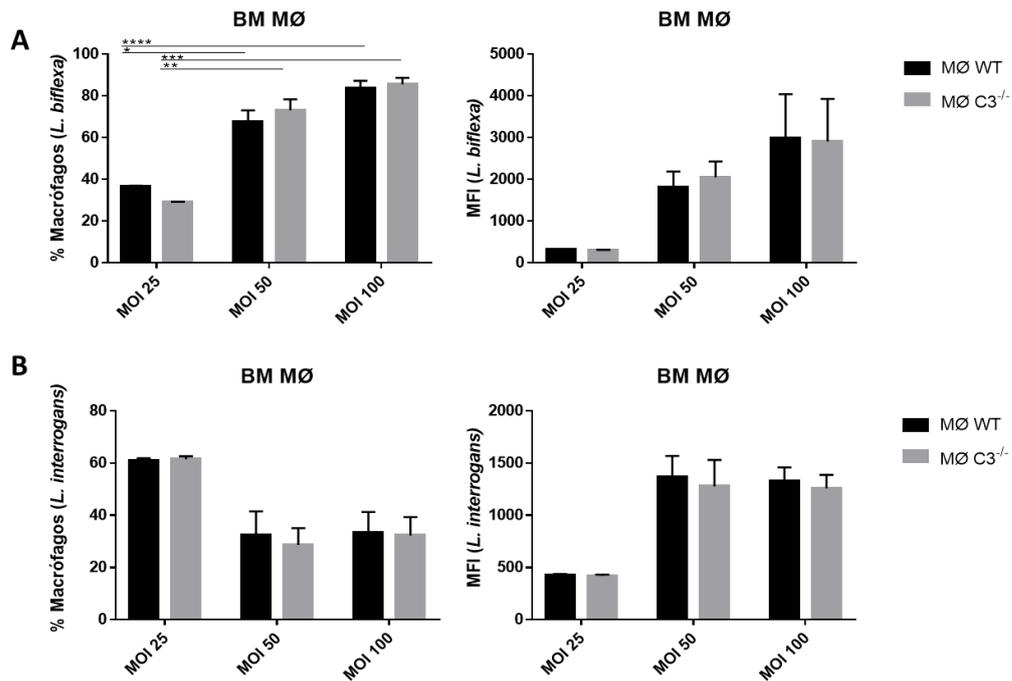
- Ingalls RR, Golenbock DT. CD11c/CD18, a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 1995 Apr 1;181(4):1473-9. doi: 10.1084/jem.181.4.1473. PMID: 7535339; PMCID: PMC2191975.
- Isogai E, Kitagawa H, Isogai H, Kurebayashi Y, Ito N. Phagocytosis as a defense mechanism against infection with leptospires. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*. 1986 Feb;261(1):65-74. doi: 10.1016/s0176-6724(86)80063-3. PMID: 3010604.
- Jacobson AC, Weis JH. Comparative functional evolution of human and mouse CR1 and CR2. *J Immunol*. 2008 Sep 1;181(5):2953-9. doi: 10.4049/jimmunol.181.5.2953. PMID: 18713965; PMCID: PMC3366432.
- Jones PF, Jakubowicz T, Pitossi FJ, Maurer F, Hemmings BA. Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 May 15;88(10):4171-5. doi: 10.1073/pnas.88.10.4171. PMID: 1851997; PMCID: PMC51620.
- Katz Y, Strunk RC. IL-1 and tumor necrosis factor. Similarities and differences in stimulation of expression of alternative pathway of complement and IFN-beta 2/IL-6 genes in human fibroblasts. *J Immunol*. 1989 Jun 1;142(11):3862-7. PMID: 2523936.
- Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*. 2014 Sep 25;5:461. doi: 10.3389/fimmu.2014.00461. PMID: 25309543; PMCID: PMC4174766.
- Kim KH, Choi BK, Kim YH, Han C, Oh HS, Lee DG, Kwon BS. Extracellular stimulation of VSIG4/complement receptor Ig suppresses intracellular bacterial infection by inducing autophagy. *Autophagy*. 2016 Sep;12(9):1647-59. doi: 10.1080/15548627.2016.1196314. Epub 2016 Jul 20. PMID: 27440002; PMCID: PMC5082771.
- Klickstein LB, Barbashov SF, Liu T, Jack RM, Nicholson-Weller A. Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a receptor for C1q. *Immunity*. 1997 Sep;7(3):345-55. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80356-8. PMID: 9324355.
- Ko AI, Goarant C, Picardeau M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009 Oct;7(10):736-47. doi: 10.1038/nrmicro2208. PMID: 19756012; PMCID: PMC3384523.
- Konishi H, Shinomura T, Kuroda S, Ono Y, Kikkawa U. Molecular cloning of rat RAC protein kinase alpha and beta and their association with protein kinase C zeta. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Nov 30;205(1):817-25. doi: 10.1006/bbrc.1994.2738. PMID: 7999118.
- Kremlitzka M, Nowacka AA, Mohlin FC, Bompada P, De Marinis Y, Blom AM. Interaction of Serum-Derived and Internalized C3 With DNA in Human B Cells-A Potential Involvement in Regulation of Gene Transcription. *Front Immunol*. 2019 Mar 19;10:493. doi: 10.3389/fimmu.2019.00493. PMID: 30941132; PMCID: PMC6433827.
- Landar A, Oh JY, Giles NM, Isom A, Kirk M, Barnes S, Darley-Usmar VM. A sensitive method for the quantitative measurement of protein thiol modification in response to oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2006 Feb 1;40(3):459-68. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.046. Epub 2005 Nov 18. PMID: 16443161.
- Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Apr;14(2):296-326. doi: 10.1128/CMR.14.2.296-326.2001. PMID: 11292640; PMCID: PMC88975.
- Li L, Yang XJ. Tubulin acetylation: responsible enzymes, biological functions and human diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2015 Nov;72(22):4237-55. doi: 10.1007/s00018-015-2000-5. Epub 2015 Jul 31. PMID: 26227334.
- Lien EC, Lyssiotis CA, Cantley LC. Metabolic Reprogramming by the PI3K-Akt-mTOR Pathway in Cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2016;207:39-72. doi: 10.1007/978-3-319-42118-6\_3. PMID: 27557534.
- Liu B, Wang Y, Guo X, Zhu W, Zhang Y, He P. Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester labeling method to study the interaction between Leptospira and macrophages. *J Microbiol Methods*. 2014 Dec;107:205-13. doi: 10.1016/j.mimet.2014.10.005. PMID: 25455022.

- Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2:17023–. doi: 10.1038/sigtrans.2017.23. Epub 2017 Jul 14. PMID: 29158945; PMCID: PMC5661633.
- Lukácsi S, Nagy-Baló Z, Erdei A, Sándor N, Bajtay Z. The role of CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in complement-mediated phagocytosis and podosome formation by human phagocytes. *Immunol Lett.* 2017 Sep;189:64-72. doi: 10.1016/j.imlet.2017.05.014. Epub 2017 May 26. PMID: 28554712.
- Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014 Mar 3;6:13. doi: 10.12703/P6-13. PMID: 24669294; PMCID: PMC3944738.
- Medvedev AE, Flo T, Ingalls RR, Golenbock DT, Teti G, Vogel SN, Espevik T. Involvement of CD14 and complement receptors CR3 and CR4 in nuclear factor-kappaB activation and TNF production induced by lipopolysaccharide and group B streptococcal cell walls. *J Immunol.* 1998 May 1;160(9):4535-42. PMID: 9574560.
- Morgan BP. Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non-lethal effects. *Biochem J.* 1989 Nov 15;264(1):1-14. doi: 10.1042/bj2640001. PMID: 2690818; PMCID: PMC1133540.
- Nakatani K, Sakaue H, Thompson DA, Weigel RJ, Roth RA. Identification of a human Akt3 (protein kinase B gamma) which contains the regulatory serine phosphorylation site. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Apr 21;257(3):906-10. doi: 10.1006/bbrc.1999.0559. PMID: 10208883.
- Nathan C. Metchnikoff's Legacy in 2008. *Nat Immunol.* 2008 Jul;9(7):695-8. doi: 10.1038/ni0708-695. PMID: 18563074.
- Nesargikar PN, Spiller B, Chavez R. The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors. *Eur J Microbiol Immunol (Bp).* 2012 Jun;2(2):103-11. doi: 10.1556/EuJMI.2.2012.2.2. Epub 2012 Jun 13. PMID: 24672678; PMCID: PMC3956958.
- Nicholson-Weller A, March JP, Rosenfeld SI, Austen KF. Affected erythrocytes of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria are deficient in the complement regulatory protein, decay accelerating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Aug;80(16):5066-70. doi: 10.1073/pnas.80.16.5066. PMID: 6576376; PMCID: PMC384189.
- Nogales E. Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:277-302. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.277. PMID: 10966460.
- Ockenhouse CF, Chulay JD. Plasmodium falciparum sequestration: OKM5 antigen (CD36) mediates cytoadherence of parasitized erythrocytes to a myelomonocytic cell line. *J Infect Dis.* 1988 Mar;157(3):584-8. doi: 10.1093/infdis/157.3.584. PMID: 2449507.
- Ouyang YB, Zhang XH, He QP, Wang GX, Siesjö BK, Hu BR. Differential phosphorylation at Ser473 and Thr308 of Akt-1 in rat brain following hypoglycemic coma. *Brain Res.* 2000 Sep 8;876(1-2):191-5. doi: 10.1016/s0006-8993(00)02618-4. PMID: 10973608.
- Ozaita A, Puighermanal E, Maldonado R. Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain. *J Neurochem.* 2007 Aug;102(4):1105-14. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04642.x. Epub 2007 May 4. PMID: 17484726.
- Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature.* 1999 Sep 2;401(6748):82-5. doi: 10.1038/43466. PMID: 10485710.
- Pekkarinen PT, Heikkilä N, Kisand K, Peterson P, Botto M, Daha MR, Drouet C, Isaac L, Helminen M, Haahtela T, Meri S, Jarva H, Arstila TP. Dysregulation of adaptive immune responses in complement C3-deficient patients. *Eur J Immunol.* 2015 Mar;45(3):915-21. doi: 10.1002/eji.201444948. Epub 2015 Jan 19. PMID: 25446578.
- 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 Aug 20;120(3112):279-85. doi: 10.1126/science.120.3112.279. PMID: 13186838.
- 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,

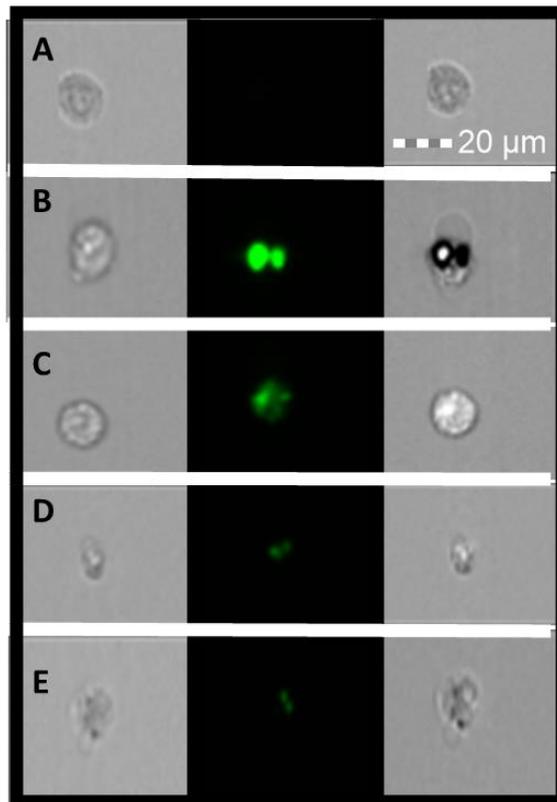
- properdin, and its role in immune phenomena. *Science*. 1954 Aug 20;120(3112):279-85. doi: 10.1126/science.120.3112.279. PMID: 13186838.
- Prabhudas M, Bowdish D, Drickamer K, Febbraio M, Herz J, Kobzik L, Krieger M, Loike J, Means TK, Moestrup SK, Post S, Sawamura T, Silverstein S, Wang XY, El Khoury J. Standardizing scavenger receptor nomenclature. *J Immunol*. 2014 Mar 1;192(5):1997-2006. doi: 10.4049/jimmunol.1490003. PMID: 24563502; PMCID: PMC4238968.
  - Ratet G, Santecchia I, Fanton d'Andon M, Vernel-Pauillac F, Wheeler R, Lenormand P, Fischer F, Lechat P, Haake DA, Picardeau M, Boneca IG, Werts C. LipL21 lipoprotein binding to peptidoglycan enables *Leptospira interrogans* to escape NOD1 and NOD2 recognition. *PLoS Pathog*. 2017 Dec 6;13(12):e1006725. doi: 10.1371/journal.ppat.1006725. PMID: 29211798; PMCID: PMC5764436.
  - Reis ES, Barbuto JA, Köhl J, Isaac L. Impaired dendritic cell differentiation and maturation in the absence of C3. *Mol Immunol*. 2008 Apr;45(7):1952-62. doi: 10.1016/j.molimm.2007.10.031. Epub 2007 Dec 3. PMID: 18061265.
  - Reis ES, Falcão DA, Isaac L. Clinical aspects and molecular basis of primary deficiencies of complement component C3 and its regulatory proteins factor I and factor H. *Scand J Immunol*. 2006 Mar;63(3):155-68. doi: 10.1111/j.1365-3083.2006.01729.x. PMID: 16499568.
  - Ricklin D, Reis ES, Lambris JD. Complement in disease: a defence system turning offensive. *Nat Rev Nephrol*. 2016 Jul;12(7):383-401. doi: 10.1038/nrneph.2016.70. Epub 2016 May 23. PMID: 27211870; PMCID: PMC4974115.
  - Ristow P, Bourhy P, Kerneis S, Schmitt C, Prevost MC, Lilenbaum W, Picardeau M. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. *Microbiology (Reading)*. 2008 May;154(Pt 5):1309-1317. doi: 10.1099/mic.0.2007/014746-0. PMID: 18451039.
  - Roskoski R Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res*. 2012 Aug;66(2):105-43. doi: 10.1016/j.phrs.2012.04.005. Epub 2012 Apr 27. PMID: 22569528.
  - Rotsch J, Rohrbeck A, May M, Kolbe T, Hagemann S, Schelle I, Just I, Genth H, Huelsenbeck SC. Inhibition of macrophage migration by *C. botulinum* exoenzyme C3. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2012 Sep;385(9):883-90. doi: 10.1007/s00210-012-0764-9. Epub 2012 May 29. PMID: 22644106.
  - Rückertl D, Jenkins SJ, Laqtom NN, Gallagher IJ, Sutherland TE, Duncan S, Buck AH, Allen JE. Induction of IL-4R $\alpha$ -dependent microRNAs identifies PI3K/Akt signaling as essential for IL-4-driven murine macrophage proliferation in vivo. *Blood*. 2012 Sep 13;120(11):2307-16. doi: 10.1182/blood-2012-02-408252. Epub 2012 Aug 1. PMID: 22855601; PMCID: PMC3501641.
  - Saqib U, Sarkar S, Suk K, Mohammad O, Baig MS, Savai R. Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation. *Oncotarget*. 2018 Apr 3;9(25):17937-17950. doi: 10.18632/oncotarget.24788. PMID: 29707159; PMCID: PMC5915167.
  - Sastry K, Ezekowitz RA. Collectins: pattern recognition molecules involved in first line host defense. *Curr Opin Immunol*. 1993 Feb;5(1):59-66. doi: 10.1016/0952-7915(93)90082-4. Erratum in: *Curr Opin Immunol* 1993 Aug;5(4):566. PMID: 8452675.
  - Scieszka JF, Maggiora LL, Wright SD, Cho MJ. Role of complements C3 and C5 in the phagocytosis of liposomes by human neutrophils. *Pharm Res*. 1991 Jan;8(1):65-9. doi: 10.1023/a:1015830306839. PMID: 1826557.
  - Stahl PD, Ezekowitz RA. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol*. 1998 Feb;10(1):50-5. doi: 10.1016/s0952-7915(98)80031-9. PMID: 9523111.
  - Steneroden KK, Hill AE, Salman MD. Zoonotic disease awareness in animal shelter workers and volunteers and the effect of training. *Zoonoses Public Health*. 2011 Nov;58(7):449-53. doi: 10.1111/j.1863-2378.2011.01389.x. Epub 2011 Feb 22. PMID: 21824343.
  - Stossel TP, Mason RJ, Pollard TD, Vaughan M. Isolation and properties of phagocytic vesicles. II. Alveolar macrophages. *J Clin Invest*. 1972 Mar;51(3):604-14. doi: 10.1172/JCI106850. PMID: 5011103; PMCID: PMC302167.

- STRAUS W. CYTOCHEMICAL OBSERVATIONS ON THE RELATIONSHIP BETWEEN LYSOSOMES AND PHAGOSOMES IN KIDNEY AND LIVER BY COMBINED STAINING FOR ACID PHOSPHATASE AND INTRAVENOUSLY INJECTED HORSERADISH PEROXIDASE. *J Cell Biol.* 1964 Mar;20(3):497-507. doi: 10.1083/jcb.20.3.497. PMID: 14128050; PMCID: PMC2106412.
- Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, Gordon S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:901-44. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115816. PMID: 15771589.
- Toma C, Okura N, Takayama C, Suzuki T. Characteristic features of intracellular pathogenic *Leptospira* in infected murine macrophages. *Cell Microbiol.* 2011 Nov;13(11):1783-92. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01660.x. Epub 2011 Aug 31. PMID: 21819516.
- Ulbrich AG, Florido MP, Nudelman V, Reis ES, Baracho GV, Isaac L. Hereditary human complement C3 deficiency owing to reduced levels of C3 mRNA. *Scand J Immunol.* 2001 Jun;53(6):622-6. doi: 10.1046/j.1365-3083.2001.00934.x. PMID: 11422912.
- Vergadi E, Ieronymaki E, Lyroni K, Vaporidi K, Tsatsanis C. Akt Signaling Pathway in Macrophage Activation and M1/M2 Polarization. *J Immunol.* 2017 Feb 1;198(3):1006-1014. doi: 10.4049/jimmunol.1601515. PMID: 28115590.
- Vik DP, Amiguet P, Moffat GJ, Fey M, Amiguet-Barras F, Wetsel RA, Tack BF. Structural features of the human C3 gene: intron/exon organization, transcriptional start site, and promoter region sequence. *Biochemistry.* 1991 Jan 29;30(4):1080-5. doi: 10.1021/bi00218a029. PMID: 1703437.
- Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med.* 2001a Apr 5;344(14):1058-66. doi: 10.1056/NEJM200104053441406. PMID: 11287977.
- Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med.* 2001b Apr 12;344(15):1140-4. doi: 10.1056/NEJM200104123441506. PMID: 11297706.
- Werts C. Leptospirosis: a Toll road from B lymphocytes. *Chang Gung Med J.* 2010 Nov-Dec;33(6):591-601. PMID: 21199604.
- Wiesmann C, Katschke KJ, Yin J, Helmy KY, Steffek M, Fairbrother WJ, McCallum SA, Embuscado L, DeForge L, Hass PE, van Lookeren Campagne M. Structure of C3b in complex with CR1g gives insights into regulation of complement activation. *Nature.* 2006 Nov 9;444(7116):217-20. doi: 10.1038/nature05263. Epub 2006 Oct 15. PMID: 17051150.
- Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature.* 2013 Apr 25;496(7446):445-55. doi: 10.1038/nature12034. PMID: 23619691; PMCID: PMC3725458.
- Yamashita DHS et al.; PARTICIPAÇÃO DO COMPONENTE C3 DO SISTEMA COMPLEMENTO MURINO NA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS E FAGOCITOSE CONTRA *Leptospira interrogans*. 2017. Dissertação para título de Mestre em imunologia, Instituto de ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
- Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors.* 2006 Mar;24(1):21-44. doi: 10.1080/02699050500284218. PMID: 16393692.
- Zani IA, Stephen SL, Mughal NA, Russell D, Homer-Vanniasinkam S, Wheatcroft SB, Ponnambalam S. Scavenger receptor structure and function in health and disease. *Cells.* 2015 May 22;4(2):178-201. doi: 10.3390/cells4020178. PMID: 26010753; PMCID: PMC4493455.
- Zhang H, Sun SC. NF-κB in inflammation and renal diseases. *Cell Biosci.* 2015 Nov 16;5:63. doi: 10.1186/s13578-015-0056-4. PMID: 26579219; PMCID: PMC4647710.
- Zhou W, Patel H, Li K, Peng Q, Villiers MB, Sacks SH. Macrophages from C3-deficient mice have impaired potency to stimulate alloreactive T cells. *Blood.* 2006 Mar 15;107(6):2461-9. doi: 10.1182/blood-2005-08-3144. Epub 2005 Nov 22. PMID: 16304047.

## 9. ANEXO



**Figura Suplementar 1. Quantificação de leptospiros fagocitadas.** Foram utilizadas três diferentes concentrações de *Leptospira biflexa* (saprofítica) **A**; *Leptospira interrogans* (patogênica) **B**; que foram incubadas com macrófagos de camundongos diferenciados a partir da medula óssea. ). A análise dos dados foi realizada empregando o teste ANOVA *two-way* no *software* GraphPad Prism. \* $p < 0,5$ ; \*\* $p < 0,1$ ; \*\*\* $p < 0,01$  e \*\*\*\* $p < 0,001$ .



**Figura Suplementar 2. Avaliação da internalização de leptospiras, zimosan e *E. coli* por macrófagos.** Para confirmar que as partículas de Zimonsan-FITC (B), *E. coli* (C), leptospira (D - *in vitro*; E - *in vivo*) foram realmente internalizadas e não apenas aderidas à membrana plasmática dos macrófagos, as células foram analisadas em *FlowSight* (Amnis) que permite a geração de imagens durante a aquisição de dados por citometria de fluxo. Em A foram representados os macrófagos sozinho.