

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

Erivelto Corrêa de Araújo Junior

**PERFIL DA ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS *IN VITRO*,
FRENTE ÀS AMOSTRAS VIRULENTA, ATENUADA E
SAPRÓFITA DE *LEPTOSPIRA* spp**

ARAÇATUBA - SP

2018

Erivelto Corrêa de Araújo Junior

**PERFIL DA ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS *IN VITRO*,
FRENTE ÀS AMOSTRAS VIRULENTA, ATENUADA E
SAPRÓFITA DE *LEPTOSPIRA* spp**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Orientadora: Prof^a. Associada Márcia Marinho
Coorientadora: Pesquisadora Flávia Lombardi Lopes

ARAÇATUBA- SP
2018

A663p

Araújo Junior, Erivelto Corrêa de

Perfil da atividade de macrófagos in vitro, frente às amostras virulenta, atenuada e saprófita de *Leptospira* spp. / Erivelto Corrêa de Araújo Junior. -- Araçatuba, 2018

91 p. : il., tabs., fotos + 1 CD-ROM

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba

Orientadora: Márcia Marinho

Coorientadora: Flávia Lombardi Lopes

1. Leptospiras. 2. Resposta Imune. 3. Citocinas. 4. Apoptose. 5. Transcriptoma. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

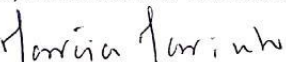
Título: Perfil da atividade de macrófagos *in vitro*, frente às amostras virulenta, atenuada e saprófita de *Leptospira* spp.

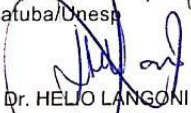
AUTOR: ERIVELTO CORREA DE ARAÚJO JUNIOR

ORIENTADORA: MARCIA MARINHO

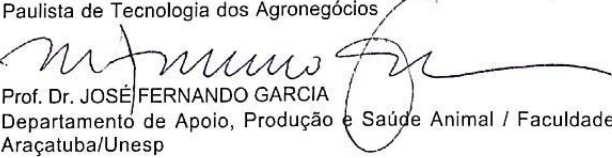
COORDENADORA: FLÁVIA LOMBARDI LOPES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. MARCIA MARINHO
Departamento de Apoio Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Prof. Dr. HELIO LANGONI
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Câmpus de Botucatu/Unesp


Dra. SIMONE BALDINI LUCHEIS
Secretaria da Agricultura e Abastecimento, Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Bauru/SP / Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios


Prof. Dr. JOSÉ FERNANDO GARCIA
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Profa. Dra. FLÁVIA DE REZENDE EUGÊNIO
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Araçatuba, 11 de dezembro de 2018.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Erivelto Corrêa de Araújo Junior - nascido em 08 de janeiro de 1987 na cidade de Araçatuba - SP, filho de Maria Helena da Silva Araújo e Erivelto Corrêa de Araújo. Ingressou no curso de Medicina Veterinária em 2005 na Faculdade Adamantinenses Integradas - FAI - Adamantina - SP, onde graduou como Médico Veterinário em janeiro de 2010. Mestre em Ciência Animal pela Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP - Campus de Araçatuba, na área de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, sob a orientação da Prof^a. Associada Márcia Marinho, concluído em fevereiro de 2014. Em 2015, ingressou no curso de Doutorado do mesmo Programa de Pós-Graduação, com financiamento de sua pesquisa aprovado pela FAPESP. É Médico Veterinário funcionário público municipal de Santópolis do Aguapeí - SP, atuando na vigilância de zoonoses, desde fevereiro de 2014. Participou de diversos eventos nacionais com apresentação de trabalhos derivados de suas pesquisas. Ministrou aulas para alunos de graduação em Medicina Veterinária e de pós-graduação em Ciência Animal e colaborou com a formação de residentes em Saúde Pública da FMVA-Unesp.

"Onde não há caridade, não pode haver justiça."

(Santo Agostinho)

*"Médico veterinário também cuida de gente, embora
muita gente não saiba disso".*

(Conselho Federal de Medicina Veterinária)

"Aos meus pais, Erivelto e Maria Helena, pelo exemplo de luta, educação, por me ensinar os verdadeiros valores, por me apoiarem em todas as decisões acadêmicas e profissionais". Às minhas irmãs (Tici e Nara) por todo incentivo.

"À minha noiva, Catia, pelo amor, compreensão, muita paciência e por estar sempre ao meu lado. Amo vocês!".

AGRADECIMENTOS

A Deus, criador de todas as coisas, por ter me abençoado com saúde, paciência e coragem para executar essa pesquisa; ao meu Anjo da Guarda.

À minha Orientadora, Prof^a. Associada Márcia Marinho, que é uma grande inspiração, por sempre estar disposta a me ajudar e me escutar, pela orientação, pela confiança depositada em meu trabalho e por sempre estar aberta à discussão de novas ideias. Meu muito obrigado, sou eternamente grato!

Ao Prof. Marcos B. Heinemann do Laboratório de Zoonoses da FMVZ/USP, à Pesquisadora Simone Baldine Lucheis do APTA/Bauru por cederem tão prontamente as culturas de *Leptospiras*.

À Pesquisadora Flávia Lombardi Lopes, minha co-orientadora por toda ajuda e conhecimento transmitido durante a execução do projeto.

Às Professoras Valéria Lima, Juliana Peiró e Tereza Cristina, pela colaboração, durante o processo.

À Técnica do Laboratório de Microbiologia, Cilene, pela amizade, aprendizado e colaboração na execução do projeto. Aos residentes do Laboratório de Micro, e ao estagiário de iniciação científica, Reinaldo.

Aos amigos que conheci durante a pós-graduação: Fábio Taniwaki, Thiago Grassi, Iderlipes, João (Butina), André Shirani, Leandro, Dielson, Matheus, Mariana Destro, Larissa, Giovana e Priscila.

Aos meus amigos para todo o sempre: Marcel, Peron, Nelson, Guilherme, Brunão, Alfredo e Cícero.

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária, em nome de todos os professores e funcionários.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio do financiamento do projeto concedido (Proc. 2014/20719-2).

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a finalização de mais uma etapa acadêmica.

Meus sinceros agradecimentos

ARAÚJO-JUNIOR, E.C. **Perfil da atividade de macrófagos *in vitro*, frente às amostras virulenta, atenuada e saprófita de *Leptospira* spp.** 2018. 92 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi verificar a dinâmica da resposta imune celular *in vitro* utilizando-se cultivos de macrófagos de camundongos (J774A.1) quando expostos às amostras virulenta, atenuada e saprófita de *Leptospira*, observados nos períodos de 1h, 3h, 6h, 12h, 24h, 36, 48h e 72h após a exposição. Foram realizados ensaios que determinaram a produção de intermediários reativos do nitrogênio (NO), expressão de genes para citocinas e interleucinas, pela técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) e a presença e quantificação das mesmas no sobrenadante do cultivo celular pelo teste ensaio imunoenzimático (ELISA). Avaliam-se as diferenças na modulação da expressão gênica do hospedeiro por cepas de *Leptospira* com variados graus de virulência, pelo método do microarranjo. Os resultados demonstraram que as amostras virulenta e atenuada proporcionaram um estímulo maior aos macrófagos em comparação à amostra saprófita, principalmente na fase tardia da infecção, considerando-se os valores expressos por óxido nítrico (NO), óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e induzido (iNOS). Os valores, embora estatisticamente não significativos, apresentaram uma dinâmica maior à resposta de citocinas (TNF- α , IL-1 β) pela amostra virulenta em comparação à atenuada e saprófita. Outro fator relevante foi o encontro de Caspase-3 e -8 na fase inicial da infecção, sugerindo que a apoptose dos macrófagos ocorreu no começo do processo, logo após a internalização das *Leptospiras*, atingindo níveis elevados às 24 horas, com pico máximo, às 72 horas. Após análise transcriptômica, os resultados mostraram um alto número de genes diferencialmente expressos após 6h de infecção por *L. interrogans* virulenta e atenuada, e em menor proporção com a linhagem saprófita *L. biflexa*. Isto sugere que RNAs são modulados após a infecção por *Leptospira* em macrófagos, independente do grau de virulência. Os dados

produzidos neste estudo contribuirão para melhor compreensão da patogênese da leptospirose.

Palavras-chave: *Leptospiras*. Resposta Imune. Citocinas. Apoptose. Transcriptoma.

ARAÚJO-JUNIOR, E.C. **Profile of the *in vitro* macrophages activity against the virulent, attenuated and saprophytic samples of *Leptospira* spp. by *Leptospira* virulent, attenuated and saprophytic samples of macrophages *in vitro*.** 2018. 92 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

Abstract

The objective of the present work was verify the dynamic of the cellular immune response *in vitro* using macrophages cultures of mice (J774A.1) when exposed to virulent, attenuated and saprophytic *Leptospira* samples, observed in eight time intervals after exposure: 1h, 3h, 6h, 12h, 24h, 36, 48h and 72h. The assays that determined the production of reactive nitrogen intermediates (NO), the expression of genes for cytokines and interleukins by polymerase chain reaction (PCR) and the presence and quantification of them in the supernatant of the cell culture were performed by the assay ELISA. In this context, we aimed to evaluate the differences in modulation of host gene expression by *Leptospira* strains with varied virulence degrees, using the microarray method. The results demonstrated that the virulent and attenuated samples provided a greater stimulus to the macrophages compared to the saprophyte sample, especially in the late phase of the infection, considering the values expressed by nitric oxide (NO), endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and induced (iNOS). The values, although statistically insignificant, presented a greater dynamics to the cytokine response (TNF- α , IL-1 β) by the virulent sample compared to the attenuated and saprophyte. Another important factor was the finding of Caspase-3 and -8 in the initial phase of the infection, suggesting that macrophage apoptosis occurred early in the process, soon after *Leptospira* internalization, reaching high levels at 24 hours, with a maximum peak at 72 hours. After transcriptomic analysis, the results showed a high number of differentially expressed genes after 6h of infection by virulent and attenuated *L. interrogans*, and to a lesser extent with *L. biflexa* saprophytic lineage. This suggests that RNAs are modulated after infection by *Leptospira* in macrophages, regardless of the degree of virulence. It is hoped that the data produced will contribute to the understanding of the pathogenesis of leptospirosis.

Keywords: *Leptospiras*. Immune Response. Cytokines. Apoptosis.
Transcriptome.

LISTA DE ABREVIATURAS

BCL2 - Célula b de linfoma 2
CO₂ - Gás carbônico
cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DEGs - Genes diferencialmente expressos
ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática
EMJH - Meio de cultura Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial
FDR - *False discovery rate*
GEO - *Gene Expression Omnibus*
H₃PO₄ - Ácido fosfórico
iNOS - Óxido nítrico sintase induzido
IL-1 β - Interleucina 1 beta
IL-6 - Interleucina 6
IL-10 - Interleucina 10
IL-12 - Interleucina 12
IPA - *Ingenuity Pathway Analysis*
LPS - Lipopolissacarídeo
NO₂ - Nitrito
NO₃ - Nitrato
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PBS - *Phosphate buffered saline*
pH - Potencial hidrogeniônico
RNA - Ácido ribonucleico
RPMI - Meio de Cultura Roswell Park Memorial Institute
TNF- α - Fator necrose tumoral alfa
TREM - *Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells 1*
TH1 - Célula tipo 1 T helper
TLR2 - Receptor toll-like 2

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	17
1.1 Aspectos históricos.....	18
1.2 <i>Leptospira</i>	19
1.2.1 Taxonomia e classificação	19
1.2.2 Aspectos morfológicos	20
1.2.3 Resposta imune	21
1.2.4 Patogenicidade	22
1.2.5 Medidas preventivas	24
1.3 Hipóteses	26
1.4 Objetivos	26
1.5 Referências	27
1.6 Comissão de ética no uso de animais	32
2 CAPÍTULO 1	33
Resposta imune de macrófagos murinos à infecção por <i>Leptospira</i> spp <i>in vitro</i>	33
2.1 Resumo	34
2.2 Abstract	36
2.3 Introdução	38
2.4 Material e Métodos	40
2.4.1 Cultivo e manutenção de <i>Leptospira</i> spp.....	40
2.4.2 Preparo do inóculo	40
2.4.3 Cultivo Celular.....	40
2.4.4 Infecção Celular	41
2.4.5 Coleta do sobrenadante.....	41
2.4.6 Determinação da produção de intermediários reativos do nitrogênio .	41
2.4.7 Determinação da produção de citocinas e caspases	41
2.4.8 Eficiência da infecção	41
2.4.9 Análise Estatística.....	42
2.5 Resultados	42
2.5.1 Ativação de Macrófagos.....	42

2.5.2 Validação da infecção	47
2.5.3 Quantificação dos níveis de óxido nítrico.....	51
2.5.4 Quantificação da produção de óxido nítrico sintase endotelial e induzido (eNOS e iNOS).....	52
2.5.5 Quantificação de citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-10.....	53
2.5.6 Quantificação de caspase-3 e caspase-8	56
2.6 Discussão	57
2.7 Conclusão	59
2.8 Referências	60
3 CAPÍTULO 2.....	64
Transcriptoma de macrófagos murinos infectados com diferentes cepas de <i>Leptospira</i> spp. revela que a infecção é independente do grau de virulência	64
3.1 Resumo	65
3.2 Abstract	66
3.3 Introdução	67
3.4 Material e Métodos.....	68
3.4.1 Cultivo de <i>Leptospira</i> spp.....	68
3.4.2 Cultivo de macrófagos	69
3.4.3 Infecção de macrófagos.....	69
3.4.4 Extração e quantificação do RNA	69
3.4.5 Microarranjo para análise transcriptômica	69
3.4.6 Identificação de genes diferencialmente expressos e enriquecimento funcional	70
3.4.7 Validação dos resultados do transcriptoma pelo RT-PCR	70
3.4.8 Análise Estatística.....	71
3.5 Resultados	71
3.5.1 Deposição dos dados genéticos	71
3.5.2 Perfil de expressão gênica via análise do microarranjo	72
3.5.3 Análise de vias de sinalização	77
3.5.4 Vias específicas moduladas pela cepa virulenta.....	79
3.5.5 Validação do microarranjo por meio do RT-PCR	82
3.6 Discussão.....	86

3.7 Conclusão	88
3.8 Referências	89
ANEXO	93

1 INTRODUÇÃO GERAL

A leptospirose, uma zoonose disseminada no mundo todo, emergiu como preocupação para a saúde pública, tanto nos países desenvolvidos como em desenvolvimento (BHARTI et al., 2003; RILEY et al., 2007), sendo as últimas populações as mais atingidas.

Estima-se que mais de 1 milhão de pessoas se infectam, com aproximadamente 100.000 óbitos por ano (LEVETT, 2001; BHARTI et al., 2003; COSTA et al., 2015; PICARDEAU, 2015). O número de casos fatais é comparável ou até superior a algumas outras doenças tropicais negligenciadas, como a dengue hemorrágica ou a leishmaniose visceral (PICARDEAU, 2015). No entanto, a estimativa ainda é baixa, uma vez que muitos casos de leptospirose não são notificados e outros tantos não são diagnosticados, devido à falta de conscientização sobre a doença e dificuldades dos testes de confirmação laboratorial (WHO, 2003).

No Brasil, a leptospirose é uma doença endêmica em períodos chuvosos, principalmente nas capitais e áreas metropolitanas, devido a enchentes associadas a aglomerações populacionais em locais de condições inadequadas de saneamento e alta infestação de roedores infectados (SOUZA et al., 2010). Sua notificação é compulsória no Brasil desde 1993, tanto para o registro de casos suspeitos isolados, como para ocorrência de surtos, conforme a Portaria de Consolidação nº 4, de 28 de setembro de 2017. A Portaria também orienta a identificação oportuna dos casos e a realização das ações de vigilância epidemiológica, controle e prevenção (BRASIL, 2017). No período de 2007 a 2016, foram registrados 39.263 casos confirmados de leptospirose (BRASIL, 2018).

Os roedores constituem o principal reservatório de leptospiras e excretam as bactérias de forma assintomática na urina durante toda a sua vida. Humanos podem ser infectados pelo contato com água e solo contaminados (BHARTI et al., 2003; NAHORI et al., 2005). *Leptospiras* patogênicas são capazes de infectar humanos e muitos animais domésticos e selvagens, e sobrevivem e crescem em tecidos dos hospedeiros, escapando de mecanismos naturais de defesa (LEVETT, 2001). A leptospirose humana apresenta sintomas

variados, desde uma síndrome semelhante à gripe, a uma falência múltipla de órgãos, levando à morte (ADLER, 2010; HAAKE; LEVETT, 2015). Disfunções hepáticas associadas com insuficiência renal e hemorragias constituem a síndrome de Weil, uma forma severa de leptospirose (HAAKE; LEVETT, 2015). A lesão renal aguda é comumente relatada como uma manifestação precoce da leptospirose e pode evoluir para doença renal crônica (CORREA-ROTTER et al., 2014). A síndrome hemorrágica pulmonar também pode ocorrer e ser confundida com pneumonia viral (HAAKE; LEVETT, 2015).

Embora ainda não esteja claro por que os pacientes com leptospirose apresentam várias manifestações clínicas, tanto a resposta imune quanto a adaptativa à infecção por *Leptospira* influenciam o resultado da doença (REIS et al., 2013).

Apesar de sua significância no cenário mundial, informações sobre os mecanismos da patogênese, e a evolução da virulência permanecem pouco elucidadas.

1.1 Aspectos históricos

Diversas epidemias de uma doença de característica infecciosa icterica, com disfunção renal, foram observadas e documentadas até o final do século XVIII, contudo suas causas eram desconhecidas. Durante o cerco do Cairo, em 1812, Larrey, detalhou casos onde combatentes apresentaram sintomas compatíveis com leptospirose. Landouzy, em 1883, descreveu a doença analisando determinados sintomas apresentados por funcionários da limpeza do esgoto em Paris, à qual denominou na época como “*Typhu hepaticque grave*”. Porém, a primeira descrição clínica no homem só seria realizada em 1886, pelo médico alemão Adolf Weil, como uma síndrome infecciosa aguda, com icterícia, esplenomegalia e nefrite, que foi denominada de doença de Weil (CALDAS et al., 1978; CORREA; CORREA, 1992).

Segundo relatos, a primeira descrição do agente etiológico da leptospirose foi apresentada, de forma simultânea e independente em 1915, tanto na Alemanha como no Japão, por três grupos de pesquisadores distintos. No Japão, Inada e Ido (1916) detectaram espiroquetas e anticorpos específicos em sangue de mineradores japoneses com infecção icterica, denominando de

Spirochaeta icterohaemorrhagiae e sugeriram, na época, que os ratos fossem os reservatórios responsáveis pela transmissão ao homem (LEVETT, 2001).

A primeira publicação a respeito da morfologia da *Leptospira* foi atribuída a Noguchi (1918), que descreveu sucessivos trabalhos a respeito da estrutura fina das leptospiros, comparando-as microscópicamente e sorologicamente, com outras espiroquetas. Estudando a *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* de Inada, e as cepas dos casos de Weill, e de ratos selvagens nos Estados Unidos, concluiu que essas eram iguais, e que apresentavam respostas semelhantes nos testes imunológicos, propondo, assim, a criação da família *Leptospiraceae*.

Muito do conhecimento microbiológico sobre leptospiros e leptospirose foi estabelecido até meados da década de 20, quando vários tipos de leptospiros foram reconhecidos. Inada e Ido também caracterizaram, neste período, a leptospirose como zoonose e os ratos como carreadores e vetores. Nos anos seguintes, outros animais selvagens e domésticos foram identificados como carreadores (IDO et al., 1918; VIJAYACHARI et al., 2008)

No Brasil, as primeiras descrições de leptospirose em ratos foram feitas por Aragão (1917) e Bentes (1917) no Rio de Janeiro.

Atualmente, o conhecimento sobre leptospiros avança rapidamente através do campo da biologia molecular, em posição de prioridade para importantes grupos de pesquisa no Brasil e no mundo (NASCIMENTO et al., 2004; PICARDEAU et al., 2008).

1.2 *Leptospira*

1.2.1 Taxonomia e classificação

As leptospiros pertencem à família *Leptospiraceae*, composta pelos gêneros *Leptospira* spp., *Turneria* spp. e *Leptonema* spp. (HAAKE et al., 2002). O gênero é classificado sob a ordem *Spirochaetales*, e é subdividido em três espécies: saprófitas de vida livre (*L. biflexa*), patogênica (*L. interrogans*) e dependente do hospedeiro (*L. borgpetersenii*) (McBRIDE et al., 2005; LEHMANN et al., 2014). Há duas formas de classificação de *Leptospira* spp.: uma molecular, fundamentada em análises gênicas, e outras sorológicas, baseada em determinantes antigênicos.

A sorologia foi o método utilizado para a classificação das leptospiros até o final da década de 1980 (DIKKEN et al., 1978) sendo que as amostras ainda são referidas pelo sorovar. Atualmente, as leptospiros são classificadas em mais de 250 sorovares, patógenos intermediários e saprófitos com classificação genética em 21 espécies diferentes (LEHMANN et al., 2014).

Com o uso de técnicas moleculares, a classificação por sorovares começou a ser revisada. A classificação molecular do gênero *Leptospira* baseia-se no grau de hibridização por homologia de DNA (ácido desoxirribonucleico) (BRENNER et al., 1999). Assim, o gênero divide-se em 17 espécies definidas, com pelo menos 70% de similaridade gênica, e com divergência de pelo menos 5% de bases não pareadas (LEVETT, 2008). Embora a reclassificação por genotipagem seja mais confiável, ainda requer maior amplitude e refinamento, permanecendo motivo de controvérsia entre microbiologistas, por ser incompatível com o sistema adotado por clínicos epidemiologistas (BHARTI et al., 2003).

1.2.2 Aspectos morfológicos

Leptospiras são bactérias espiroquetas, com estrutura helicoidal, que apresentam aproximadamente 0,1 μ m de largura a 6-20 μ m de comprimento. Possuem dois flagelos com inserções polares, localizados no espaço periplasmático que conferem movimentos de rotação e translação (LEVETT, 2001). Suas extremidades são curvas, em forma de ganchos e a visualização é feita pela microscopia de campo escuro (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

São bactérias aeróbias obrigatórias, crescem bem em temperaturas entre 28°C e 30°C e pH 7,2 a 7,6. Essas bactérias necessitam de meio especial para crescimento, enriquecido com albumina bovina sérica (BSA), soro de coelho, vitaminas B1 e B12, amônia e ferro. A sua principal fonte de energia são os ácidos graxos de cadeia longa. O meio de cultura mais utilizado para o seu cultivo é o meio Ellinghausen-McCulloughJohnson-Harris (EMJH) (ELLINGHAUSEN et al., 1965; JOHNSON et al., 1967), que contém ácido oleico, BSA como detoxificante e Tween 80 como fonte de carbono. As leptospiros possuem tempo de geração longo, variando de três horas, para espécies

saprófitas e 8-18 horas, para espécies patogênicas, e o crescimento em meio de cultura pode variar de dois a 30 dias (FAINE et al., 1999).

As leptospiros possuem uma arquitetura distinta de dupla-membrana, tendo semelhanças com bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Assim como em bactérias Gram-positivas, a membrana interna das espiroquetas é associada com a parede celular de peptidoglicanos, como as bactérias Gram-negativas, possuem uma membrana externa que atua como proteção para antígenos (HAAKE; MATSUNAGA, 2010).

1.2.3 Resposta imune

Durante uma infecção, o contato com patógenos ativa o sistema imunológico inato, gerando uma resposta inflamatória. Estudos *in vitro* e em modelos animais mostraram que leptospiros altamente virulentas podem induzir uma "tempestade" de citocinas nos estágios iniciais da enfermidade, com uma resposta TH1 (VERNELL-PAUILLAC; MERIEN, 2006).

Em um estudo recente, Reis et al. (2013) demonstraram que as concentrações de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17 e TNF- α , foram significativamente maiores em pacientes com casos leves, enquanto o baixo nível de TNF- α esteve relacionado com o desfecho fatal. Níveis elevados de TNF- α no soro de pacientes com leptospirose foram observados por Estavoyer et al. (1991) e Tajiki et al. (1996) que o associaram à gravidade da infecção. Conclusão semelhante foi descrita por Marinho et al. (2005) em ensaio experimental com *L. interrogans* sorovar icterohaemorrhagiae em camundongos geneticamente selecionados.

Com relação cinética da produção de citocinas na leptospirose, Vernel Pauillac & Merian (2006) demonstraram que células mononucleares do sangue periférico dos animais infectados secretam citocinas pró-inflamatórias (TNF- α), apresentando um perfil TH1 (IL-12) na primeira hora pós-infecção, enquanto que o perfil TH2 aparece tardiamente, após 24 horas da infecção.

Estudos analisando a importância das citocinas TH1 no controle de lesões ou na patogênese de lesões ainda são escassos, tanto em humanos quanto na leptospirose experimental. Como contraste, uma resposta TH1 também pode ser deletéria, quando em excesso, no choque séptico causado por bactérias Gram-positivas/-negativas.

Altos índices séricos de TNF- α em pacientes com leptospirose grave associam-se com insuficiência renal e alta mortalidade (ESTAVOYER et al., 1991). Porém, uma correlação baixa de IL-10/TNF- α , aponta para um melhor prognóstico na leptospirose humana, refletindo uma resposta inflamatória menos exacerbada, com menor comprometimento renal e pulmonar (TAJIKI et al., 1996). Marinho et al (2009) em estudo sobre a expressão gênica *in situ* de citocinas sintetizadas durante a hemorragia pulmonar grave, demonstraram pico de TNF- α durante a fase precoce da infecção junto a um aumento da produção de IL-10.

1.2.4 Patogenicidade

O mecanismo molecular da patogênese da leptospirose ainda não é claro (EVANGELISTA et al., 2010). *Leptospiras* patogênicas ultrapassam as barreiras teciduais penetrando, por meio de abrasões na pele e mucosas, podendo atingir a corrente sanguínea, onde se multiplicam e se disseminam. Entretanto, leptospiras não patogênicas são rapidamente eliminadas, principalmente por fagocitose e ativação do sistema complemento (MERI et al., 2005). Durante o processo de infecção, colonizam órgãos como baço, fígado, pulmão e rim, onde permanecem aderidas ao epitélio dos túbulos renais. Este ambiente é rico em nutrientes provenientes do filtrado glomerular, e funciona como nicho ideal para a multiplicação e disseminação de leptospiras na urina contaminada (KO et al., 2009).

A infecção causa uma prolongada leptospiremia até que o hospedeiro possa montar uma resposta imune efetiva, que ocorre uma ou duas semanas após a exposição. Quando a infecção é instalada, pode ocorrer a evolução para uma doença aguda, o desenvolvimento de imunidade protetora e eliminação do agente ou o desenvolvimento do estado de portador crônico (ATHANAZIO et al., 2008). Marinho et al. (2015) verificaram, por imuno histoquímica, a presença de TNF em tecidos renais e hepáticos associando-o ao dano celular.

Nos últimos anos, vem sendo bastante documentado que a interação de patógenos com proteínas de matriz extracelular (MEC) exerce um papel importante na colonização do hospedeiro. A aderência aos diferentes constituintes da MEC do hospedeiro é mediada por proteínas expostas na

superfície dos micro-organismos (BOYLE; FINLAY, 2003). É bem conhecido que a habilidade das bactérias espiroquetas de se aderirem às células e às proteínas de MEC seja crucial durante o início do processo de patogênese (BONAZZI; COSSART, 2011).

A produção de proteínas de virulência nas leptospiros é extremamente variável, dependente de vários fatores. As cepas patogênicas têm maior expressão destas proteínas do que cepas saprófitas e atenuadas. Do mesmo modo, sob as condições de temperatura e osmolaridade *in vivo*, a expressão de proteínas de virulência é maior que *in vitro* (HAAKE et al., 2000; NALLY et al., 2005; RISTOW et al., 2007).

Micro-organismos patogênicos desenvolveram inúmeras estratégias para escapar da ação do sistema imune dos hospedeiros. Ao que tudo indica, utilizam múltiplas estratégias de escape combinadas para inibir o ataque pelas diversas etapas da resposta imune inata ou adaptativa. Assim, após sua invasão no hospedeiro, as leptospiros patogênicas devem ser capazes de contornar o sistema imune enquanto na circulação, para se disseminarem aos órgãos e, finalmente, colonizar sítios imunológicos privilegiados, como os túbulos renais proximais (FAINE et al., 1999).

Estudos recentes, utilizando cepas mutantes de leptospiros, identificaram uma série de fatores de virulência, incluindo a presença de lipopolissacarídeo (MURRAY et al., 2010), heme oxigenase (MURRAY et al., 2008), lipoproteína Loa 22 (RISTOW et al., 2007). A adesão da leptospiros a componentes do tecido do hospedeiro seria um fator importante do processo inicial da infecção. Outro fator de destaque seria a diversidade de proteínas de superfície expressas em amostras patogênicas de *Leptospira* que teriam a função de mediar as interações entre a bactéria e a matriz extracelular de células de hospedeiro. Entretanto, não foram observadas, na leptospiros, proteínas de secreção do tipo III e tipo IV, como as utilizadas por bactérias Gram-negativas para a introdução de proteínas nas células hospedeiras (KO et al., 2009).

Algumas proteínas de superfície externa (OMP) são de grande interesse para a compreensão da patogenia da doença, como também são escopo de intensa pesquisa com o objetivo da utilização como inóculo vacinal contra leptospirose. Entre as OMPs, destacam-se: *Loa22*, *LipL32*, proteínas da

família Lig e as glicoproteínas (DUARTE NETO, 2011). A *Loa22* foi o primeiro fator de virulência identificado geneticamente (RISTOW et al., 2007). Cepas mutantes com depleção do gene responsável pela expressão da *Loa22* apresentaram virulência atenuada durante a infecção aguda em modelos experimental, como hamster e porquinhos da Índia (VIEIRA et al., 2012). A *LipL32* é a proteína de maior abundância encontrada sobre a superfície da leptospira (MALMOSTROM et al., 2009), estando altamente conservada em espécies patogênicas e ausente em cepas saprófitas (HAAKE et. al., 2000), apresentando grande potencial como antígeno vacinal (CULLEN et al., 2004).

Outras proteínas de membrana estariam implicadas na patogenia da infecção, como as *Leptospiral immunoglobulin-like proteins*, (*Lig A* e *Lig B*), que seriam expressas na superfície apenas de cepas de *leptospira* patogênicas (MATSUNUGA et al., 2003), com capacidade imunogênica, e que se ligariam à matriz extracelular, mediando à adesão entre a *Leptospira* e a célula hospedeira (CHOY et al., 2007), apresentando expressão aumentada em condições fisiológicas de osmolaridade, contudo, a inativação de *Lig B* não afetaria a virulência (CRODA et al., 2008).

Recentemente, Zhang et al. (2012) demonstraram a presença de proteína de *mammalian cell entry*, (*Mce*) de *Leptospira* durante a fase inicial da infecção, sendo responsável pela aderência e invasão de macrófagos pelas leptospiras virulentas, sendo que sua deleção atenuou significativamente a virulência do microrganismo quando inoculado em hamsters.

A presença destas proteínas associa-se à virulência na leptospirose sendo a sua expressão variável e dependente de fatores múltiplos. Muitos estudos relacionados à biologia molecular com manipulação genética sugerem um alto grau de prolixidade de função das proteínas de superfície, o que torna difícil a identificação de fatores de virulência pela inativação de genes únicos (VIEIRA et al., 2012).

1.2.5 Medidas preventivas

Devido ao grande número de sorovares, fontes de infecção e transmissão, o controle da leptospirose é difícil e dependente de condições locais de vigilância. Medidas profiláticas devem considerar a identificação de grupos com risco particular de infecção e os fatores epidemiológicos, focando a

fonte de infecção, a via de infecção ou a doença. O risco pode ser minimizado evitando-se o contato animais infectados e ambientes contaminados (VIEIRA et al., 2012).

Atualmente, só há vacinas para o uso veterinário, obtidas a partir de preparação de leptospiras atenuadas ou inativadas. Entretanto, a resposta imune desencadeada é ativada, principalmente, pela porção polissacarídica dos LPS, estimulando uma resposta timo-independente. Além disso, são sorovar-específicas, ou seja, não promovem proteção cruzada contra sorovares diferentes dos inclusos na preparação vacinal (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

1.3 Hipóteses

- Macrófagos murinos *in vitro*, são ativados e estimulam a produção de citocinas e reativos do oxigênio, após infecção por *Leptospira* virulenta, atenuada e saprófita.
- RNAm são modulados após infecção de *Leptospira* em macrófagos *in vitro*, independente da virulência.

1.4 Objetivos

Objetivo geral:

- Verificar a dinâmica da ativação de macrófagos murinos (J774A.1) *in vitro*, frente às amostras virulenta, atenuada e saprófita de *Leptospira*.

Objetivos específicos:

- Verificar a ativação dos macrófagos frente à dosagem de Óxido Nítrico (NO), pela técnica de Griees.
- Quantificar, em sobrenadantes do cultivo celular, a presença de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-10), proteases (caspase-3 e -8) e das enzimas óxido nítrico sintase induzível e endotelial (iNOS, eNOS), pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura;
- Avaliar a expressão gênica global dos macrófagos frente a diferentes cepas, pela técnica do microarranjo para análise transcriptômica.

1.5 Referências

- ADLER, B.; DE LA PENA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Vet. Microbiol.** v.140, p. 287–296. 2010.
- ARAGÃO, H. B. Sobre a presença do *Spirochaeta icterohemorrhagiae* nos ratos do Rio de Janeiro. **Brasil Med.** v. 39, pp. 329-30, 1917.
- ATHANAZIO, D. A.; SILVA, E. F.; SANTOS, C. S. et al. *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. **Acta Trop.** v. 105, p. 176-80, 2008.
- BENSCHOP, J.; HEUER, C.; JAROS, P. et al. Sero-prevalence of leptospirosis in workers at a New Zealand slaughterhouse. **N Z Med. J.** v. 1307, n. 122, p. 39-47, 2009.
- BENTES, J. A. Da leptospirose de Inada ou *icterus hemorrhagiae*. Estudo clínico e experimental. Rio de Janeiro, 1917. 83 p. Tese - Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro.
- BOYLE, E. C.; FINLAY, B. ..Bacterial pathogenesis: exploiting cellular adherence. **Curr. Opin. Cell. Biol.** v. 5, p. 633-39, 2003.
- BONAZZI, M.; COSSART, P. Impenetrable barriers or entry portals? The role of cell-cell adhesion during infection. **J. Cell. Biol.** v.3, p. 349-58, 2011.
- BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, JN. et al. Peru-United States Leptospirosis Consortium. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect. Dis.** v. 12, n. 3, p.757–771, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria consolidação nº 4, de 28 de setembro de Consolidação das normas sobre os sistemas e os subsistemas do Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da República Federativa.** 2018.
- BRENNER, D. J.; KAUFMANN, A. F.; SULZER, K. R. et al. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexandri* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 49, p. 39-58, 1999.
- CALDAS, E. M.; SAMPAIO, M.B. Leptospirosis in the city of Salvador , Bahia, Brasil. **Intern. J. Zoonosis.** v.6, p. 85-96, 1979.
- CORREA-ROTTER, R.; WESSELING, C.; JOHNSON, R. J. et al. CKD of unknown origin in Central America: the case for a Mesoamerican nephropathy. **Am. J. Kidney Dis.** v.63, p. 506–520, 2014.
- CORREA, W.M.; CORREA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos.** 2 ed. Rio de Janeiro: MedSci, 1992. 843 p.
- CHOY, H. .; KELLEY, M. M.; CHEN, T. L. et al. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infect. Immun.** v. 75, 2441-2450, 2007.

CRODA, J.; NETO, A. N.; BRASIL, R. A. et al. Leptospirosis pulmonary hemorrhage syndrome is associated with linear deposition of immunoglobulin and complement on the alveolar surface. **Clin. Microbiol. Infect**, v. 16, p. 593-599, 2010.

CULLEN, P. A.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. **FEMS Microbiol. Rev**, v. 3, p. 291-318, 2004.

DESAI, S.; VAN TREECK, U.; LIERZ M. Resurgence of field fever in a temperate country: an epidemic of leptospirosis among seasonal strawberry harvesters in Germany in 2007. **Clin. Infect. Dis.** v. 6, n.48,p. 691–697, 2007.

DIKKEN, H.; KMETY, E.; de GEUS, A. et al. Two new *leptospira* serovars belonging to the hebdomadis serogroup. **Trop. Geogr. Med**, v. 4, p. 537-42, 1978.

DINARELLO, C. A. Historical review of cytokines. **Eur. J. Immunol.** v. 37(Suppl. 1), p. S34–S45, 2007.

DUARTE NETO, A. N. **Patogenia do desenvolvimento esplênico na leptospirose grave com síndrome de choque séptico**. São Paulo, 2009. 243p. Tese Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

ESTAVOYER, J. M.; RACADOT, E.; COUETDIC, G. et al. Tumor necrosis factor in patients with leptospirosis. **Rev. Infect. Dis.** v.13, p. 1245, 1991

ELLINGHAUSEN, H. C.; McCULLOUGH, W. G. Nutrition of *Leptospira Pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. **Am J Vet Res**, v. 26, p. 45-51, 1965.

EVANGELISTA, K. V.; COBURN, J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Futures Microbiol**, v. 5, p. 1413-25, 2010.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C. et al. **Leptospira and Leptospirosis**. 2nd ed. MedSci, Melbourne, Australia. 1999.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. **Infect. Immun**, v. 9, pp. 4936-45, 2002.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. *Leptospira*: a spirochaete with a hybrid outer membrane. **Mol. Microbiol**, 2010.

HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N. (2015). Leptospirosis in humans. **Curr. Top. Microbiol. Immunol**, v. 387, p. 65–97, 2015.

HAAKE, D. A.; CHAO, G.; ZUERNER, R. L. ET al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity**. v. 68, p. 2276- 2285, 2000.

IDO, Y.; ITO, H.; WANI, H. H. et al. (1918), **Journ. Exp. Med**, 28: 435.

INADA, R.; IDO, Y.; HOKI, R. et al. The etiology, mode of infection and specific therapy of Weil's disease (*Spirochaetosis icterohaemorrhagica*). **J. Exp. Med**, v. 23, p. 377-403, 1916.

JOHNSON, R. C.; HARRIS, V. G. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. **J Bacteriol**, v. 94, p. 27-31, 1967.

KO, A.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics for an emerging zoonotic pathogen. **Nature**. v.7, p. 736-47, 2009.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 14, p. 296–326, 2001.

LEVETT, P. N.; SMYTHE, L. International committee systematic of prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of leptospiraceae. **Inter. J. System and Evolutionary Microbiol.** v. 58, p. 1049-50, 2008.

LEHMANN, J. S.; MATTHIAS, M. A.; WINETZ, J. M. et al. Leptospiral pathogenomics. **Pathogens**. v. 2, p. 280-308, 2014.

MALMSTROM, J.; BECK, M.; SCHMIDT A. et al. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. **Nature**, v. 7256, p. 762-65, 2009.

MATSUNAGA, J.; BAROCCHI, M. A.; CRODA, J. et al. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Mol. Microbiol**, v. 4, p. 929-45, 2003.

MARINHO, M.; LANGONI, H.; OLIVEIRA, S. L. et al. Role of cytokines, H₂O₂ and NO on immunopathology of Leptospirosis in genetically selected mice. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.** v.11, p. 1-11, 2005.

MARINHO, M.; OLIVEIRA-JUNIOR, I. S.; MONTEIRO, C. M. R. et al. Pulmonary disease in hamsters infected with *Leptospira interrogans*: histopathologic findings and cytokine mRNA expressions. **AM. J. Trop. Med. Hyg.** v.80, p. 832-36, 2009.

MARINHO, M.; TAPARO, C. V.; OLIVEIRA-JUNIOR, I. S. et al. Tissue apoptosis in mice infected with *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. **J. of Ven. Anim. and Tox. Includ. Trop. Dis.** p. 21:22, 2015.

MARTINEZ, R.; PEREZ, A.; QUIMONES, C. et al. Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba. **Rev. Panam. Salud Publica**, v. 4, p. 249-55, 2004.

MERI, T.; MURGIA, R.; STEFANEL, P. et al. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires. **Microb. Pathog**, v. 4, p.139-7, 2005.

MURRAY, G. L.; ELLIS, K. M.; LO, M. et al. *Leptospira interrogans* requires a functional heme oxygenase to scavenge iron from hemoglobin. **Microbes Infect**, v. 10, p. 791-797, 2008.

MURRAY, G. L.; SRIKRAM, A.; HENRY, R. et al. Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. **Mol Microbiol**, v. 78, p. 701-709, 2010.

McBRIDE, A. J.; ATHANOZIS, D. A.; REIS, M. G. et al. Leptospirosis. **Curr. Opin. Infect. Dis.** v. 5, p. 376-86, 2005.

NASCIMENTO, A. L.; KO, A. L.; MARTINS, E. A. et al. Comparative genomes of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insight into physiology and pathogenesis. **J. bacteriol.** v. 186, p. 2164-72, 2004.

NAHORI, M. A.; FOURNIE-AMAZOUZ, E.; QUE-GEWIRTH, N. S. et al. . Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. **J. Immunol.** 175, 6022–6031. 10.4049/jimmunol.175.9.6022, 2005.

NALLY, J. E.; CHOW, E.; FISHBEIN, M. C. et al. Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus chronic *Leptospira interrogans* infection. **Infect. Immunol**, v. 73, p. 3251-60, 2005.

PICARDEU, M.; BULACH, D. M.; BOUCHIER, C. et al. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of leptospira and the pathogenesis of leptospirosis. **PLoS One**. v. 2, e1607, 2008.

PICARDEAU, M. Leptospirosis: updating the global picture of an emerging neglected disease. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 9:e0004039. 10.1371/journal.pntd.0004039, 2015.

RAJA, V.; NATARAJASEENIVASAN, K. Pathogenic, diagnostic and vaccine potential of leptospiral outer membrane proteins. (OMP). **Critical Rev. in Microb**, p.1-17, 2013.

REIS, E. A.; HAGAN, J. E.; RIBEIRO, G. S. et al. Cytokine response signatures in disease progression and development of severe clinical outcomes for leptospirosis. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 7:e2457. 10.1371/journal.pntd.0002457, 2013.

RILEY, L. W.; KO, A. I.; UNGER, A. et al. Slum health: diseases of neglected populations. **BMC Int Health Hum Rights**. v.7, p. 2, 2007.

RICCIOTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol**, v. 31, p. 986 - 1000, 2011.

RISTOW, P.; BOURHY, P.; McBRIDE, F.W.C. et al. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. **PLOS Pathogens**, n. 7, p.894-903, 2007.

SOUZA, V. M. M.; BRANT, J. L.; ARSKY, M. L. S.; ARAÚJO, W. N. Avaliação do sistema nacional de vigilância epidemiológica da leptospirose - Brasil, 2007. **Cad Saúde Colet.** v.18.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, v. 140, p. 821-32, 2010.

TAJIKI, M. H.; SALOMÃO, R. Association of plasma levels of tumor necrosis factor a with severity of diseases and mortality among patients with leptospirosis. **C. Infect. Dis.** v. 23, p.1177-8, 1996.

TISONCIK, J. R.; KORTH, M. J.; SIMMONS, C. P. et al. Into the eye of the cytokine storm. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 76, p.16-32, 2012.

TURNER, M. .; NEDJAI, B.; HURST, T. et al. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1843, p. 2563-2582, 2014.

VERNEL-PAUILLAC, F.; MERIEN, F. Proinflammatory and immunomodulatory cytokine mRNA time course profiles in hamsters infected with a virulent variant of *Leptospira interrogans*. **Infect Immun.** v. 74, p.4172-79, 2006.

VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; SHRIRAN, A. N. Leptospirosis: an emerging global public health problem. **J. Biosci.** v. 4, p.557-59, 2008.

VIEIRA, M. L.; ATZINGEN, M. V.; OLIVEIRA, R. et al. Plasminogen binding proteins and plasmin generation on the surface of *Leptospira* spp.: the contribution to the bacteria-host interactions. **J. Biomed. Biotechnol**, 2012:758513, 2012.

WHO. Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. Geneva, Switzerland, 2003.

WINK, D. A.; HINES, H. B.; CHENG, R. Y., et al. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. **J. Leukoc. Biol.** v. 89, p. 873–891, 2011.

ZHANG, L.; ZHANG, C.; OJCIUS, D. M. et al. The mammalian cell entry (Mce) protein of pathogenic *Leptospira* species is responsible for RGD motifdependent infection of cells and animal. **Mol Immunol.** v.5, p.1006-1023, 2012.

1.6 Comissão de ética no uso de animais

O presente projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP campus de Araçatuba, sob o número de protocolo 2015-00895.

2 CAPÍTULO 1

Resposta imune de macrófagos murinos à infecção por *Leptospira* spp *in vitro*

***In vitro* infection of murine macrophages to *Leptospira* spp. and immune response**

Erivelto Corrêa de Araújo Junior¹, Leandro Encarnação Garcia¹, Reinaldo Augusto Ferreira Victor¹, Silvia H. V. Perri¹, Flavia Lombardi Lopes¹, Márcia Marinho^{1*}

¹Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Universidade Estadual de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, SP, Brasil.

***Autor Correspondente**

E-mail: mmarinho@fmva.unesp.br

Artigo a ser submetido

Referências: ABNT

2.1 Resumo

A leptospirose é uma zoonose tropical causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. Sabe-se que, durante a infecção, há uma cinética da resposta imune celular com ativação de macrófagos e ativa produção de citocinas. O presente trabalho teve por objetivo verificar a dinâmica da infecção *in vitro* frente a cultivos de macrófagos de murinos J774A.1 quando expostos às amostras virulenta, atenuada e saprófita de *Leptospira* spp. Como inóculo, foram utilizadas amostras: virulenta de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (FIOCRUZ L1-130), atenuada de *L. Interrogans* sorovar Copenhageni (M20) e *L. biflexa* sorovar Patoc (FIOCRUZ – Patoc I), saprófita, que foram mantidas em meio semi-sólido de Fletcher a 30°C e quantificadas na dose de 1×10^8 leptospira/mL. Para o cultivo, foi utilizada uma linhagem de células de macrófagos de murinos (J774A.1), mantida em meio completo de RPMI, acrescido de soro fetal bovino 10% e mantidos em estufa umidificada contendo 5% CO₂. Os cultivos foram infectados na proporção de 100:1 (bactérias:células) e as amostras foram coletadas em oito intervalos após a exposição: 1h, 3h, 6h, 12h, 24h, 36, 48h e 72h. Os resultados obtidos inicialmente nos três ensaios biológicos independentes mostraram que a infecção *in vitro* por *Leptospira* spp. ocorreu. A observação da ativação dos macrófagos murinos incubados com amostras virulenta e atenuada durante os oito intervalos revelou alteração da sua morfologia e, até mesmo, a diminuição das células presentes nos cultivos pós infecção, expressando, muito provavelmente, a morte celular. Os resultados demonstraram que as amostras virulenta e atenuada proporcionaram um estímulo maior aos macrófagos em comparação à amostra saprófita, principalmente na fase tardia da infecção, considerando-se os valores expressos por óxido nítrico (NO), óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e induzido (iNOS). Os valores, embora estatisticamente não significativos, apresentaram uma dinâmica maior à resposta de citocinas (TNF- α , IL-1 β) pela amostra virulenta em comparação à atenuada e saprófita. Outro fator relevante, foi o encontro de Caspase-3 e -8 na fase inicial da infecção, sugerindo que a apoptose dos macrófagos ocorreu no começo do processo, logo após a internalização das *Leptospiras*, atingindo níveis elevados às 24 horas, com pico máximo às 72 horas. Conclui-se que a infecção *in vitro* ocorreu, demonstrando que a

Leptospira induz à ativação de macrófagos, bem como a síntese de citocinas e caspases, independente da virulência.

Palavras-chave: *Leptospira*. Citocinas. Resposta Imune. Macrófagos. Apoptose.

2.2 Abstract

Leptospirosis is a neglected tropical zoonosis, caused by pathogenic spirochetes of *Leptospira* genus. There is a kinetics of cellular immune response during infection with macrophages activation and production of cytokines. The present work aimed to verify the dynamics of *in vitro* infection in murine macrophages cultures from J774A.1 murines exposed to virulent, attenuated and saprophytic samples of *Leptospira* spp. As inoculum, the following samples were used: virulent *L. interrogans* serovar Copenhageni (FIOCRUZ L1-130), attenuated *L. interrogans* serovar Copenhageni (M20) and saprophytic *L. biflexa* serovar Patoc (FIOCRUZ - Patoc I). The samples were kept in Fletcher semi-solid medium at 30°C and quantified at the dose of 1×10^8 leptospira/mL. A strain of murine macrophages (J774A.1) was maintained in RPMI complete medium with 10% fetal bovine serum in a humidified greenhouse with 5% CO₂ for cultivation. The cultures were infected in 100:1 (bacteria:cells) ratio and being collected at eight following intervals after exposure: 1h, 3h, 6h, 12h, 24h, 36, 48h and 72h. The three independent biological assays results obtained initially showed that the *in vitro* infection by *Leptospira* spp. was occurred. The observation of incubated of murine macrophages activation with virulent and attenuated samples during the eight intervals reveals the alteration of their morphology and even the decrease of the present cells in post infection cultures expressing cell death. The results demonstrated that the virulent and attenuated samples provided a greater stimulus to the macrophages compared to the saprophyte sample, especially in the late phase of the infection, considering the values expressed by nitric oxide (NO), endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and induced (iNOS). The values, although statistically insignificant, presented a greater dynamics to the cytokine response (TNF- α , IL-1 β) by the virulent sample compared to the attenuated and saprophyte. Another important factor was the finding of Caspase-3 and -8 in the initial phase of the infection suggesting that macrophage apoptosis occurred early in the process soon after *Leptospiras* internalization reaching high levels at 24 hours with a maximum peak at 72 hours. We concluded that the *in vitro* infection occurred, demonstrating that *Leptospira* induces the activation of macrophages and induces the synthesis of cytokines and caspases, independent of virulence.

Keywords: *Leptospira*. Cytokines. Immune Response. Macrophages. Apoptosis.

2.3 Introdução

A leptospirose é a zoonose causada por espécies patogênicas do gênero *Leptospira*, sendo conhecida como uma doença ocupacional de caráter infeccioso e reemergente, ocorrendo de forma epidêmica em países em desenvolvimento de clima tropical e subtropical (LEVETT, 2001; BHART et al., 2003; KO, GORANT, PICARDEAUL, 2009).

Os problemas causados pela desordem da urbanização nos grandes centros de países subdesenvolvidos, como enchentes, más condições sanitárias, pobreza e infestação de ratos, favorecem a ocorrência de leptospirose nas formas endêmicas e epidêmica (COSTA et al., 2015). O número de casos fatais é comparável ou até superior ao de algumas outras doenças tropicais, como a dengue hemorrágica ou a leishmaniose visceral (PICARDEAU, 2015).

Os principais reservatórios são roedores, que podem eliminar e disseminar o agente por vários anos. Outros reservatórios importantes incluem caninos, bovinos, caprinos, ovinos, suínos e animais selvagens (HAAKE; LEVETT, 2015). O homem é considerado suscetível à leptospirose, infectando-se pelo contato com secreções e fluidos corpóreos de animais infectados (LEVETT, 2001).

As espécies de *Leptospiras* patogênicas são invasoras e a infecção resulta da sua capacidade de invadir e colonizar os túbulos renais de hospedeiros acidentais, durante a fase inicial da infecção. Durante décadas, considerou-se a imunidade humoral como a única responsável pela resposta à leptospirose, porém, nos últimos anos, alguns avanços foram alcançados nos campos da imunidade inata e também da adaptativa (ADLER, FAINE, 1976; PEREIRA et al., 1998; WERTS et al., 2001; BARBOSA et al., 2009). Embora ainda não esteja claro por quê os pacientes com leptospirose apresentam várias manifestações clínicas, estudos recentes demonstram que tanto a resposta imunológica inata, quanto a adaptativa à infecção por *Leptospira*, influenciam o resultado da doença (XUE et al., 2013; CAGLIERO et al., 2018).

As citocinas constituem os principais mediadores inflamatórios que "orquestram" as respostas imunes à infecção (CHONG, 2011) e a regulação

diferencial da expressão de citocinas foi associada aos resultados clínicos na leptospirose humana. Níveis de expressão de citocinas incluindo IL-10, IL1 β e TNF- α , foram previamente avaliados como potentes marcadores de gravidade da leptospirose em humanos (TAJIKI et al., 1997; REIS et al., 2013; MIKULSKI et al., 2015; CHIRATHAWORN et al., 2016). Entretanto, a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias leva a distúrbios patológicos e lesão tecidual (BARTON, 2008).

O Óxido Nítrico (NO) é um radical livre de vida curta sintetizado a partir de L-arginina pela reação catalítica de óxido nítrico sintases (NOS). As isoformas de NOS de mamíferos incluem duas enzimas expressas: endotelial (eNOS) e induzida (iNOS) (ALDERTON et al., 2001). A expressão de iNOS pode-se apresentar bom ou perigoso, no que diz respeito à proteção do hospedeiro (ADLER, 2010; LI et al., 2017).

A apoptose é um processo bioquímico e genético que desempenha um papel essencial na morfogênese, defesa do hospedeiro e homeostase de todos os tecidos (MEIER et al., 2000). As caspases são uma família de proteases de cisteína que medeiam a apoptose induzida por uma variedade de estímulos. De acordo com suas estruturas, as caspases podem ser divididas em iniciadores (caspase-2, -8, -10 e -12) e efetores (caspase -3, -6 e -7) (EARSHAW et al., 1999).

Embora, recentemente, existam muitos estudos sobre a resposta imune celular frente à *Leptospira*, gerando um avanço considerável em termos de conhecimento, ainda existem muitas dúvidas e questionamentos sobre a dinâmica real da patogênese na leptospirose.

Este estudo teve como objetivos: (1) verificar a dinâmica da ativação de macrófagos J774A.1 *in vitro*, frente às amostras patogênica, atenuada e saprófita de *Leptospira*; (2) Verificar a ativação dos macrófagos frente à dosagem de Óxido Nítrico (NO), pela técnica de Griess; (3) Quantificar, em sobrenadantes do cultivo celular, a presença de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-10), proteases (caspase-3 e -8) e das enzimas óxido nítrico sintase induzível e endotelial (iNOS, eNOS), pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura.

2.4 Material e Métodos

2.4.1 Cultivo e manutenção de *Leptospira* spp

Três tipos de amostras da bactéria foram utilizados neste estudo: *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni - cepa FIOCRUZ-L1-130, como cepa virulenta; *L. interrogans* sorovar Copenhageni - cepa M20; e *L. biflexa* sorovar Patoc - cepa FIOCRUZ-Patoc I, como cepa saprófita. Todas as amostras foram cultivadas e mantidas em meio semissólido de Fletcher (1928) e em meio líquido EMJH (1965), posteriormente, incubadas à temperatura de 28 a 30°C durante 7 a 14 dias. Os inóculos foram repicados, semanalmente, em novos tubos contendo os dois meios.

2.4.2 Preparo do inóculo

As culturas de leptospira (*L. interrogans* e *L. biflexa*) foram centrifugadas a 8000rpm por um período de 10 minutos a 20° C e, após a formação do *pellet* bacteriano, o mesmo foi ressuspenso em meio PBS estéril (pH 7,2) e, novamente centrifugado, sob idênticas condições supracitadas, por duas vezes. Finalmente, o sedimento bacteriano formado foi ressuspenso em meio RPMI - 1640 (suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado) na concentração final de 10⁸ bactéria/mL.

2.4.3 Cultivo Celular

Foi utilizada linhagem de células J774A.1 (macrófagos murinos) fornecidas pelo Banco de células Paul Ehrlich, Rio de Janeiro, mantidas em placas de cultivo celular de fundo chato (Corning) com meio RPMI -1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) enriquecido com 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco) e 100µg/mL de estreptomicina (Sigma Chemical Co St.Louis, MO) e 1 mL de solução L-glutamina (Sigma) e 100UI/mL de penicilina. As células foram incubadas a 37°C com 5% CO₂, até a formação das monocamadas em placas de cultura de seis poços.

2.4.4 Infecção Celular

Após a formação das monocamadas, as células foram lavadas três vezes com solução tampão fosfato estéril (pH 7,2) para a remoção dos antibióticos e das células não aderentes. Posteriormente, o cultivo celular foi infectado com amostras virulenta e atenuada de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni, e amostra de *L. biflexa*, incubadas em estufa umidificada a 37°C, com tensão de 5% de CO₂, como descrito por Xue et al (2013).

2.4.5 Coleta do sobrenadante

Os sobrenadantes foram coletados em oito intervalos de tempo (1, 3, 6, 12, 24, 36, 48 e 72h) após a infecção, respectivamente, tendo um grupo controle para cada intervalo.

2.4.6 Determinação da produção de intermediários reativos do nitrogênio

O óxido nítrico decompõe-se espontaneamente em nitritos (NO₂⁻) e em nitratos (NO₃⁻) no meio de cultura. A produção de NO₂⁻ pelo cultivo de macrófagos foi determinada pelo método colorimétrico baseado na técnica de Griess (GREEN et al. 1981). Aos sobrenadantes, obtidos, foi adicionado o mesmo volume (100µL) do reagente de Griess, que contém NEED 0,1% (N-(1naphthyl) ethyl-enediamine-Sigma), diluído em água destilada e acrescido de sulfanilamida 1% (Sigma Co. USA) diluída em H₃PO₄ a 5%, adicionados em volumes iguais no momento da reação. As amostras, em triplicata, foram lidas em leitor de ELISA em 540nm contra um branco constituído por reagentes de Griess. Os resultados foram expressos em nanomoles (nmoles) de NO por 2x10⁶ células.

2.4.7 Determinação da produção de citocinas e caspases

A mensuração da produção de citocinas (TNF-α, IL-1β e IL-10) e caspases-3 e -8 foi determinada pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura, utilizando-se reagentes e realizando-se leitura, conforme o protocolo recomendado pelo fabricante (DuoSet ELISA Development Systems).

2.4.8 Eficiência da infecção

A eficiência da infecção *in vitro* foi revelada pela imunofluorescência indireta após a marcação das células com Isotiocianato de

fluoresceína (FITC-sigma) e capturados com fluorcromo, utilizando-se microscópio de UV (Microscopio AxioVison (A1) da Carl Zeis - Software AxionImage v.8.7e).

2.4.9 Análise Estatística

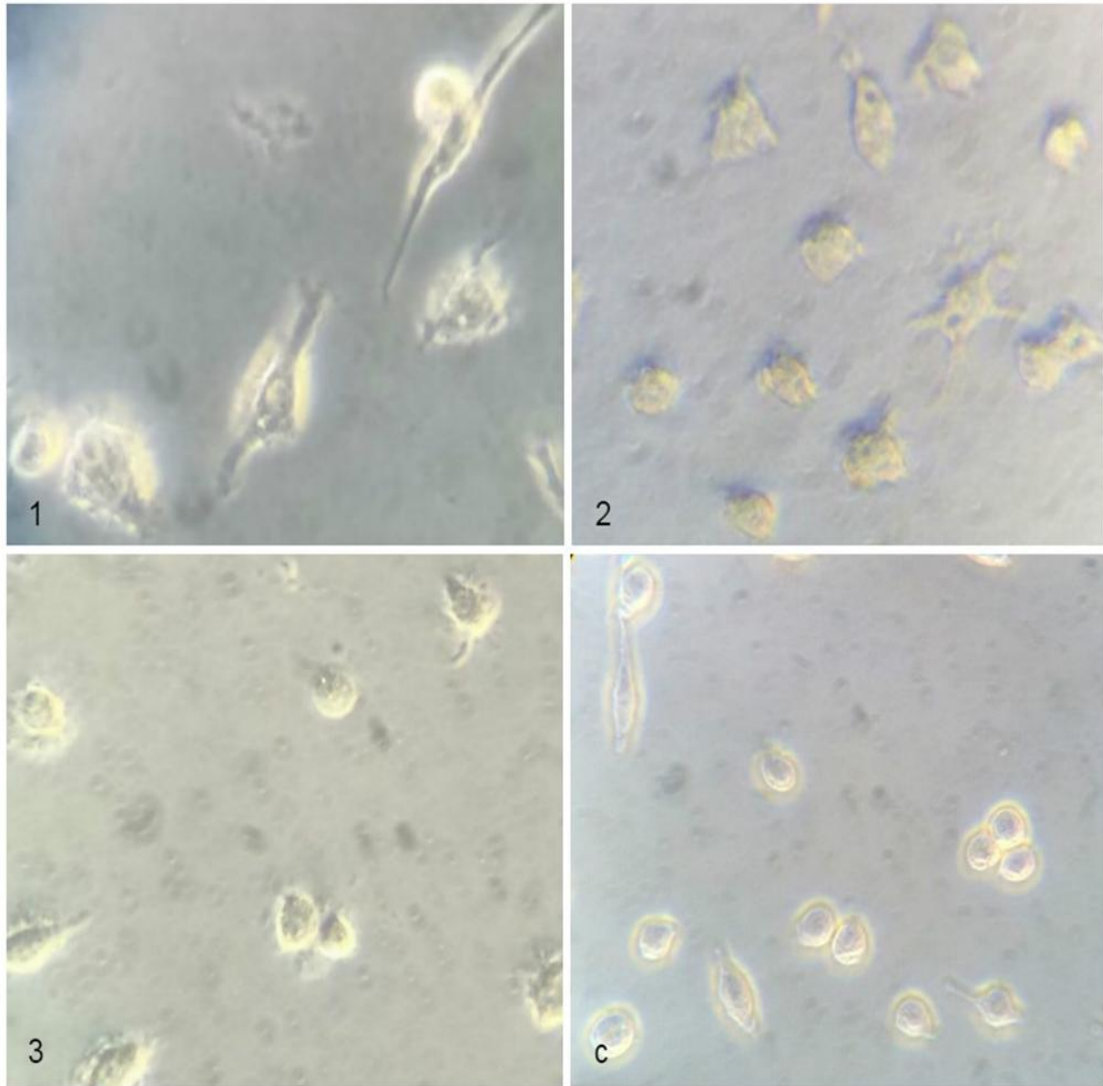
Os resultados da produção do óxido nítrico (NO) e a mensuração da produção das citocinas e reativos para a análise das médias das variáveis foram analisados pelo teste de variância, com médias repetidas e teste de *Student-Newman-Keuls* de comparações múltiplas (ZAR, 1996).

2.5 Resultados

2.5.1 Ativação de Macrófagos

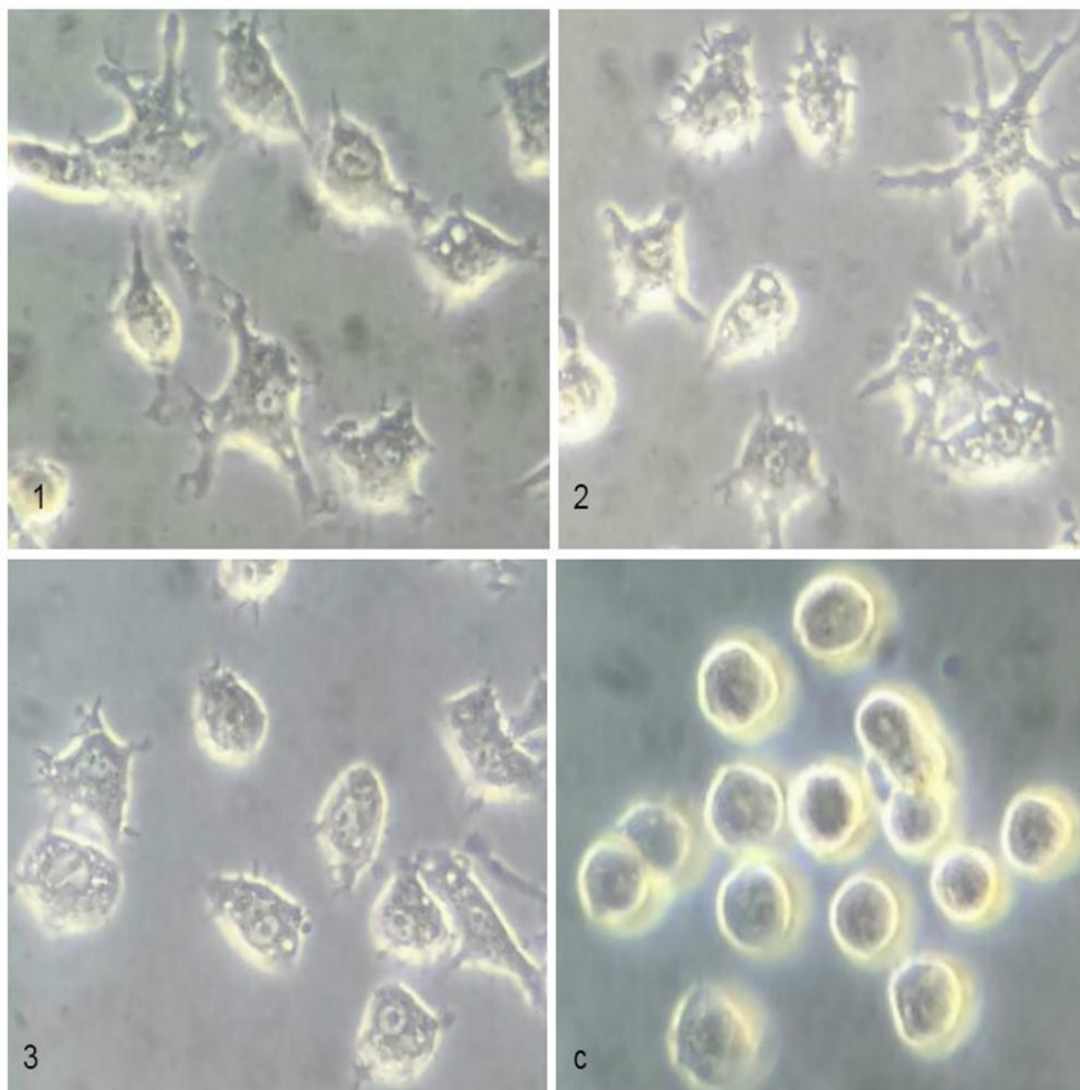
As figuras 1 a 4 ilustram os macrófagos infectados com *L. interrogans* de amostras virulenta e atenuada, e de amostra *L. biflexa* durante às 12, 24, 48 e 72 horas após a infecção, quando se observa a alteração da morfologia do macrófago, devido à infecção pelo microrganismo. Diferentemente do observado nas células do grupo controle, as mesmas permaneceram com morfologia simétrica.

Figura 1 Macrófagos após 12 horas de infecção com amostras: (1) *L. interrogans* virulenta; (2) *L. interrogans* atenuada; (3) *L. biflexa*; (c) Grupo controle. Microscopia de inversão (100x).



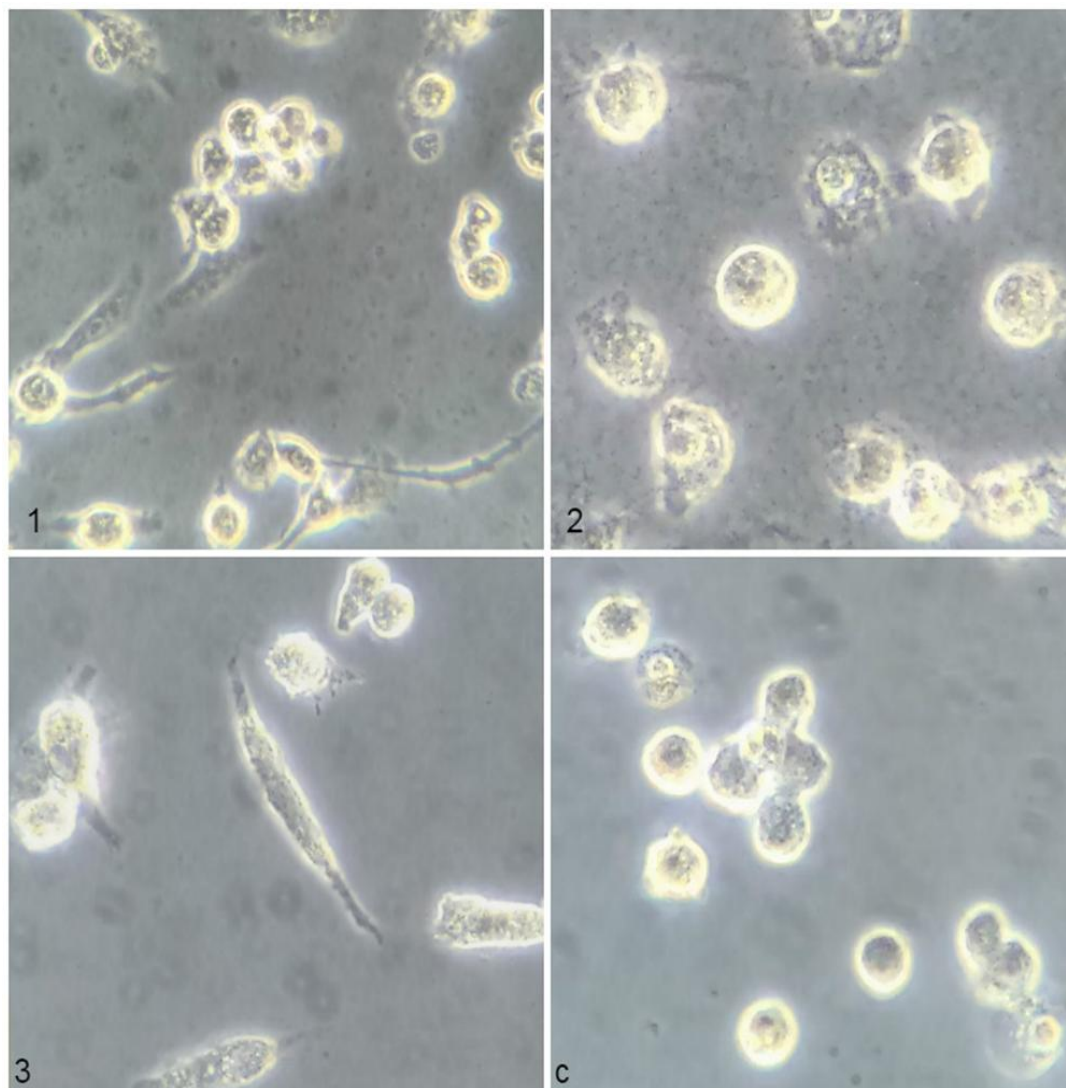
Fonte: Laboratório de Microbiologia FMVA/UNESP

Figura 2 Macrófagos após 24 horas de infecção com amostras: (1) *L. interrogans* virulenta; (2) *L. interrogans* atenuada; (3) *L. biflexa*; (c) Grupo controle. Microscopia de inversão (100x).



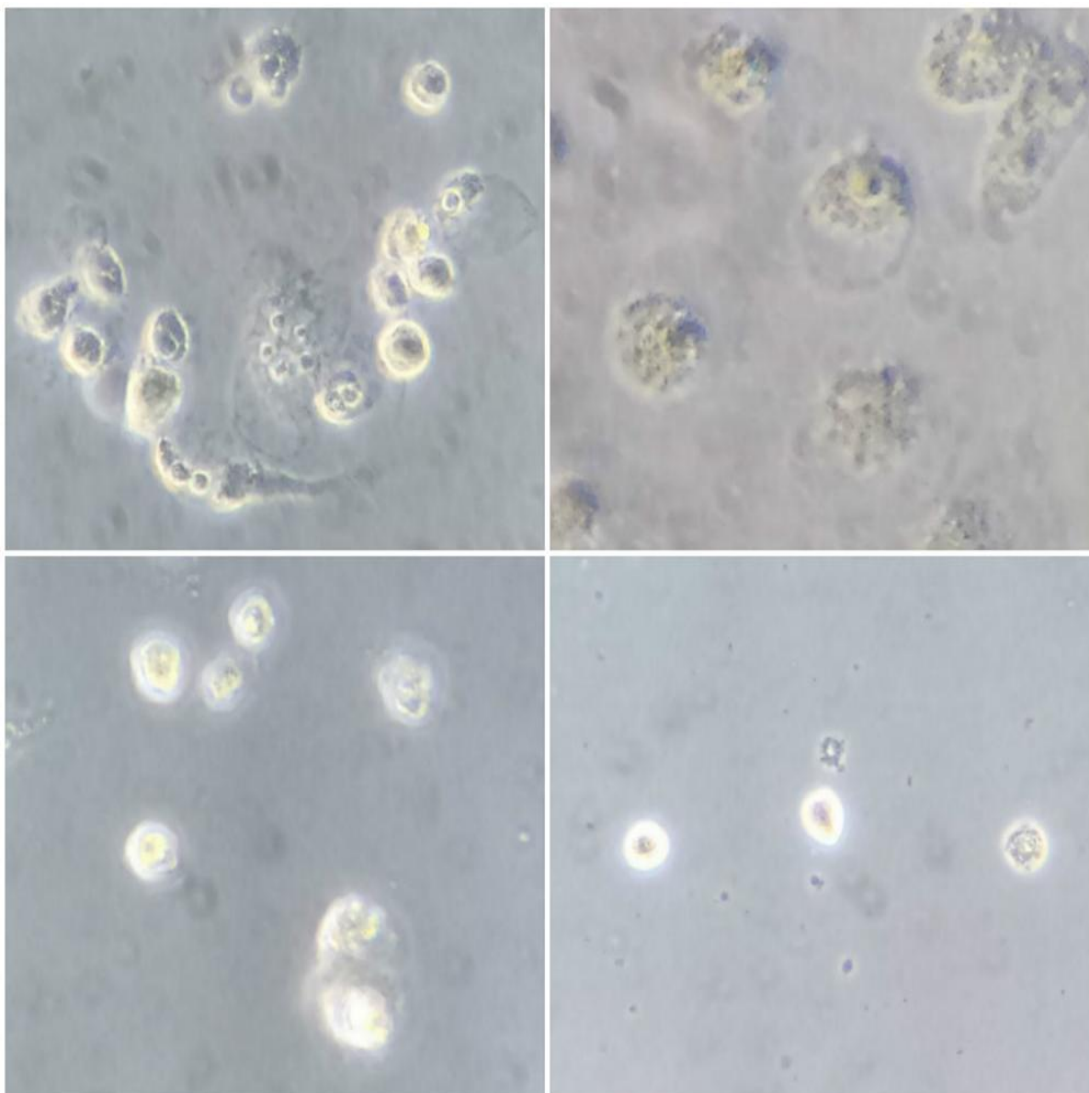
Fonte: Laboratório de Microbiologia FMVA/UNESP

Figura 3 Macrófagos após 48 horas de infecção com amostras: (1) *L. interrogans* virulenta; (2) *L. interrogans* atenuada; (3) *L. biflexa*; (c) Grupo controle. Microscopia de inversão (100x).



Fonte: Laboratório de Microbiologia FMVA/UNESP

Figura 4 Macrófagos após 72 horas de infecção com amostras: (1) *L. interrogans* virulenta; (2) *L. interrogans* atenuada; (3) *L. biflexa*; (c) Grupo controle. Microscopia de inversão (100x).



Fonte: Laboratório de Microbiologia FMVA/UNESP

2.5.2 Validação da infecção

A validação da infecção *in vitro* foi verificada durante 1h, 3h, 6h e 12 horas após a infecção, mostrando a internalização da *Leptospira* spp após a infecção com amostras de *L. interrogans* virulenta e atenuada, e amostra de *L. biflexa* (figuras 5, 6, 7 e 8).

Figura 5 Grupo controle de macrófagos sem infecção por *Leptospira* spp

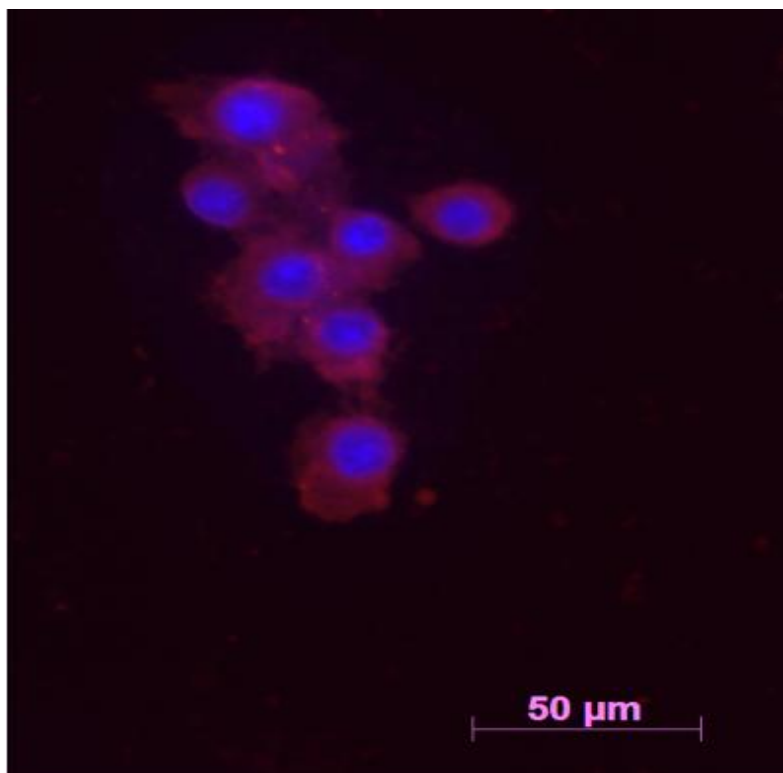
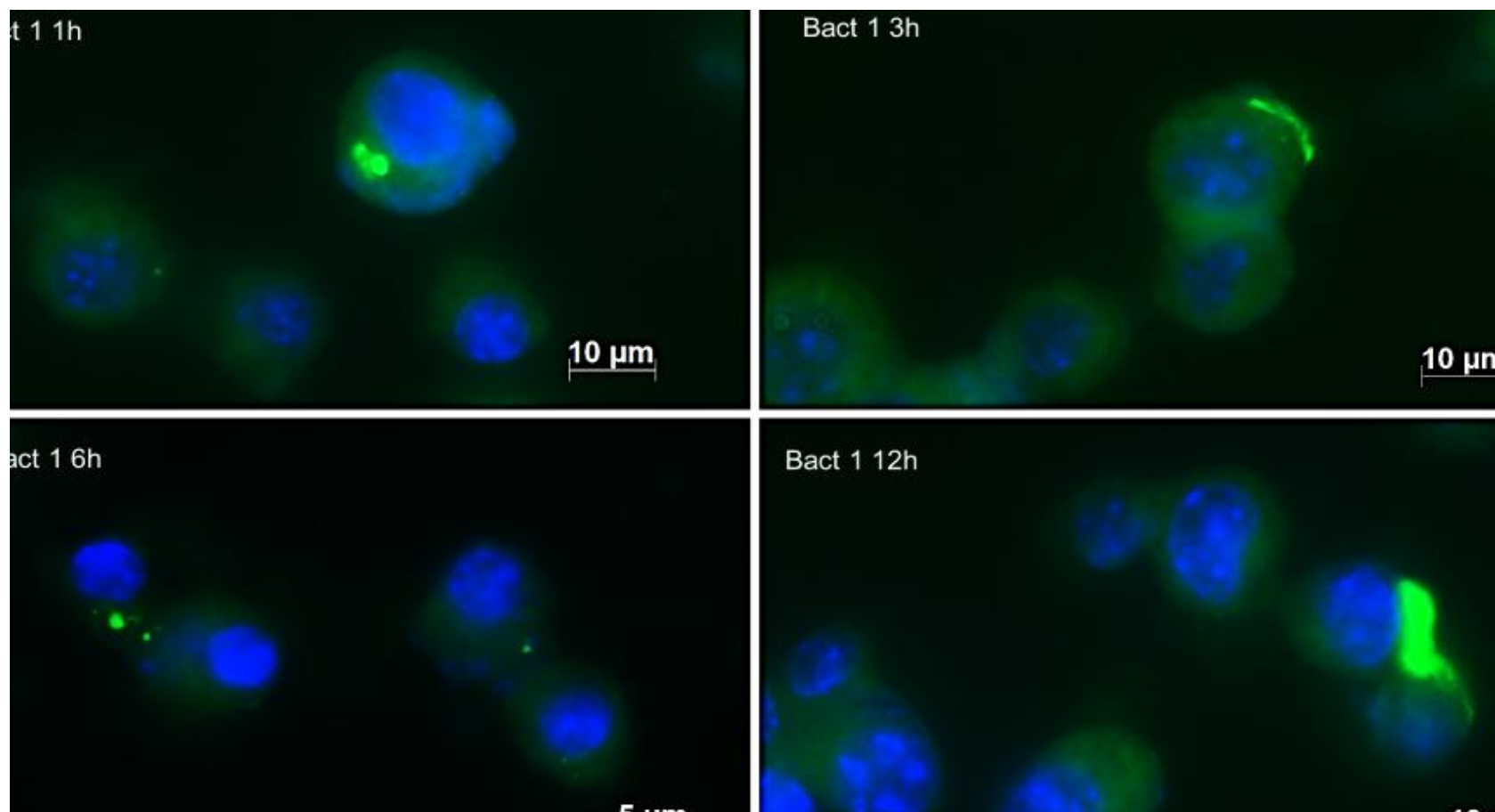
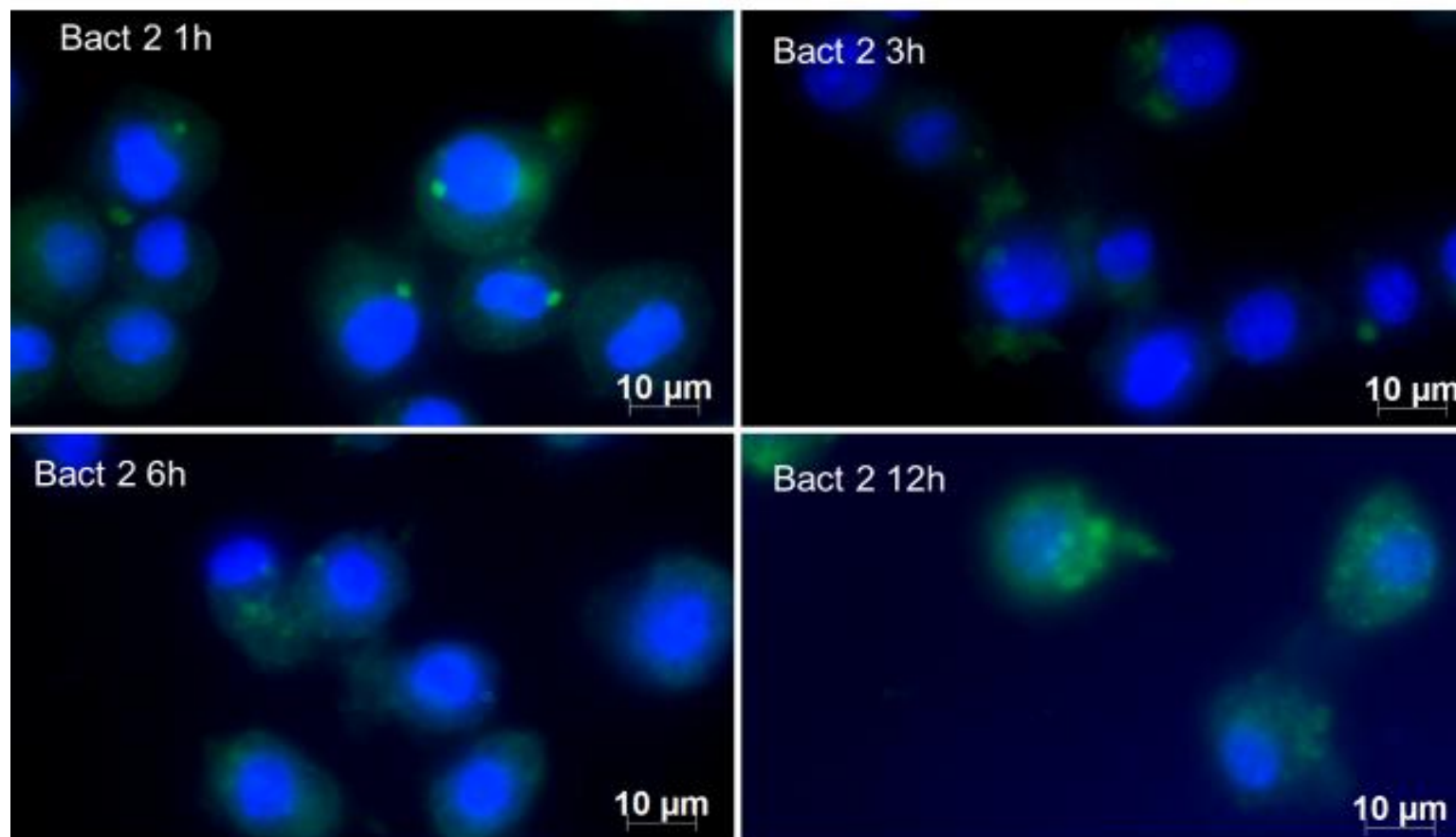


Figura 6 Infecção de amostra virulenta de *L. interrogans* em macrófagos durante os intervalos 1, 3, 6 e 12 horas, após a infecção, à Imunofluorescência indireta. Verde indica *Leptospiras* intracelulares e azul indica núcleos.



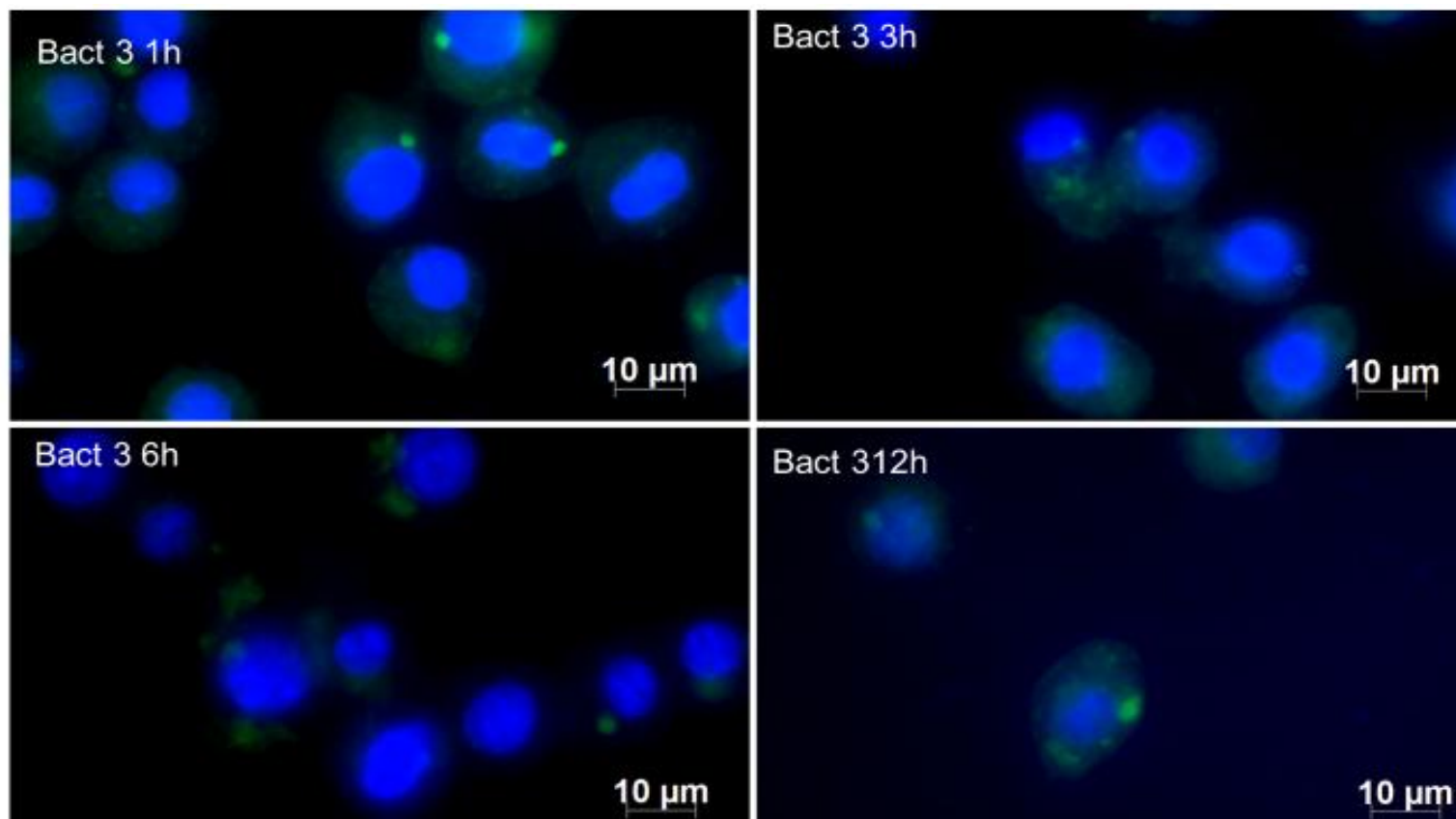
Fonte: Laboratório de Microbiologia FMVA/UNESP

Figura 7 Infecção de amostra atenuada de *L. interrogans a* em macrófagos durante os intervalos 1, 3, 6 e 12 horas, após a infecção, à Imunofluorescência indireta. Verde indica *Leptospiras* intracelulares e azul indica núcleos.



Fonte: Laboratório de Microbiologia FMVA/UNESP

Figura 8 Infecção de *L.biflexa* em macrófagos durante os intervalos 1, 3, 6 e 12 horas, após a infecção, à Imunofluorescencia indireta. Verde indica *Leptospiras* intracelulares e azul indica núcleos.

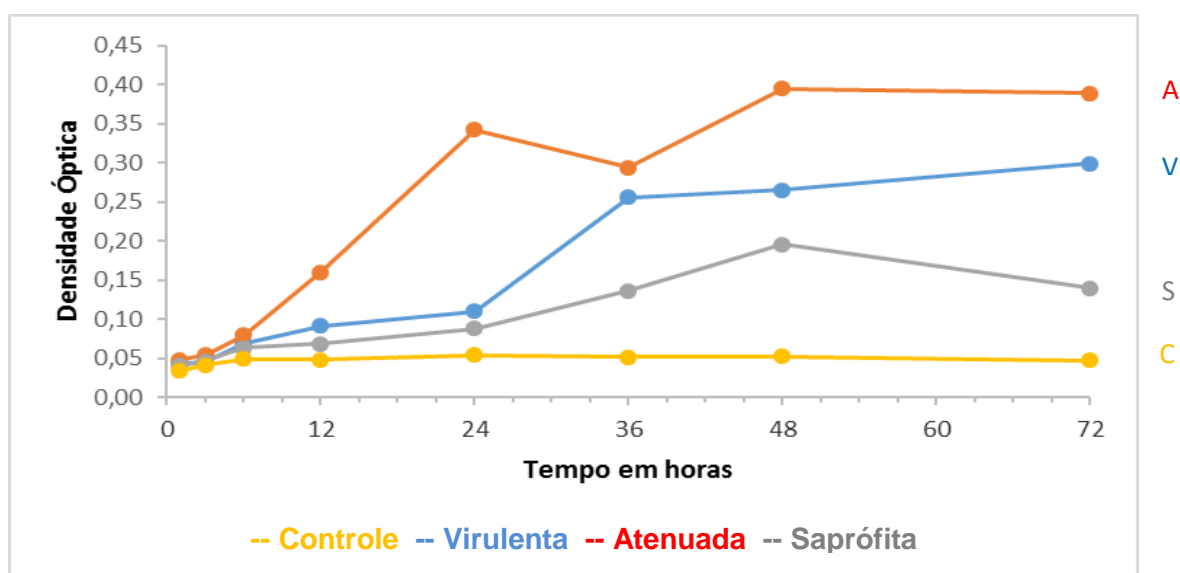


Fonte: Laboratório de Microbiologia FMVA/UNESP

2.5.3 Quantificação dos níveis de óxido nítrico

O perfil da resposta da produção de óxido nítrico frente aos três inóculos, ilustrados na Figura 9, apresentou-se de forma semelhante, ou seja, a ativação dos macrófagos ocorreu após 6 horas da infecção. Sendo que a cinética de ativação dos macrófagos, em função dos níveis de produção de NO observados pelos inóculos atenuado e saprófita, apresentou-se semelhante, ao longo do período de observação. A amostra virulenta apresentou um aumento de produção de óxido nítrico a partir das 24 horas, atingindo-se seu pico às 36h, mantendo-se elevado e constante, com um pequeno aumento, às 72 horas.

Figura 9 Comparação da cinética da produção dos níveis de Óxido Nítrico (NO), expressos em nanomoles (nmoles) de NO por 2×10^6 células de culturas, entre os diferentes inóculos e controle.



2.5.4 Quantificação da produção de óxido nítrico sintase endotelial e induzido (eNOS e iNOS)

A análise comparativa entre os níveis de eNOS encontrados nos sobrenadantes dos cultivos de macrófagos infectados com amostras virulenta, atenuada de *Leptospira interrogans*, e amostra saprófita de *L. biflexa*, respectivamente, e grupo controle apresentou diferenças significativas após todos os momentos observados, com exceção da amostra saprófita, que não apresentou diferença significativa com o grupo controle após 1, 3 e 6 horas de experimento. A análise entre os resultados expressos a partir dos níveis de iNOS apresentou diferenças significativas após os oito momentos observados (figura 11).

Figura 10 Comparação da cinética da produção dos níveis de eNOS expressos pg/mL , entre os diferentes inóculos e controle, ao longo do período de infecção por *Leptospira* spp.

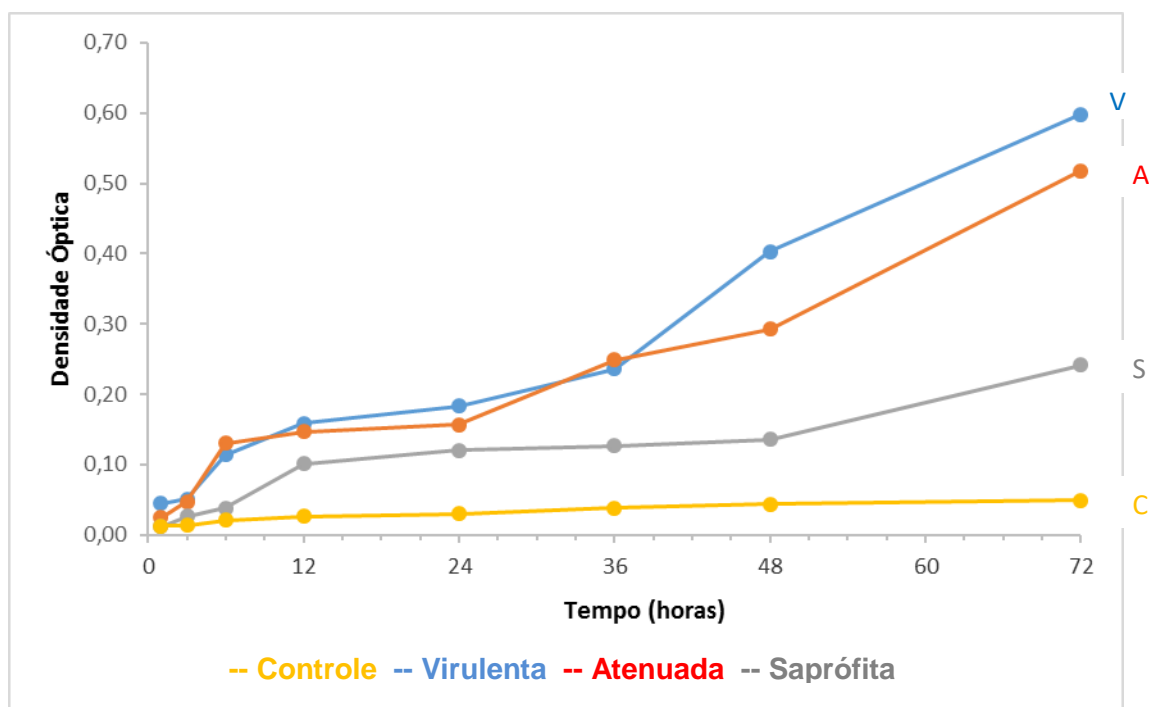
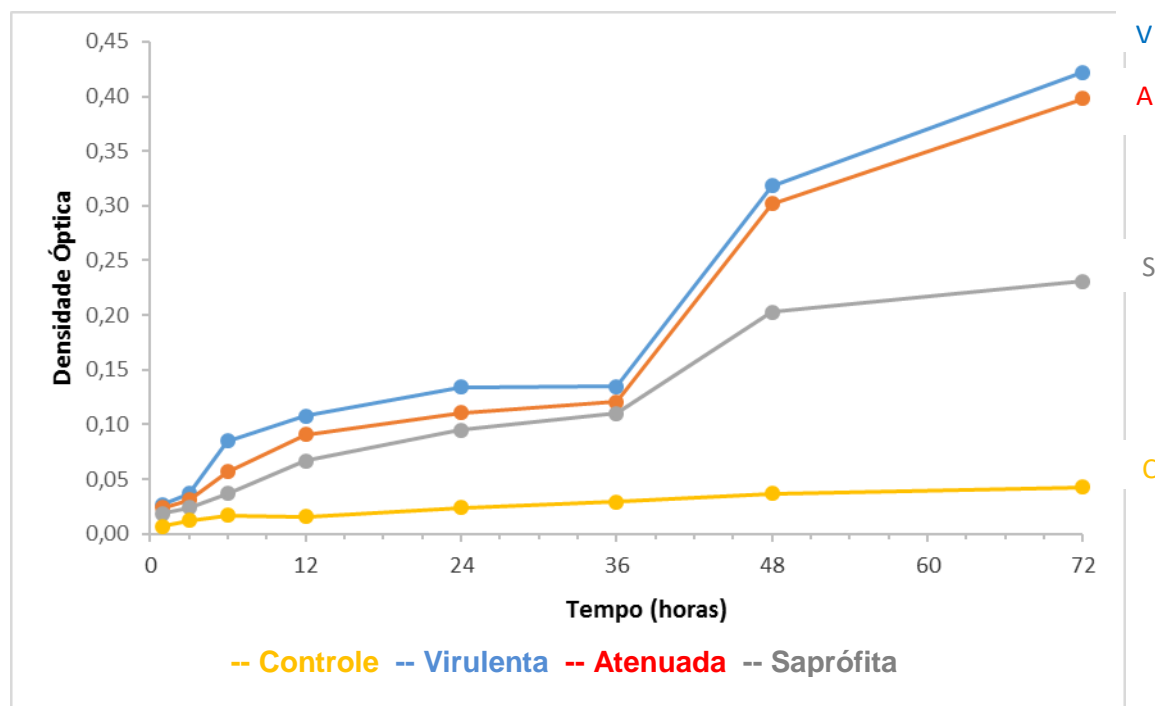


Figura 11 Comparação da cinética da produção dos níveis de iNOS expressos pg/mL , entre os diferentes inóculos e controle, ao longo do período de infecção por *Leptospira* spp.



2.5.5 Quantificação de citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-10

A análise comparativa entre os resultados expressos a partir dos níveis de TNF- α encontrados nos sobrenadantes dos cultivos de macrófagos infectados com amostras virulenta, atenuada de *Leptospira interrogans*, e amostra de *L. biflexa* (saprófita), respectivamente, e grupo controle apresentou diferenças significativas após os momentos avaliados 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48 e 72 horas ($p < 0,05$), com exceção, da amostra virulenta que não diferiu significativamente do grupo controle após 1, 3 e 72h de tratamento. Exceção também para *L. biflexa*, que não diferiu significativamente do grupo controle após 3h de infecção (figura 12).

Os níveis da citocina IL-1 β encontrados nos sobrenadantes dos cultivos apresentaram diferenças significativas em todos os momentos avaliados ($p < 0,05$), com exceção da amostra virulenta, que não diferiu nos momentos após 3, 12 e 48h. A amostra atenuada não diferiu significativamente do grupo controle nos momentos após 1 e 6h. A amostra saprófita não diferiu do grupo controle após 3, 6 e 72h de avaliação (figura 13).

A interleucina-10 não diferiu significativamente após 1, 3, 6, 24 horas da infecção. Diferindo estatisticamente após 12h, a amostra saprófita com respectivo grupo controle; após 36, 48 e 72h a amostra virulenta diferiu significativamente do grupo controle e, após 48 e 72h a amostra atenuada diferiu estatisticamente do grupo controle ($p < 0,05$) (figura 14).

Figura 12 Comparação da cinética da produção dos níveis de TNF- α expressos pg/mL, entre os diferentes inóculos e controle, ao longo do período de infecção por *Leptospira* spp.

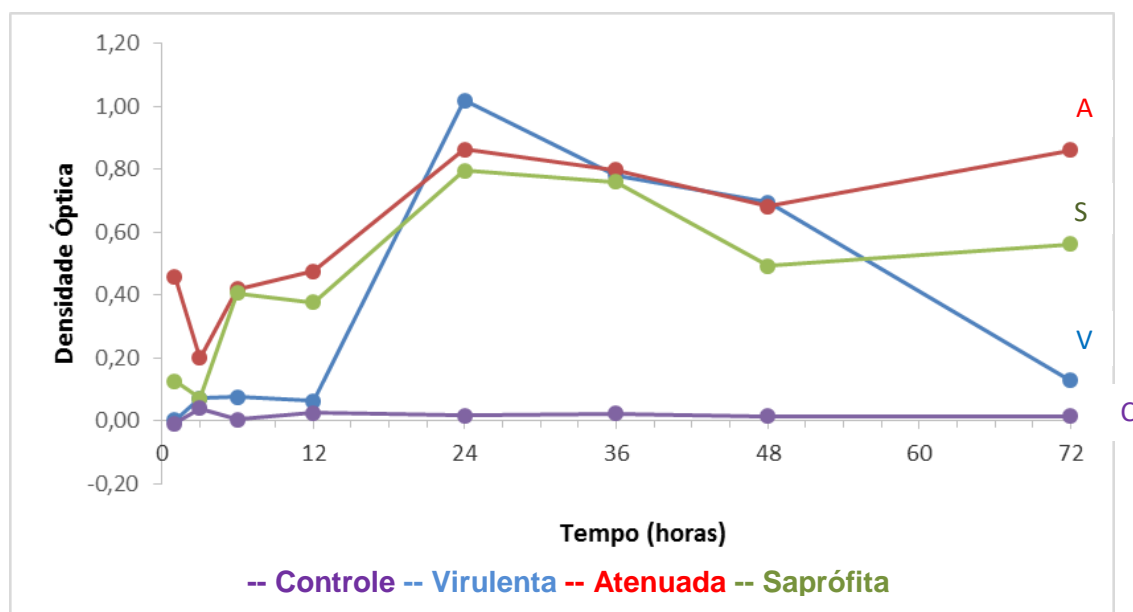


Figura 13 Comparação da cinética da produção dos níveis de IL-1 β expresso pg/mL, entre os diferentes inóculos e controle, ao longo do período de infecção por *Leptospira* spp.

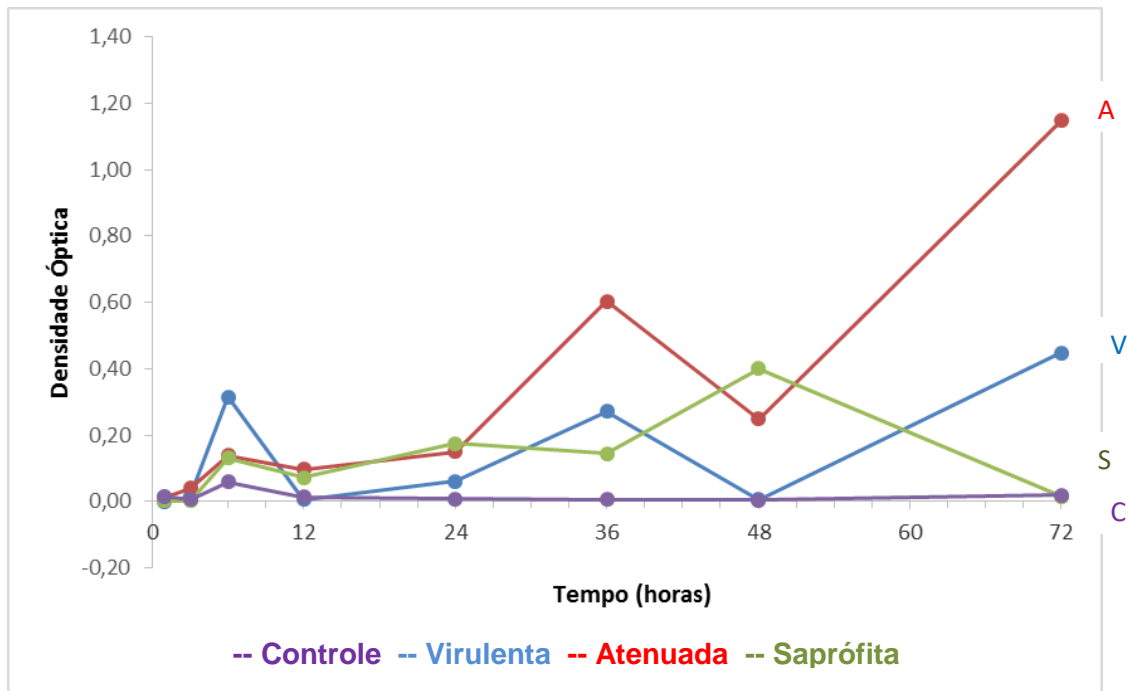
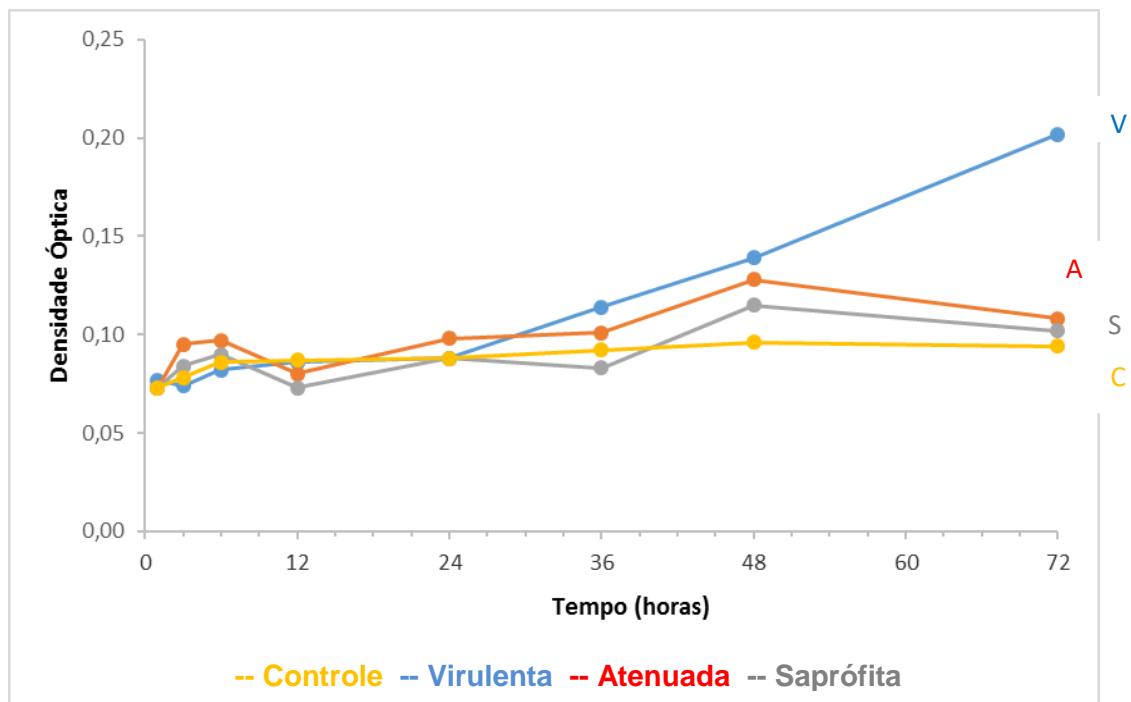


Figura 14 Comparação da cinética da produção dos níveis de IL-10 expressos pg/mL, entre os diferentes inóculos e controle, ao longo do período de infecção por *Leptospira* spp.



2.5.6 Quantificação de caspase-3 e caspase-8

A análise comparativa entre os níveis de caspase-3 encontrados nos sobrenadantes dos cultivos de macrófagos infectados com amostras virulenta, atenuada de *Leptospira interrogans*, e amostra saprófita de *L. biflexa* respectivamente, e grupo controle apresentou diferenças significativas após os oito momentos observados (1, 3, 6, 12, 24, 36, 48 e 72h), demonstrando que há produção da caspase-3 pelos macrófagos (figura 15). Os níveis de caspase-8 apresentaram diferenças significativas após os oito momentos observados (figura 16).

Figura 15 Comparação da cinética da produção dos níveis de Caspase-3 expressos pg/mL, entre os diferentes inóculos e controle, ao longo do período de infecção por *Leptospira* spp.

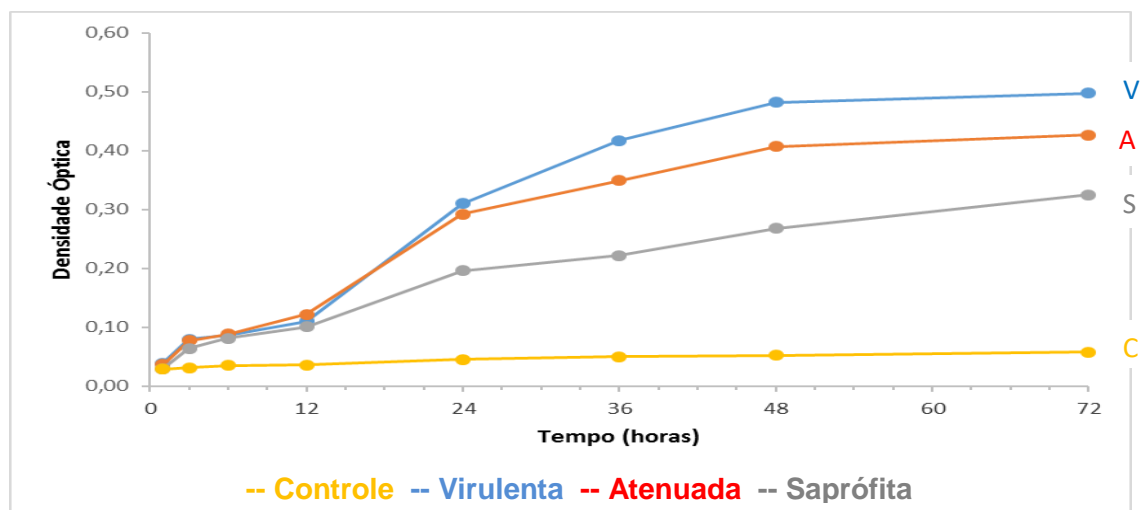
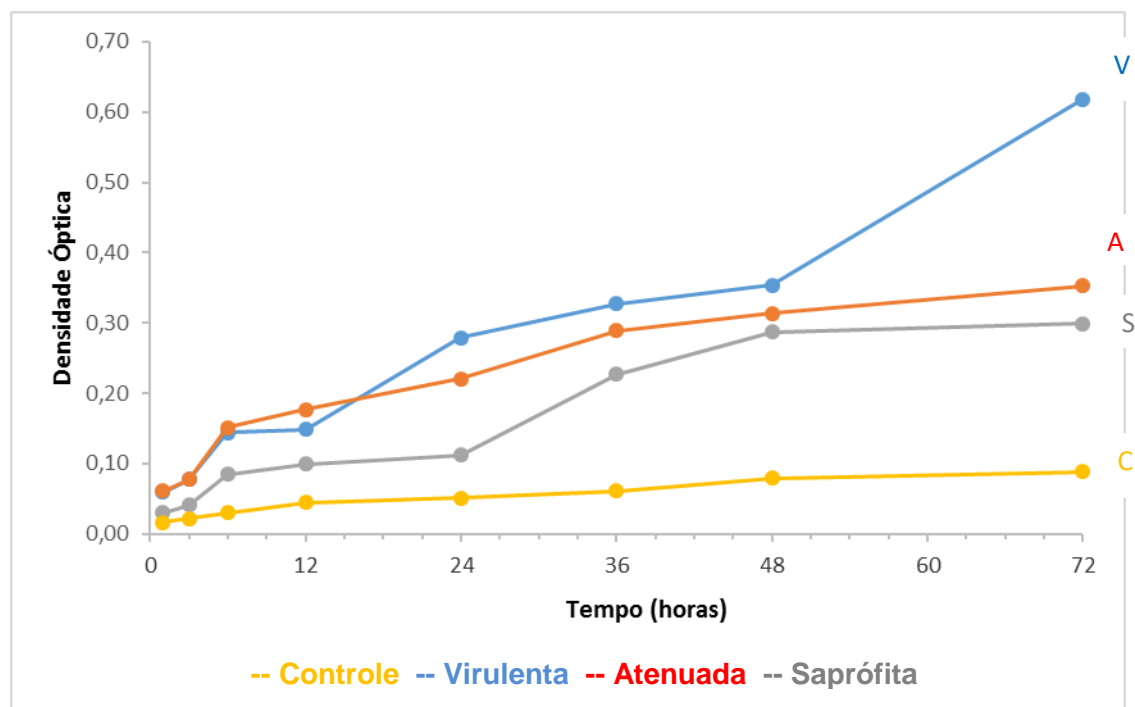


Figura 16 Comparação da cinética da produção dos níveis de Caspase-8 expressos pg/mL, entre os diferentes inóculos e controle, ao longo do período de infecção por *Leptospira* spp



2.6 Discussão

A infecção *in vitro* dos macrófagos frente às amostras virulenta e atenuada de *Leptospira interrogans* apresentou uma nítida alteração da sua morfologia inicial, como também um *clearance* celular/campo, expressando, assim, sua inviabilidade ou morte celular. Não se pôde identificar como o processo de internalização ocorreu, mas, pela imunofluorescência, foi possível observar a co-localização das bactérias nos macrófagos após 1h de infecção, independente da virulência. Semelhante aos resultados obtidos por Li et al. (2017), quando utilizaram células de cultura J774A.1 infectadas com amostras virulentas e saprófitas de *Leptospira*, e a Merien et al (1997), que observaram em células Vero que a *Leptospira* foi internalizada em 20 minutos pós infecção, e em macrófagos murinos, que houve a internalização precoce, seguida a ativação da apoptose.

Os resultados demonstram que as amostras virulenta e atenuada de *L. interrogans* foram capazes de proporcionar um estímulo maior aos macrófagos *in vitro*, que quando, reativos, produziram mais óxido nítrico em comparação à amostra de *L. biflexa*, principalmente na fase tardia da infecção,

considerando-se os resultados expressos por óxido nítrico (NO) e óxido nítrico sintase endotelial e induzido (eNOS, iNOS). Marinho et al (2005), utilizando modelo murino *in vivo* e infectado com amostra de *L. interrogans icterohaemorrhagiae* verificaram a resposta imune celular pela dosagem de reativos do oxigênio, H₂O₂ e NO.

As citocinas são os principais mediadores inflamatórios que "orquestram" as respostas imunes à infecção, sendo que TNF- α , IL-1 β e IL-10, foram previamente determinados como potentes marcadores da gravidade da leptospirose (MATSUI et al., 2017).

Na Figura 12, a produção de TNF- α foi expressa de forma elevada e constante frente à infecção pelas três amostras, independentes da patogenicidade da cepa. Observou-se que a cinética da produção dos níveis de TNF- α após a infecção pela cepa virulenta, não diferiu do grupo controle após 3 horas de infecção, demonstrando uma adaptação ao ambiente *in vitro*. Entretanto, um pico ocorreu a partir de 12 horas de infecção, acentuando-se às 24 horas.

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que apresenta consequências dúbias, protetivas e deletérias ao hospedeiro (SCHULTE et al., 2013; VERNEL; MERIEN, 2006). Kyriakidis et al. (2011) relataram que o TNF- α foi a única citocina identificada associada à Síndrome Hemorrágica Pulmonar em pacientes com leptospirose. Estavoyer et al. (1991) associaram o TNF- α à severidade da infecção em pacientes humanos. Marinho et al. (2015) verificaram, por imuno histoquímica, o TNF- α em tecidos renais e hepáticos, associando-o ao dano celular.

A análise dos resultados expressos a partir dos níveis de IL-1 β , apresentou diferenças significativas comparadas ao grupo controle após todos os tempos avaliados. Esses dados colocam a IL-1 β como condutores da resposta inflamatória desordenada e da subsequente "sepse" induzida pela "tempestade" de citocinas que foi observada por Schulte et al. (2013).

Na Figura 14, a citocina anti-inflamatória IL-10, que age inibindo a ação de citocinas de resposta Th1, expressou-se a partir de 24 horas após infecção pela amostra virulenta de *L. interrogans*, sendo mais evidente em 36 horas, evidenciando sua capacidade de interferir na síntese de TNF- α , como evidenciado por Mikulski et al. (2015), Kyriakidis et al (2011) e Tajiki et al. (1997).

Também foram observados níveis mais baixos de IL-10 pela cepa atenuada de *L. interrogans* e pela cepa de *L. biflexa*, demonstrando que a expressão ocorre independente da patogenicidade.

Outro dado relevante é o encontro de caspase-3 e -8 na fase inicial da infecção, apresentando uma cinética para os três ensaios, independente da patogenicidade. Jin et al. (2009) demonstraram, em ensaio *in vitro*, que a apoptose de macrófagos induzida por *L. interrogans* é desencadeada pelas vias caspase-3 e caspase-8. Marinho et al. (2015) sugeriram que *Leptospira* induza apoptose em órgãos de camundongos, pela via dependente de caspase-3. A indução da apoptose de macrófagos por *Leptospira* é um importante mecanismo de evasão desenvolvido pela bactéria ao longo de sua evolução ou uma estratégia de defesa adquirida pelo macrófago infectado, impedindo a disseminação da infecção (CAGLIERO et al., 2018).

2.7 Conclusão

Conclui-se que a infecção *in vitro* ocorreu, demonstrando que *Leptospira* spp. induziu a ativação de macrófagos de camundongos (J774A.1), independente da virulência da amostra. Houve também a cinética da produção dos níveis de TNF- α , IL-1 β , caspase-3 e-8 e NO, eNOS e iNOS frente à infecção pelas três amostras, independente da patogenicidade.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann por gentilmente ceder as amostras de *Leptospira* spp. para esse experimento e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro nas modalidades Auxílio à Pesquisa (proc. n.º. 2014/ 20719-2) e Iniciação Científica (proc. n.º 2015/118552).

2.8 Referências

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J.S. **Citocinas, in Imunologia Celular e Molecular (Second edition)**. Rio de Janeiro: Revinter. p. 253-76, 1998
- AL-ASHY, R.; CHAKROUN, I.; EL-SABBAN, M. E. et al. The role of NF kappa B in mediating the anti-inflammatory effects of IL-10 in intestinal epithelial cells. **Cytokine**. v. 36, p. 1–8, 2006.
- ADLER, B.; FAINE, S. Susceptibility of mice treated with cyclophosphamide to lethal infection with *Leptospira interrogans* serovar Pomona. **Infect. Immun.** v. 3, p. 703-8, 1976.
- BHART, A. R.; NALLY, J.E.; RICALDI, J. N. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect Dis**. v. 3, p. 757-71, 2003
- BARBOSA, A. S.; ABREU, P. A.; VASCONCELOS, S. A.; et al. Immune evasion of *Leptospira* species by acquisition of human complement regulator C4BP. **Infect. Immun.** v. 77, p.1137-43, 2009.
- BOGDAN, C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. **Trends Immunol.** v. 3, p. 161-78, 2015.
- DE BRITO, T.; PRADO, M. J.; NEGREIROS, V. A. et al. Detection of leptospiral antigen (*L. interrogans* serovar copenhageni serogroup Icterohaemorrhagiae) by immunoelectron microscopy in the liver and kidney of experimentally infected guinea-pigs. **Int. J. Exp. Pathol.** v. 73, p.633-42, 1992.
- COSTA, F.; HAGAN, J. E.; CALCAGNO, J. et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Negl Trop Dis**. 9(9):e0003898, 2015.
- CAGLIERO, J.; VILLANUEVA, S. Y. A. M.; MATSUI, M. Leptospirosis Pathophysiology: Into the storm of cytokines. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** v.8, p.204, 2018.

ESTAVOYER, J. M.; RACADOT, E.; COUETDIC, G. et al. Tumor necrosis factor in patients with leptospirosis. **Rev. Infect. Dis.** v.13, p. 1245, 1991.

ELLINGHAUSEN, H. C.; McCULLOUGH, W. G. Nutrition of *Leptospira Pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. **Am J Vet Res**, v. 26, p. 45-51, 1965.

FAINE, S. Guidelines for the control of Leptospirosis. **World Health Org.** p. 82-83, 1982.

FLETCHER, W. Recent work on leptospirosis, tsutsugamushi disease and tropical typhus in the Federated Malay States. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene, n.21, p.267-287, 1928. In: CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS. Manual sobre métodos de laboratórios para leptospirose. 1928. (Nota Técnica, n. 9).

GREEN, L. C.; RUIZ, K. L.; WAGNER, D. A, et al. Nitrate biosynthesis in man. **Proc. Natl Acad Sci USA.** v. 78, p. 7764-68, 1981.

HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N. Leptospirosis in humans. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** v. 387, p. 65-97, 2015.

JIN, D.; OJCIUS, D.; SUN, D. et al. *Leptospira interrogans* induces apoptosis in macrophages via caspase-8 and caspase-3-dependent pathways. **Infec and Immunity.** v. 2, p. 799-809, 2009.

KYRIAKIDIS, I.; SAMARA, P.; PAPA, A. Serum TNF-alpha, sTNRF1, IL-6, IL-8 and IL-10 levels in Weil's syndrome. **Cytokine.** 2011; 54:117-120.

KO, A.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics for an emerging zoonotic pathogen. **Nature.** v.7, p. 736-47, 2009.

LEVETT, P.N. Leptospirosis. **Clin Microbiol Rev.** v. 14, p. 296-326, 2001.

LI, L.; OJCIUS, D. M.; YAN, J. Comparison of invasion of fibroblasts and macrophages by high- and lowvirulence *Leptospira* strains: colonization of the host-cell nucleus and induction of necrosis by the virulent strain. **Arch Microbiol.** v. 188, p. 591–598, 2007.

LI, S.; OJCIUS, D. M.; LIAO, S. et al. Replication or death: distinct fates of pathogenic *Leptospira* strain Lai within macrophages of human or mouse origin. **Innate Immun.** v. 16, p. 80-92, 2010.

MARINHO, M.; LANGONI, H.; OLIVEIRA, S. L. et al. Role of cytokines, H₂O₂ and NO on immunopathology of Leptospirosis in genetically selected mice. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.** v.11, p. 1-11, 2005.

MARINHO, M.; OLIVEIRA-JUNIOR, I. S.; MONTEIRO, C. M. R. et al. Pulmonary disease in hamster infected with *Leptospira interrogans*: histopathologic findings and cytokine mRNA expressions. **Am J Trop Med Hyg.** v. 80, p. 832-36, 2009.

MARINHO, M.; TAPARO, C. V.; OLIVEIRA-JUNIOR, I. S. et al. Tissue apoptosis in mice infected with *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. **J. of Ven. Anim. and Tox. Includ. Trop. Dis.** p. 21:22, 2015.

MERIEN, F.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. **Infect Immun.** v. 65, p. 729–38, 1997.

MIKULSKI, M.; BOISIER, P.; LACASSIN, F. et al. Severity markers in severe leptospirosis: a cohort study. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v. 34, p. 687-95, 2015.

OLIVEIRA, S.L.; IBANEZ, O. M.; MOUTON-SANT'ANNA, O. A.; et al. Independent poligenic regulation of quantitative antibody responsiveness and expression of delayed-type hypersensitivity (DTH). **Ex. Clin. Immunogenet.** v.2, p.223-33, 1985.

PICARDEAU, M. Leptospirosis: updating the global picture of an emerging neglected disease. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 9:e0004039, 2015.

PEREIRA, M. M.; ANDRADE, J.; MARCHEVSKY, R. S. et al. Morphological characterization of lung and kidney lesions in C3H/HeJ mice infected with *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae: defect of CD4+ and CD8+ T-cells are prognosticators of the disease progression. **Exp. Toxicol. Pathol.** v. 50, p. 191-8, 1998.

SISTO, M.; BRANDONISIO, O.; PANARO, M. A. et al. Inducible nitric oxide synthase expression in Leishmania-infected dog macrophages. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.** 2001;24:247–54.

SCHULTE, W.; BERNHAGEN, J.; BUCALA, R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic target-an updated view. **Mediators Inflamm.** 165974, 2013.

TAJIKI, M. H.; SALOMÃO, R. Association of plasma levels of tumor necrosis factor α with severity of diseases and mortality among patients with leptospirosis. **C. Infect. Dis.** v. 23, p.1177-8, 1996.

TAJIKI, M. H.; NAKAMA, A. S. Y.; SALOMÃO, R. The ratio of plasma levels of IL-10/TNF- α and its relationship to disease severity and survival in patients with leptospirosis. **Braz. J. Infect. Dis.** v.1, p.138-41, 1997.

TISONCIK, J. R.; KORTH, M. J.; SIMMONS, C. P. et al. Into the eye of the cytokine storm. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 76, p.16-32, 2012.

TOMA, C.; OKURA, N.; TAKAYAMA, C. et al. Characteristic features of intracellular pathogenic *Leptospira* in infected murine macrophages. **Cell. Microbiol.** v. 13, p. 1783-92, 2011.

VERNEL-PAUILLAC, F.; MERIEN, F. Proinflammatory and immunomodulatory cytokine mRNA time course profiles in hamsters infected with a virulent variant of *Leptospira interrogans*. **Infect Immun.** v. 74, p.4172-79, 2006.

XUE, F.; ZHAO, X.; YANG, Y. et al. Responses of Murine and Human Macrophages to Leptospiral Infection: A Study Using Comparative Array Analysis. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 10, e2477, 2013.

XU, Y.; ZHU, Y.; WANG, Y. et al. Whole genome sequencing revealed host adaptation-focused genomic plasticity of pathogenic *Leptospira*. **Sci. Rep.** 6:20020, 2016.

WERTS, C.; TAPPING, R. I.; MATHISON, J. C.; et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. **Nat. Immun.** v. 2, p.346-52, 2001.

ZHAO, H. Q.; LI, W. M.; LU, Z. Q. et al. The growing spectrum of anti-inflammatory interleukins and their potential roles in the development of sepsis. **J. Interferon Cytokine Res.** v. 35, p. 242-251, 2015.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis.** 3ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 1996:718.

3 **CAPÍTULO 2**

Transcriptoma de macrófagos murinos infectados com diferentes cepas de *Leptospira* spp. revela que a infecção é independente do grau de virulência

Transcriptome of murine macrophages infected with different strains of *Leptospira* spp reveals that infection is independent of the degree of virulence

Erivelto Corrêa de Araújo Junior¹, Leandro Encarnação Garcia¹, Matheus Janeck Araújo¹, Itamar Souza Oliveira-Junior², Daniel Robert Arnold¹, Flavia Lombardi Lopes¹, Márcia Marinho^{1*}

¹Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, SP, Brasil.

²Departamento de Cirurgia, Disciplina de Anestesia, Dor e Medicina Intensiva, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

***Autor correspondente**

E-mail: mmarinho@fmva.unesp.br

Artigo submetido na Revista *PLOS ONE*

Referências: Vancouver

3.1 Resumo

A leptospirose é uma zoonose negligenciada e reemergente, causada por bactérias espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* e com estimativa de infectar mais de um milhão de pessoas com aproximadamente 60.000 mortes anuais. O gênero *Leptospira* contém espécies que afetam a saúde humana com diferentes graus de patogenicidade. Neste contexto, objetivou-se avaliar as diferenças na modulação da expressão gênica do hospedeiro frente a cepas de *Leptospira* com variados graus de virulência. Um alto número de transcritos diferencialmente expressos em macrófagos murinos após 6h de infecção, tanto por *L. interrogans* virulenta, quanto pela atenuada e em menor proporção com a linhagem saprófita *L. biflexa*. Isso sugere que mRNAs são modulados pela infecção por *Leptospira* em macrófagos, independente de seu grau de virulência. Uma pletera de genes e vias são identificadas como parte dos mecanismos envolvidos na resposta imune. A análise da via de engenhosidade indicou que a inflamação, resposta imune, sinalização de citocinas, replicação de DNA, recombinação, reparo, movimento celular, morte celular e sobrevivência foram ativados, significativamente, após a infecção com a cepa virulenta. Existe a possibilidade de que a cepa virulenta seja responsável pela regulação dos genes envolvidos na degradação do DNA da célula hospedeira, levando à apoptose. Espera-se que os dados produzidos por esse estudo contribuam para a compreensão das bases moleculares da patogênese da leptospirose.

Palavras-chave: Leptospirose. Transcritoma. RNA. Análise da Expressão

3.2 Abstract

Leptospirosis is a re-emerging neglected zoonosis, caused by pathogenic spirochete bacteria from the genus *Leptospira* and estimated to infect more than a million people with approximately 60,000 deaths annually. *Leptospira* genus contains species that affect human health with varying degrees of pathogenicity. In this context, we aimed to evaluate the differences in modulation of host gene expression by strains of *Leptospira* with varied virulence degrees. Our data showed a high number of differentially expressed transcripts in murine macrophages following 6h of infection with both virulent and culture-attenuated *L. interrogans* and in a lower rate with the saprophyte strain *L. biflexa*. That suggests mRNAs are modulated by *Leptospira* infection in macrophages independent of their degree of virulence. A plethora of genes and pathways are identified as part of the mechanisms involved in immune response. Ingenuity pathway analysis indicated that inflammation, immune response, cytokine signaling, DNA replication, recombination, repair, cellular movement, cell death and survival were significantly activated by following infection with the virulent strain. There is a possibility that the virulent strain is responsible for the regulation of genes involved in the degradation of host cell DNA, leading to apoptosis. We hope that the data produced by these studies contribute to the understanding of the molecular basis of leptospiral pathogenesis.

Keywords: Leptospirosis; Transcriptome; mRNA; Analysis Expression

3.3 Introdução

A leptospirose é uma zoonose que ocorre em diferentes condições epidemiológicas [1]. O gênero *Leptospira* engloba espécies patogênicas e saprófitas que diferem em sua capacidade de sobreviver e colonizar diferentes ambientes e hospedeiros [2]. As espécies de *Leptospira* são classificadas em três grupos de acordo com seu potencial patogênico: virulentas, intermediárias e saprófitas [3]. A leptospirose ocorre, principalmente, em populações vulneráveis, incluindo habitantes urbanos e rurais [4] de países em desenvolvimento tropicais e subtropicais [5,6,7]. É um grande problema de saúde pública, com uma estimativa recente de 1 milhão de casos por ano e uma taxa de mortalidade de 5 a 10% [4,8,9].

As leptospirosas são capazes de infectar seres humanos e muitos animais domésticos e selvagens; sobrevivem e prosperam nos tecidos do hospedeiro, escapando dos mecanismos naturais de defesa do mesmo. A transmissão é baseada no contato direto ou indireto com a urina de portadores (principalmente roedores); a doença varia de subclínica para casos mais graves, progredindo para insuficiência renal e hemorragia pulmonar [10,11].

A resposta imune hospedeira específica contra leptospirosas patogênicas é pouco compreendida, tanto na suscetibilidade, quanto na resistência à infecção. Durante décadas, a imunidade humoral adaptativa foi considerada como a única imunidade anti-leptospirose, mas, nos últimos anos, houve progresso da imunidade inata e adaptativa [11, 12, 13,14]. Murray et al. [15] identificaram uma série de fatores de virulência, incluindo a presença de lipopolissacarídeos (LPS), heme oxigenase [16], lipoproteína Loa22 [17] e outras proteínas relacionadas à interação de macrófagos com *Leptospira*.

A fagocitose é um dos principais mecanismos para eliminar patógenos microbianos invasores nos estágios iniciais da doença em indivíduos sem imunidade adquirida contra o agente infeccioso. Mas, a leptospirose patogênica pode escapar do ataque do complemento e da fagocitose após a infecção [18,19,20], sendo também capaz de sobreviver e se replicar em macrófagos humanos, sendo morta por macrófagos murinos [21]. Os LPSs da leptospirose patogênica ativam os macrófagos humanos apenas através do receptor *Toll-like 2* (TLR2), enquanto os macrófagos murinos são ativados

através de TLR2 e TLR4 [13,22]. Vernon Pauillac e Merian [23] mostraram que macrófagos mononucleares do sangue periférico de hamster infectados com uma variante virulenta de *Leptospira interrogans* secretam citocinas pró-inflamatórias (TNF- α) com um perfil de TH1 (IL-12) na primeira hora, predominando até o quarto dia de infecção, enquanto o perfil de TH2 aparece após 24 horas de infecção.

Marinho et al [24] em um estudo *in vivo* de hamster infectado com *L. interrogans* observaram uma expressão gênica (RNA) de citocinas durante a hemorragia pulmonar grave na leptospirose, que demonstraram uma produção de TNF- α durante a fase inicial da infecção e altos níveis de IL -10 (até o vigésimo oitavo dia) e eNOS.

A *L. interrogans* dentro do hospedeiro mamífero encontra, simultaneamente, múltiplos sinais que são diferentes das condições ambientais. No curso inicial da infecção, as leptospirosas têm que sobreviver e se espalhar na corrente sanguínea antes de causarem danos aos órgãos-alvo [25].

Neste estudo, foram aplicados *microarrays* de expressão gênica para, comparativamente, serem analisadas as respostas de macrófagos murinos frente a inóculos de *Leptospira* spp e genes e vias de sinalização mais ativadas neste modelo de infecção celular *in vitro*.

3.4 Material e Métodos

3.4.1 Cultivo de *Leptospira* spp

Três tipos de amostras da bactéria foram utilizados neste estudo, *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni-cepa FIOCRUZ-L1-130, como cepa virulenta; *L. interrogans* sorovar Copenhageni - cepa M20; e *L. biflexa* sorovar Patoc - cepa FIOCRUZ-Patoc I, como cepa saprófita. Todas as amostras foram cultivadas e mantidas em meio semissólido de Fletcher (1928) e em meio líquido EMJH (1965), posteriormente incubadas à temperatura de 28 a 30°C, durante 7 a 14 dias. Os inóculos foram repicados semanalmente em novos tubos contendo os dois meios.

3.4.2 Cultivo de macrófagos

Foi utilizada linhagem de células J774A.1 (macrófagos murinos) fornecidas pelo Banco de células Paul Ehrlich, Rio de Janeiro, e usadas como descrito por Araújo-junior *et al* [26]. As células foram incubadas a 37°C com 5% CO₂, até a formação das monocamadas em placas de cultura de seis poços.

3.4.3 Infecção de macrófagos

Após a formação das monocamadas, as células foram lavadas três vezes com solução tampão fosfato estéril (pH 7,2) para a remoção dos antibióticos e das células não aderentes. Posteriormente, o cultivo celular foi infectado com amostras virulenta e atenuada de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni, e amostra de *L. biflexa*, incubadas em estufa umidificada a 37°C, com tensão de 5% CO₂, como descrito anteriormente [28]. As células foram, então, infectadas (100:1 bactérias:célula) e macrófagos não infectados foram utilizados como controles. Todas as células infectadas, em triplicatas biológicas, foram transportadas em RPMI-1640, desprovidas de antibióticos, por 6h a 37° C, 5% CO₂. A taxa de infecção não diferiu entre as cepas (78, 85 e 80% para saprófita, cultura atenuada e virulenta, respectivamente). No final do período de 6 horas de infecção, a extração de RNA foi imediatamente realizada.

3.4.4 Extração e quantificação do RNA

RNA total (n = 3 / grupo experimental) foi extraído de macrófagos com RNeasy Mini Kit (Qiagen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram imediatamente armazenadas a -80°C. A quantificação foi realizada utilizando um espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) e a qualidade das amostras foi avaliada por eletroforese capilar (Bioanalyzer 2100 Agilent, Santa Clara, CA, EUA). Todas as amostras utilizadas para análise do microarranjo tiveram um RIN (RNA *integrity number*) de 10.

3.4.5 Microarranjo para análise transcriptômica

Utilizou-se um "kit" de reagente da WT PLUS (Affymetrix®, Santa Clara, CA, EUA) para preparo das amostras de RNA para análise da expressão do transcriptoma utilizando o *Mouse Genome 2.1 ST Array Strip* (Affymetrix®),

de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, os controles RNA *Poly-A* (*lys*, *phe*, *thr* e *dap*), ausentes nas células eucarióticas, foram adicionados às amostras de RNA (controle do ensaio) antes da geração do cDNA. Após o processo de amplificação, o cDNA final foi purificado, quantificado, fragmentado e marcado para hibridação em *strips*. Os *strips* permaneceram durante 20 horas a 48°C num forno de hibridação. Os *strips* foram, então, lavados e corados no sistema robótico GeneAtlas (Affymetrix®) usando o kit GeneAtlas *Hybridization, Wash and Stain* para WT Array Strips (Affymetrix®). Finalmente, os *strips* foram digitalizados usando o sistema de imagens GeneAtlas, gerando os arquivos celulares totais. Os valores de intensidade nos arquivos foram corrigidos em segundo plano, transformados em \log_2 e depois normalizados pelo software *Expression Console*, utilizando-se o algoritmo *Robust Multi-array Average* (RMA).

3.4.6 Identificação de genes diferencialmente expressos e enriquecimento funcional

A fim de serem identificados genes diferencialmente expressos, utilizou-se o software *Transcriptome Analysis Console* (Affymetrix®), empregando-se a análise estatística ANOVA (*fold change* ± 2 , FDR corrigido $p < 0,05$). Para fins de enriquecimento funcional dos perfis de expressão obtidos para cada tratamento, utilizou-se o software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA), da Qiagen.

3.4.7 Validação dos resultados do transcriptoma pelo RT-PCR

Para a validação da expressão gênica de genes selecionados em macrófagos infectados (cepas saprófita, atenuada e virulenta) e não infectados (controle), as amostras de RNA foram transcritas reversamente (1 μ g de RNA total/amostra) utilizando-se o *Moloney Murine Leukemia Virus* (MML-V) enzima (Life Technologies) e iniciadores Oligo-dT. Todos os *primers* foram projetados para abranger pelo menos um *intron*, para se evitar a repetição de regiões e semelhanças com outras regiões genômicas não específicas. A sequência do genoma do rato, disponível no *Genome Browser* da Universidade da Califórnia, em Santa Cruz (UCSC), foi empregada para o desenho de iniciadores, utilizando o programa Primer3 [29]. A PCR foi realizada pregando-se um *Stratagene QPCR*

Systems Mx3005P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) utilizando-se o "kit" *QuantiTect SYBR Green PCR* (Qiagen). Os níveis de expressão foram determinados por curvas-padrão para todos os genes em cada ensaio individual, e a expressão do gene-candidato é apresentada como uma razão para um controle endógeno não regulado (β -actina). Os *primers* usados para a validação do qPCR estão listados no quadro 1.

Quadro 1 *Primers* usados para validação dos resultados do transcriptoma pelo RT-PCR em macrófagos infectados e não infectados

GENE	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
IL-1β	TCATTGTGGCTGTGGAGAAG	AGCTCATATGGGTCCGACAG
NOS2	GACGAGACGGATAGGCAGAG	CACATGCAAGGAAGGGAAGT
TNF-α	CGAGTGACAAGCCTGTAGCC	CGAGTGACAAGCCTGTAGCC

3.4.8 Análise Estatística

A expressão diferencial de cada gene foi determinada por ANOVA com dois critérios: uma variação de *fold change* ± 2 comparando-se todos os grupos infectados ao controle não infectado e filtrada pelo valor de $p < 0,01$ e *false discovery rate* (FDR) $< 0,05$. Para análise no *software* de *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA), Qiagen, foi empregada a correção de Benjamini-Hochberg (BH) ou teste múltiplo (BH corrigido $p < 0,05$), onde rejeitou-se a hipótese nula de que os genes identificados não estão envolvidos nas respectivas funções. Os dados de PCR em tempo real foram analisados por análise de variância do modelo linear geral do SAS ($p < 0,01$). A comparação das médias foi feita pelo teste de comparações múltiplas de Duncan.

3.5 Resultados

3.5.1 Deposição dos dados genéticos

Os dados completos do microarranjo estão disponíveis no *Gene Expression Omnibus* (GEO) e são acessíveis através do número de série GEO GSE105141 [26].

3.5.2 Perfil de expressão gênica via análise do microarranjo

Foram encontrados 892 genes diferencialmente expressos em células infectadas com cepas virulentas quando comparadas ao controle (422 *up*-reguladas e 470 *down*-reguladas). No grupo infectado com leptospiros atenuadas, 848 genes (400 *up*-reguladas e 448 *down*-reguladas) foram diferencialmente expressos, enquanto 299 genes (128 *up*-reguladas e 171 *down*-reguladas) foram alterados no grupo saprófita em comparação ao controle (*fold change* ± 2 e *false discovery* (FDR) $< 0,05$) (Fig. 1A-C). O Diagrama de Venn (figura 2) apresenta 51, 104 e 22 genes específicos para o ensaio de virulenta, atenuada e saprófita em comparação com o controle, respectivamente. Pode-se observar, também, que 274 genes eram comuns a todas as células infectadas, quando comparados ao controle. Grupos infectados virulentos e atenuados compartilharam 512 genes em comum, enquanto oito genes foram compartilhados entre grupos virulentos e saprófitas e apenas um gene, entre células infectadas, com saprófitas e atenuadas.

Figura 1A Volcano Plot ilustrando genes diferencialmente regulados após 6h de infecção em macrófagos murinos com cepas virulenta, atenuada e saprófita de *Leptospira* spp. contendo 34.472 sondas para macrófagos A - *Leptospira Interrogans* Copenhageni (virulenta). O eixo x representa o \log_2 (razão) onde a relação é a proporção das médias de intensidade dos tratamentos sob o controle. O eixo y representa $-\log_{10}$ (p-valor) onde 'p \leq 0,01' é o valor associado ao teste estatístico ANOVA aplicado nos três tratamentos. Os pontos coloridos mostram os genes considerados *up*-regulados (vermelhos) ou *down*-regulados (verdes), enquanto que os genes não regulados são exibidos como pontos cinza. (n = 3 /tratamentos, FDR <0.05, fold change \pm 2).

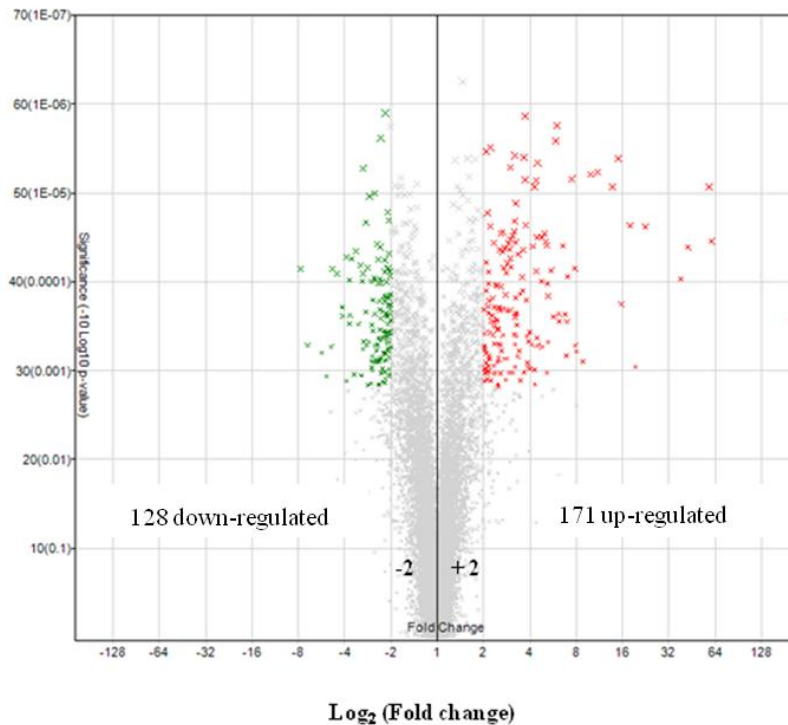


Figura 1B Volcano Plot ilustrando genes diferencialmente regulados após 6h de infecção em macrófagos murinos com cepas virulenta, atenuada e saprófita de *Leptospira* spp. contendo 34.472 sondas para macrófagos. B - *L. Interrogans* Copenhageni (atenuada). O eixo x representa o \log_2 (razão) onde a relação é a proporção das médias de intensidade dos tratamentos sob o controle. O eixo y representa $-\log_{10}$ (p-valor) onde 'p \leq 0,01' é o valor associado ao teste estatístico ANOVA aplicado nos três tratamentos. Os pontos coloridos mostram os genes considerados *up*-regulados (vermelhos) ou *down*-regulados (verdes), enquanto que os genes não regulados são exibidos como pontos cinza. (n = 3 / tratamentos, FDR <0.05, fold change \pm 2).

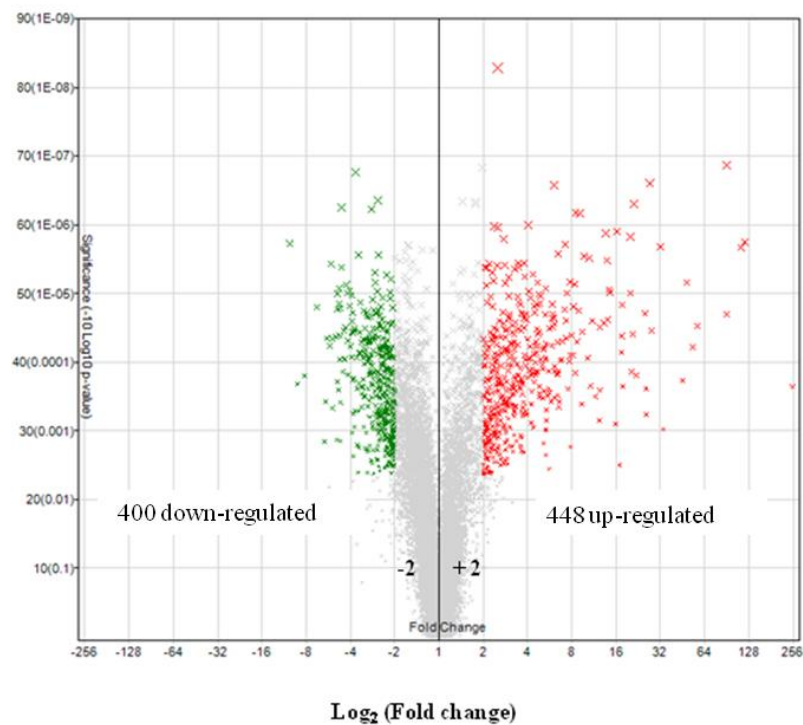


Figura 1C Volcano Plot ilustrando genes diferencialmente regulados após 6h de infecção em macrófagos murinos com cepas virulenta, atenuada e saprófita de *Leptospira* spp. contendo 34.472 sondas para macrófagos C - *Leptospira biflexa* (saprófita). O eixo x representa o \log_2 (razão) onde a relação é a proporção das médias de intensidade dos tratamentos sob o controle. O eixo y representa $-\log_{10}$ (p-valor) onde ' $p \leq 0,01$ ' é o valor associado ao teste estatístico ANOVA aplicado nos três tratamentos. Os pontos coloridos mostram os genes considerados *up*-regulados (vermelhos) ou *down*-regulados (verdes), enquanto que os genes não regulados são exibidos como pontos cinza. (n = 3 / tratamentos, FDR <0.05, fold change ± 2).

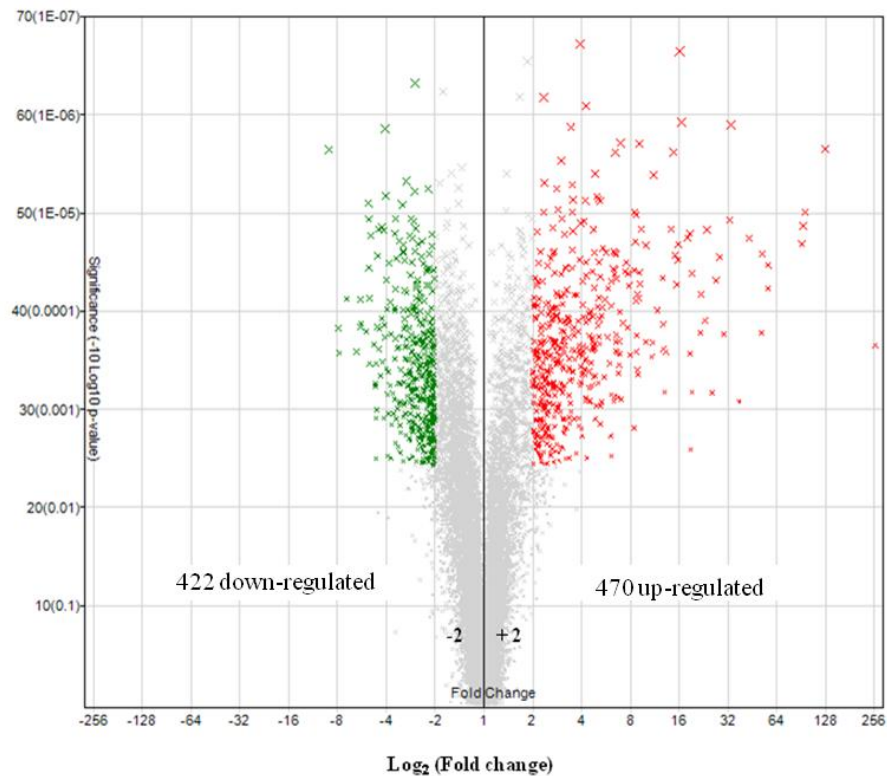
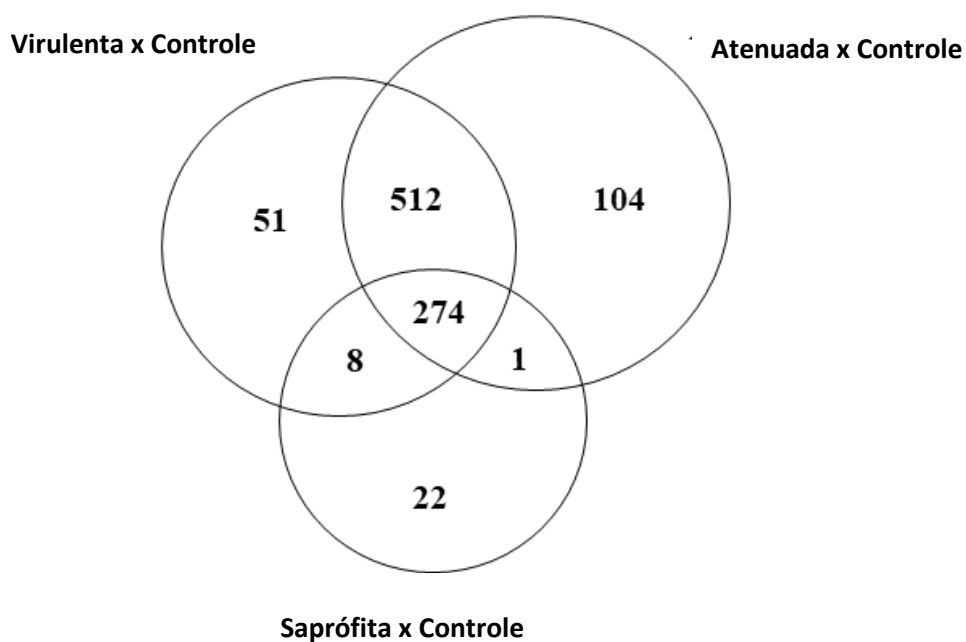


Figura 2 Diagrama de Venn dos genes diferencialmente expressos após 6h de infecção dos macrófagos murinos com cepas virulenta, atenuada e saprófita de *Leptospira* spp.

Número total de vias canônicas (n = 3 / ensaio; p-valor <0,01) nos contrastes infectados (Saprófita; Atenuada e Virulenta) vs. Controle Não-infectado.



3.5.3 Análise de vias de sinalização

Para o enriquecimento funcional dos perfis de expressão obtidos para cada tratamento, utilizou-se o *software Ingenuity Pathway Analysis (IPA)*. A análise de núcleo foi realizada para identificar as vias biológicas relevantes de cepas saprófita, atenuada e virulenta e funções com o $-\log_{10}$ BH valor de $p > 1,3$ (equivalente a um valor de $p < 0,01$) (figura 3). A maioria das vias ativas foi associada à resposta imune inata e vias inativas ao ciclo celular. Estas vias de sinalização ativadas foram relatadas, principalmente, como indutores de apoptose e investigações adicionais são necessárias para se interpretar o significado dessas vias de sinalização na infecção por leptospirose.

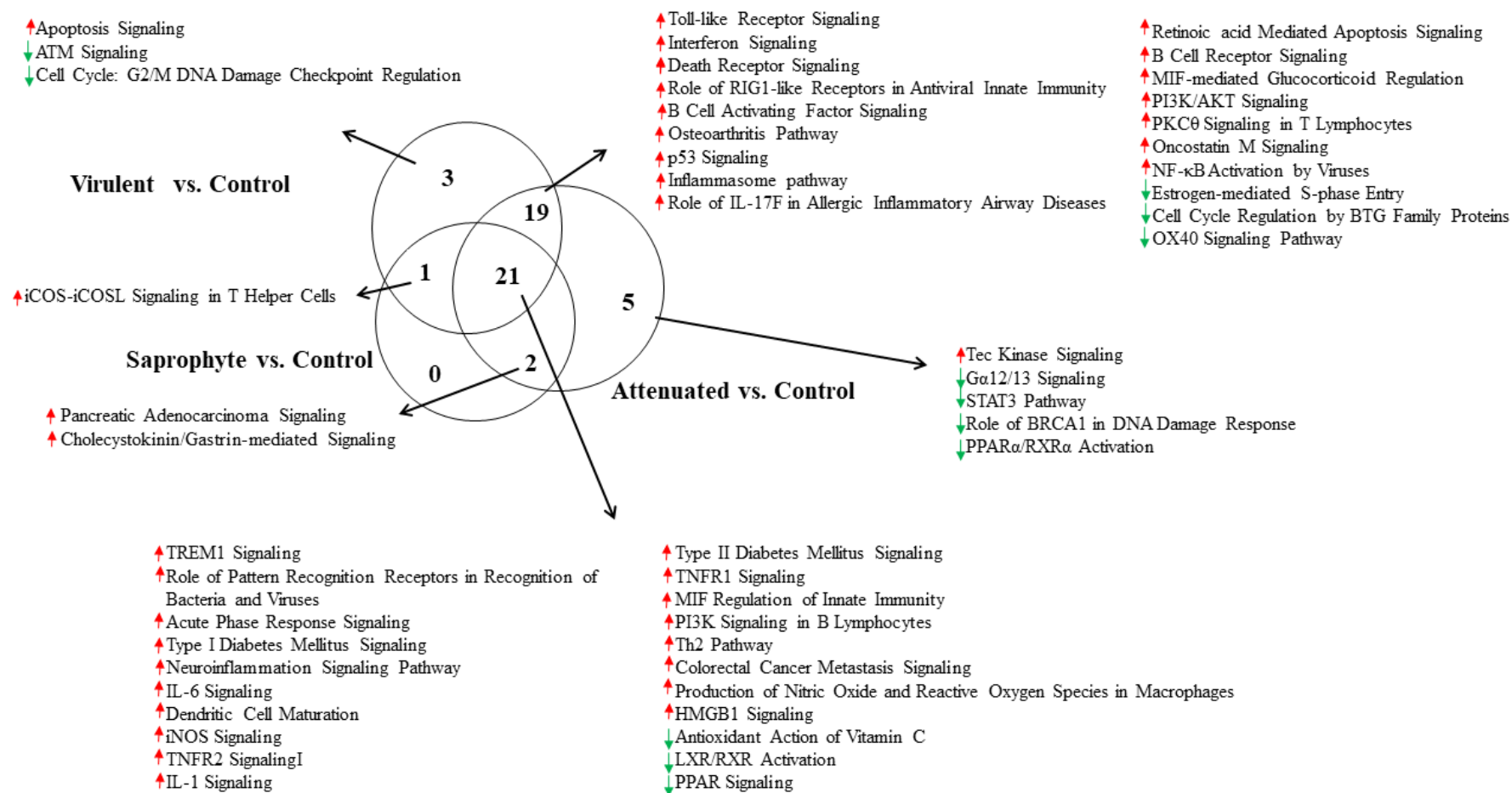


Figura 3 Diagrama de vias canônicas moduladas por macrófagos às 6h de infecção por diferentes cepas de *Leptospira* spp. Número total de vias canônicas ($n=3/\text{tratamentos}$; $p\text{-valor} < 0.01$; $\text{fold change} \pm 2$) em contraste infectados (saprófita; atenuada e virulenta) vs. controle não infectado.

3.5.4 Vias específicas moduladas pela cepa virulenta

Diversas vias foram expressas, entretanto, a *Apoptosis Signaling* (figura 4), *ATM Signaling* (figura 5) e o *Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation* (figura 6), foram exclusivamente expressos e afetados pelo tratamento com a cepa virulenta. Na *Apoptosis Signaling*, os principais genes transcritos *up*-regulados foram FAS, IKBKE, NFKB1, NFKBIA, NFKBIB, NFKNID, NFKBIE, TNF, TNFRSF1B; transcritos *down*-regulados foram BCL2, CAPN2 e PARP1. Na *ATM Signaling*, os genes transcritos *up*-regulados foram P21, CDKN1A, GADD45G, MDM2, NFKBIA e TLK2; Os transcritos *down*-regulados foram BRCA1, CBX5, CDK2, CHEK1, CHEK2, FANCD2, MDC1 e TOPBP1. Os genes *up*-regulados da *Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation pathway* foram P21, CDKN1A e MDM2; transcritos *down*-regulados foram BRCA1, CHEK1, CHEK2, PKMYT1 e WEE1.

Figura 4 Apoptosis Signaling

Os sinais vermelhos indicam genes regulados positivamente, e os sinais verdes indicam genes regulados negativamente em comparação com os grupos controle, e pertencem aos conjuntos de dados dos testes DEGs virulentos vs. controle. A intensidade da cor corresponde ao grau de *up* ou *down*-regulado (*fold-change*). Os sinais brancos representam os genes conhecidos da via sem identificação na análise transcriptômica. Os dois sinais de coloração são estatisticamente significativos.

Apoptosis Signaling : Virulent vs. Control 02-07-2017 - 2017-07-07 09:48 AM : Expr Fold Change

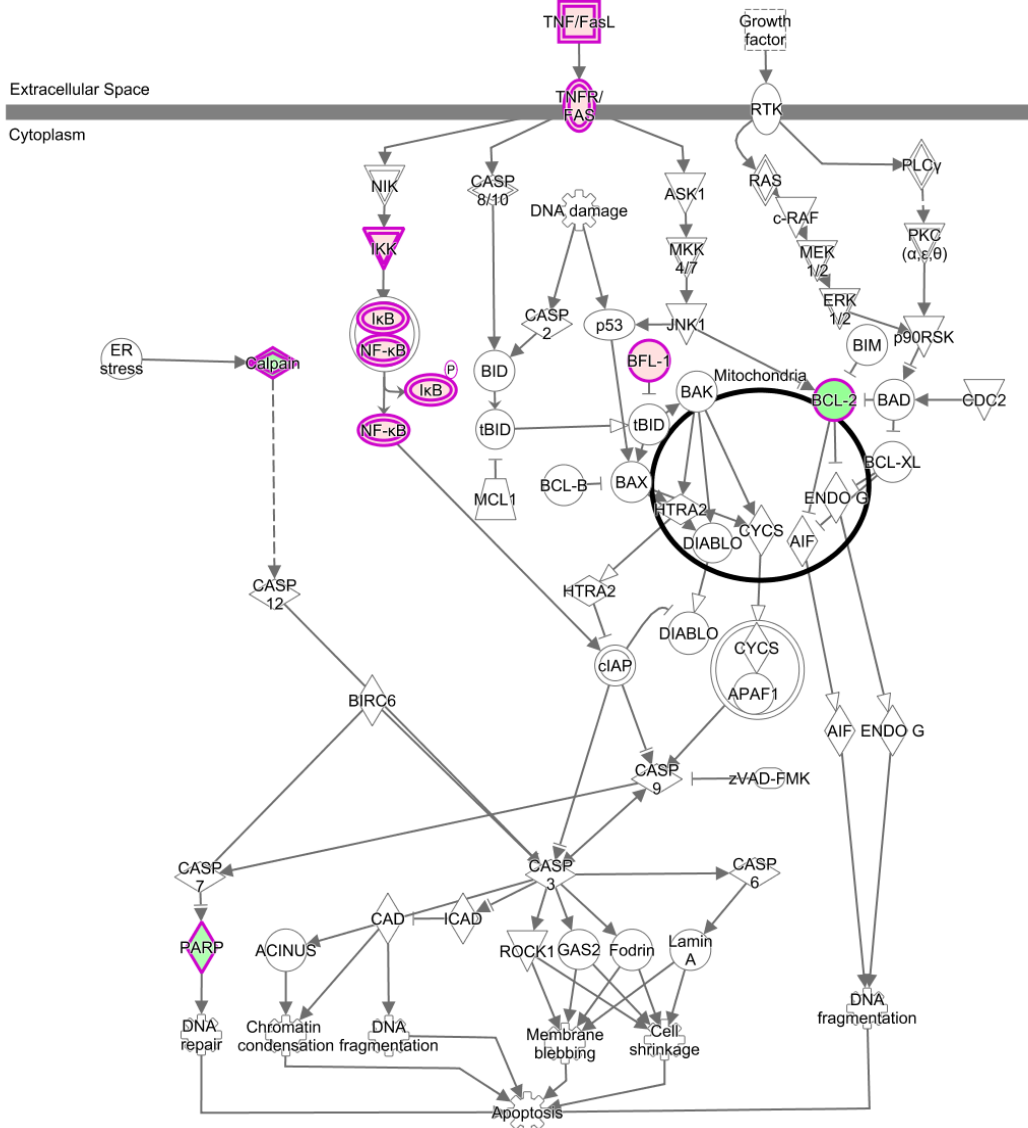


Figura 5 ATM Signaling

Os sinais vermelhos indicam genes regulados positivamente, e os sinais verdes indicam genes regulados negativamente em comparação com os grupos controle, e pertencem aos conjuntos de dados dos testes DEGs virulentos vs. controle. A intensidade da cor corresponde ao grau de *up* ou *down*-regulado (*fold-change*). Os sinais brancos representam os genes conhecidos da via sem identificação na análise transcriptômica. Os dois sinais de coloração são estatisticamente significativos.

ATM Signaling : Virulent vs. Control 02-07-2017 - 2017-07-07 09:48 AM : Expr Fold Change

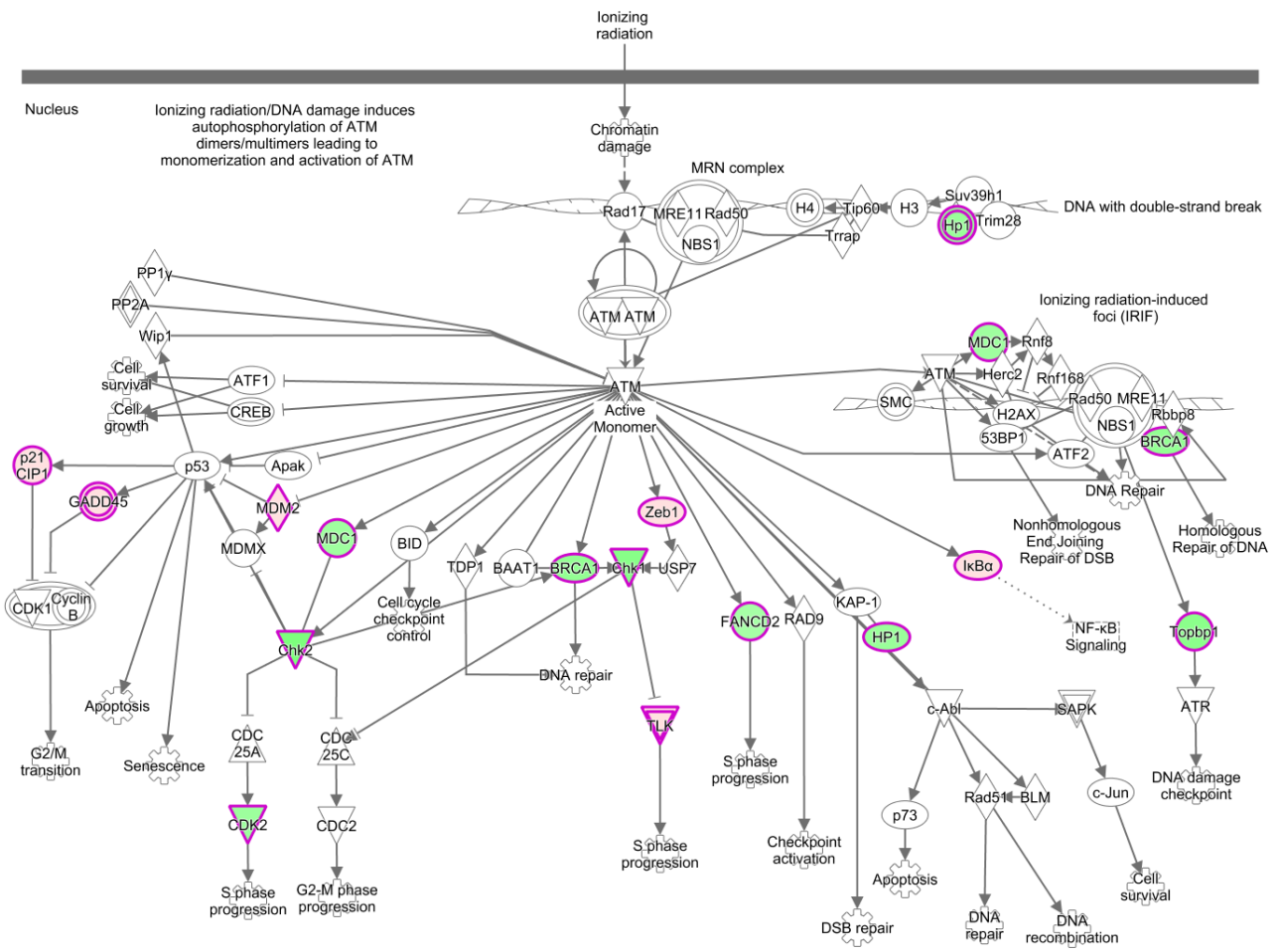
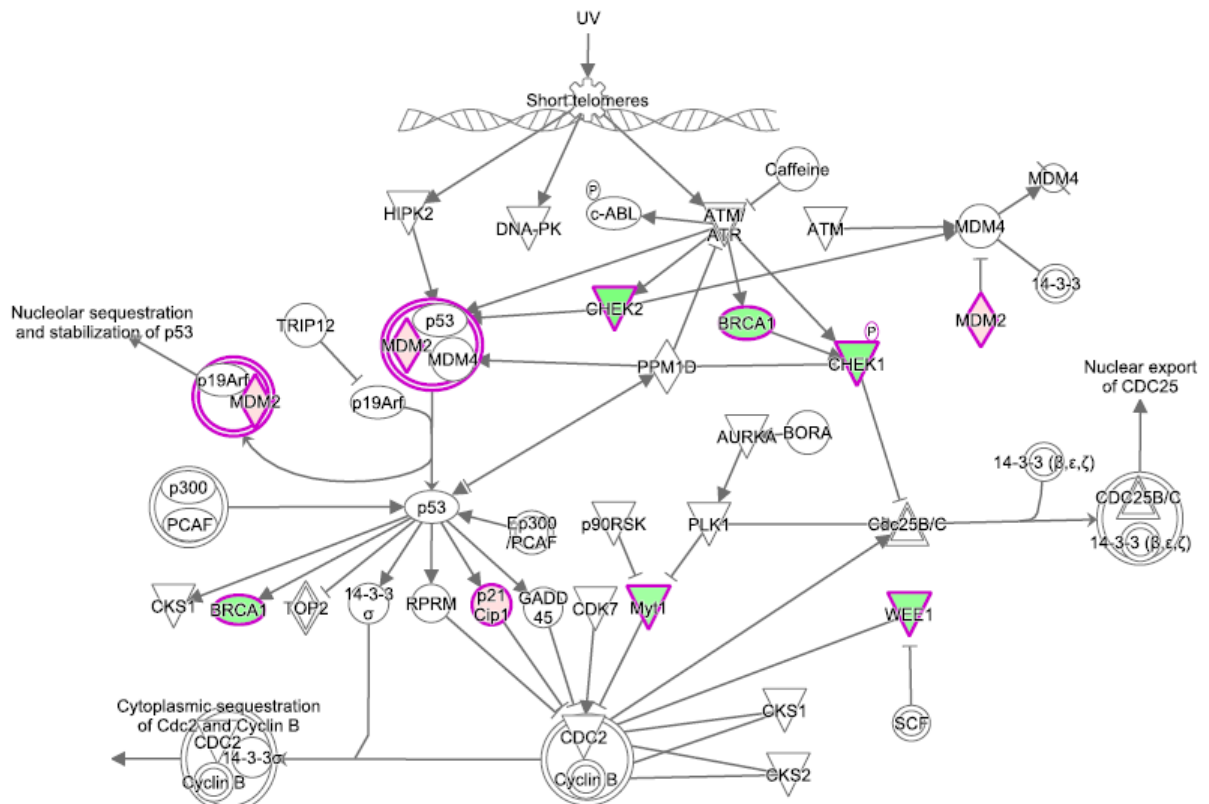


Figura 6 Cell Cycle: G2 / M DNA Damage Checkpoint Regulation

Os sinais vermelhos indicam genes regulados positivamente, e os sinais verdes indicam genes regulados negativamente em comparação com os grupos controle, e pertencem aos conjuntos de dados dos testes DEGs virulentos vs. controle. A intensidade da cor corresponde ao grau de *up* ou *down*-regulado (*fold-change*). Os sinais brancos representam os genes conhecidos da via sem identificação na análise transcriptômica. Os dois sinais de coloração são estatisticamente significativos.

Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation : Virulent vs. Control 02-07-2017 - 2017-07-07 09:48 AM : Expr Fold Change



© 2000-2018 QIAGEN. All rights reserved.

3.5.5 Validação do microarranjo por meio do RT-PCR

A Infecção com 10^7 amostras virulentas, atenuadas por *L. interrogans* sorovar Copenhageni e *L. biflexa* sorovar Patoc, induziu ao aumento significativo da expressão de TNF- α (figura 7) em macrófagos murinos ($p < 0,0001$) em relação ao controle. Sobre a expressão gênica de IL-1 β (figura 8) e NOS2 (figura 9), observou-se um perfil de expressão semelhante entre o controle e saprófita, que diferiram do perfil encontrado nas amostras atenuada e virulenta. A análise comparativa dos valores expressos para IL-1 β e NOS2 foi estatisticamente diferente entre os ensaios, em comparação às linhagens atenuada e virulenta, diferindo quando comparadas aos grupos controle e infecção com a linhagem saprófita. Diferentemente dos

resultados da expressão de TNF observados, houve diferença significativa em todos os ensaios (Fig 6A-C).

Figura 7 RT-PCR dos níveis de expressão de mRNA em macrófagos infectados com diferentes cepas de *Leptospira* em comparação com controles não infectados.

A quantidade relativa baseada na curva padrão foi utilizada para quantificar a expressão do mRNA. A análise estatística entre dois grupos (infectado vs. controle) foi realizada com ANOVA (valor de $p < 0,0001$) seguido por teste de comparações múltiplas de Duncan. A expressão relativa de TNF- α em ensaios de saprófita, atenuados em cultura e virulentos foi significativamente diferente quando comparada ao controle.

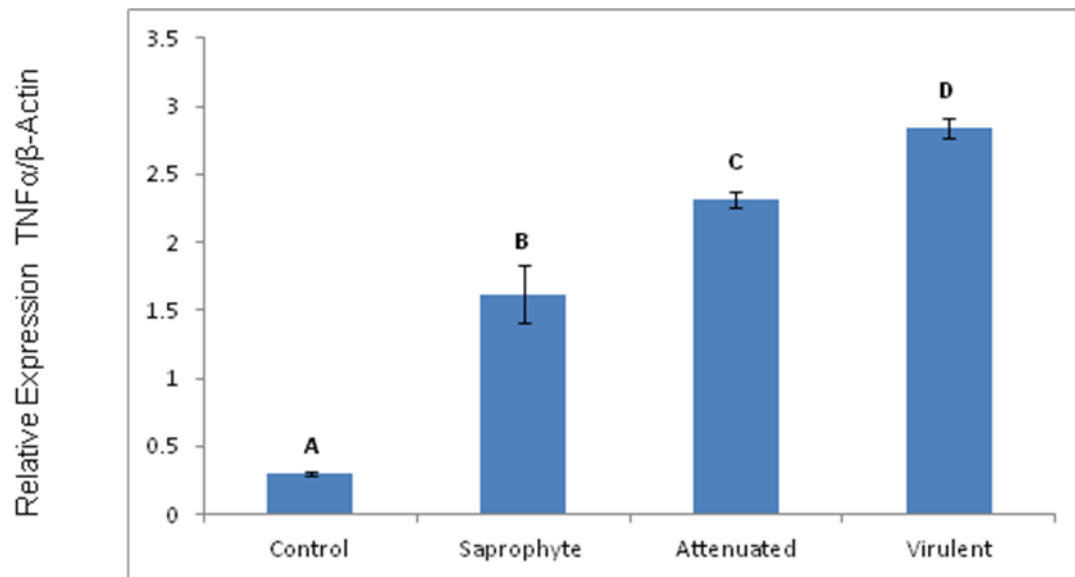


Figura 8 RT-PCR dos níveis de expressão de mRNA em macrófagos infectados com diferentes cepas de *Leptospira* em comparação com controles não infectados.

A quantidade relativa baseada na curva padrão foi utilizada para quantificar a expressão do mRNA. A análise estatística entre dois grupos (infectado vs. controle) foi realizada com ANOVA (valor de $p < 0,0001$) seguido por teste de comparações múltiplas de Duncan. Expressão relativa de IL-1 β , uma expressão similar foi observada entre saprófita vs. controle, que diferiu do perfil encontrado nas amostras atenuadas e virulentas. Diferentes letras sobscritas diferem significativamente ($p < 0,05$).

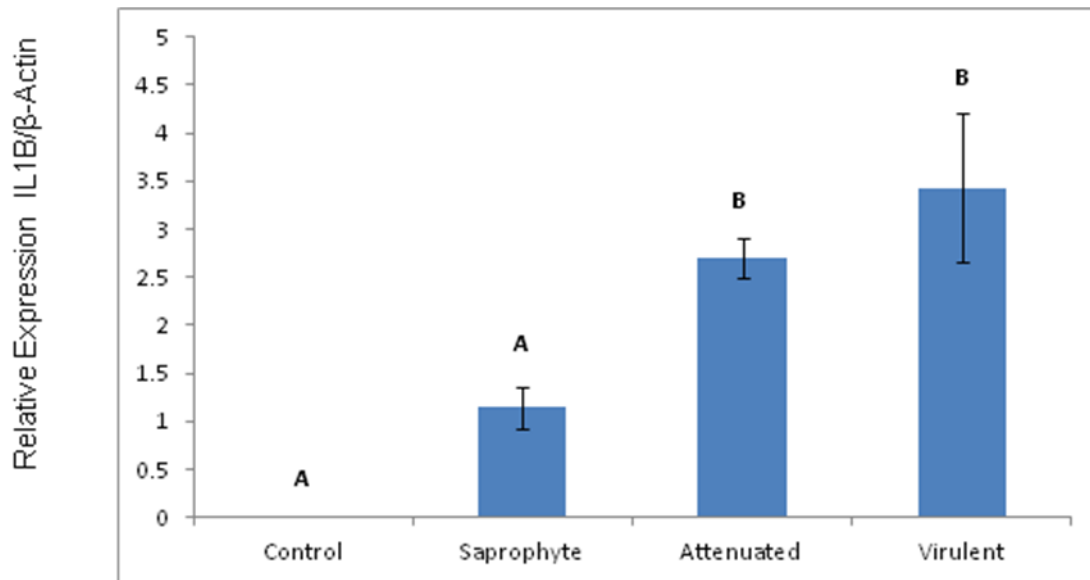
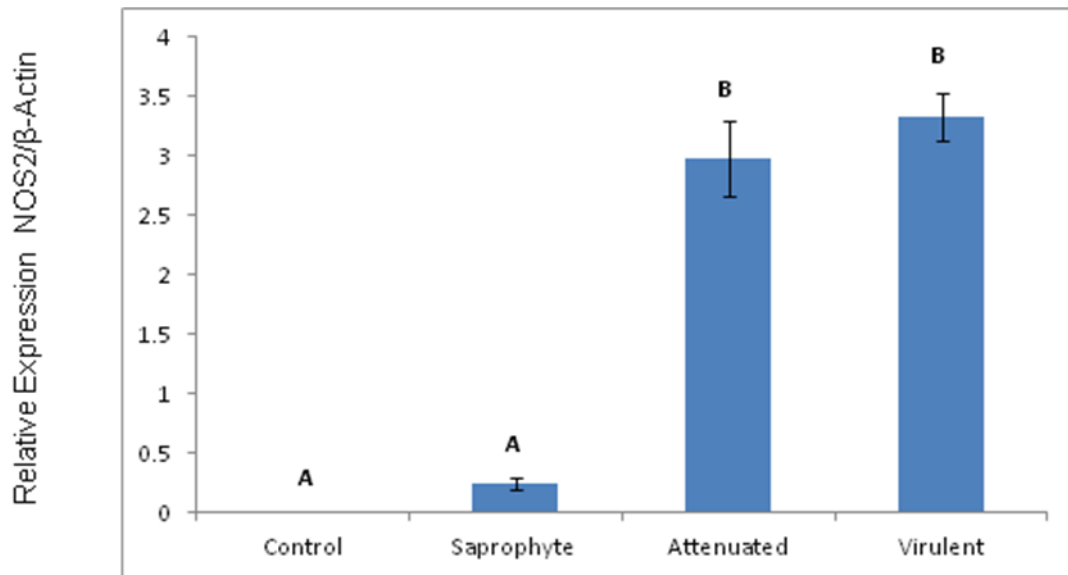


Figura 9 RT-PCR dos níveis de expressão de mRNA em macrófagos infectados com diferentes cepas de *Leptospira* em comparação com controles não infectados.

A quantidade relativa baseada na curva padrão foi utilizada para quantificar a expressão do mRNA. A análise estatística entre dois grupos (infectado vs. controle) foi realizada com ANOVA (valor de $p < 0,0001$) seguido por teste de comparações múltiplas de Duncan. A expressão relativa de NOS2 não diferiu estatisticamente entre os ensaios quando comparados com as linhagens atenuadas e virulentas, mas diferiu quando comparada aos grupos controle ($p < 0,05$).



3.6 Discussão

Uma visão abrangente dos padrões de expressão gênica após a infecção por *Leptospira* spp. virulenta, atenuada e saprófita, foram obtidas pelo software IPA, atribuindo genes diferencialmente expressos e vias canônicas específicas, funções biológicas e redes de ligação genética.

Neste estudo, analisaram-se os perfis transcriptômicos da atividade macrofágica *in vitro* frente à amostra saprófita, atenuada e virulenta de *Leptospira* spp, para melhor compreensão dos mecanismos e vias moleculares, a fim de inferirem-se possíveis causas da doença. Os resultados foram analisados em relação às hipóteses de que os mRNAs são modulados pela infecção por *Leptospira* em macrófagos, independente de seu grau de virulência. Deve-se notar que um único tipo de sinal pode levar a diferentes respostas e que diferentes vias de sinalização podem levar a uma única resposta [28].

Na figura 3, a via de sinalização do TREM-1 (*Triggering receptor expressed on myeloid cells*) foi a mais significativa para as três cepas. Os TREM são uma família de receptores recém-descobertos da superfamília de imunoglobulinas, expressos em várias células da linhagem mieloide, que desempenham papéis importantes nas respostas imunes inatas, como ativar respostas inflamatórias e contribuir para a resposta ao choque séptico em infecções mediadas por bactérias [29, 30]. A ativação direcionada do TREM-1 nesse estudo pode cooperar para ampliar a eficácia dos tratamentos existentes de respostas inflamatórias agudas e para a prevenção da sepse causada pela leptospirose.

Outras vias canônicas relacionadas ao sistema imune inato foram identificadas nas três cepas, na *Acute Phase Response Signaling Pathway*, iNOS, IL-6, IL-1, TNFR1 / TNFR2, MIF-*regulation of innate immunity* e HMGB-1. Nas amostras com atenuada e virulenta, foi identificada a sinalização dos receptores *Toll-like*, *Interferon* e *Inflamassoma*. A resposta imune inata é ativada pelo reconhecimento de patógenos usando algum tipo de padrão de receptores, como os do tipo *Toll*. A ativação desses receptores é caracterizada pela liberação massiva de mediadores pró-inflamatórios, como a produção de citocinas, quimiocinas e interferons [31].

Foram identificadas três vias de sinalização específicas (figura 4, 5 e 6) reguladas por mRNAs modulados após infecção por *L. interrogans* virulenta. *up-regulados: Apoptosis signaling; down-regulados: ATM signaling e Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation*, responsável pelo ciclo celular, reparo de DNA e apoptose. Após danos no DNA, as células devem detectar a quebra e bloquear transitoriamente a progressão do ciclo celular para obter tempo para reparo [32]. Jin et al [27] concluíram que a leptospira patogênica causa apoptose entre 3-6 horas após a infecção. Os dados do presente estudo indicam que a leptospira virulenta pode causar apoptose em 6 horas de infecção por induzir dano e degradação ao DNA, bem como por inibir as vias responsáveis pelo reparo do DNA e pelo ciclo celular, tal como pela inibição do gene BCL-2 (anti-apoptótico).

A infecção leptospiral em macrófagos induz a uma parada dependente do ciclo celular p53 / p21 [32]. Verificou-se que a sinalização da via alvo do p53 é regulada após a infecção virulenta pela modulação de mRNAs em macrófagos murinos. O fator de transcrição homotetramérica é formado por p53 que é relatado para regular diretamente 500 genes alvos, controlando, assim, uma ampla gama de processos celulares, incluindo parada do ciclo celular, senescência celular, reparo de DNA, adaptação metabólica e morte celular [33]. Os dados anteriores desenvolvidos por este grupo de pesquisa mostraram que o BCL2 (gene anti-apoptótico) é potencialmente regulado negativamente pelo mmu-miR-7667-3p após a infecção por *L. interrogans*, sugerindo que a sobrevivência celular pode estar em risco após a infecção de macrófagos [34].

As citocinas representam um grupo de proteínas que promovem a comunicação entre as células, e sua ativação é através da diferenciação, expressão do receptor e imunidade mediada por células [35]. Isso sugere que os fatores de virulência presentes, expressos ou não, durante o processo de infecção de culturas de macrófagos *in vitro* estão associados aos resultados encontrados.

Os resultados do microarranjo, identificaram alta expressão gênica para TNF- α , IL-1 β , IL-6 e iNOS. Semelhante aos resultados de Iskandar et al [36], que em soro de pacientes humanos com leptospirose, verificaram a presença de IL-6, IL-8 e IL-1 β , associando a gravidade da doença. Schulte et al. [37] concluíram que o aumento de TNF- α , IL-1 β e IL-6, pode ativar o sistema de coagulação em modelos endotoxêmicos. A alta concentração de IL-6 é um indicador de choque séptico e se correlaciona com a gravidade da leptospirose [38].

A ocorrência de apoptose, envolvendo a via da caspase, não foi evidente na análise transcriptômica, e a correlação entre os genes regulados e os três ensaios não pode ser estabelecida, diferentemente dos resultados de Xue et al. [28]. Entretanto, a inibição do gene BCL-2 e a ativação de p21 esteve presente e pode representar uma importante via de supressão no fenômeno apoptótico, até então pouco esclarecido.

Os resultados revelam uma relação quantitativa e qualitativa da expressão gênica, com a amostra virulenta, apresentando genes regulados positivamente relacionados à infecção aguda e a autofagia celular, ao contrário dos outros dois ensaios de cultura de cultura atenuada e saprófita.

Em geral, a análise da cinética da expressão gênica contra as três infecções é muito semelhante, assumindo uma maior similaridade entre virulenta e atenuada, durante quase todo o seu percurso, diferindo em alguns pontos determinados onde foram observadas expressões antagônicas, uma acima e o outro abaixo, provavelmente associado à virulência e ao caráter da infecção, atuando como biomarcadores.

3.7 Conclusão

A *Leptospira interrogans* Copenhageni (virulenta), induz a apoptose de macrófagos infectados, mediada à supressão de vias de reparo do DNA, vias de ciclo celular e ao gene BCL-2.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao Dr. Marcos Bryan Heinemann por graciosamente ceder às amostras de *Leptospira* spp., à Cilene Vudovix Táparo pela valiosa ajuda durante os experimentos.

3.8 Referências

1. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14: 296-326.
2. Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, et al. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS One.* 2008; 3:e1607.
3. Adler B. History of leptospirosis and *Leptospira*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2015; 387:1–9.
4. Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(9):e0003898
5. Bhart AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* 2003; 3:757-71.
6. Ko A, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics for an emerging zoonotic pathogen. *Nature.* 2009; 7:736-47.
7. Lau CL, Smythe LD, Craig SB, Weinstein P. Climate Change, Flooding, Urbanisation and Leptospirosis: Fuelling the fire? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010;104: 631–638.
8. Torgerson PR, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Martinez-Silveira MS, Goris MGA, et al. Global burden of Leptospirosis: estimated in terms of disability adjusted life years. *PLoS Neglec Trop Dis.* 2015; 9:10e0004122
9. Lourdault K, Matsunaga J, Haake DA. High-throughput parallel sequencing to measure fitness of *Leptospira interrogans* transposon insertion mutants during acute infection. *PLoS neglec trop dis.* 2016;10(11):e0005117.
10. Coker R, Rushton J, Maurier-Jack S, Karimuribo E, Lutumba P, Kambarage D, et al. Towards a conceptual framework to support one health research for policy on emerging zoonoses. *Lancet Infect Dis.* 2011; 11(4): 326-31.
11. Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 2009; 140: 287-96.
12. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Biofilme formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol.* 2005; 13:7-10.

13. Iraola G, Spangenberg L, Lopes Bastos B, et al. Transcriptome Sequencing Reveals Wide Expression Reprogramming of Basal and Unknown Genes in *Leptospira biflexa* Biofilms. McMahon K, ed. *mSphere*. 2016;1(2):e00042-16.
14. Adler B, Faine S. Susceptibility of mice treated with cyclophosphamide to lethal infection with *Leptospira interrogans* serovar pomona. *Infect Immun*. 1976;14:703–708.
15. Murray GL, Srikrum A, Henry R, Hartskeerl RA, Sermswan RW, Adler B. Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. *Mol Microbiol*. 2010;78(3):701–9.
16. Murray GL, Ellis KM, Lo M, Adler B. *Leptospira interrogans* requires a functional heme oxygenase to scavenge iron from hemoglobin. *Microbes Infect*. 2008;10:791-797.
17. Ristow P, Bourhy P, da Cruz McBride FW, Figueira CP, Huerre M, Ave P, et al. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLoS Pathog*. 2007; 3(7):e97.
18. Davis JM, Haake DA, Ramakrishnan L. *Leptospira interrogans* stably infects zebrafish embryos, altering phagocyte behavior and homing to specific tissues. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009; 3: e463.
19. Gordon S. Phagocytosis: an immunobiologic process. *Immunity*. 2016; 44(3):463–75.
20. Kaufmann SH, Dorhoi A. Molecular determinants in phagocyte-bacteria interactions. *Immunity*. 2016; 44(3):476–91.
21. Li S, Ojcius DM, Liao S, Li L, Xue F, et al. Replication or death: distinct fates of pathogenic *Leptospira* strain Lai within macrophages of human or mouse origin. *Innate Immun*. 2010;16:80-92.
22. Nahori MA, Fournie-Amazouz E, Que-Gewirth NS, Balloy V, Chignard M, et al. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. *J Immunol*. 2005;175: 6022–6031.
23. Vernel-Pauillac F, Merien F. Proinflammatory and immunomodulatory cytokine mRNA time course profiles in hamsters infected with a virulent variant of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun*. 2006; 74:4172-4179.
24. Marinho M, Oliveira-Junior IS, Monteiro CMR, Perri SH, Salomão R. Pulmonary disease in hamster infected with *Leptospira interrogans*: histopathologic findings and cytokine mRNA expressions. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80:832-36.

25. Patarakul K, Lo M, Adler B. Global transcriptomic response of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni upon exposure to serum. *BMC Microbiol.* 2010;10:(31).
26. de Araújo Junior EC, Garcia LE, Melo LM, Bragato JP, de Lima VMF, Peiró JR, et al. Transcriptome datasets of macrophages infected with different strains of *Leptospira* spp. *Data in Brief.* 2018;16:1044-1050.
27. Jin D, Ojcius DM, Sun D, Donh H, Luo Y, May Y, et al. *Leptospira interrogans* induces apoptosis in macrophages via caspase-8 and caspase-3-dependent pathways. *Infect and Immunity.* 2009; 77(2):799-809.
28. Xue F, Zhao X, Yang Y, Zhao J, Yang Y, Cao Y, et al. Responses of Murine and Human Macrophages to Leptospiral Infection: A Study Using Comparative Array Analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(10): e2477.
29. Nathan C, Ding A. TREM-1: a new regulator of innate immunity in sepsis syndrome. *Nature.* 2001;5:7:530-32.
30. Colonna M, Facchetti F. TREM-1 (Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells): a new player in acute inflammatory responses. *The J. of Infect. Dis.* 2003; 187 (Suppl 2): 5397-401
31. Bouchon A, Fachetti F, Weigand MA, Colonna M. TREM-1 amplifies inflammations and is a crucial mediator of septic shock. *Nature.* 2001; 410. 1103-1107.
32. Hu W, Ge Y, Ojcius DM, Sun D, Dong H, Yang XF, et al. P53 Signalling Controls Cell Cycle Arrest And Caspase-Independent Apoptosis In Macrophages Infected With Pathogenic *Leptospira* Species. *Cell Microbiol.* 2013;15(10):1624–59.
33. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasser A. How does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ.* 2018;25(1):104-113.
34. Garcia LE, de Araújo Junior EC, Melo LM, Bragato JP, Peiró JR, et al. Characterization of the microtranscriptome of macrophages infected with virulent, attenuated and saprophyte strains of *Leptospira* spp. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018;12(7):e0006621.
35. Van der Meide PH, Schellekens H. Cytokines and the immune response. *Biotherapy.* 1996;8(3-4):243-9.
36. Iskandar BJ, William T, Daisy VJ. Cytokine profile of patients with leptospirosis in Sabah, Malaysia. *Med J Malaysia,* 2018;73(2):106-109.

37. Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic target-an updated view. *Mediators Inflamm.* 2013:165974.
38. Reis EA, Ribeiro GS, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Montgomery RR, et al. Cytokine response signatures in disease progression and development of severe clinical outcomes for leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(9):e2457.

ANEXO

Datasets publicado

Data in Brief 16 (2018) 1044–1050



Contents lists available at ScienceDirect

Data in Brief

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dib

Data Article

Transcriptome datasets of macrophages infected with different strains of *Leptospira* spp

Erivelto Corrêa de Araújo Junior^a, Leandro Encarnação Garcia^a,
 Larissa Martins Melo^b, Jaqueline Poletto Bragato^b,
 Valéria Marçal Félix de Lima^b, Juliana Regina Peiró^b,
 Flavia Lombardi Lopes^{a,*}, Márcia Marinho^a

^a Department of Support, Production and Animal Health, São Paulo State University (Unesp), School of Veterinary Medicine, Araçatuba, SP, Brazil

^b Department of Clinic, Surgery and Animal Reproduction, São Paulo State University (Unesp), School of Veterinary Medicine, Araçatuba, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 December 2017

Received in revised form

15 December 2017

Accepted 19 December 2017

Available online 21 December 2017

Keywords:

Microarray

ABSTRACT

The datasets reported herein provide information about microarray experiment of macrophage cell line J774A.1 infected with three different strains of *Leptospira* spp. Transcriptomic profiles were generated using Affymetrix® Mouse Gene 2.1 ST Array Strip. Data was normalized and statically process, p -value < 0.01 , FDR < 0.05 and \log_2 fold change (± 2). The microarray raw data are available in Gene Expression Omnibus (GEO) under accession number GSE105141.