

LAZARA ELENA SANTIESTEBAN LORES

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

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

São Paulo
2021

LAZARA ELENA SANTIESTEBAN LORES

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

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

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Lourdes Isaac

Versão original

São Paulo
2021

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

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

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

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Lazara Elena Santiesteban Lores

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

Orientador(a): Profa. Dra. Lourdes Isaac

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

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

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

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

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

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



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

São Paulo, 14 de dezembro de 2017.

PARECER 1370/CEPSH

CAAE nº 78969417.5.1001.5467

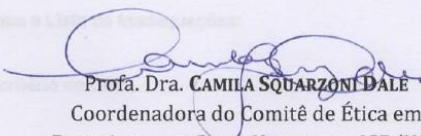
Protocolo CEPSH-ICB nº 1405/17

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

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

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

Atenciosamente,


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



SECRETARIA MUNICIPAL DA
SAÚDE DE SÃO PAULO -
SMS/SP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Lourdes Isaac

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 78969417.5.3001.0086

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.105.222

Apresentação do Projeto:

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

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

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

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

Endereço: Rua General Jardim, 36 - 8º andar

Bairro: Vila Buarque

UF: SP

Município: SAO PAULO

CEP: 01.223-010

Telefone: (11)3397-2464

E-mail: smscep@gmail.com

Continuação do Parecer: 3.105.222

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 02 de Janeiro de 2019

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

Endereço: Rua General Jardim, 36 - 8º andar

Bairro: Vila Buarque

UF: SP

Município: SAO PAULO

CEP: 01.223-010

Telefone: (11)3397-2464

E-mail: smscep@gmail.com

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Natureza bifásica da leptospirose e aspectos relevantes em diferentes estágios da doença.	- 17 -
Figura 2 - Representação esquemática da ativação do Sistema Complemento	- 23 -
Figura 3 - Estrutura da proteína Fator H, reguladora da ativação do SC.....	- 31 -
Figura 4 - Eventos principais da ativação e regulação da VA.....	- 32 -
Figura 5 - Família do Fator H.	- 34 -
Figura 6 - Mutações do FH associadas com a Síndrome Hemolítica Urêmica atípica.....	- 37 -

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aHUS	síndrome hemolítica urêmica atípica (do inglês - <i>atypical Hemolytic Uremic Syndrome</i>)
C1-INH	inibidor de C1 (do inglês - <i>C1 inhibitor</i>)
C3G	C3 glomerulopatia
C4BP	proteína ligadora de C4b (do inglês - <i>C4b binding protein</i>)
CFH	Fator H do complemento (do inglês - <i>complement Factor H</i>)
CFHR	proteínas relacionadas ao Fator H (do inglês - <i>complement Factor H related proteins</i>)
CRP	proteína C reativa (do inglês - <i>C-reactive protein</i>)
DAF	fator acelerador do decaimento (do inglês - <i>decay accelerating factor</i>)
DDD	doença dos depósitos densos (do inglês - <i>dense deposit disease</i>)
FB	Fator B
FD	Fator D
FH	Fator H
FHL-1	Fator H tipo 1 (do inglês - <i>Factor H-like 1</i>)
FI	Fator I
FP	Fator P ou protectina
GAGs	glicosaminoglicanos
GPI	glicofosfatidilinositol
HLA	antígeno leucocitário humano (do inglês - <i>human leukocyte antigen</i>)
Lig	proteínas da leptospira com domínios tipo imunoglobulinas (do inglês - <i>Leptospiral immunoglobulin-like proteins</i>)
LPS	lipopolissacarídeo
MAC	complexo de ataque à membrana (do inglês - <i>membrane attack complex</i>)
MASP	serino protease associada a MBL (do inglês - <i>MBL associated serine protease</i>)
MAT	teste de microaglutinação (do inglês - <i>microagglutination test</i>)
MBL	lectina ligadora de manose (do inglês - <i>mannan-binding lectin</i>)
MCP	proteína cofatora de membrana (do inglês - <i>membrane cofactor protein</i>)
RCA	reguladores da ativação do complemento (do inglês - <i>regulators of complement activation</i>)
SAP	proteína amiloide sérica (do inglês - <i>serum amyloid protein</i>)
SARA	Síndrome da Angústia Respiratória Aguda
SC	Sistema Complemento
SCR	do inglês- <i>short consensus repeat</i>
SNP	polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês - <i>single nucleotide polymorphism</i>)
TCS	sistema regulador de dois componentes (do inglês - <i>two component regulatory system</i>)
TLR	receptores do tipo Toll (do inglês - <i>toll-like receptors</i>)

SUMÁRIO

1.Introdução	- 15 -
1.1 A leptospirose	- 15 -
1.2 Leptospira	- 20 -
1.3 Sistema Complemento	- 22 -
1.3.1 Regulação do SC	- 28 -
1.3.1.1 FH e a família de proteínas relacionadas	- 30 -
1.3.2 Patologias decorrentes de alterações nos genes CFH e FHR -	35 -
1.4 Polimorfismos genéticos humanos associados com a susceptibilidade à leptospirose	- 38 -
1.5 Mecanismos de evasão de leptospiras patogênicas ao SC -	41 -
6. Conclusões	- 44 -
REFERÊNCIAS	- 45 -
ANEXOS	- 59 -
ANEXO A - Trabalhos apresentados em congressos	- 59 -
ANEXO B - Artigos publicados	- 60 -

1.Introdução

1.1 A leptospirose

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

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

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

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

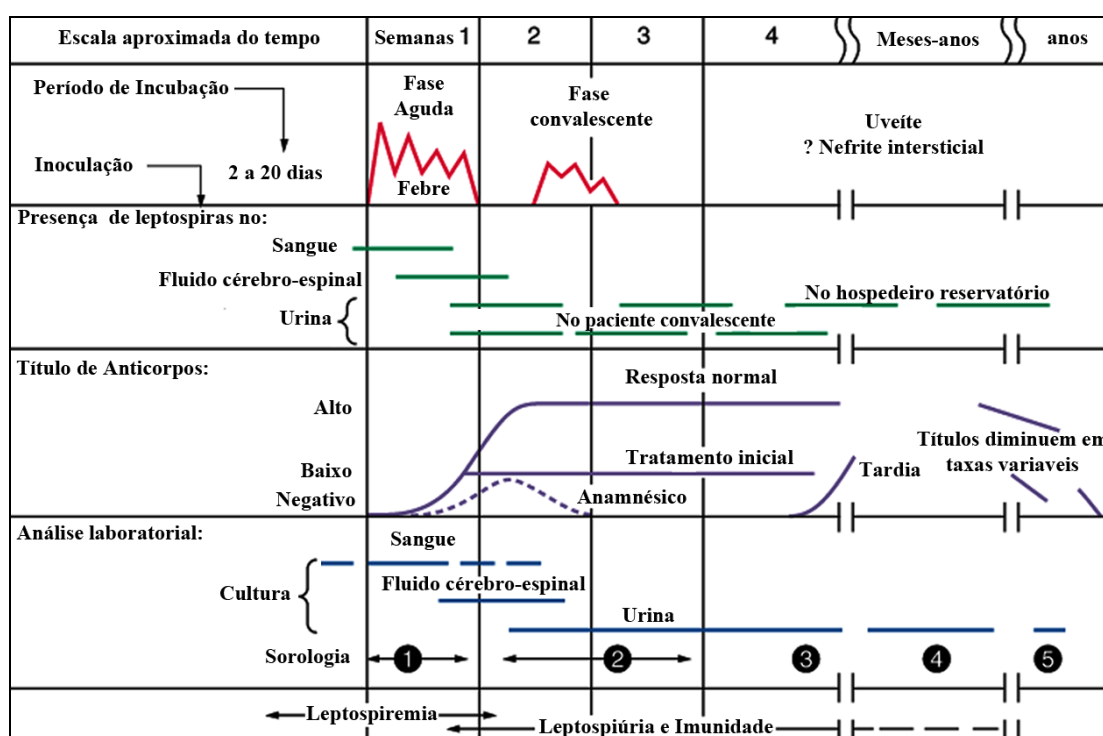
As leptospiras causam infecções assintomáticas em seus hospedeiros de manutenção, nos quais colonizam os túbulos renais proximais, podendo ser eliminadas na urina. A infecção em humanos ocorre pela penetração das bactérias em mucosas intactas e na pele lesada. As leptospiras se disseminam pela circulação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

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

Desde a exposição inicial até o início dos sintomas transcorrem em média entre 7 e 12 dias, mas este período é variável, podendo ser tão curto quanto 3 dias ou tão longo quanto um mês (MORGAN et al., 2002). A doença segue um curso bifásico: de início repentino, a fase aguda ou septicêmica dura entre 4 a 7 dias e se caracteriza pela presença de febre, calafrios, mialgia e dor de cabeça não podendo ser diferenciada de outras causas de doenças febris agudas. Neste período as leptospiras podem ser encontradas no sangue ou no

líquor cefalorraquidiano. Esta fase é seguida por um período de 1 a 3 dias de defervescência (declínio ou cessão da febre). Na segunda etapa da doença chamada de fase tardia ou fase imune as leptospiras podem ser encontradas na urina e a produção de anticorpos específicos pode ser detectada por métodos sorológicos (**Figura 1**). Em 10 a 15% dos pacientes pode haver evolução para manifestações clínicas mais graves que típicamente iniciam-se após a primeira semana da doença (HAAKE; LEVETT, 2015).

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



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

Fonte: Adaptado de LEVETT (2001).

A insuficiência renal aguda é considerada uma importante complicação da fase tardia da leptospirose e ocorre em 16% a 40% desses pacientes

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

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

O fígado é outro órgão alvo afetado na leptospirose. Análises histopatológicas hepáticas provenientes de casos fatais demonstram congestionamento sinusoidal e distensão do espaço de Disse (AREAN, 1962). A presença de leptospiros nos hepatócitos foi observada por imunohistoquímica em modelos animais (MIYAHARA et al., 2014). O dano hepatocelular e a ruptura das junções inter-hepatócitos causam ao vazamento dos canalículos biliares e entrada da bile nos vasos sanguíneos sinusoidais.

Como consequência há aumento dos níveis de bilirrubina típico de icterícia (MIYAHARA et al., 2014). A icterícia é considerada um sinal característico e é frequentemente usada para auxiliar no diagnóstico da leptospirose, sendo um preditor de pior prognóstico associado com a Síndrome de Weil (GANCHEVA, 2016). Em certas ocasiões o aumento dos níveis de bilirrubina ocorre em consequência de anemia hemolítica, mais comum em pacientes com deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (AVDEEVA et al., 2002).

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

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

No tratamento contra a leptospirose o uso de antibiótico é amplamente empregado. Os casos mais severos são tratados com doses altas de penicilina endovenosa; já os casos menos graves são tratados com antibióticos orais como amoxicilina, ampicilina, doxiciclina e eritromicina (RICALDI; SWANCUTT; MATTHIAS, 2013). Atualmente, não há vacina licenciada contra a leptospirose humana. No entanto, vacinas desenvolvidas a partir da preparação de leptospiras mortas por formalina ou calor (bacterinas), já foram testadas com pouco êxito em países como Japão (KITAOKA; INOUE, 1952; KOIZUMI; WATANABE, 2005), Cuba (MARTÍNEZ et al., 2004) e China (YAN et al., 2003). A limitada eficácia deste tipo de vacinas deriva do curto período de proteção que oferecem. A resposta imune gerada pela bacterina não estimula memória imunológica prolongada, precisando repetir as doses anualmente para manter a imunidade (FAINE et al., 1999). Além disso, a vacina é sorovar-específica e,

portanto, a proteção dependerá dos sorovares empregados na sua preparação. Assim, para aumentar a eficácia da vacina em determinada localidade geográfica, deve-se agrupar os sorovares mais relevantes na região onde pretende ser aplicada.

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

1.2 *Leptospira*

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

Desde sua descrição original em 1907 por Stimson, o gênero *Leptospira* é dividido em dois grupos com base em sua virulência: saprófitas como *Leptospira biflexa* e patogênicas como *Leptospira interrogans* (STIMSON,

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

Essa classificação genética coexiste com a classificação sorológica mais antiga, na qual antisoros são usados para estabelecer a relação antigênica entre os isolados. O teste de adsorção e aglutinação cruzada define os sorovares, os quais são distinguidos pela heterogeneidade estrutural no componente carboidrato do LPS da bactéria (TERPSTRA, 1992). Atualmente mais de 300 sorovares são reconhecidos, porém esta lista é periodicamente atualizada. Os sorovares antigenicamente relacionados são organizados por conveniência em soro-grupos. Os sorogrupos são identificados pelo teste de microaglutinação (MAT, do inglês - *microagglutination test*) e têm como propósito agrupar sorovares com antígenos em comum. Nem sorovares, nem sorogrupos são indicativos da relação taxonômica entre as cepas, pois um sorovar (definido por anticorpos direcionados contra seu antígeno lipopolissacarídeo) pode pertencer a mais de uma espécie e membros do mesmo grupo genético não pertencem necessariamente ao mesmo sorogrupo. Contudo, é importante caracterizar a distribuição de sorovares em diferentes regiões para fins epidemiológicos e vacinais (BHARTI et al., 2003; MARQUEZ et al., 2017).

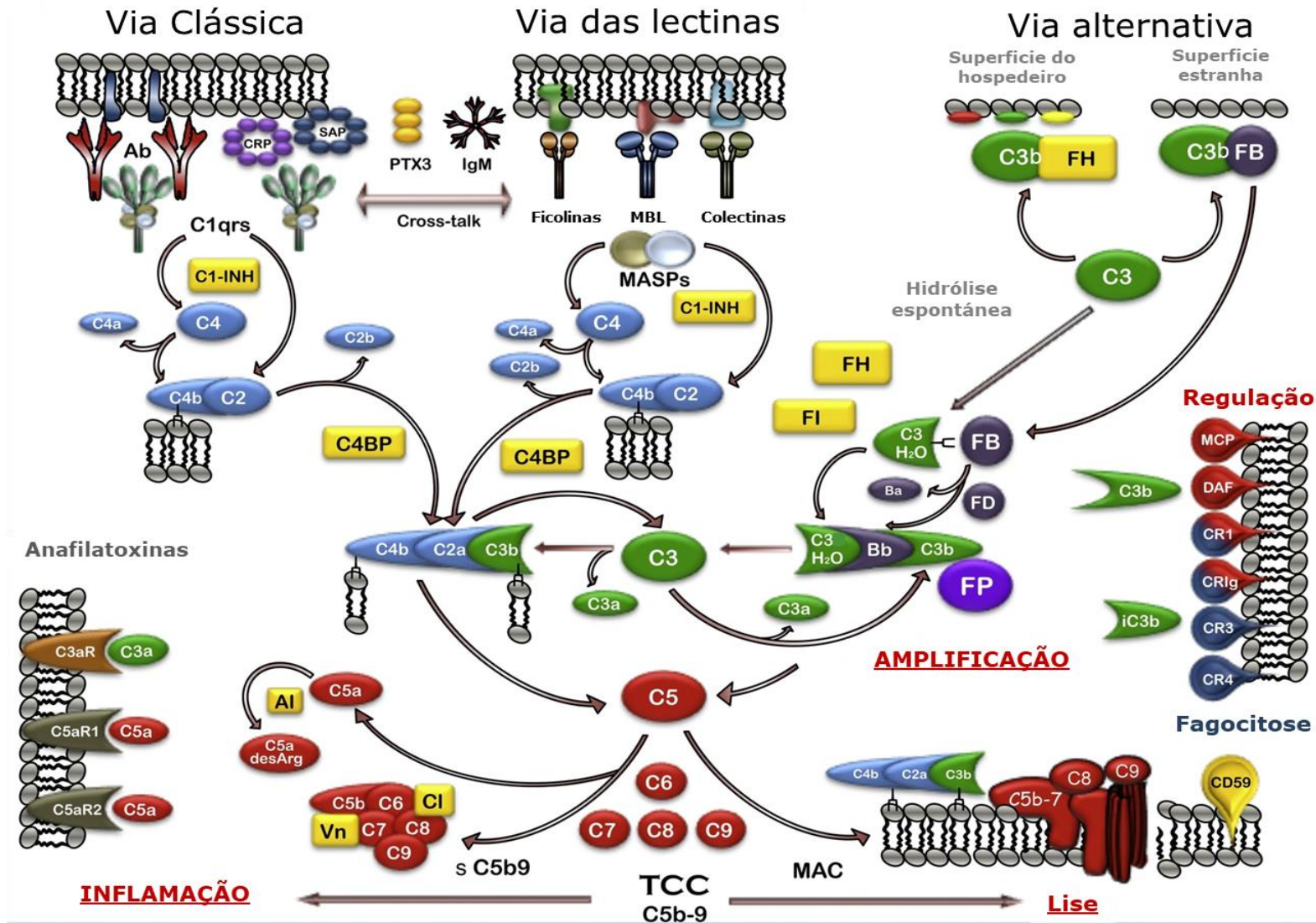
Recentemente, análises de reconstrução de ganho e perda gênica ao longo do tempo permitiram uma melhor compreensão sobre a evolução das leptospiros. A perda de genes ancestrais, a maioria dos quais codifica proteínas envolvidas no metabolismo e sistemas de transdução de sinal é uma tendência predominante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

1.3 Sistema Complemento

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

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

Figura 2 - Representação esquemática da ativação do Sistema Complemento



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3.1 Regulação do SC

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

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

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

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

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

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

Outros cofatores de membrana que participam da clivagem proteolítica de C3b e C4b são MCP (ANDREWS et al., 1985), CR1 (KLICKSTEIN et al., 1988) e DAF (NICHOLSON-WELLER; WANG, 1994). MCP é composta de 4 domínios SCRs extracelulares e é expressa em todas as células nucleadas, já o CR1 contém 30 domínios extracelulares e é expresso em leucócitos e eritrócitos (BARILLA-LABARCA et al., 2002). CR1 é o único cofator do FI capaz de continuar a clivagem proteolítica de iC3b gerando os fragmentos C3c e

C3dg. O CR1 também acelera o decaimento das C3 convertases da VC e VA (SMITH et al., 2002).

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

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

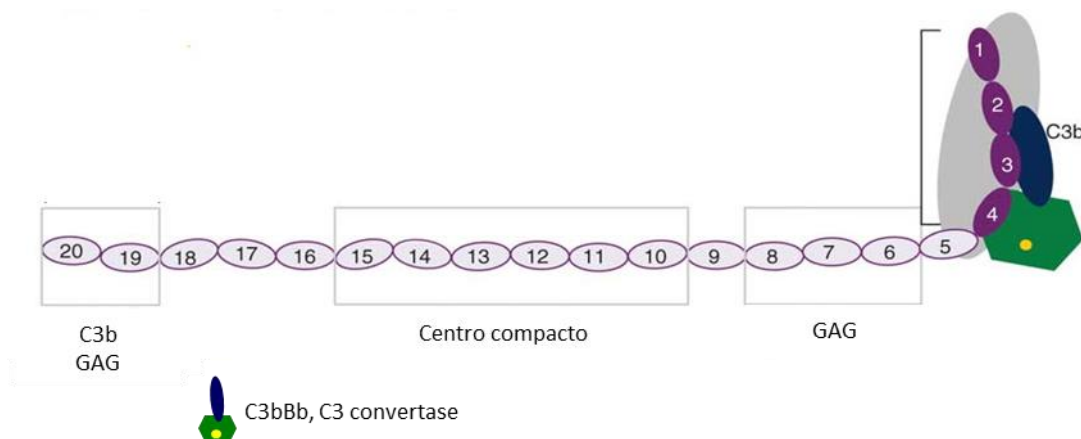
Assim, as proteínas do SC funcionam mediando uma série de reações biológicas, todas servindo diretamente para a defesa do organismo contra agentes microbianos, especialmente contra os microrganismos extracelulares e, indiretamente, contribuindo para a regulação de outros processos de defesa adaptativos.

1.3.1.1 FH e a família de proteínas relacionadas

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

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

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



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

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

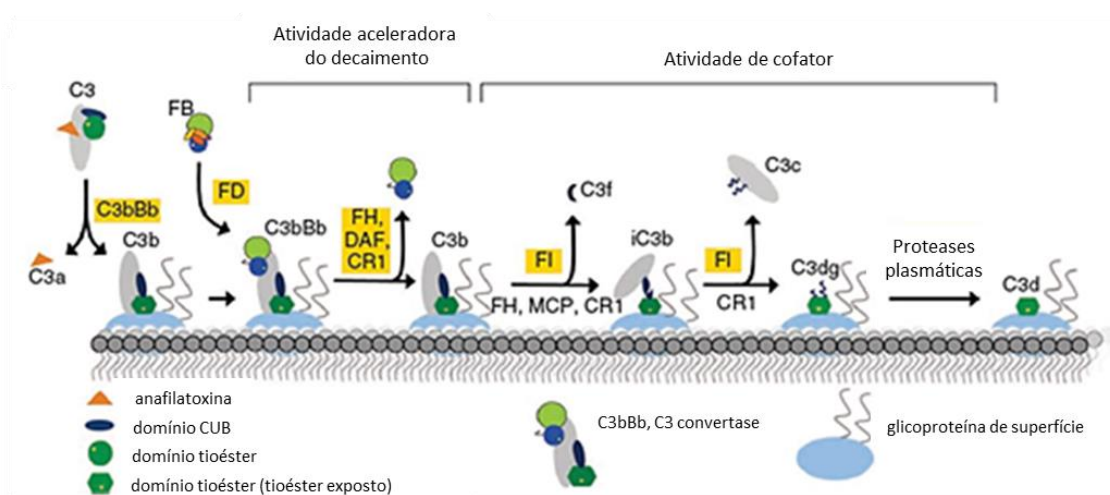
Os primeiros quatro domínios N-terminais regulam a amplificação do SC (KUHNS; ZIPFEL, 1996), ao passo que os outros 16 domínios contêm diversos pontos de ligação que controlam a efetividade funcional dos domínios iniciais.

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

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

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

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



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

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

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

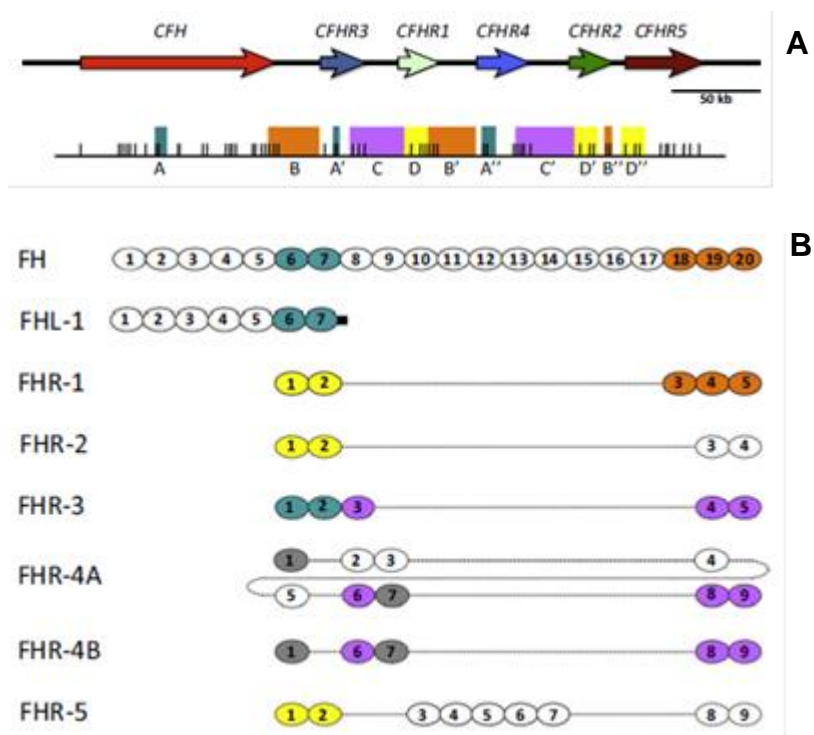
hemolíticos para avaliar a ativação do SC reside nos níveis de expressão de ácido siálico na superfície destas células. Isso permite que o FH se ligue às hemácias de cabra e não se ligue às hemácias de coelho (ROUMENINA et al., 2014; KAZATCHKINE; FEARON; AUSTEN, 1979). Quando o FH interage com a superfície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

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

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

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

Figura 5 - Família do Fator H.



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

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

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

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

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

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

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

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

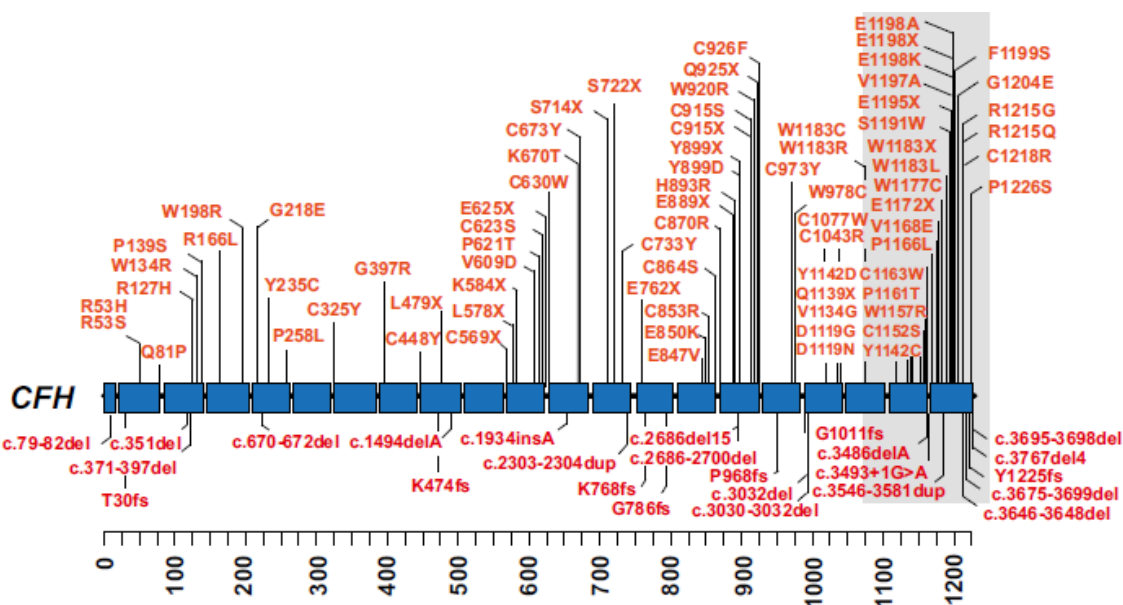
Durante a última década alterações no *cluster* genético das proteínas relacionadas ao FH têm sido identificadas em pacientes com C3G ou distúrbios relacionados (GOICOCHEA DE JORGE et al., 2013). O elevado grau de homologia entre os genes *FHR* e entre estes e o gene *CFH* faz este locus um 'hot spot'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

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

Na aHUS a patologia ou distúrbio implícito é a desregulação da VA nas superfícies celulares do hospedeiro. Estima-se que 60% dos indivíduos com

aHUS têm mutações em genes do SC e em aproximadamente 30% dos afetados as alterações ocorrem no FH (25% identificadas em casos esporádicos e 40% em casos familiares), principalmente na região C-terminal (NORIS et al., 2010; FREMEAUX-BACCHI et al., 2013; MAGA et al., 2010) (**Figura 6**). Por razões pouco conhecidas a penetrância do fenótipo é incompleta, alguns estudos calculam ser em torno de 50%.

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



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

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

As mutações no FH observadas nos pacientes com aHUS afetam o reconhecimento de ácido siálico nas células endoteliais, eritrócitos e plaquetas; deixando estas superfícies desprotegidas que ficam, portanto, vulneráveis à ação do SC (HYVARINEN; MERI; JOKIRANTA, 2016). Entretanto na patogênese da doença a interligação entre o SC e a cascata da coagulação têm um papel fundamental. A geração de C5a pela ativação do SC induz a ativação do Fator Tissular em células endoteliais, desencadeando um estado procoagulante no endotélio (CARSON; JOHNSON, 1990). Uma vez ativada, a trombina cliva não somente fibrinogênio, mas também pode clivar C5,

potenciando a ativação do SC. A clivagem de C5 pela trombina pode ser relevante para a formação do MAC nas células endoteliais e nas plaquetas provocando dano endotelial e ativação plaquetária (ATEFI et al., 2016). A ação conjunta das proteínas da coagulação e a agregação plaquetária leva à formação de microtrombos em capilares e arteríolas.

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

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

1.4 Polimorfismos genéticos humanos associados com a susceptibilidade à leptospirose

Os polimorfismos ocorrem quando dois ou mais fenótipos sabidamente diferentes existem na mesma população e podem ser definidos como alterações genéticas presentes em mais de 1% da população. A categoria mais básica e mais frequente de polimorfismo é uma alteração pontual no genótipo originada a partir de uma simples troca de um nucleotídeo por outro, conhecido como polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, do inglês - *single nucleotide polymorphism*). Estas variações genéticas são resultado do processo evolutivo, são modificadas pela seleção natural e contribuem para aumentar a diversidade nas diferentes populações (DELANGHE et al., 2012). Os SNPs têm

uma estreita associação com algumas patologias clínicas, embora em sua maioria o impacto na saúde humana é modesto.

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

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

A associação de polimorfismos no gene *IL-1 β* com a leptospirose apresentou resultados discordantes em dois estudos diferentes, embora tenham sido realizados em um curto período de tempo em duas coortes provenientes das ilhas Terceira e São Miguel do arquipélago Açores em Portugal (ESTEVES et al., 2014; FIALHO et al., 2009). Na população de São Miguel, a variante rs16944 da região promotora do gene *IL-1 β* foi associada com maior suscetibilidade à infecção sugerindo que os níveis de expressão desta citocina são importantes na resposta inflamatória inicial contra a

leptospira (ESTEVEES et al., 2014). Entretanto, esta associação não foi observada na coorte da ilha Terceira (FIALHO et al., 2009).

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

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

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

1.5 Mecanismos de evasão de leptospiras patogênicas ao SC

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6. Conclusões

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

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

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

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

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

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

REFERÊNCIAS ¹

- ADLER B. Vaccines Against Leptospirosis. In:_____. **Leptospira and Leptospirosis**. Current Topics in Microbiology and Immunology. (eds). Berlin, Heidelberg: Springer, 2015b. v. 387.doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_10
- ADLER, B. History of Leptospirosis and *Leptospira*. In:_____. **Leptospira and Leptospirosis**. Current Topics in Microbiology and Immunology. (eds) Berlin, Heidelberg: Springer, 2015a. v. 387.doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_1
- ALBERTÍ, S.; MARQUÉS, G.; HERNÁNDEZ-ALLÉS, S.; RUBIRES, X.; TOMÁS, J.M.; VIVANCO, F.; BENEDÍ, V.J. Interaction between complement subcomponent C1q and the *Klebsiella pneumoniae* porin OmpK36. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 4719–4725, 1996. 10.1128/iai.64.11.4719-4725.1996.
- ANDREWS, P.W.; KNOWLES, B.B.; PARKAR, M.; PYM, B.; STANLEY, K.; GOODFELLOW, P.N. A human cell-surface antigen defined by a monoclonal antibody and controlled by a gene on human chromosome 1. **Ann. Hum. Genet.**, v. 49, n. 1, p. 31–39, 1985. doi: 10.1111/j.1469-1809.1985.tb01673.x.
- AREAN, V.M. The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). **Am. J. Pathol.**, v. 40, n. 4, p. 393-423, 1962.
- ATEFI, G.; AISIKU, O.; SHAPIRO N, HAUSER, C.; DALLE LUCCA, J.; FLAUMENHAFT, R.; TSOKOS, G.C. Complement activation in trauma patients alters platelet function. **Shock**, v. 46, n. 3, p. 83-88, 2016. Supplement 1. doi: 10.1097/SHK.0000000000000675.
- AULT, B.H.; SCHMIDT, B.Z.; FOWLER, N.L.; KASHTAN, C.E.; AHMED, A.E.; VOGT, B.A.; COLTEN, H.R. Human factor H deficiency. Mutations in framework cysteine residues and block in H protein secretion and intracellular catabolism. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 40, p. 25168-25175, 1997. doi: 10.1074/jbc.272.40.25168.
- AVDEEVA, M.G.; MOISOVA, D.L.; GORODIN, V.N.; KOSTOMAROV, A.M.; ZOTOV, S.V.; CHERNIAVSKAIA, O.V. The role glucose-6-phosphate dehydrogenase in pathogenesis of anemia in leptospirosis. (Russian in original). **Klin. Med. (Mosk.)**, v. 80, n. 6, p. 42–44, 2002.
- BARBOSA, A.S.; ABREU, P. A. E.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; GONÇALES, A. P.; SILVA, A. S.; DAHA, M.R.; ISAAC. L. Immune evasion of leptospira species by acquisition of human complement regulator C4BP. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 3, p. 1137-1143, 2009. doi: 10.1128/IAI.01310-08.
- BARBOSA, A.S.; MONARIS, D.; SILVA, L.B.; MORAIS, Z.M.; VASCONCELLOS, S.A.; CIANCIARULLO, A.M.; ISAAC, L.; ABREU, P.A. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. **Infect. Immun.**, v. 78, n. 7, p. 3207-3716, 2010. doi: 10.1128/IAI.00279-10.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CASTIBLANCO-VALENCIA, M.M.; FRAGA, T.R.; PAGOTTO, A.H.; DE TOLEDO SERRANO, S.M.; ABREU, P.A.; BARBOSA, A.S.; ISAAC, L. Plasmin cleaves

fibrinogen and the human complement proteins C3b and C5 in the presence of *Leptospira interrogans* proteins: a new role of LigA and LigB in invasion and complement immune evasion. **Immunobiol.**, v. 221, n. 5, p. 679–689, 2016. doi: 10.1016/j.imbio.2016.01.001.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

GABORIAUD, C.; LING, W.L.; THIELENS, N.M.; BALLY, I.; ROSSI, V. Deciphering the fine details of c1 assembly and activation mechanisms: "mission impossible"? **Front. Immunol.** v. 5, 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00565.

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

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

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

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

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

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

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

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

HÉJA, D.; HARMAT, V.; FODOR, K.; WILMANN, M.; DOBÓ, J.; KÉKESI, K.A.; ZÁVODSZKY, P.; GÁL, P.; PÁL, G. Monospecific Inhibitors Show That Both Mannan-binding Lectin-associated Serine Protease-1 (MASP-1) and-2 Are Essential for Lectin Pathway Activation and Reveal Structural Plasticity of MASP-2. **J. Biol. Chem.**, v. 287, n. 24, p. 20290–20300, 2012. doi: 10.1074/jbc.M112.354332.

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

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

ICHIJO, H.; HELLMAN, U.; WERNSTEDT, C.; GONEZ, L.J.; CLAESSEON-WELSH, L.; HELDIN, C.H.; MIYAZONO, K. Molecular cloning and characterization of ficolin, a multimeric protein with fibrinogen- and collagen-like domains. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 19, p. 14505–14513, 1993.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KLOS, A. WENDE, E.; WAREHAM, K.J.; MONK, P.N. International union of basic and clinical pharmacology. [corrected] LXXXVII. Complement peptide C5a, C4a, and C3a receptors. **Pharmacol. Rev.**, v. 65, n. 1, p. 500–543, 2013. doi: 10.1124/pr.111.005223.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MORGAN, H. P.; SCHMIDT, C. Q.; GUARIENTO, M.; BLAUM, B. S.; GILLESPIE, D.; HERBERT, A. P.; KAVANAGH, D.; MERTENS, H. D.; SVERGUN, D. I.; JOHANSSON, C. M.; UHRÍN, D. BARLOW, P. N.; HANNAN, J. P. Structural basis for engagement by complement factor H of C3b on a self-surface. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 18, n. 4, p. 463-470, 2011. doi: 10.1038/nsmb.2018.

MORGAN, J.; BORNSTEIN, S.L.; KARPATI, A.M.; BRUCE, M.; BOLIN, C.A.; AUSTIN, C.C.; WOODS, C.W.; LINGAPPA, J.; LANGKOP, C.; DAVIS, B.; GRAHAM, D.R.;

PROCTOR, M.; ASHFORD, D.A.; BAJANI, M.; BRAGG, S.L.; SHUTT, K.; PERKINS, B.A.; TAPPERO, J.W. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, n. 1, p. 1593–1599, 2002. doi: 10.1086/340615.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PÉREZ-CABALLERO, D. GONZÁLEZ-RUBIO, C.; GALLARDO, M. E.; VERA, M.; LÓPEZ-TRASCASA, M.; RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA, S.; SÁNCHEZ-CORRAL, P. Clustering of missense mutations in the C-terminal region of factor H in atypical

hemolytic uremic syndrome. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 68, n. 2, p. 478–484, 2001. doi: 10.1086/318201.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ROUMENINA, L.T.; KANTARDJIEV, A.A.; ATANASOV, B.P.; WATERS, P.; GADJEVA, M.; REID, K.B.M.; MANTOVANI, A.; KISHORE, U.; KOJOUHAROVA, M.S. Role of

Ca²⁺ in the electrostatic stability and the functional activity of the globular domain of human C1q. **Biochem.**, v. 44, n. 43, p. 14097–14109, 2005. doi: 10.1021/bi051186n.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

STIMSON, A.M. Note on an Organism Found in Yellow-Fever Tissue. **Public Health Reports**, v. 22, n. 18, p. 541, 1907. doi.org/10.2307/4559008

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ANEXOS

ANEXO A - Trabalhos apresentados em congressos.

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

ANEXO B - Artigos publicados.

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