

Antonio Ferreira Mendes de Sousa

Estudo da inibição do sistema complemento humano pela
saliva de anofelinos (Diptera; Anophelinae) neotropicais

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

Dezembro, 2015

Antonio Ferreira Mendes de Sousa

Estudo da inibição do sistema complemento humano pela
saliva de anofelinos (Diptera; Anophelinae) neotropicais

*Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Parasitologia do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais
como requisito para obtenção do grau
de Doutor em Parasitologia*

Área de concentração: Entomologia

Orientador: Prof. Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo

Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos

Departamento de Parasitologia - UFMG

Belo Horizonte – 2015

Aos meus pais, Antonio Ferreira de Sousa
Sobrinho e Francisca Mendes de Sousa, minha
maior inspiração

Agradecimentos

Agradeço ao meu pai e à minha mãe, Antonio Ferreira de Sousa Sobrinho e Francisca Mendes de Sousa, pelo incentivo constante a alcançar meus objetivos, pelo apoio incondicional e pelo amor que conforta e fortalece. Amo vocês.

Ao meu orientador, Seu Nelder (Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos – UFMG), pela confiança, ensinamentos e oportunidades.

Ao Dr. Jesus Valenzuela (Laboratory of Malaria and Vector Research – NIH), por me receber em seu laboratório para realização do doutorado sanduíche.

Ao Dr. John Andersen (Laboratory of Malaria and Vector Research – NIH), pela ajuda direta na realização dos experimentos com as proteínas recombinantes.

Ao Dr. Luciano Moreira e à Msc. Fernanda Rezende (Laboratório de Malária – CPqRR/Fiocruz), pela gentileza em nos ceder os mosquitos da espécie *Anopheles aquasalis*.

Ao Dr. Vladimir Fazito do Vale (Laboratório de Simulídeos e Oncocercose, IOC/Fiocruz), pela amizade e pela ajuda direta, críticas e sugestões relacionadas aos experimentos realizados neste trabalho, sempre com muita paciência e boa vontade.

Ao Daniel Costa Queiroz (Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos – UFMG), o qual tive o prazer de orientar como aluno de iniciação científica, pela ajuda na realização dos experimentos no LFIH e pela amizade.

À Dra. Héli da Andrade e à Dra. Simone Pires (Laboratório de Leishmanioses – UFMG), pela realização da análise de espectrometria de massa no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Ao Dr. José Marcos Ribeiro (Laboratory of Malaria and Vector Research – NIH), pela ajuda na análise das sequências dos genes de *Anopheles albimanus*.

Ao Andre Laughinhouse e ao Kevin Lee, pela criação dos mosquitos utilizados nos experimentos realizados no NIH.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos, especialmente ao César Oliveira, por toda ajuda dentro e fora do laboratório.

Aos amigos do Laboratory of Malaria and Vector Research, especialmente ao Dr. Fabiano Oliveira, pelo auxílio e bom humor no laboratório.

À Sumara e Sibele, secretárias da Pós-graduação em Parasitologia, pela amabilidade e por estarem sempre dispostas a ajudar.

À Luciana, Geni e Zuleika, secretárias da curso de Parasitologia para graduação, pela ajuda durante meu período como bolsista REUNI.

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia da UFMG, nas pessoas dos seus coordenadores, Prof. Ricardo Toshio Fujiwara e Prof. Marcos Horácio Pereira, pelos ensinamentos de qualidade, essenciais à minha formação como Parasitologista.

Às instituições de fomento que contribuíram para a realização deste trabalho, CAPES, CNPq e FAPEMIG, e ao programa Ciências sem Fronteiras, através do qual realizei o estágio de Doutorado Sanduíche no National Institutes of Health (NIH), Estados Unidos.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram a concluir este trabalho, deixo o meu “Muito Obrigado!”.

Sumário

Lista de abreviações	i
Lista de figuras	ii
Lista de tabelas	iii
Resumo	iv
Abstract	v
1. Introdução	15
1.1 Malária e seus vetores	15
1.2 A saliva de <i>Anopheles</i> sp.	20
1.3 O sistema complemento	24
1.4 Inibição do sistema complemento por artrópodes hematófagos	26
2. Justificativa	29
3. Objetivos	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4. Material e Métodos	32
4.1 Aprovação em comitê de ética	32
4.2 Criação dos mosquitos e obtenção de extrato de glândulas salivares	32
4.3 Ensaio hemolíticos	33
4.4 Ensaio de ativação da via das lectinas	35
4.5 Ensaio de deposição de componentes da via alternativa	36
4.6 Western blot para detecção de Fator B e C3a	38
4.7 Purificação e identificação do inibidor salivar de <i>A. albimanus</i>	39
4.8 RT-PCR para detecção do gene da proteína gSG7 em extrato de glândulas salivares de <i>A. albimanus</i>	41
4.9 Clonagem, expressão e purificação das proteínas gSG7 e gSG7-2 de <i>A. albimanus</i> e gSG7 de <i>A. darlingi</i>	42
4.10 Identificação do inibidor salivar do complemento de <i>A. aquasalis</i>	44
4.11 Western blot e ensaio hemolítico com anticorpo anti-gSG7 de <i>A. albimanus</i>	45
4.12 ELISA para detectar ligação de componentes do complemento aos inibidores salivares	47

4.13 Ensaio de ressonância plasmônica de superfície	48
4.14 Análise estatística	48
5. Resultados	49
5.1 Quantificação de proteínas dos EGS das espécies de <i>Anopheles</i> estudadas	49
5.2 Ensaio hemolíticos	49
5.2.1 Via alternativa	49
5.2.2 Via clássica	51
5.3 Ensaio de ativação da via das lectinas	52
5.4 Ensaio de deposição de componentes da via alternativa	52
5.5 Western blot para detecção de Fator B e C3a	54
5.6 Western blot com C3b, Fator B e Fator D purificados	56
5.7 Purificação do inibidor salivar de <i>A. albimanus</i>	56
5.8 RT-PCR para detecção do gene da proteína gSG7 em extrato de glândulas salivares de <i>A. albimanus</i>	65
5.9 Expressão e purificação das proteínas gSG7 e gSG7-2 de <i>A. albimanus</i> e gSG7 de <i>A. darlingi</i>	66
5.10 Identificação do inibidor salivar de <i>A. aquasalis</i>	74
5.11 Western blot e ensaio hemolítico com IgG anti-gSG7 de <i>A. albimanus</i>	75
5.12 ELISA para detectar ligação de componentes do complemento aos inibidores salivares	77
5.13 Ensaio de ressonância plasmônica de superfície	79
6. Discussão	80
7. Conclusões	90
8. Referências bibliográficas	91

Lista de abreviações

AAPP – proteína anti-plaquetária de *Anopheles* (do inglês, *Anopheles anti-platelet protein*)
ADP – adenosina difosfato
AMP – adenosina monofosfato
ATP – adenosina trifosfato
BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*
BSA – albumina de soro bovino (do inglês, *bovine serum albumine*)
CAM – complexo de ataque à membrana
cDNA – DNA complementar
DTT – ditionitrito
EDTA – ácido etilenodiamino tetraacético
EGS – extrato de glândulas salivares
EGTA – ácido etilenoglicol tetraacético
HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *high performance liquid chromatography*)
IL-10 – interleucina 10
IPTG – isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo
ISAC – *Ixodes scapularis* anti-complement
ka – constante de associação
kd – constante de dissociação
kD – constante de afinidade
MASP – serino-protease associada à MBL (do inglês, *MBL-associated serine protease*)
MBL – lectina ligante de manana (do inglês, *mannan binding lectin*)
MW – peso molecular (do inglês, *molecular weight*)
NCBI – Centro Nacional para Informação Biotecnológica (do inglês, *National Center for Biotechnology Information*)
NIH – Instituto Nacional de Saúde (do inglês, *National Institutes of Health*)
OPD – ortofenilenodiamina
PBS – solução salina fosfatada (do inglês, *phosphate-buffered saline*)
PCR – reação em cadeia de polimerase (do inglês, *polymerase chain reaction*)
RNAi – RNA de interferência
SDS-PAGE – gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (do inglês, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)
SHN – Soro humano normal
Tw – Tween
UV – ultravioleta

Lista de Figuras

Figura 1: Distribuição atual dos casos de malária no mundo.	15
Figura 2: Ciclo biológico de <i>Anopheles</i> sp..	19
Figura 3: Distribuição global dos principais vetores de malária.	20
Figura 4: Glândula salivar de fêmea de <i>Anopheles aquasalis</i> .	21
Figura 5: Esquema representativo das três vias de ativação do sistema complemento.	25
Figura 6: Sequências dos genes sintéticos utilizados para clonagem e expressão de proteínas recombinantes de <i>A. albimanus</i> e <i>A. darlingi</i> .	43
Figura 7: Ação do extrato de glândulas salivares de seis espécies de <i>Anopheles</i> sobre a via alternativa do sistema complemento humano.	50
Figura 8: Efeito de tratamentos desnaturantes sobre a atividade inibidora da via alternativa do EGS de <i>A. albimanus</i> .	51
Figura 9: Ação do EGS de <i>A. albimanus</i> , <i>A. aquasalis</i> e <i>A. gambiae</i> sobre a via clássica do sistema complemento.	52
Figura 10: Efeito do extrato de glândulas salivares de <i>A. albimanus</i> sobre a via das lectinas.	52
Figura 11: Ação do EGS de <i>A. aquasalis</i> e <i>A. albimanus</i> sobre a deposição de componentes da via alternativa do sistema complemento.	53
Figura 12: Efeito do EGS de <i>A. aquasalis</i> sobre componentes da via alternativa previamente depositados em superfície ativadora.	54
Figura 13: Ação do EGS de <i>A. aquasalis</i> e <i>A. albimanus</i> na ativação do Fator B.	55
Figura 14: Ação do EGS de <i>A. aquasalis</i> e <i>A. albimanus</i> na ativação do componente C3.	55
Figura 15: Ação do EGS de <i>A. albimanus</i> na formação da C3-convertase da via alternativa.	56
Figura 16: Purificação do inibidor da via alternativa presente no EGS de <i>A. albimanus</i> .	57
Figura 17: SDS-PAGE com frações da cromatografia de fase reversa do EGS de <i>A. albimanus</i> .	58

Figura 18: Quantificação das proteínas salivares de <i>A. albimanus</i> identificadas por espectrometria de massa da fração purificada 1H12.	59
Figura 19: Sequência do gene AALB001854 de <i>A. albimanus</i> disponível no VectorBase.	61
Figura 20: Sequências dos dois genes anotados como gene AALB001854 de <i>A. albimanus</i> .	62
Figura 21: Sequência da proteína salivar gSG7 de <i>A. albimanus</i> .	63
Figura 22: Sequência da proteína salivar gSG7-2 de <i>A. albimanus</i> .	63
Figura 23: Alinhamento das sequências dos peptídeos de proteína salivar de <i>A. albimanus</i> com a sequência da proteína gSG7 obtida no VectorBase.	64
Figura 24: Sequência da proteína salivar gSG7 de <i>A. darlingi</i> .	64
Figura 25: Comparação das sequências das proteínas gSG7 de diferentes espécies de <i>Anopheles</i> .	65
Figura 26: Eletroforese dos produtos da reação de PCR para amplificação do gene da proteína gSG7 de <i>A. albimanus</i> .	66
Figura 27: Cromatografia de gel filtração para purificação das proteínas recombinantes.	67
Figura 28: SDS-PAGE com as proteínas recombinantes após o último passo de purificação.	67
Figura 29: Ação das proteínas recombinantes gSG7 e gSG7-2 de <i>A. albimanus</i> e gSG7 de <i>A. darlingi</i> sobre a via alternativa do sistema complemento.	68
Figura 30: Ação das proteínas recombinantes gSG7 e gSG7-2 de <i>A. albimanus</i> e gSG7 de <i>A. darlingi</i> sobre a via clássica do sistema complemento.	68
Figura 31: Efeito das proteínas gSG7 e gSG7-2 de <i>A. albimanus</i> sobre a via das lectinas.	69
Figura 32: Efeito das proteínas gSG7 e gSG7-2 de <i>A. albimanus</i> na deposição dos componentes C3, Fator B, properdina e C9 em placas cobertas com agarose.	70
Figura 33: Efeito da proteína gSG7 de <i>A. darlingi</i> sobre a deposição dos componentes C3, Fator B, properdina e C9 em placas cobertas com agarose.	71
Figura 34: Efeito da gSG7 de <i>A. albimanus</i> e Fator H sobre componentes da via alternativa previamente ligados à superfície ativadora.	72

Figura 35: Efeito das proteínas gSG7 e gSG7-2 de <i>A. albimanus</i> na ativação dos componentes Fator B e C3.	73
Figura 36: Ação das proteínas recombinantes gSG7 e gSG7-2 de <i>A. albimanus</i> na formação da C3-convertase da via alternativa.	73
Figura 37: Eletroforese das proteínas gSG7 recombinantes de <i>A. albimanus</i> e <i>A. darlingi</i> e do EGS de <i>A. aquasalis</i> em gel de poliacrilamida corado com prata.	74
Figura 38: Alinhamento da sequência de peptídeo gerado de proteína salivar de <i>A. aquasalis</i> com a sequência da proteína gSG7 de <i>A. darlingi</i> .	75
Figura 39: Western blot com anticorpo anti-gSG7 de <i>A. albimanus</i> .	75
Figura 40: Western blot com IgG anti-gSG7 de <i>A. albimanus</i> .	76
Figura 41: Efeito do IgG anti-gSG7 sobre a atividade anti-complemento do EGS e da proteína gSG7 recombinante.	77
Figura 42: Ligação de componentes do complemento à gSG7 de <i>A. albimanus</i> .	78
Figura 43: Ligação de componentes do complemento ao EGS de <i>A. aquasalis</i> .	78
Figura 44: Ensaio de ressonância plasmônica de superfície com gSG7 e gSG7-2 de <i>A. albimanus</i> .	79

Lista de Quadros

Quadro 1: Ciclos de temperatura utilizados nas reações de PCR para amplificação do gene da proteína gSG7 de *A. albimanus*. 42

Quadro 2: Proteínas salivares de *A. albimanus* identificadas na fração 1H12 submetida a espectrometria de massa. 59

Resumo

Mosquitos pertencentes ao gênero *Anopheles* são os transmissores naturais de malária no mundo. A transmissão ocorre durante a hematofagia, quando esses insetos inoculam na pele do hospedeiro formas infectantes do *Plasmodium* sp. juntamente com o conteúdo de suas glândulas salivares. A saliva desses mosquitos contém moléculas importantes para o sucesso da hematofagia, como vasodilatadores e anticoagulantes. Entretanto, há pouca informação existente sobre a interação de componentes salivares de anofelinos com o sistema imune do hospedeiro vertebrado. Este trabalho teve como objetivo demonstrar e caracterizar a atividade inibidora do sistema complemento na saliva de anofelinos, principalmente *A. albimanus* e *A. aquasalis*, importantes vetores de malária na América Latina. Para isso, ensaios hemolíticos, ensaios de deposição e Western blots para detectar ativação de componentes do complemento foram realizados na presença de extrato de glândulas salivares dos mosquitos. Os resultados desses experimentos mostraram inibição significativa e dose-dependente da via alternativa do sistema complemento pelo extrato de glândulas salivares das duas espécies citadas. O inibidor salivar de *A. albimanus* foi purificado em HPLC e identificado por espectrometria de massa como sendo a proteína gSG7. O gene dessa proteína foi então clonado e expresso em bactérias. A proteína recombinante apresentou atividade tão potente quanto o extrato de glândula salivar de *A. albimanus*. Anticorpos produzidos contra a recombinante foram capazes de reconhecer tanto a recombinante como a proteína nativa presente no extrato de glândulas, além de bloquear a atividade das duas formas da proteína. Através de ensaio de ELISA e de ressonância plasmônica de superfície, demonstramos que a gSG7 liga-se em properdina, um regulador positivo da via alternativa do complemento, bloqueando a ação estabilizadora dessa via. Esta é a primeira descrição de um inibidor do complemento na saliva de mosquitos, e apresenta potencial importância no processo hematofágico e na transmissão do *Plasmodium* sp..

Palavras-chave: *Anopheles albimanus*, *Anopheles aquasalis*, glândulas salivares, sistema complemento, gSG7, inibição do complemento.

Abstract

Anopheles mosquitoes are the natural vectors of malaria throughout the world. The transmission occurs during bloodmeal, when the insects inject infective forms of *Plasmodium* together with the contents of their salivary glands. Their saliva presents active molecules important for hematophagy, such as vasodilators, anticoagulant and platelet inhibitors. However, little is known about the interactions of *Anopheles*' salivary components with the host's immune system. The aim of this work was to demonstrate and to characterize anti-complement activity in the saliva of neotropical anophelines, specially *A. albimanus* and *A. aquasalis*, important malaria vectors in Latin America. Hemolytic assays, ELISA assays and Western blots for detecting activation of complement components were performed in the presence and absence of salivary glands extracts of both mosquito species. The results showed significant and dose-dependent inhibition of the alternative pathway by the saliva of the two species. The salivary inhibitor of *A. albimanus* was then purified using HPLC and identified by mass spectrometry, as being a gSG7 protein. The gene of that protein was cloned and expressed in *E. coli* bacteria. The recombinant protein presented anti-complement activity as potent as the salivary glands extracts. Anti-recombinant gSG7 IgG antibodies produced in rabbits were able to detect both the recombinant and the native protein in the glands extract. The antibodies also blocked gSG7 activity in the hemolytic assays. Through ELISA and surface plasmon resonance, we showed that gSG7 binds directly to properdin, a positive regulator of the alternative pathway of the complement system. This is the first report of an anti-complement molecule in mosquito saliva, which has potential role in blood-feeding and parasite transmission by the vector.

Key-words: *Anopheles albimanus*, *Anopheles aquasalis*, salivary glands, complement system, gSG7, complement inhibition.

1. Introdução

1.1 Malária e seus vetores

A malária humana é uma das principais doenças parasitárias no mundo, provocada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida por mosquitos do gênero *Anopheles*. A doença é responsável por elevada mortalidade e morbidade em países tropicais e subtropicais, sendo atualmente endêmica em 97 países, acometendo anualmente cerca de 200 milhões de pessoas e com mais de 45% da população mundial sob o risco de infecção (WHO, 2014). Estima-se que cerca de 580.000 pessoas morreram de malária em 2013, principalmente crianças com menos de 5 anos de idade residentes no continente africano (Figura 1) (WHO, 2014).

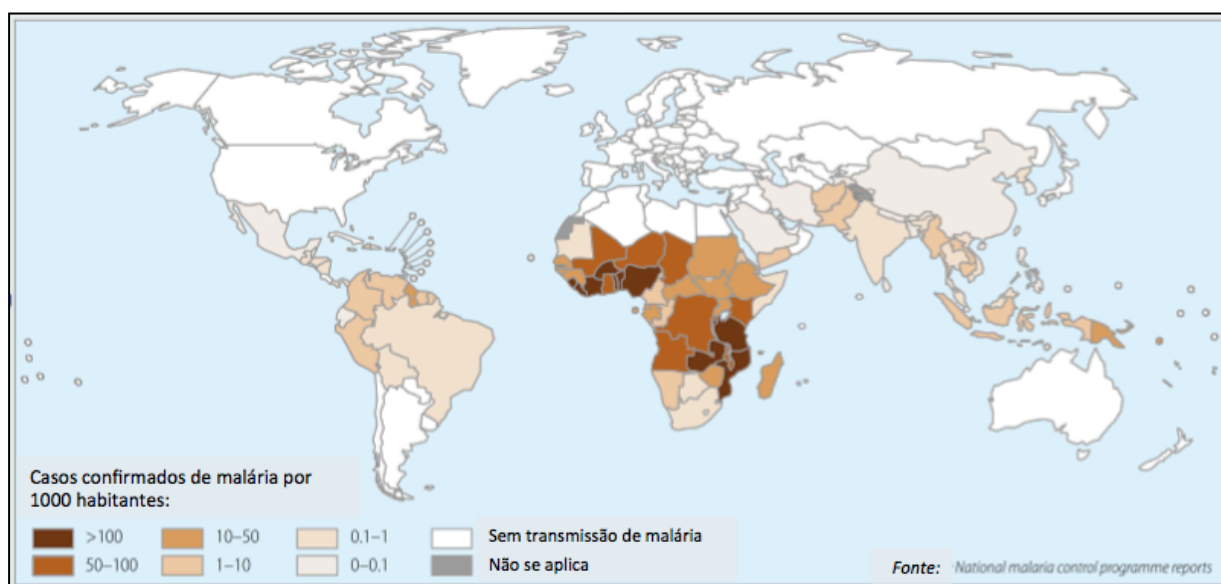


Figura 1: Distribuição atual dos casos de malária no mundo (Adaptado de WHO, 2014).

Nas Américas, a malária ocorre em 21 países, com cerca de 420.000 casos confirmados e 82 mortes em 2013. Brasil, Colômbia e Venezuela apresentaram 72% dos casos deste continente (WHO, 2014). No Brasil, a doença predomina na região amazônica, onde ocorrem mais de 99% dos casos notificados (Oliveira-Ferreira et al. 2010). A malária apresenta distribuição heterogênea nessa região, sendo as áreas de maior transmissão aquelas recém-ocupadas, áreas de garimpo

e populações ribeirinhas. Nessas áreas, o desenvolvimento do vetor e exposição da população ao mesmo são favorecidos pelos hábitos dos moradores e pelas condições deficientes de moradia, favorecendo assim a manutenção da malária endêmica (Alves et al. 2002, Sampaio et al. 2015).

Os plasmódios são protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e ao gênero *Plasmodium*. Atualmente cinco espécies são consideradas causadoras de malária humana: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*, sendo as duas primeiras as mais prevalentes no mundo e as principais causadoras da doença em humanos (Cox-Singh & Singh 2010, WHO, 2014). *P. knowlesi* possui macacos como hospedeiros vertebrados, mas recentemente casos de malária humana provocada por essa espécie têm sido relatados na Ásia (Cox-Singh & Singh, 2010). De forma geral, a malária é caracterizada por episódios de calafrios, febre com temperatura igual ou superior a 40°C e sudorese intensa. É comum o paciente apresentar juntamente cefaléia, mialgia, náuseas e vômitos (MS, 2010). A malária grave é causada principalmente por *P. falciparum*, havendo obstrução de capilares sanguíneos em órgãos como rins, pulmões, coração e cérebro, sendo comumente fatal se não tratada a tempo (Miller et al. 2002, Weatherall et al. 2002). Em mulheres grávidas, a infecção causa anemia e disfunção placentária, prejudicando o crescimento do feto, que nasce com peso reduzido, favorecendo a mortalidade infantil nas áreas endêmicas (Weatherall et al., 2002). Recentemente, casos de malária grave por *P. vivax* também têm sido relatados, caracterizados principalmente por anemia severa, icterícia, trombocitopenia e dificuldade respiratória (Lacerda et al. 2012).

Os plasmódios apresentam ciclo biológico heteroxênico, dividido em ciclo assexuado no hospedeiro vertebrado e sexuado no mosquito vetor. A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre naturalmente quando fêmeas de anofelinos infectadas, ao realizarem a hematofagia, inoculam juntamente com sua saliva formas infectantes do parasito, denominadas esporozoítos. Esta forma evolutiva do *Plasmodium* acumula-se na glândula salivar do mosquito e, em um repasto infectante, uma fêmea inocula em média 120 esporozoítos na pele do hospedeiro (Medica & Innis 2005).

Parte dos parasitos inoculados na pele penetram em capilares cutâneos e caem na corrente sanguínea. Os esporozoítos atravessam o citosol de várias células para ativar as vias necessárias à invasão e ao futuro desenvolvimento do parasito no fígado (Mota & Rodriguez 2004). Em alguns minutos invadem hepatócitos, diferenciam-se em formas arredondadas e iniciam o ciclo pré-eritrocítico, no qual realizam merogonia e geram milhares de células-filhas, os merozoítos. O hepatócito parasitado é então rompido, liberando os parasitos em vesículas conhecidas como merossomos (Sturm et al. 2006). Muitos dos merozoítos liberados são fagocitados pelas células de Kupffer, mas os que conseguem sobreviver invadem hemácias e dão origem ao ciclo eritrocítico. Nessas células, os plasmódios multiplicam-se novamente por merogonia, gerando dezenas de milhares de novos merozoítos. Com o rompimento da célula, os merozoítos liberados invadem novas hemácias, repetindo novamente a multiplicação assexuada. Após algum tempo de evolução da infecção (cerca de sete a doze dias para *P. falciparum* e 24 horas para *P. vivax*), aparecem no interior das hemácias formas que não mais se reproduzem. São os gametócitos ou gamontes (Weatherall et al. 2002, Bousema et al. 2010).

Quando um anofelino se alimenta em hospedeiro com gametócitos circulantes, ele ingere estas formas sexuadas do parasito. Devido a alteração de pH e temperatura e produção de ácido xanturênico no trato digestivo do inseto, os gametócitos se diferenciam em microgametas masculinos ou macrogameta feminino (um gametócito pode dar origem a oito microgametas masculinos flagelados ou a um único macrogameta feminino arredondado), que se fecundam e formam o zigoto (Billker et al. 1997, Billker et al. 1998, Josling & Llinás 2015). Cerca de 20 horas após a fusão dos dois núcleos, o zigoto começa a movimentar-se e passa a ser chamado de oocineto. Este atravessa a célula intestinal do inseto, alojando-se entre o epitélio e a membrana basal do intestino. Nesta localização, transforma-se em oocisto e inicia o processo de multiplicação esporogônica, dando origem aos esporozoítos. O oocisto maduro rompe-se, liberando os esporozoítos, que caem na hemolinfa e migram para as glândulas salivares do inseto, invadindo-as. Em um novo repasto sanguíneo, estas formas do parasito são inoculadas no hospedeiro

juntamente com a saliva do vetor, completando seu ciclo biológico (Revisado por Pimenta et al. 2015).

Os anofelinos são insetos pertencentes à ordem Diptera, família Culicidae e sub-família Anophelinae. O gênero *Anopheles*, compreende mais de 400 espécies, embora apenas aproximadamente 60 tenham importância epidemiológica para malária (Harbach 2004). São vulgarmente conhecidos como mosquito-prego ou carapanã no Brasil e diferenciam-se de outros culicídeos por apresentarem pouso perpendicular em relação ao substrato, palpos do mesmo comprimento da probóscide, asas manchadas, ovos com expansões cuticulares formando os flutuadores, e larvas sem sifão respiratório (Forattini, 2002). Taxonomicamente, distribuem-se em seis subgêneros: *Anopheles*, *Cellia*, *Kertessia*, *Lophopodomyia*, *Nyssorhynchus* e *Stethomyia*, dos quais *Anopheles*, *Cellia* e *Nyssorhynchus* possuem o maior número de espécies (Harbach 2004).

Como todo díptero, os anofelinos apresentam ciclo holometábolo, passando pelas fases de ovo, quatro estádios larvais, pupa e adultos (Figura 2). As fases imaturas do ciclo ocorrem em coleções de água com condições variáveis de acordo com a espécie de *Anopheles*, onde as larvas se alimentam de microrganismos aquáticos. Os adultos se alimentam de sucos vegetais e apenas as fêmeas são hematófagas, necessitando do sangue ingerido para maturação dos folículos ovarianos. De forma geral, a cópula dos anofelinos se dá em enxames, formando 'nuvens' nas quais os machos agarram as fêmeas com suas terminálias, fecundando-as (Forattini, 2002).

Entre as espécies do gênero *Anopheles* existem importantes diferenças biológicas que permitem sua adaptação a diferentes ambientes, possibilitando a ampla distribuição desses mosquitos nos seis continentes (Figura 3), e a transmissão global de malária (Sinka et al. 2010). Entre os principais vetores de malária no Velho Mundo estão: *A. gambiae* (principal vetor na África subsaariana), *A. stephensi* (principal vetor nas áreas urbanas da Índia) e *A. dirus* (principal vetor no sudeste asiático) (Sinka et al. 2010). Na América do Norte, *A. pseudopunctipennis* é considerado o principal transmissor de malária no México, e *A. freeborni* e *A. quadrimaculatus* foram importantes vetores da doença nas costas

oeste e leste, respectivamente, dos Estados Unidos até a década de quarenta (CDC, 2015).

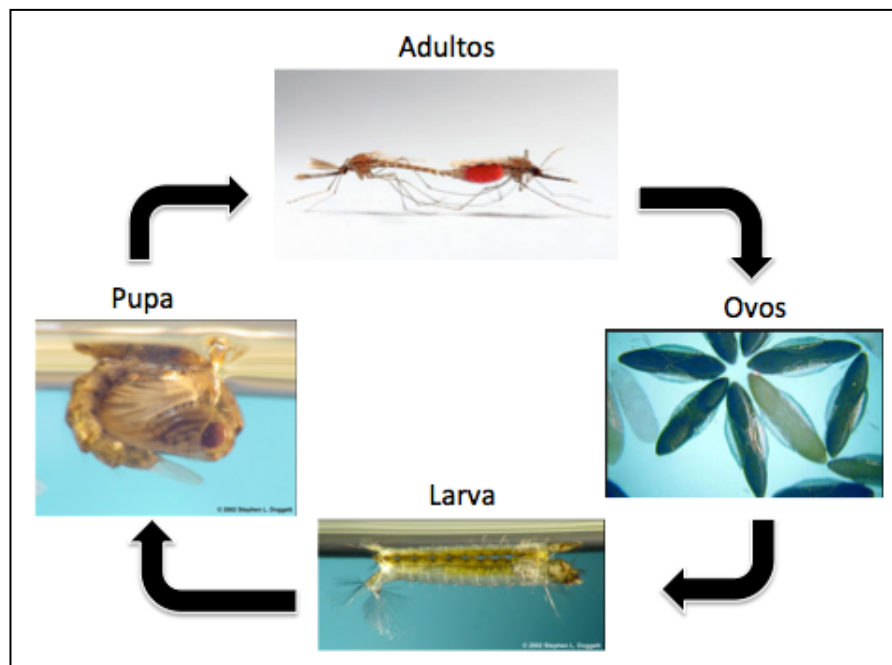


Figura 2: Ciclo biológico de *Anopheles* sp.. Os anofelinos possuem ciclo holometábolo, passando pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto [Fotos: Stephen Dogget (larva e pupa), Sam Cotton (adultos), Roxanne Connely (ovos)].

Na América do Sul, *A. darlingi* é a principal espécie transmissora de malária. No Brasil, ela é encontrada em quase todo o país, com exceção do extremo sul e de certas áreas muito secas na região Nordeste (Figura 3). É altamente susceptível à infecção por *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* e apresenta alto grau de antropofilia, alimentando-se predominantemente no peri-domicílio (Forattini, 2002, Gil et al. 2007). Entretanto, nas regiões costeiras onde a malária é endêmica, *A. aquasalis* é incriminado como o principal vetor. Essa espécie possui como criadouros coleções de água salobra e, portanto, suas larvas suportam altos teores de salinidade (Forattini, 2002; Silva et al. 2006). Devido a esta característica, sua distribuição é quase exclusivamente litorânea, ocorrendo nas regiões costeiras das Américas Central e do Sul. Em Belém (PA), Pova et al (2003) relataram índices de infecção natural de *A. aquasalis* de 1,18% (e de *A. darlingi* de 1,61%), contribuindo de forma significativa na transmissão da doença nessa cidade.

Já na América Central, *A. albimanus* é a espécie mais importante na transmissão de *P. vivax* (Faran 1980). Esta espécie realiza hematofagia no final da tarde e durante a noite, principalmente fora das moradias humanas, apesar de ser encontrada repousando tanto no intra- quanto no peri-domicílio (Breeland 1972, Sinka et al. 2010). Em relação à preferência alimentar, é considerada uma espécie oportunista, alimentando-se tanto em humanos quanto em animais, o que favorece a sua manutenção nas áreas endêmicas (Sinka et al. 2010). Suas larvas toleram diferentes condições nos ambientes aquáticos, como salinidade, poluição e turbidez (Faran 1980).

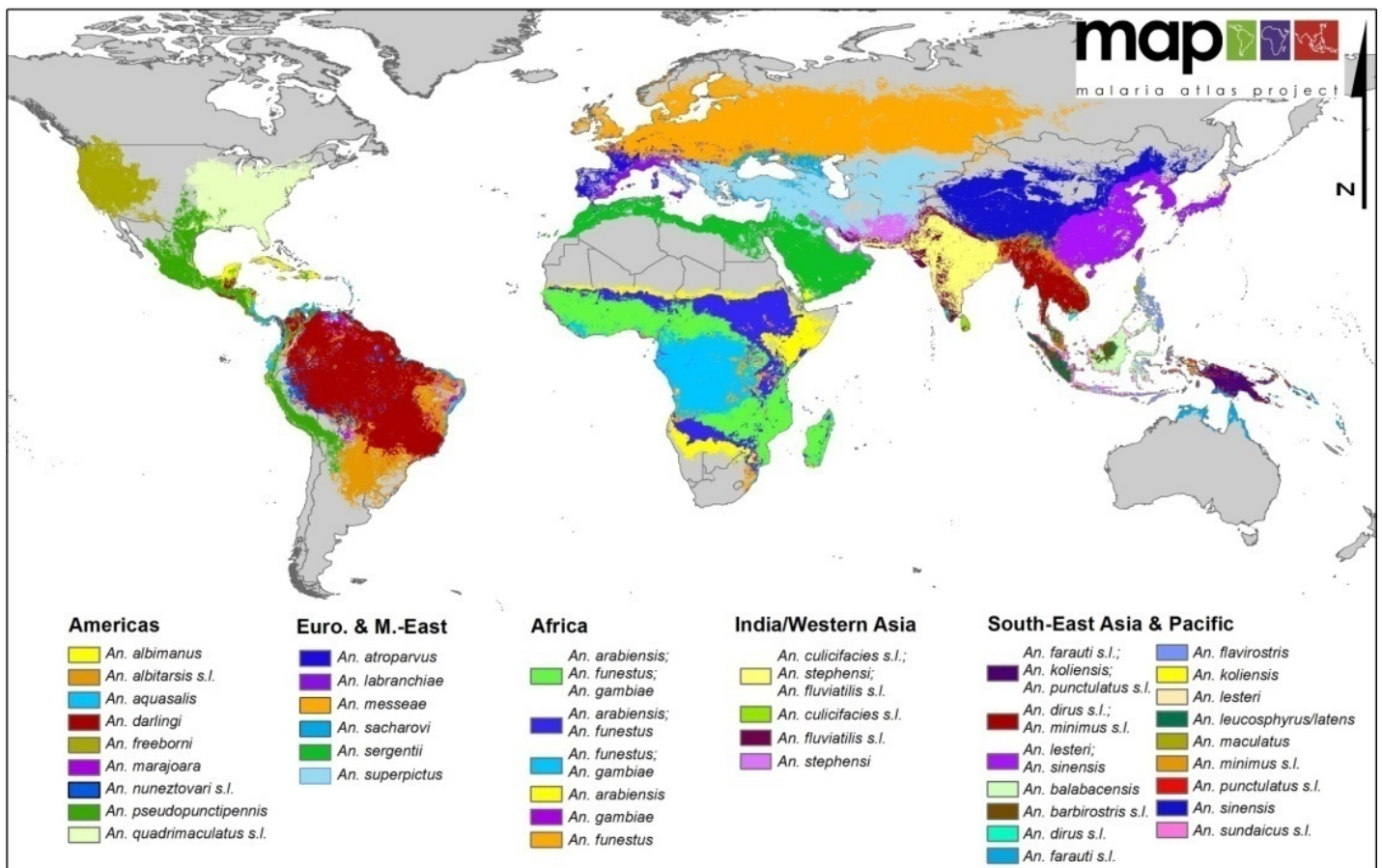


Figura 3: Distribuição global dos principais vetores de malária (Sinka et al, 2010).

1.2 A saliva de *Anopheles* sp.

Durante a alimentação sanguínea, os mosquitos injetam no hospedeiro a secreção de suas glândulas salivares. Cada fêmea de *Anopheles* sp. apresenta duas

glândulas salivares, cada uma formada por três lobos (Figura 4), localizadas no interior do seu tórax (Jariyapan & Choochote 2007).

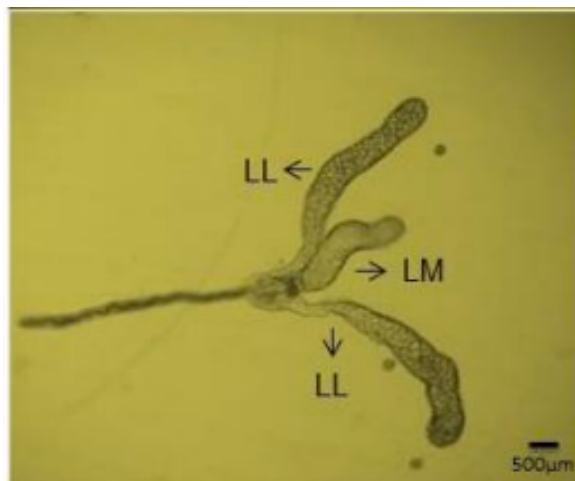


Figura 4: Glândula salivar de fêmea de *Anopheles aquasalis*. As glândulas salivares de anofelinos são compostas por dois lobos laterais (LL) e um lobo medial (LM) (Foto: Kel Martins).

A saliva dos anofelinos, assim como a de outros artrópodes hematófagos, apresenta moléculas importantes para o processo de hematofagia, como inibidores de agregação plaquetária, anti-coagulantes e vasodilatadores. Recentemente, com estudos de sialomas (transcriptomas e proteomas de glândulas salivares) desses insetos, algumas dessas moléculas foram identificadas e caracterizadas (Titus et al. 2006).

Anopheles albimanus apresenta em sua saliva um peptídeo de 6,5 kDa denominado Anophelina. Esta molécula apresenta atividade inibidora de α -trombina, proteína responsável pela clivagem de fibrinogênio e consequente geração de fibrina para formação do coágulo sanguíneo. Assim, a Anophelina constitui um importante componente salivar dificultando a hemostasia no local da picada, favorecendo o repasto sanguíneo pelo vetor (Valenzuela et al. 1999).

A proteína anti-plaquetária de *Anopheles* (AAPP), descrita na saliva de *A. stephensi*, inibe fortemente a agregação plaquetária ligando-se ao colágeno subendotelial do vaso sanguíneo lesado pelas peças bucais do vetor. Desta forma, bloqueia a adesão e ativação de plaquetas ao colágeno. Seus altos níveis de expressão sugerem que a AAPP possui um importante papel na localização de

vasos sanguíneos e na prevenção da hemostasia (Yoshida et al. 2008). Também na saliva de *A. stephensi*, foi encontrada uma proteína da família D7 que liga-se em tromboxano A2 e leucotrienos, atuando como inibidor de agregação plaquetária e possivelmente como anti-inflamatório (Alvarenga et al. 2010).

Outra importante molécula inibidora de agregação plaquetária, a enzima apirase, já foi descrita na saliva de *A. darlingi*, *A. gambiae* e *A. dirus* (Moreira et al. 2001, Jariyapan & Choochote 2007). A apirase é uma nucleotidase que cliva ATP e ADP em AMP e fosfato inorgânico e desse modo inibe a agregação plaquetária dependente de ADP (Ribeiro 1995). Mosquitos que tiveram o gene codificador desta proteína silenciado por RNAi necessitaram do dobro do tempo de mosquitos normais para localizar vasos sanguíneos, retardando assim a hematofagia (Boisson et al. 2006).

O sialoma de *A. gambiae* mostrou que esta espécie de mosquito apresenta várias proteínas salivares relacionadas à hematofagia (como mucinas, que lubrificam as peças bucais do inseto) e à digestão de proteínas e de carboidratos, (como peptidases e glicosidases, respectivamente). Com ensaios de silenciamento gênico por RNAi, ficou demonstrada a importância de determinadas proteínas salivares na localização do vaso sanguíneo e no sucesso da hematofagia (Das et al. 2010).

Recentemente, Francischetti et al (2014) relataram atividade de hemaglutinina no extrato de glândulas salivares de cinco espécies de anofelinos. O extrato de glândulas salivares de *A. gambiae* apresentou atividade sobre hemácias de diversas espécies de vertebrados, como humanos, equinos e bovinos. Entre outras funções, essas lectinas podem ser ingeridas durante a hematofagia, aglutinando hemácias no intestino do mosquito e favorecendo o processo digestivo (Francischetti et al. 2014).

Além da importância no processo hematofágico, alguns trabalhos têm demonstrado a importância da saliva do vetor na infecção pelos esporozoítos de *Plasmodium* sp. Utilizando modelos murinos, Vaughan et al (1999) demonstraram que esporozoítos de *P. berguei* inoculados por picadas de *A. stephensi* foram mais infectantes que esporozoítos inoculados intravenosamente por injeção com seringa. Rocha et al (2004) encontraram resultados semelhantes, observando

níveis aumentados de parasitemia por *P. gallinaceum* em galinhas inoculadas com esporozoítos juntamente com saliva de *Aedes fluviatilis*.

Assim como demonstrado para outras doenças transmitidas por artrópodes, como leishmaniose (Oliveira et al. 2015) e doença de Lyme (Schuijt et al. 2011a), a pré-imunização de camundongos com saliva do vetor *A. stephensi*, protegeu esses animais contra a infecção por *P. yoelii* (Donovan et al. 2007). Estes resultados fortalecem a ideia da utilização de antígenos salivares como componentes de vacinas para doenças transmitidas por artrópodes.

Os mecanismos pelos quais a saliva de flebotomíneos e carrapatos do gênero *Ixodes* favorecem a infecção por *Leishmania* sp. e *Borrelia burgdorferi*, respectivamente, vêm sendo elucidados há mais de duas décadas e várias informações já foram adquiridas sobre a interação da saliva desses artrópodes com o parasito por eles transmitido e o sistema imune do hospedeiro (Titus et al. 2006). Entretanto, há relativamente poucos trabalhos na literatura sobre a interação da saliva de anofelinos com o sistema imune de vertebrados e os processos pelos quais ela pode auxiliar na infecção pelos plasmódios. Os poucos trabalhos descritos até o momento foram realizados apenas com extrato de glândulas ou proteína salivar recombinante de uma espécie, *A. stephensi*.

Owhashi et al (2001, 2008) demonstraram a presença de uma glicoproteína salivar de 200 kDa com atividade quimiotática para neutrófilos e eosinófilos, contribuindo para a resposta inflamatória no local da picada. Demeure et al. (2005) demonstraram que saliva de *A. stephensi* induz a degranulação de mastócitos na pele de camundongos, provocando extravasamento de líquido e rápida infiltração de neutrófilos. Em linhagens de camundongos deficientes de mastócitos, essa infiltração não foi observada, reforçando o papel dos mastócitos na resposta inflamatória provocada pela picada de anofelinos. O mesmo grupo relatou a diminuição de respostas por linfócitos T na presença de extrato de glândula salivar *in vitro* e *in vivo*. Os autores demonstraram que a diminuição da resposta de hipersensibilidade do tipo tardia foi dependente da ativação de mastócitos e mediada por IL-10 (Depinay et al. 2006). Entretanto, não há informação sobre outras possíveis atividades imunomoduladoras em outras

espécies de anofelinos, permanecendo as interações na infecção malárica um campo de pesquisa promissor.

1.4 O sistema complemento

O sistema complemento (SC) é um dos principais mediadores da resposta imune inata dos vertebrados, formado por cerca de 30 proteínas solúveis no plasma ou associadas à superfície celular. Este sistema atua em esquema de cascata proteolítica, sendo sua principal função o reconhecimento, opsonização e lise de microrganismos invasores e células alteradas do hospedeiro (Sim & Laich 2000). Possui também importante papel na resposta imune adaptativa, auxiliando a apresentação de antígenos e tornando a resposta humoral mais eficiente (Morgan et al. 2005).

Sua ativação se dá através de três vias: a clássica, a das lectinas e a alternativa (Figura 5). A via clássica é ativada quando o componente C1q, juntamente com as serino-proteases C1r e C1s (complexo C1), se ligam a anticorpos IgM e IgG aderidos à superfície de patógenos invasores. Uma vez ativado, o complexo C1 é capaz de clivar os componentes C4 e C2, e seus fragmentos maiores, C4b e C2a, formam o complexo C4b2a sobre a superfície ativadora. Este complexo possui a capacidade de clivar o componente C3, o mais importante e abundante componente do sistema complemento, em C3a e C3b (Dunkelberger & Song 2010).

O fragmento C3a é uma anafilotoxina, responsável pela quimiotaxia de leucócitos, e pelo recrutamento e degranulação de mastócitos, causando aumento da permeabilidade vascular e facilitando a infiltração celular em pontos de inflamação (DiScipio & Schraufstatter 2007). Já C3b é uma opsonina que liga-se covalentemente à superfície ativadora. Esta opsonização marca o patógeno como “estranho”, sinalizando para que células de defesa o fagocitem. Além disso, C3b se liga próximo ao complexo C4b2a, formando a C5 convertase (C4b2a3b), que cliva o componente C5 em C5a e C5b. Este dá início à montagem do complexo de ataque à membrana (CAM). C6 se liga ao C5b recém ativado e logo forma um grande complexo composto por C5b, C6, C7, C8 e C9. Durante a montagem do CAM, várias

moléculas do componente C9 inserem-se na bicamada lipídica do patógeno, formando poros que levam à lise celular (Dunkelberger & Song 2010).

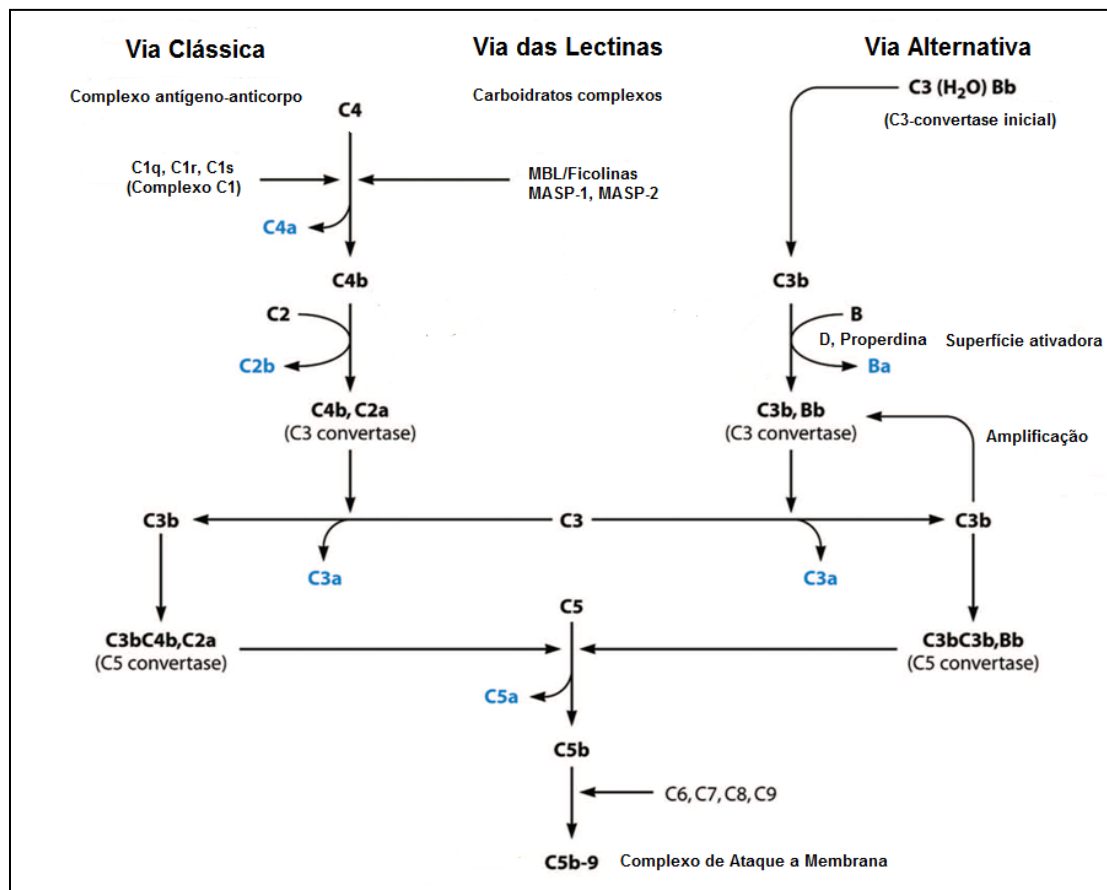


Figura 5: Esquema representativo das três vias de ativação do sistema complemento. A via clássica é ativada quando C1q se liga a anticorpos aderidos ao antígeno; a via das lectinas quando a lectina ligante de manana (MBL) encontra carboidratos específicos associados a patógenos; e a via alternativa é ativada quando C3 sofre hidrólise espontânea e forma a C3-convertase inicial desta via na presença dos fatores B e D. As três vias convergem para um ponto comum, a ativação do componente C3, e culminam com a formação do Complexo de Ataque a Membrana, responsável pela formação de poros na membrana celular (Adaptado de Lewis & Ram 2014).

A via das lectinas foi a mais recentemente descrita. Ela é ativada de forma similar à via clássica, entretanto é independente de anticorpos. As moléculas de ativação desta via são a lectina ligante de manana (MBL) ou ficolinas, que reconhecem carboidratos específicos presentes na superfície de patógenos, como manana, N- acetilglicosamina ou fucose. A MBL é semelhante estruturalmente ao

componente C1q da via clássica, e como tal, uma vez ligada ao patógeno, ativa as proteases MASP-1 e MASP-2. Uma vez ativadas, as MASPs clivam C4 e C2, formando a C3 convertase C4b2a, que ativa o componente C3, dando continuidade à cascata proteolítica até a formação do CAM. MBL e MASPs são muito menos abundantes no soro que C1q, C1r e C1s, tendo, portanto, uma importância menor dentro do sistema complemento (Dunkelberger & Song 2010).

A via alternativa é iniciada pela hidrólise espontânea de C3, com formação de C3b solúvel (C3b-H₂O), que se liga ao componente Fator B. Uma vez associados, o complexo C3b-H₂O-B é clivado pela serino-protease Fator D, que cliva o Fator B, formando C3b-H₂O-Bb solúvel. Este produto é capaz de ativar outras moléculas de C3. Se alguma molécula de C3b se liga a uma superfície estranha, como a superfície de um patógeno, ela vai continuar ativa e é capaz de receber moléculas do Fator B que é imediatamente ativado a Bb, formando C3bBb (a C3-convertase da via alternativa) sobre o organismo estranho (Dunkelberger e Song, 2010). Com a ligação de mais uma molécula de C3b, forma-se a C5 convertase (C3bBb3b) da via alternativa, que ativa o componente C5. Este processo também culmina na formação do CAM. Esta via pode ser amplificada através da ligação de properdina à C3-convertase. A properdina (ou Fator P) estabiliza o instável complexo C3bBb funcionando como uma proteína ativadora, ligando-se ao mesmo tempo em sítios dos componentes C3b e Bb que impossibilitam a ação de reguladores negativos desta via (Torreira et al. 2009). Por estar em constante ativação, esta via apresenta reguladores negativos específicos, como Fator H e Fator I. O Fator H atua na C3 convertase removendo Bb do complexo C3bBb e servindo como cofator para a proteólise mediada por Fator I (Ricklin et al. 2010).

1.5 Inibição do sistema complemento por artrópodes hematófagos

O sistema complemento do hospedeiro exerce forte pressão evolutiva nos parasitos, que por sua vez desenvolvem mecanismos de proteção contra a ação deletéria dos efeitos desse sistema. Exemplo disso são os artrópodes hematófagos, que desenvolveram inibidores do complemento presentes na saliva e/ou conteúdo intestinal (Barros et al. 2009, Schroeder et al. 2009, Mendes-Sousa et al. 2013).

A inibição do sistema complemento por um artrópode hematófago foi descrita pela primeira vez em estudos com saliva de *Ixodes dammini*, onde demonstrou-se que a saliva desse carrapato possui a capacidade de inibir a via alternativa do complemento humano (Ribeiro 1987), além de inativar as anafilotoxinas produzidas durante a ativação da cascata (Ribeiro & Spielman 1986). Valenzuela et al. (2000) purificaram, clonaram e expressaram a proteína salivar anti-complemento de *Ixodes scapularis* (ISAC) e demonstraram que essa molécula de 18,5 kDa é capaz de inibir apenas a via alternativa, inibindo a deposição de C3b e fator B em superfícies ativadoras, além de remover o fator B ligado anteriormente. A saliva de *Ixodes ricinus* também possui a capacidade de inibir a via alternativa e previne a clivagem do Fator B e C3 (Lawrie et al. 2005). Moléculas semelhantes à ISAC foram encontradas em sua saliva e atuam de modo parecido, inibindo a ativação dos mesmos componentes (Couvreur et al. 2008).

Estudando a inibição do complemento por triatomíneos, Barros et al (2009) observaram que tanto a saliva quanto o conteúdo intestinal das espécies *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis* e *Rhodnius prolixus* foram capazes de atuar sobre as vias clássica e alternativa do complemento humano, causando diminuição significativa da atividade dessas vias.

Já a saliva de *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor de *Leishmania infantum* nas Américas, possui atividade inibidora da via clássica e da via alternativa do complemento humano (Cavalcante et al. 2003). Vale (2011) descreveu o mecanismo de ação do inibidor salivar da via clássica desse vetor. Através de cromatografia líquida (HPLC) e testes imunoenzimáticos, mostrou tratar-se de uma proteína de aproximadamente 11 kDa que atua ligando-se ao componente C1q, bloqueando a ativação de C1r e C1s e, consequentemente, o fluxo normal da cascata. Além disso, demonstrou também que a proteína recombinante LJM19, cuja forma natural está presente na glândula salivar de *L. longipalpis*, apresenta a mesma ação sobre a via clássica do sistema complemento de seres humanos (Vale, 2011). Essa atividade também foi observada sobre o SC de cães, ratos e cobaias (Mendes-Sousa et al., 2013).

Recentemente, Khattab et al (2015) demonstraram que uma das formas pelas quais fêmeas de *Anopheles gambiae* e *A. stephensi* se evadem do ataque do

sistema complemento ao nível de intestino, é através da ligação de fator H do sangue do hospedeiro às células intestinais. Os autores mostraram por microscopia confocal a ligação do regulador às células epiteliais do intestino do mosquito e verificaram que mosquitos que se alimentaram com sangue contendo anticorpo anti-Fator H apresentaram maior índice de mortalidade e menor índice de fecundidade (Khattab et al, 2015). Para nosso conhecimento, porém, não há relato na literatura de inibidores do sistema complemento na saliva de culicídeos.

Para os vetores hematófagos, a inibição do SC tem funções muito importantes. Durante a hematofagia, essa ação levaria à diminuição parcial da resposta inflamatória no local da picada devido à produção reduzida de anafilotoxinas, diminuindo assim a percepção pelo hospedeiro e permitindo o repasto sanguíneo completo (Schroeder et al, 2009). Adicionalmente, é possível que no local da picada os inibidores salivares reduzam consideravelmente a quantidade de antígenos salivares opsonizados com C3b, diminuindo assim a produção de anticorpos contra proteínas salivares, preservando suas propriedades necessárias para o sucesso da hematofagia (Barros et al, 2009).

Além disso, a função aparentemente mais óbvia desses inibidores salivares é a proteção do epitélio intestinal contra injúrias mediadas pelo complemento. Uma vez que o trato digestivo dos insetos é formado por apenas uma camada de células (Billingsley 1990), o dano provocado pela ativação do complexo de ataque à membrana poderia levar à sua ruptura e morte do inseto (Barros et al, 2009).

2. Justificativa

Apesar dos programas de controle da malária terem conseguido reduzir em torno de 45% a incidência da doença no mundo nos últimos quinze anos, devido à ausência de uma vacina eficiente, da resistência crescente dos parasitos aos anti-maláricos existentes e da pouca eficácia dos métodos de controle do vetor em áreas endêmicas, a malária ainda constitui um sério e ameaçador problema de saúde pública nessas áreas (WHO, 2014).

Anopheles albimanus e *A. aquasalis* são importantes vetores de malária na América Latina e, entre as espécies de anofelinos neotropicais, são as mais comumente mantidas em colônias de laboratório. Isso proporciona acesso a esses insetos, permitindo sua utilização em trabalhos de pesquisa em diferentes campos, como o estudo da sua resposta imune à infecção por *Plasmodium* (Bahia et al. 2011), estudos de resistência a inseticidas (Molina & Figueroa 2009), observações sobre seu desenvolvimento embrionário (de Carvalho et al. 2002) e investigações de moléculas salivares com função anti-homeostática (Ribeiro & Nussenzveig 1993, Valenzuela et al. 1999).

Entretanto, para nosso conhecimento, na literatura não consta trabalho sobre a interação da saliva dessas espécies de *Anopheles* com o sistema imune do hospedeiro vertebrado, nem a identificação e caracterização de moléculas salivares específicas envolvidas na interação vetor-sistema complemento, constituindo assim um importante e promissor campo de pesquisa. A caracterização de como os artrópodes hematófagos conseguem se evadir do sistema do complemento tem sido tema de vários estudos (Schroeder et al, 2009) e tem constituído uma das linhas de pesquisa do nosso laboratório (Cavalcante et al, 2003; Barros et al, 2009; Mendes-Sousa et al, 2013), na tentativa de elucidar as lacunas no conhecimento das interações vetor-parasito-hospedeiro vertebrado.

Estudos voltados para a interação da saliva do vetor com o sistema imune de hospedeiros fazem-se ainda mais necessários depois da demonstração *in vivo* de proteção contra infecção por *Plamosdium* sp. conferida através da imunização por picadas de anofelinos não infectados (Donovan et al, 2007). Observações de como antígenos salivares com potencial vacinal interagem com o sistema imune

de seres humanos são importantes para a determinação de sua utilização em possíveis vacinas.

Considerando este contexto, o estudo da inibição do sistema complemento pela saliva de mosquitos do gênero *Anopheles* é de grande importância para um melhor entendimento da interação destes importantes vetores com o hospedeiro humano.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Demonstrar e caracterizar a atividade inibidora do sistema complemento humano presente na saliva de *Anopheles albimanus*, *A. aquasalis*, *A. dirus*, *A. freeborni*, *A. gambiae* e *A. stephensi*.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Avaliar se o extrato de glândulas salivares (EGS) de *Anopheles* spp. é capaz de inibir as vias clássica, das lectinas e alternativa do sistema complemento humano;

3.2.2 Avaliar o efeito do EGS sobre componentes específicos da via alternativa;

3.2.3 Identificar, clonar e expressar possíveis moléculas salivares com atividade inibidora do sistema complemento;

3.2.4 Produzir anticorpo contra possíveis inibidores salivares e avaliar sua capacidade de bloquear a atividade anti-complemento dos mesmos;

3.2.5 Investigar o mecanismo de ação de possíveis inibidores salivares.

4. Material e Métodos

4.1 Aprovação em comitê de ética

Os experimentos realizados neste estudo foram conduzidos de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Universidade Federal de Minas Gerais e do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG) sob número de protocolo número 087/11, e pelo Comitê de Uso e Cuidado Animal do NIH, com ID de aprovação ASP-LMVR3.

4.2 Criação dos mosquitos e obtenção de extrato de glândulas salivares (EGS)

Os mosquitos pertencentes às espécies *Anopheles albimanus*, *A. gambiae*, *A. dirus*, *A. stephensi* e *A. freeborni* foram mantidos em colônias fechadas em insetários no Laboratório de Pesquisa de Malária e Vetores (LMVR) do Instituto Nacional de Saúde (NIH), Estados Unidos, sob a coordenação do Sr. Andre Laughinhouse. Os insetos adultos eram mantidos em gaiolas cilíndricas com tela na parte superior, onde chumaços de algodão embebidos em solução de xarope Karo® 10% eram oferecidos aos mosquitos. Galinhas imobilizadas eram colocadas sobre a tela das gaiolas para que as fêmeas realizassem o repasto sanguíneo. As formas imaturas (ovos, larvas e pupas) eram mantidas em cubas de plástico, contendo água da torneira. As condições climáticas dos insetários eram preservadas a 27°C e 75% de umidade.

Os mosquitos das espécies *Anopheles aquasalis* e *Aedes aegypti* foram criados no insetário do Laboratório de Malária (LAMAL), no Centro de Pesquisa René Rachou – CPqRR/FIOCRUZ, sob a coordenação do Dr. Luciano Moreira. Para a criação de *A. aquasalis*, gaiolas cilíndricas de papelão (Barripel®) com a face superior telada eram utilizadas para manter os insetos adultos. Bolinhas de algodão com solução de açúcar 10% e camundongos anestesiados eram utilizados para sua alimentação. As formas imaturas eram mantidas em cubas de plástico contendo água do mar diluída 1:10. Para a criação de *A. aegypti*, os

adultos eram mantidos em gaiolas quadriculares de plástico com as laterais teladas (BugDorm®) contendo bolinhas de algodão com solução de açúcar 10%. As formas imaturas eram criadas em cubas contendo água filtrada e desclorada. Os insetários de criação das duas espécies eram mantidos a 27°C e aproximadamente 80% de umidade.

Para obtenção do EGS, fêmeas de 4 a 8 dias não alimentadas com sangue foram dissecadas em lâmina de vidro escavada contendo PBS ou solução salina 0,9%, com auxílio de microscópio estereoscópico e estiletes entomológicos. As glândulas salivares foram coletadas e transferidas para tubos de 1,5 ml contendo solução específica para o teste a ser realizado e mantidos constantemente em gelo. Os tubos foram então sonicados por 60 segundos e centrifugados a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante era utilizado nos ensaios. A concentração de proteínas nos extratos de glândulas salivares foi medida pelo método de Bradford (Bradford 1976) ou pelo kit BCA (Thermo Scientific®), ambos baseados em uma curva padrão de albumina de soro bovino, seguindo as orientações do manual de instruções.

4.3 Ensaio hemolítico (Baseado em Mendes-Sousa et al., 2013)

Nos testes de hemólise mediada pela via alternativa do SC, foram utilizadas hemácias de coelho coletadas por punção da veia auricular de um animal mantido no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (para os ensaios com EGS de *A. aquasalis*) ou obtidas comercialmente da empresa CompTech® (para os ensaios com EGS das demais espécies). As células foram lavadas três vezes com solução Mg-EGTA (HEPES 1 mM, NaCl 30 mM, EGTA 10 mM, MgCl₂ 7 mM, glicose 3%, gelatina 0,02%, pH 7,4) através de centrifugação a 600 g por 5 minutos a 4°C seguida de descarte do sobrenadante e ressuspensão das hemácias em 1 ml de Mg-EGTA. Antes dos experimentos, a concentração das células foi ajustada para 1x10⁸ células/ml

Para os ensaios com EGS de *A. aquasalis*, foi utilizado um *pool* de soro humano proveniente da coleta de sangue de doadores voluntários saudáveis no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (Departamento de

Parasitologia, ICB, UFMG). Nos ensaios com as outras espécies, foi utilizado soro humano normal adquirido da CompTech®. Em ambos os casos, o soro foi aliquotado e mantido a -80°C até a realização dos experimentos, sendo que cada alíquota foi utilizada apenas uma vez.

Em tubos de 1,5 ml, foram adicionados 25 µl de soro humano diluído 1:20 em Mg-EGTA juntamente com 12,5 µl de PBS contendo a concentração desejada de EGS. Em seguida, foram adicionados 25 µl de solução de hemácias e os tubos foram então incubados a 37°C por 30 minutos para a ativação do complemento. Após a incubação, 250 µl de PBS gelado foram acrescentados a cada tubo para parar a reação de hemólise. Após centrifugação a 1700 g por 30 segundos, transferiu-se 200 µl do sobrenadante para uma placa de 96 poços, para ser lida em leitor de ELISA (Bio-Rad Benchmark®) a 415nm. Exclusivamente com *A. albimanus*, foram realizados ensaios com EGS (quantidade referente a 4 glândulas) aquecido em água fervente por 30 minutos ou incubado por 3 horas a 37°C com 0,2 µg de proteinase K.

Em cada teste, foram utilizados três controles: controle hemólise total, no qual eram acrescentados 250 µl de água destilada fria após a incubação a 37°C; hemólise espontânea (controle negativo), no qual não havia adição de soro, apenas 25 µl de Mg-EGTA; e hemólise pelo complemento (controle positivo), no qual era acrescentado soro, mas não havia adição de EGS. Os testes foram realizados em duplicata, com no mínimo três repetições. Para análise dos dados, a média dos controles negativos era subtraída dos demais resultados e os mesmos transformados em porcentagem de hemólise, considerando o controle positivo como 100% de atividade hemolítica.

Nos ensaios com a via clássica, foram utilizadas hemácias de carneiro. Para os experimentos com EGS de *A. aquasalis*, foi coletado sangue da veia jugular de um carneiro adulto mantido no ICB. O sangue era imediatamente misturado com solução conservadora (ácido cítrico 0,05%, citrato de sódio 0,8%, glicose 2,05%, NaCl 0,42%) na proporção 1:1 e armazenado a 4°C. Para preparo das hemácias, 1 ml do sangue foi centrifugado a 600g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. As células precipitadas foram ressuspensas e homogeneizadas em 1 ml de solução GHB-EDTA (HEPES 5 mM, NaCl 145 mM,

EDTA 10 mM e gelatina 0,1%, pH 7,4) e centrifugadas novamente. Após mais duas lavagens semelhantes, as células foram ressuspensas em 1 ml de GHB-EDTA e opsonizadas com anticorpo IgG anti-hemácia de carneiro produzido em coelho (Sigma®) diluído 1:1000 durante incubação a 37°C por 30 minutos sob leve agitação. Após a sensibilização, as células foram lavadas uma vez com solução GHB-EDTA e, em seguida, duas vezes com solução GHB²⁺ (HEPES 5 mM, NaCl 145 mM, CaCl₂ 0,15 mM, MgCl₂ 0,5 mM e gelatina 0,1%, pH 7,4). Após a última lavagem, a concentração das hemácias foi ajustada para 2x10⁸ células/ml em solução GHB²⁺. Para os experimentos com EGS das outras espécies de mosquitos foram utilizadas hemácias de carneiro opsonizadas com anticorpo adquiridas da CompTech®. Essas células foram lavadas três vezes em solução GVB²⁺ (gelatina 0.1%, veronal 5 mM, NaCl 145 mM, NaN₃ 0.025%, CaCl₂ 0.15 mM, MgCl₂ 0, 5mM, pH 7,3) (CompTech®), como descritas anteriormente e a concentração ajustada para 2 x 10⁸ células/ml. O restante dos experimentos se deu como descrito para a via alternativa, utilizando soro humano diluído 1:60 em solução GHB²⁺ (nos ensaios com *A. aquasalis*) ou GVB²⁺ (nos ensaios com as outras espécies).

4.4 Ensaio de ativação da via das lectinas (Baseado em Bergström et al. 2009)

Poços de uma placa de ELISA (Costar®) foram sensibilizados *overnight* a 4°C com 50 µl de tampão carbonato de sódio 35 mM e bicarbonato de sódio 15 mM pH9,6 contendo 100 µg/ml de manana obtida de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma®) ou BSA 1% (controle negativo). Os poços foram então incubados com 200 µl de solução de bloqueio (PBS + BSA 1%) por uma hora em temperatura ambiente sob leve agitação. Em seguida, foi adicionado soro humano normal 1% (diluído em tampão GVB²⁺) juntamente com diferentes concentrações de EGS de *A. albimanus* (volume final de 100 µl por poço) e a placa incubada por 30 minutos a 37°C.

Após a incubação, os poços foram lavados duas vezes com 200 µl de solução de lavagem (PBS-Tw 0,05%) sob agitação por dois minutos e em seguida incubados com 50 µl de solução de bloqueio contendo anticorpo anti-C3

(CompTech®) 1:1000 por 60 minutos em temperatura ambiente sob leve agitação.

Depois de mais duas lavagens, os poços foram incubados sob agitação por 60 minutos em temperatura ambiente com 50 µl de solução de bloqueio contendo anticorpo anti-cabra conjugado com peroxidase (Sigma®) diluído 1:1500. Em seguida, os poços foram lavados novamente e 200 µl de tampão citrato de sódio 50 mM e fosfato de sódio 50 mM pH 5,0 contendo OPD (Sigma®) 1 mg/ml e peróxido de hidrogênio 0,075% foram adicionados aos poços para revelação da placa. A leitura foi feita a 450 nm no modo cinético por 10 minutos a 37°C em leitor de ELISA (Bio-Rad Benchmark®), utilizando o software SoftMax Pro 5.2.

Poços sensibilizados com BSA 1% e poços sensibilizados com manana e incubados apenas com soro (sem EGS) foram utilizados como controles negativos e positivos, respectivamente. Os ensaios foram realizados em duplicata, com pelo menos três repetições. Para o cálculo estatístico, foi calculada a média de cada duplicata e a média do controle negativo subtraída das demais. Os resultados foram expressos como porcentagem de ativação de C3 da via das lectinas, considerando o controle positivo como 100% de ativação.

4.5 Ensaio de deposição de componentes da via alternativa em placas cobertas com agarose (Baseado em Mendes-Sousa et al., 2013)

Placas de 96 poços (Costar®) foram cobertas com 100 µl de solução de agarose 0,1% e deixadas secar a 37°C *overnight* para a formação de uma película de agarose no fundo do poço. Então foram adicionados 20 µl de soro humano normal diluído 1:5 em solução HMEBN (HEPES 5 mM, MgCl₂ 7 mM, EGTA 10 mM, BSA 5 mg/ml, NaCl 140 mM, pH 7,4), juntamente com EGS de *A. aquasalis* ou *A. albimanus* em 80 µl de HMEBN, totalizando assim 100 µl de volume no poço, e a placa incubada a 37°C por 30 minutos.

Em seguida, os poços foram lavados duas vezes com 200 µl de solução de lavagem (Tris 10 mM, NaCl 140 mM e BSA 0,1%) por dois minutos sob agitação e foram adicionados 50 µl de anticorpo anti-C3 (CompTech®), anti-Fator B

(CompTech®) ou anti-Propertina (CompTech®) diluídos 1:1000, 1:500 e 1:1000, respectivamente, em solução contendo HEPES 10 mM e NaCl 140 mM (pH 7,4) e a placa incubada por 30 minutos em temperatura ambiente sob agitação. Após duas lavagens, os poços foram tratados com 50 µl de anticorpo anti-cabra conjugado com peroxidase (Sigma®) diluído 1:1500 na mesma solução e incubados novamente por 30 minutos em temperatura ambiente sob agitação. O restante do ensaio se deu como descrito para o ensaio de ativação da via das lectinas, utilizando poços incubados sem soro e poços incubados apenas com soro (sem EGS ou proteína recombinante) como controles negativos e positivos, respectivamente. Os ensaios foram realizados em duplicata e, em cada ensaio, a média do controle negativo foi subtraída das médias das velocidades máximas das reações do controle positivo e dos poços com inibidor salivar. Os resultados foram então transformados em porcentagem de deposição de cada componente, considerando o controle positivo como 100% de deposição.

Para investigar se os inibidores salivares de *A. aquasalis* e *A. albimanus* eram capazes de desligar componentes da via alternativa previamente depositados sobre superfície ativadora, realizamos ensaios de deposição como descritos acima, mas com algumas modificações. Inicialmente, foram adicionados 100 µl de SHN diluído em HMEBN (SHN 7% nos ensaios com *A. aquasalis* e 4% nos ensaios com *A. albimanus*) e a placa incubada a 37°C por 30 minutos para ativação da via alternativa e deposição dos seus componentes no fundo do poço. Após duas lavagens com 200 µl do mesmo tampão, 100 µl de HMEBN contendo EGS relativo a 15 glândulas de *A. aquasalis* ou concentração final de 20 nM de proteína recombinante de *A. albimanus* foram adicionados aos poços e a placa incubada novamente por 30 minutos a 37°C. Poços incubados apenas com tampão foram utilizados como controle negativo. Nos ensaios com o inibidor de *A. albimanus*, 100 µg de Fator H purificado (CompTech) também foi utilizado como controle para o desligamento de Fator B. Após mais duas lavagens, anticorpo anti-Fator B, anti-C3 ou anti-propertina foi adicionado aos poços e o restante do ensaio ocorreu como descrito para os ensaios de deposição.

4.6 Western blot para detecção de Fator B e C3a (Baseado em Lawrie et al., 2005)

Ensaio de hemólise pela via alternativa como descritos no item 4.3 foram realizados utilizando apenas quantidade de EGS referente a 4 ou 15 glândulas salivares (nos ensaios com *A. albimanus* ou *A. aquasalis*, respectivamente) e soro humano normal diluído 1:35 em Mg-EGTA. Tubos com adição de PBS sem EGS foram utilizados como controles positivos. Os tubos foram incubados a 37°C e em diferentes tempos de incubação (tempos 0' e 30', nos ensaios com *A. aquasalis*; e tempos 0', 30' e 60', nos ensaios com *A. albimanus*), foram centrifugados a 1700g por 30 segundos, e uma alíquota de 5 µl do sobrenadante foi coletado e misturado com tampão da amostra 4 vezes concentrado (Life Technologies®) e agente redutor 10 vezes concentrado (Life Technologies®). Os tubos foram então aquecidos a 90°C por 5 minutos e seu conteúdo aplicado em gel de poliacrilamida 4-10%. Em cada gel, foi utilizado 10 ng de Bb ou 5 ng de C3a purificados (CompTech®), um poço apenas com soro diluído 1:35 não incubado a 37°C e um padrão de bandas pré-corado (SeeBlue Pre stained, Invitrogen®) que, juntamente com as amostras, correram por aproximadamente 30 minutos a 200 V.

Após a corrida, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose durante uma hora a 30V e, logo após a transferência, a membrana foi bloqueada *overnight* com solução bloqueadora (PBS-Tw 0,05% + leite em pó desnatado 10%) em constante agitação. Seguindo o bloqueio, a membrana foi lavada três vezes por cinco minutos com PBS-Tw 0,05% e incubada por uma hora em temperatura ambiente sob agitação com anticorpo anti-Fator B ou anti-C3a (CompTech®), ambos diluídos 1:1000 em PBS-Tw + 1% BSA. Após mais três lavagens, a membrana foi incubada por uma hora com anticorpo anti-cabra (nos ensaios para detecção de Fator B) diluído 1:2000 em PBS-Tw + 1% BSA ou anticorpo anti-coelho (ensaios para detecção de C3a) diluído 1:3000 na mesma solução. Ambos anticorpos secundários eram conjugados com peroxidase. Após a incubação, as membranas foram lavadas mais três vezes e a revelação das bandas de Fator B e C3a se deu utilizando o kit

Peroxidase Substrate DAB (Vector Laboratories®), seguindo as instruções do fabricante.

Para investigar a ação da saliva de *A. albimanus* na formação da C3 convertase da via alternativa, 200 ng de C3b purificado, 0,5 ng de Fator D purificado e 0,5 µg de Fator B purificado (CompTech®) em 20 µl de Mg-EGTA foram incubados a 37°C juntamente com 20 µl do mesmo tampão com ou sem EGS referente a 4 glândulas. Nos tempos 0', 20' e 40' de incubação, uma alíquota dos tubos foi coletada e misturada com tampão da amostra e agente redutor. O material foi então aquecido a 95°C por cinco minutos e corrido em gel de poliacrilamida 4-10%.

A ativação do componente Fator B (surgimento das bandas referentes a Bb e Ba) foi avaliada através de Western blot realizado como descrito acima.

4.7 Purificação e identificação do inibidor salivar de *A. albimanus*

Para purificar o inibidor do complemento de *A. albimanus*, 200 glândulas salivares de fêmeas entre 4 e 8 dias de vida não alimentadas com sangue foram dissecadas e armazenadas em 100 µl de PBS. O material foi sonificado por 30 a 60 segundos, centrifugado a 10.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado. Uma alíquota do material coletado foi testada em ensaio hemolítico para confirmar a presença do inibidor. O restante foi submetido a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usando uma coluna de fase reversa (Source 15 RPC 3ml, GE Healthcare®) conectada em sistema ÄKTA Purifier (GE Healthcare®). A coluna foi equilibrada com tampão TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl) pH 7,4 (Tampão A) num fluxo de 1 ml/min e nossa amostra foi então aplicada. As proteínas foram eluídas de acordo com sua hidrofobicidade, usando gradiente (0 a 100%) de acetonitrila contendo 0,1% de ácido trifluoroacético (Tampão B) num fluxo de 1 ml/min e coletadas em frações de 250 µL. A concentração de proteínas foi avaliada a 220 nm, utilizando o software Unicorn 5.0 (GE Healthcare®).

As frações coletadas foram centrifugadas em SpeedVac-SC 110 (Savant Instruments®) a 45°C por 3 horas para completa evaporação do tampão B e, em

seguida, resolubilizadas em 100 µl de PBS. Uma alíquota de 12,5 µl de cada fração foi testada em ensaio hemolítico como descrito anteriormente para identificar atividade inibidora da via alternativa. As frações que apresentaram atividade e as suas adjacentes, tiveram uma alíquota coletada e misturada com tampão da amostra e agente redutor, aquecidas a 95°C por cinco minutos, corridas em gel de poliacrilamida (4-10%) e coradas com prata usando o kit SilverQuest (Invitrogen®), seguindo o seu manual de instruções.

Para identificação do inibidor, inicialmente a fração 1H12 inteira foi enviada para a plataforma de espectrometria de massa no NIH. O material foi submetido a digestão por tripsina e os peptídeos gerados submetidos a cromatografia líquida em nano-escala associada a espectrometria de massa simultânea (nano LC-MS/MS). As proteínas encontradas na fração enviada foram identificadas a partir de comparações com os bancos de dados disponíveis (genoma e transcriptoma) no site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ou VectorBase (www.vectorbase.org). Em um segundo momento, apenas uma banda entre 6 e 14 kDa que aparecia exclusivamente nas frações com atividade foi submetida à análise de espectrometria de massa.

A proteína identificada nos resultados da espectrometria como o inibidor salivar de *A. albimanus* foi encontrada no banco de dados do VectorBase e a similaridade com proteínas de outras espécies de anofelinos foi investigada através de BLAST no mesmo site ou no NCBI. Para a verificação da presença de peptídeo sinal e de possíveis domínios conhecidos da proteína, foram utilizados os softwares SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) e Pfam (<http://pfam.xfam.org/>), respectivamente. Para o alinhamento das sequências de proteínas e desenho da árvore filogenética foram utilizados o UniProt (<http://www.uniprot.org/align/>) e o PhyML (Seaview®), respectivamente. Para investigar demais características dos genes e das proteínas, foi utilizado o software DNASTar Lasergene®.

4.8 RT-PCR para detecção do gene da proteína gSG7 em extrato de glândulas salivares de *A. albimanus*

Para confirmar a presença do gene referente à proteína gSG7 no extrato de glândulas salivares de *A. albimanus*, foram sintetizados primers para a sequência deste gene: albigsg7FOR1 (5' GACAGTCATATTGCCGTTGG) e albigsg7REV3 (5' AACATGCGCTTTGCATACAG). Esses primers originam um amplicon de 477 pb.

Inicialmente, foram dissecadas 50 glândulas salivares de fêmeas de *A. albimanus* com 5 dias de vida não alimentadas com sangue. O material foi dissecado e transferido imediatamente para 50 µl de Trizol® Reagent (Life Technologies®). Após homogeneização do material com pistilo estéril, foi realizada extração de RNA total seguindo o protocolo do Trizol®. O tubo com o RNA extraído foi secado totalmente em SpeedVac e, em seguida, o material foi dissolvido em 20 µl de água ultrapura (Ultra Pure DNase/RNase Free Distilled Water, Life Technologies®).

Utilizando o kit QuantiTect® Reverse Transcription kit (QIAGEN®), produziu-se o DNA complementar (cDNA) a partir de 5 µl de RNA extraído, seguindo o manual de instruções do kit, com uma alteração: ao invés de utilizar o RT Primer Mix do kit, utilizamos o primer albigsg7REV3 para que apenas o DNA complementar da nossa sequência fosse gerado.

Seguindo o manual de instruções do Kit FastStart PCR Master (Roche®), com os primers descritos acima e o cDNA produzido como molde, foi realizada PCR para verificar a presença do gene de interesse. Tubos com água ultrapura como molde, sem cDNA, foram utilizados como controle negativo. Os ciclos da reação são apresentados no Quadro 1.

Nove microlitros dos produtos da PCR foram misturados com 1 µl de tampão da amostra 10 x (Invitrogen®), aplicados em gel de agarose 1,2% com SYBR Safe stain (Invitrogen®) e corridos por 30 minutos a 100 V. Como padrão de peso molecular, foi utilizado o Gene Ruler 1 kb (Therma Scientific®). Após a corrida, o gel foi visualizado e fotografado em aparelho transiluminador com luz UV.

Quadro 1: Ciclos de temperatura utilizados nas reações de PCR para amplificação do gene da gSG7 de *A. albimanus*

	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação	1	95	4 min
Desnaturação	30	95	30 seg
Anelamento		59	30 seg
Alongamento		72	2 min
Extensão final	1	72	7 min

4.9 Clonagem, expressão e purificação das proteínas gSG7 e gSG7-2 de *A. albimanus* e gSG7 de *A. darlingi* (Baseado em Alvarenga et al., 2010)

Genes sintéticos otimizados das proteínas gSG7 e gSG7-2 de *A. albimanus* e gSG7 de *A. darlingi* sem a sequência do peptídeo sinal (Figura 6) ligados em vetor Pet17b foram produzidos (BioBasic®) e expressos em *E. coli* BL21 pLys (New England BioLabs®).

Sequência do gene sintético da gSG7 de *A. albimanus* :

```

      10      20      30      40      50      60
|-----|-----|-----|-----|-----|
ATGGCAAACAACCATCCGTACGGTACTGAAGCTGTTCCGTACTATCGATCTGGATGAT      60
TCTAAAAAGAGCTTCTACCTGACCGCAGCTAAATACGGCATCCAGACCCAGCTGCGTGAA      120
CCTATTATCCGTATCGTCGGTGTTATCTGCCATCTACTAAACTGAGCGAAGCGTGTGTT      180
AAAAATATGATTTCCGAGGTGTACGAGATTGAGGGCGACTTCTACTCCAAATTCTCCTAC      240
GCCTGCGAAGACCATGCTCCGTATTCTGTGGAATGTCTGGAAGATGCGCGCGACGACTAT      300
CTGACCCAACTGGTTGAACTGTTTAAAGAAACCAAAAAATGCCTGCGCGAA      351

```

Sequência do gene sintético da gSG7-2 de *A. albimanus*:

```

      10      20      30      40      50      60
|-----|-----|-----|-----|-----|
ATGACTCACGAACACGCTAACAAGATGACCAACATCTTCCGTCTGTAAAGCTGGACAAG      60
ACTAAAAACGCGGTGTACCAGGACTACGTCCAGAAAGGTATCAAAACGCTGCTGAAAGAC      120
CCACTGGTGTCTAAAGCTATGCTGCTGCCTGCATCTAAATCCCTGCCGGATGATTGTCTG      180
AACGCTATGGTTGATGAAGCACGCGAACATGAAAACAAATTCTACGCGGTTTTACCTAC      240
GACTGCCAAGATCACATTCCGACCGCGTTTTCCGTGTCTGGAAGGCGTTGCGACCTAT      300
TATGAAAACCTGAAAGCCCTGGAGAAAAGCACCAGAAAATGCTGCAATATG      351

```

Sequência do gene sintético da gSG7 de *A. darlingi* :

	10	20	30	40	50	60	
ATGGCACATTCTCACATCCGTAAGGTCCTGCAACTGTTCCGTTCTATCGAGCTGGATGAC							60
TCTAAGAAATCCTTCTACCTGACGGCAGCTAAATACGGCATCCAGACCCAGCTGCGTGAA							120
CCACTGGTACGTCTGGTTGGTGGTTTCGCTCCTTCCACTAAACTGTCCGAAGCCTGTGTT							180
AAAAACGCTATTGCGCGCATCTATGAAATTGAAGGCGAATTTTACGCGAAATTCAGCTAC							240
GCCTGTGAGAAATCACGACCCGTACAGCGTGGAATGCCTGGAAGAAGCGCAGGATGACTAT							300
CTGACCAAACCTGGTGGAAGTGTTTAAAGAAACCAAAAAATGCCTGCGCGAG							351

Figura 6: Sequências dos genes sintéticos utilizados para clonagem e expressão de proteínas recombinantes de *A. albimanus* e *A. darlingi*.

As bactérias foram transformadas por choque térmico (mantidas em gelo por 15 minutos, transferidas para banho-maria a 42°C por 30 segundos e, logo em seguida, mantidas em gelo novamente), transferidas para placa de ágar LB contendo ampicilina 100 µg/ml (KD Medical®) e incubadas *overnight* a 37°C. As colônias crescidas foram transferidas para um frasco com 50 ml de meio LB Broth (KD Medical®) contendo 50 µl de ampicilina 100 mg/ml e 50 µl de cloranfenicol 35 mg/ml e incubadas a 37°C *overnight*.

Quatro garrafas com 1 litro de meio LB contendo ampicilina 100 µg/ml e cloranfenicol 35 µg/ml foram semeadas com 10 ml da cultura crescida e incubadas até a concentração de bactérias atingir A₆₀₀ de 0,6 a 0,8. Em seguida as culturas foram induzidas com 1 ml de IPTG 1 M (Invitrogen®) e incubadas a 37°C por 3 horas. Após a incubação, as culturas foram centrifugadas a 7000 rpm por 15 minutos a 10°C e o sobrenadante descartado. O pellet formado foi resolubilizado em 150 ml de TBS e centrifugado da mesma forma. O sobrenadante foi descartado, e o pellet formado congelado a -20°C *overnight*.

Após descongelar, o pellet foi resolubilizado em 150 ml de TBS, sonificado em sonificador de ponta por aproximadamente 1 minuto e centrifugado por 15 minutos a 7000 rpm a 10°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet resolubilizado, sonificado e centrifugado novamente. O pellet formado foi então resolubilizado em 100 ml de TBS contendo 1 g de Triton X-100 (Sigma-Aldrich®) e agitado com barra magnética por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado como anteriormente, o sobrenadante descartado e o pellet resolubilizado em 100 ml de TBS. Esta lavagem foi repetida

mais duas vezes e após a última centrifugação, o pellet foi redissolvido em 50 ml de tampão Tris 20 mM pH 8,0 contendo hidrocloreto de guanidina (Invitrogen®) 6 M e incubado por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação constante. Em seguida, foi adicionado ditioneitol (DTT) (Sigma-Aldrich®) na concentração final de 10 mM e o frasco incubado por 30 minutos sob agitação constante em temperatura ambiente. Após esse período, o material desnaturado pela guanidina e pelo DTT foi adicionado gota a gota a 4 litros de tampão de renovelamento (Trizma 20 mM, arginina 300 mM, dihidrocloreto de cistamina 2 mM, pH 9,2) sempre em agitação com barra magnética e, em seguida, incubado *overnight* a 4°C. As proteínas renoveladas foram concentradas usando aparato de concentração Millipore® pressionado por nitrogênio e filtro de 10 kDa (Millipore Ultracell®) até atingir o volume final de aproximadamente 10 ml.

Para purificação das proteínas, o material foi aplicado em coluna de gel filtração HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR (GE Healthcare®) conectada em aparelho de HPLC (ÄKTA Purifier, GE Healthcare®) e as proteínas coletadas em frações de 4 ml de TBS pH 7,4. Uma alíquota de cada fração foi corrida em SDS-PAGE, corado com Comassie blue. As frações contendo a proteína de interesse foram misturadas e concentradas para aproximadamente 10 ml usando filtro de 10 kDa (Amicon®). As proteínas concentradas foram novamente purificadas usando coluna de gel filtração Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare®) e a pureza da proteína avaliada por SDS-PAGE corado com Comassie blue. As frações contendo a proteína de interesse foram misturadas, concentradas e a concentração final calculada pelo coeficiente de extinção molar de cada proteína.

As proteínas purificadas foram testadas nos ensaios hemolíticos para via alternativa e via clássica, ensaios de deposição de componentes do complemento (C3, Fator B, properdina e C9) e Western blots, como descritos previamente, substituindo o EGS pelas proteínas recombinantes.

4.10 Identificação do inibidor do complemento da saliva de *A. aquasalis*

Em gel de poliacrilamida 12,5% foram corridos 0,5 µg de gSG7 recombinante de *A. albimanus*, 0,5 µg de gSG7 recombinante de *A. darlingi* e 5 µg

de EGS de *A. aquasalis* e o gel corado com prata para visualização das proteínas presentes.

Para a identificação do possível inibidor salivar de *A. aquasalis*, um novo gel foi corrido com 20 µg de EGS dessa espécie e 10 µg de gSG7 recombinante de *A. darlingi* e corado com Comassie blue. A proteína recombinante e uma proteína do EGS de *A. aquasalis* com peso similar foram cortadas do gel com ajuda de bisturi, transferidas para tubos de 1,5 ml e tratadas com bicarbonato de amônio, acetonitrila e iodoacetamina para descorar a banda e desidratar o gel. Em seguida, as proteínas foram submetidas a digestão por tripsina a 37°C *overnight*.

Os peptídeos gerados pela tripsinização foram então sequenciados em aparelho MALDI-TOF-TOF (Bruker®) mantido no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, utilizando o software MASCOT. As sequências dos peptídeos gerados das duas amostras foram comparados com a sequência da gSG7 de *A. darlingi*, utilizando o software UniProt (<http://www.uniprot.org/align/>).

4.11 Western blot e ensaio hemolítico com anticorpo anti-gSG7 de *A. albimanus*

Anticorpos anti-gSG7 foram produzidos pela Spring Valley Laboratories (Woodbine, Maryland, EUA), em coelho imunizado com a proteína recombinante juntamente com adjuvante de Freund's. Após três imunizações, o animal foi sangrado e seu soro foi coletado e enviado ao Laboratório de Pesquisa de Malária e Vetores.

Para purificação de IgG do soro, foi utilizado coluna de proteína A (HiTrap™ 5 ml Protein A HP, GE Healthcare®), seguindo o seu manual de instruções. O IgG purificado foi então testado por Western blot para ver o reconhecimento da proteína recombinante e da proteína presente no EGS. Para isso, quantidade de EGS relativo a 20 glândulas salivares de fêmeas de *A. albimanus* e 0,2 µg da proteína recombinante gSG7 foram corridos em gel de poliacrilamida (4-12%) a 200 V por 30 minutos. Antes de aplicados no gel, o EGS ou a recombinante foram misturados com tampão da amostra e agente redutor e aquecidas por 5 minutos a 95°C.

Após a corrida, as proteínas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose, que foi bloqueada por duas horas com solução bloqueadora (PBS-Tw 0,05% + leite em pó desnatado 10%) em agitação constante. Seguindo o bloqueio, a membrana foi lavada três vezes por cinco minutos com PBS-Tw 0,05% e incubada por uma hora em temperatura ambiente com IgG anti-gSG7 diluído 1:10000 em PBS + 1% BSA. Após mais três lavagens, a membrana foi incubada por uma hora com anticorpo anti-coelho conjugado com peroxidase diluído 1:5000 na mesma solução. Após a incubação, as membranas foram lavadas mais três vezes e a revelação se deu utilizando o kit Peroxidase Substrate DAB (Vector Laboratories®).

Para verificar se o IgG anti-gSG7 de *A. albimanus* reconheceria outras proteínas salivares de outras espécies de mosquitos, foram aplicados e corridos em gel de poliacrilamida 12,5%, 0,5 µg de gSG7 de *A. albimanus*, 0,5 µg de gSG7-2 de *A. albimanus*, 0,5 µg de gSG7 de *A. darlingi*, 5 µg de EGS de fêmeas de *A. aquasalis* e 5 µg de EGS de fêmeas de *Aedes aegypti*. O Western blot foi realizado como descrito acima, utilizando anticorpos primário e secundário diluídos 1:2000.

Para avaliar a capacidade do anticorpo de bloquear a atividade da gSG7 de *A. albimanus*, ensaios hemolíticos foram realizados na presença do IgG anti-gSG7. Em um tubo de 1,5 ml, foram adicionados 12,5 µl de PBS contendo EGS referente a 1 glândula salivar ou gSG7 na concentração de 30 nM (concentração final de 5 nM no tubo) e, em seguida, misturados com 12,5 µl de Mg-EGTA contendo diferentes diluições do IgG anti-gSG7. Após adição de 25 µl de soro diluído 1:20 e 25 µl de hemácias de coelhos na concentração de 1×10^8 céls/ml, o conteúdo dos tubos foi homogeneizado e incubado a 37°C por 30 minutos. Um controle foi adicionado aos experimentos: um tubo com apenas hemácias e IgG anti-gSG7 diluído 1:10 (concentração mais alta testada), para averiguar se o anticorpo por si só afetaria as hemácias. O restante do ensaio se deu como descrito previamente no Item 4.3.

4.12 ELISA para detectar ligação de componentes do complemento aos inibidores salivares de *A. aquasalis* e *A. albimanus*

Placas de ELISA (Costar®) foram sensibilizadas com 0,5 µg de gSG7 ou gSG7-2 de *A. albimanus* ou 5 µg de EGS de *A. aquasalis* em 50 µl de tampão carbonato de sódio 35 mM/bicarbonato de sódio 15 mM pH 9,6 durante incubação *overnight* a 4°C. Poços incubados com BSA 1% foram utilizados como controles negativos.

Os poços foram bloqueados por uma hora com 200 µl de solução de bloqueio (PBS + BSA 1%) em temperatura ambiente sob agitação e, em seguida, incubados com 0,2 µg de cada componente do complemento a ser testado (Fator B, Bb, C3, C3b, Fator D e properdina) em 50 µl de PBS em temperatura ambiente por 30 minutos. Os poços foram então lavados duas vezes com 200 µl de solução de lavagem (PBS-Tw 0,05%) por 2 minutos sob agitação e incubados com 50 µl de solução de bloqueio contendo anticorpo específico para cada componente testado (anti-C3 foi utilizado para detectar C3 e C3b; anti-Fator B, para detectar Fator B e Bb) diluído 1:5000 por 30 minutos em temperatura ambiente sob agitação. Após mais duas lavagens, os poços foram tratados com anticorpo secundário conjugado com peroxidase diluído 1:3000 em solução de bloqueio por 30 minutos em temperatura ambiente e agitação constante. Seguindo a incubação, mais duas lavagens foram realizadas e os poços foram revelados com 200 µl de substrato para peroxidase (OPD e peróxido de hidrogênio em tampão citrato pH 5,0, como descrito nos ensaios de ELISA no Item 4.5) e após 5 minutos a 37°C, as placas foram lidas a 450 nm em leitor de ELISA.

Os ensaios foram realizados em duplicata, com 3 repetições. As médias das absorvâncias das duplicatas de cada componente foram calculadas e comparadas estatisticamente com a média do seu respectivo controle negativo (poço sensibilizado com BSA).

4.13 Ensaio de ressonância plasmônica de superfície

Ensaio de ressonância plasmônica de superfície foram realizados usando aparelho Biacore T100 (GE Healthcare®). As proteínas recombinantes gSG7 e gSG7-2 de *A. albimanus* diluídas em tampão acetato de sódio 10 mM pH 5,0 (20 µg/ml) foram imobilizadas em chips Sensor CM5 (GE Healthcare®) usando grupamento amina, com alvo de imobilização de 1200 unidades de ressonância (RU). Células do chip sem proteína imobilizada foram utilizadas como branco para subtração do efeito do tampão no sensorgrama. Para avaliar a ligação de properdina às proteínas, experimentos de cinética foram realizados com diferentes concentrações de properdina em tampão HBS-P (HEPES 0,01 M, NaCl 0,15 M, Surfactante P20 0.005% v/v, pH 7,4, GE Healthcare®). O tempo de contato das moléculas foi de 120 segundos em fluxo de 30 µl/min a 25°C. A dissociação do complexo properdina-gSG7 foi monitorada por 400 segundos e a superfície do chip foi regenerada com um pulso de 10 segundos de tampão glicina 10 mM.

Os sensorgramas foram montados usando o modelo 1:1 de ligação de Langmuir das fases de associação e dissociação simultaneamente, usando o software Biacore Evaluation v2.0.3 (GE Healthcare®). A constante de afinidade (KD) foi calculada a partir da razão das constantes das taxas de dissociação e associação (kd/ka).

4.14 Análise estatística

Os cálculos estatísticos foram realizados com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0. Em todos os experimentos, pelo menos três repetições independentes foram feitas. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. As variáveis com distribuição normal foram analisadas através do teste T pareado (no caso de 2 grupos) ou pelos testes ANOVA e Teste de Tukey (no caso de mais de 2 grupos). Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo (*).

5. Resultados

5.1 Quantificação de proteínas dos EGS das espécies de *Anopheles* estudadas

A concentração de proteínas no extrato de glândulas salivares dos anofelinos em estudo foi medida por teste de Bradford ou pelo kit BCA. As médias e desvios padrões das concentrações de proteínas totais no EGS de *A. albimanus*, *A. aquasalis*, *A. dirus*, *A. freeborni*, *A. gambiae* e *A. stephensi* foram, respectivamente, $0,75 \pm 0,02$ µg/glândula, $0,75 \pm 0,05$ µg/glândula, $0,59 \pm 0,1$ µg/glândula, $0,83 \pm 0,04$ µg/glândula, $0,56 \pm 0,04$ µg/glândula, e $0,71 \pm 0,08$ µg/glândula.

5.2 Ensaio hemolíticos

5.2.1 Via alternativa

Conforme demonstrado na Figura 7, o EGS de *A. albimanus*, *A. aquasalis* e *A. freeborni* foi capaz de inibir a atividade hemolítica provocada pela via alternativa de forma dose-dependente e estatisticamente significativa. Curiosamente, o EGS de *A. gambiae*, *A. dirus* e *A. stephensi* não apresentou nenhuma atividade sobre a hemólise provocada pelo complemento, mesmo com quantidade de EGS referente a 15 glândulas salivares.

Quando tratado com aquecimento por fervura ou proteinase K, o EGS referente a 4 glândulas de *A. albimanus* perdeu a atividade inibidora da via alternativa (Figura 8).

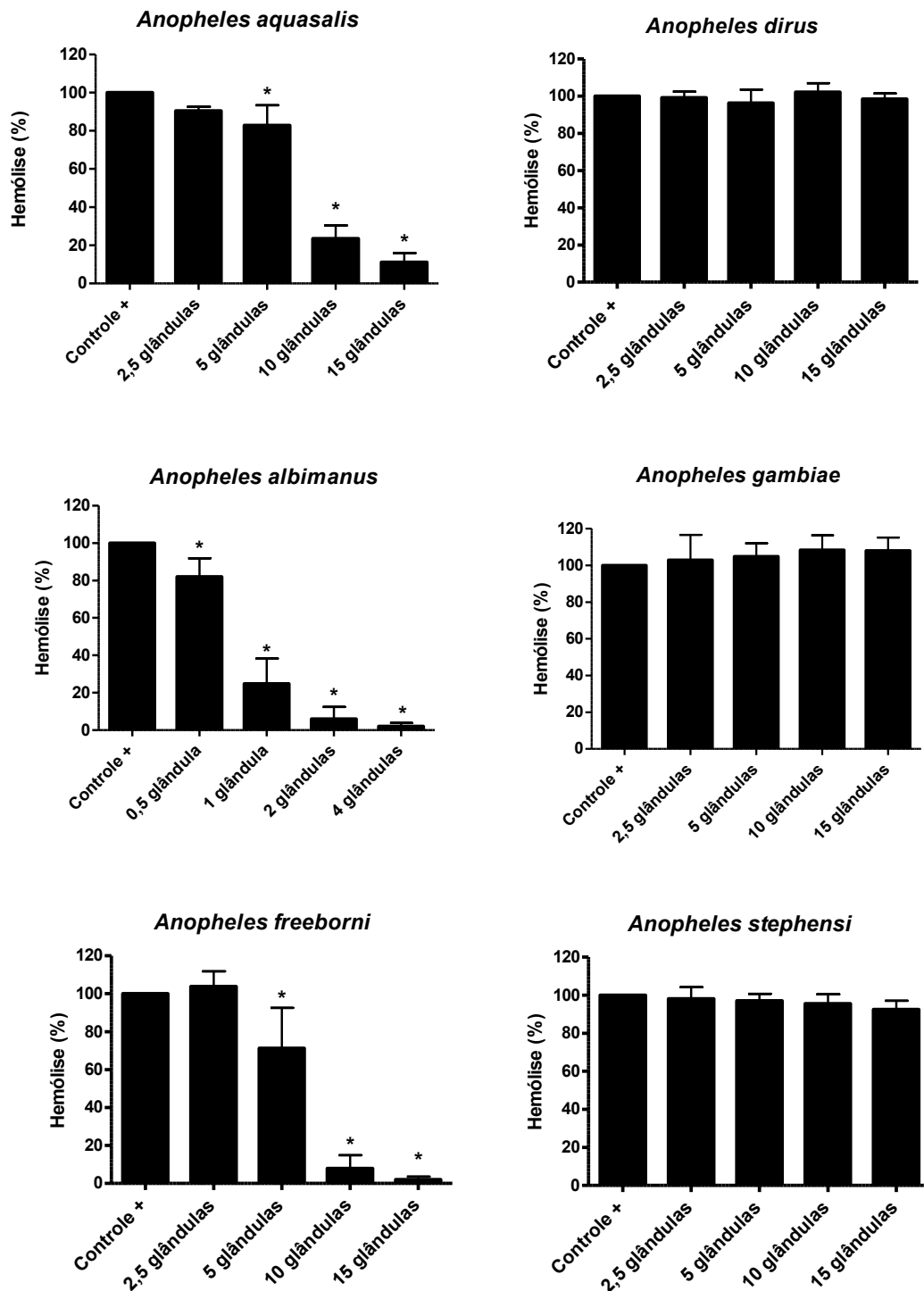


Figura 7: Ação do extrato de glândulas salivares de seis espécies de *Anopheles* sobre a via alternativa do sistema complemento humano. O EGS de *A. aquasalis*, *A. albimanus* e *A. freeborni* foi capaz de inibir a hemólise de forma dose-dependente e estatisticamente significativa em relação ao controle sem inibidor (ANOVA + Teste de Tukey. * $p < 0,05$). As barras verticais representam média + desvio padrão das repetições.

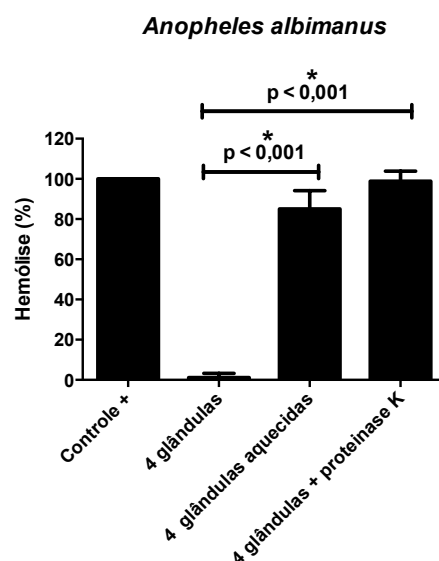


Figura 8: Efeito de tratamentos desnaturantes sobre a atividade inibidora da via alternativa do EGS de *A. albimanus*. Quando tratado com aquecimento em água fervente ou com digestão por proteinase K, o EGS perdeu sua atividade (ANOVA + Teste de Tukey). As barras verticais representam média + desvio padrão das repetições.

5.2.2 Via clássica

O EGS de *A. gambiae* e *A. albimanus* não foi capaz de inibir a atividade hemolítica provocada pela via clássica do sistema complemento humano (Figura 9). Quando saliva de *A. aquasalis* foi testada, observamos uma leve inibição com diferença estatística significativa apenas quando quantidade de saliva referente a 10 glândulas foi utilizada ($p = 0.03402$) (Figura 9).

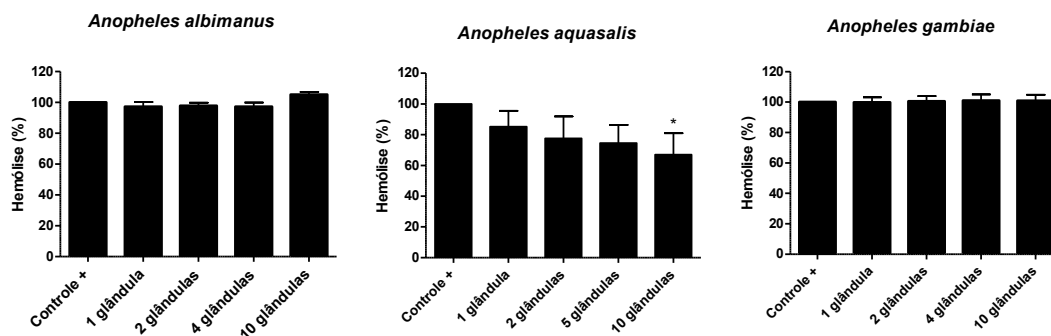


Figura 9: Ação do EGS de *A. albimanus*, *A. aquasalis* e *A. gambiae* sobre a via clássica do sistema complemento. ANOVA + Teste de Tukey. * $p < 0,05$. As barras verticais representam média + desvio padrão das repetições.

5.3 Ensaio de ativação da via das lectinas

O EGS de *A. albimanus* não apresentou atividade inibitória sobre a deposição de C3b da via das lectinas, mesmo com concentrações referentes a 10 glândulas salivares (Figura 10).

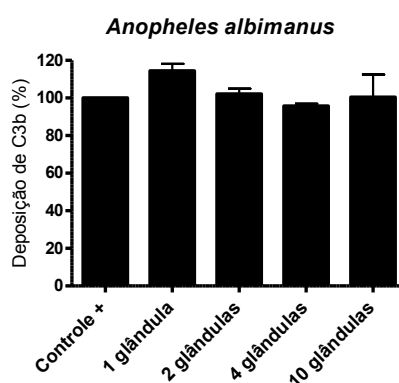


Figura 10: Efeito do extrato de glândulas salivares de *A. albimanus* sobre a via das lectinas. As barras verticais representam média + desvio padrão das repetições.

5.4 Ensaio de deposição de componentes da via alternativa

Tanto o EGS de *A. aquasalis* como o de *A. albimanus* foram capazes de provocar inibição dose-dependente e estatisticamente significativa da deposição de C3b e Fator B da via alternativa (Figura 11). No caso de *A. albimanus*, EGS

referente a 0,5 glândula salivar já foi suficiente para causar inibição significativa tanto de C3b como de Fator B ($p < 0,0001$). A deposição de properdina foi testada apenas na presença de EGS de *A. aquasalis* e apresentou ação inibitória forte e dose-dependente (Figura 11).

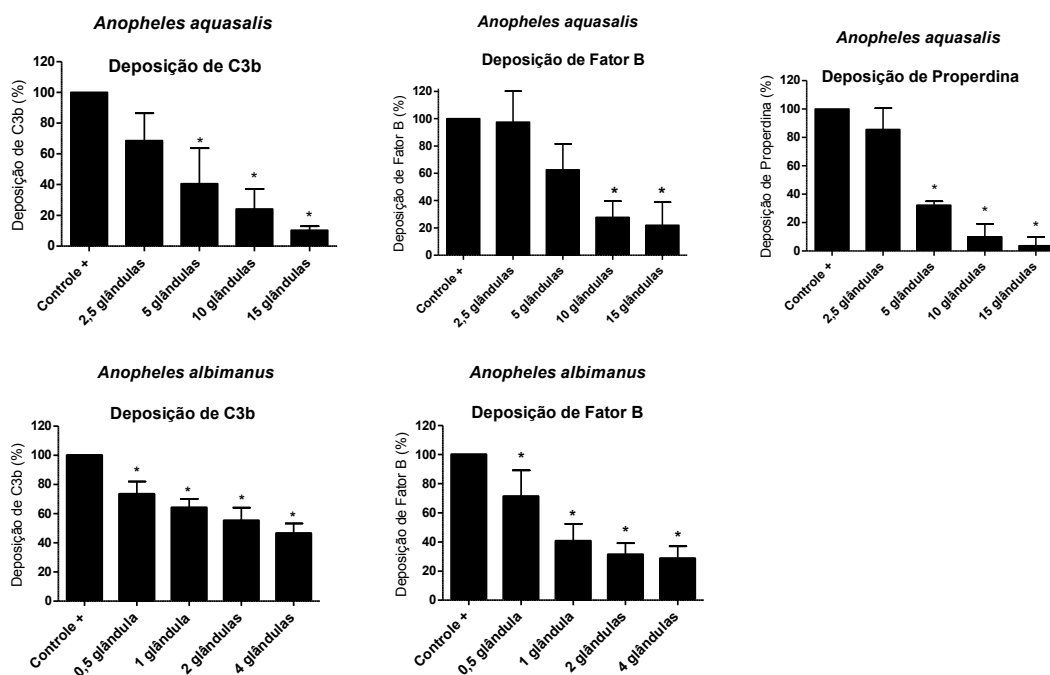


Figura 11: Ação do EGS de *A. aquasalis* e *A. albimanus* sobre a deposição de componentes da via alternativa do sistema complemento. O EGS provocou inibição dose-dependente da deposição de C3b, Fator B e Properdina (ANOVA + Teste de Tukey. * $p < 0,05$). As barras verticais representam a média e desvio padrão das repetições.

O EGS de *A. aquasalis* foi testado em ensaio de desligamento de componentes da via alternativa previamente depositados em placas cobertas com agarose. Como observado na Figura 12, não houve diferença estatística na deposição de componentes de C3b e Fator B após a incubação com o EGS.

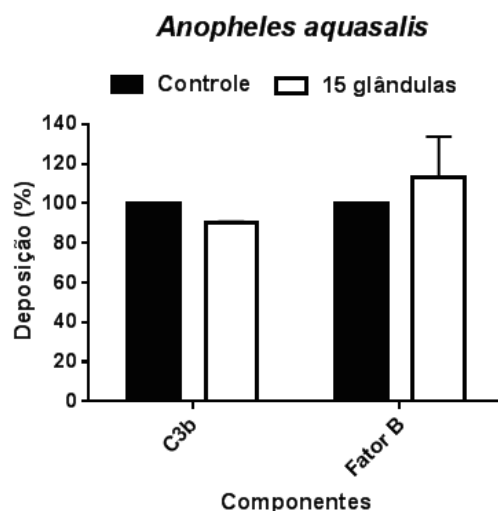


Figura 12: Efeito do EGS de *A. aquasalis* sobre componentes da via alternativa previamente depositados em superfície ativadora. As barras verticais representam a média + desvio padrão das repetições.

5.5 Western blot para detecção de Fator B e C3a

O efeito do EGS de *A. aquasalis* e *A. albimanus* na ativação de Fator B e C3 foi observado através de Western blot utilizando anticorpos específicos para cada componente. Na presença do EGS das duas espécies, houve inibição da ativação de Fator B (Figura 13), pois não houve o surgimento da banda referente a Bb (produto da ativação do Fator B), como observado no controle positivo, em que foi acrescentado apenas PBS, sem EGS.

O EGS das duas espécies também foi capaz de inibir a ativação do componente C3. Na presença do extrato de glândulas, não houve aparecimento da banda referente a C3a, produto da ativação do componente C3, após 30 e 60 minutos de incubação a 37°C (Figura 14).

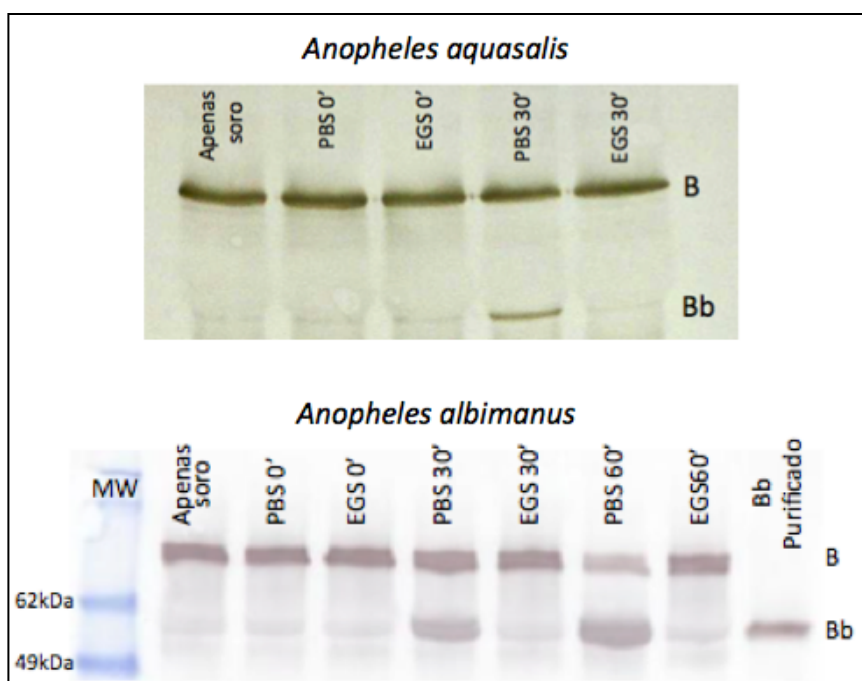


Figura 13: Ação do EGS de *A. aquasalis* e *A. albimanus* na ativação do Fator B. Ambas as espécies inibiram a ativação do componente, não havendo surgimento da banda referente ao componente Bb (produto da ativação de Fator B), após 30 e 60 minutos de incubação a 37°C.

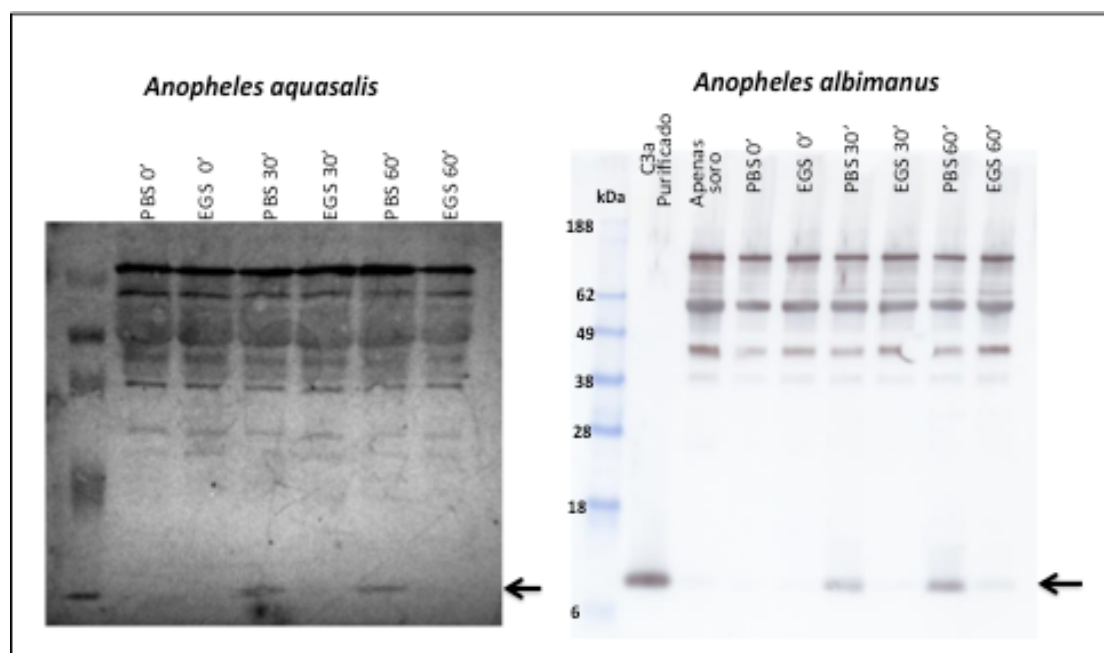


Figura 14: Ação do EGS de *A. aquasalis* e *A. albimanus* na ativação do componente C3. Ambas as espécies inibiram a ativação do componente, não havendo surgimento da banda referente ao peptídeo C3a (indicado pela seta), após 30 e 60 minutos de incubação a 37°C.

5.6 Western blot com C3b, Fator B e Fator D purificados

Para investigar se o EGS de *A. albimanus* interfere diretamente na formação da C3-convertase da via alternativa, formou-se este complexo enzimático artificialmente através da incubação a 37°C dos componentes purificados, na presença e ausência do EGS. Com o conteúdo do tubo em diferentes tempos de incubação, foi realizado Western blot usando anticorpo anti-Fator B. Conforme demonstrado na Figura 15, o EGS não interferiu na ativação do Fator B, sendo possível a detecção dos produtos do Fator B, Bb e Ba após 20 e 40 minutos de incubação, mesmo na presença do extrato de glândulas.

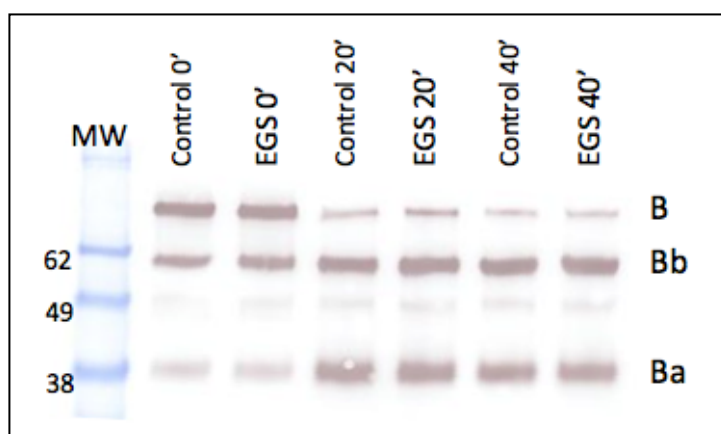


Figura 15: Ação do EGS de *A. albimanus* na formação da C3-convertase com componentes C3b, Fator B e Fator D purificados. O EGS não inibiu a ativação do Fator B, sendo observado as bandas referentes aos produtos da ativação do Fator B (Bb e Ba) tanto nas canaletas com e sem EGS.

5.7 Purificação do inibidor salivar de *A. albimanus*

A cromatografia de fase reversa em aparelho de HPLC foi utilizada para purificar o inibidor da via alternativa presente no extrato de 200 glândulas salivares de *A. albimanus*. O cromatograma gerado apresentou cerca de 10 picos de proteínas, separadas de acordo com a hidrofobicidade (Figura 16-A).

Uma alíquota de cada fração a partir do primeiro pico foi testada no ensaio hemolítico e quatro frações seguidas (frações 1H11, 1H12, 2A1 e 2A2) apresentaram atividade anti-via alternativa (Figura 16-B). Sobrepondo o

resultado do ensaio hemolítico ao cromatograma, observou-se que o inibidor foi eluído em um pico específico, em torno do 24^o ml de coleta (Figura 16-C).

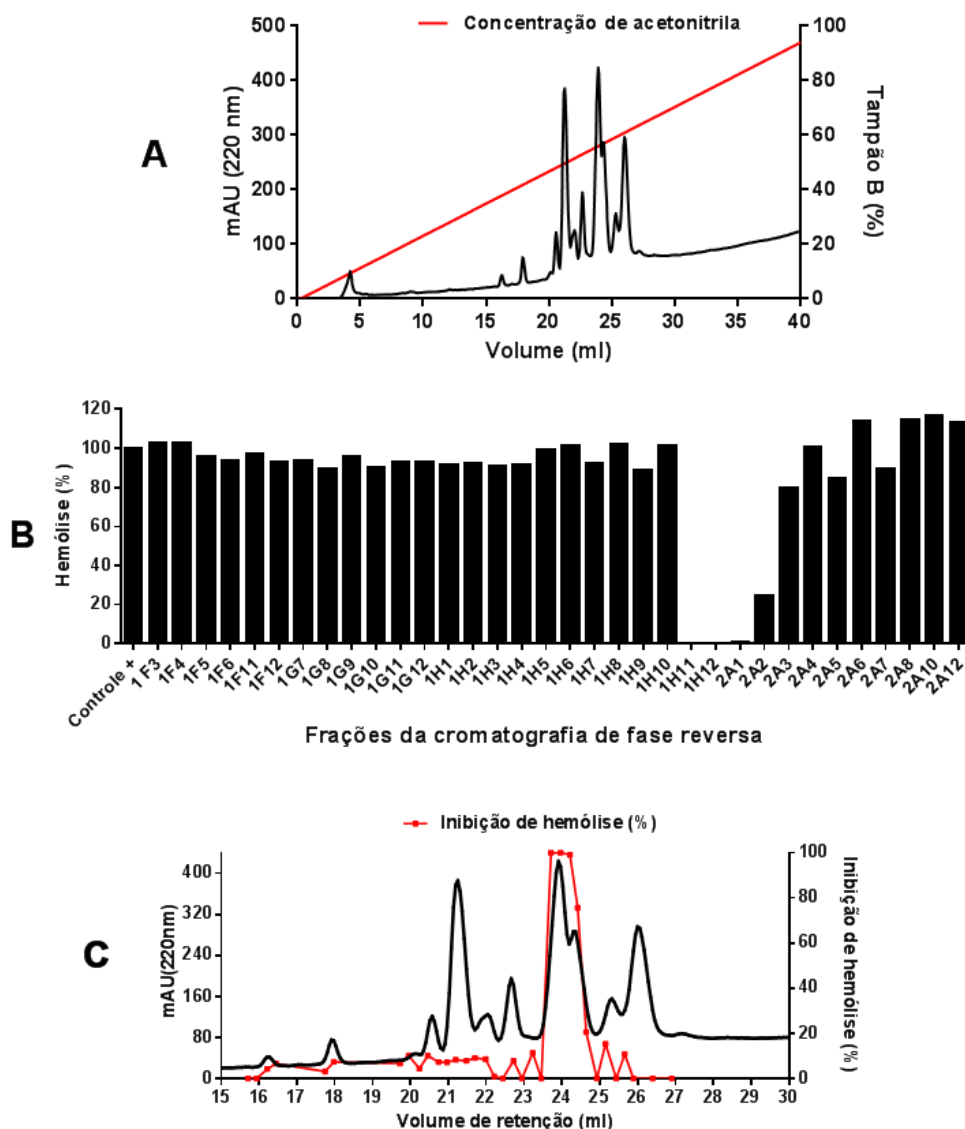


Figura 16: Purificação do inibidor da via alternativa presente no EGS de *A. albimanus*. A: Cromatograma do EGS aplicado em coluna de fase reversa e eluído contra gradiente de acetonitrila. B: Ação das frações da cromatografia na ativação da via alternativa. Quatro frações apresentaram atividade anti-complemento. C: Sobreposição do resultado do ensaio hemolítico ao cromatograma da purificação com coluna de fase reversa. O inibidor foi eluído em apenas um pico específico.

As frações com atividade e suas adjacentes foram corridas em gel de poliacrilamida e coradas com a prata. O resultado indicou duas bandas mais abundantes nas frações com maior atividade (1H11, 1H12 e 2A1): uma pouco maior que 62 kDa e outra menor, entre 6 e 14 kDa (Figura 17).

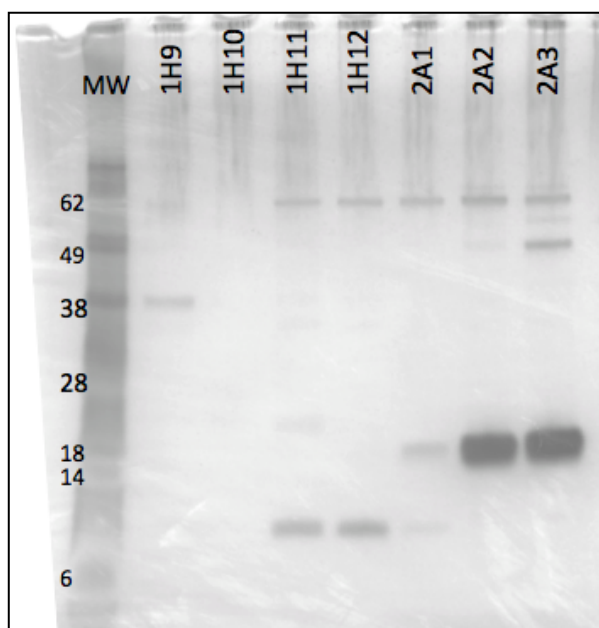


Figura 17: SDS-PAGE com frações da cromatografia de fase reversa do EGS de *A. albimanus*. As frações com atividade anti-complemento (1H11, 1H12 e 2A1) apresentaram duas bandas mais intensas: uma em torno de 62 kDa e outra entre 6 e 14 kDa.

O resultado da espectrometria de massa da fração 1H12 indicou nove proteínas salivares de *A. albimanus*, apresentadas no Quadro 2.

Como observado na Figura 18, as proteínas AALB001854-PA e AALB009922-PA foram as mais abundantes na fração. A AALB009922-PA tem peso molecular aproximado de 72 kDa, o que sugere ser a banda maior detectada no gel (alinhada logo acima do marcador de 62 kDa). Entretanto, a AALB001854-PA identificada na espectrometria de massa tem peso molecular aproximado de 30,7 kDa, em discordância com o tamanho observado da outra banda mais intensa no gel, localizada entre os marcadores de 6 e 14 kDa (Figura 17).

Quadro 2: Proteínas salivares de *A. albimanus* identificadas na fração 1H12 submetida a espectrometria de massa

Proteína	Peso molecular aproximado	Peptídeo sinal
AALB009922-PA	71,9 kDa	-
AALB001305-PA	36,5 kDa	+
AALB009827-PA	197,5 kDa	+
AALB001854-PA	30,7 kDa	+
AALB001605-PA	58,0 kDa	-
AALB005083-PA	89,6 kDa	+
AALB010753-PA	23,7 kDa	-
AALB000058-PA	26,0 kDa	+
AALB007557-PA	13,3 kDa	+

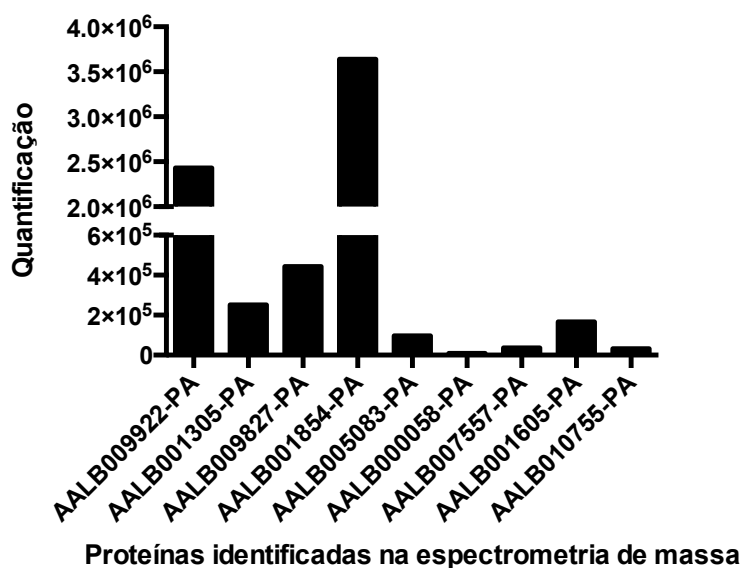


Figura 18: Quantificação das proteínas salivares de *A. albimanus* identificadas por espectrometria de massa da fração purificada 1H12, que apresentou atividade anti-complemento.

Para confirmar o resultado da espectrometria de massa, corremos novamente as frações com atividade em gel de poliacrilamida, coramos com prata e submetemos apenas a banda menor (entre 6 e 14 kDa) da fração 1H12 à espectrometria de massa. O resultado indicou que a banda corresponde

realmente à proteína AALB001854-PA. Usando a sequência desta proteína disponível no VectorBase, fizemos BLASTp no site do NCBI contra outros anofelinos e vimos que esta proteína tem alta similaridade (*e-value* de 5e-32 a 2e-41) com a proteína salivar gSG7 de *A. darlingi*, *A. funestus*, *A. gambiae*, *A. sinensis* e *A. stephensi*.

No banco de dados do VectorBase, o gene AALB001854 desta proteína apresenta seis éxons, com um longo íntron no meio da sequência, conforme demonstrado na Figura 19. Entretanto, ao analisarmos mais cuidadosamente a sequência, notamos que, na verdade, se trata de dois genes distintos, que provavelmente foram anotados erroneamente como sendo um só no genoma de *A. albimanus*. O primeiro gene começa realmente no *start* códon do gene anotado, mas termina em *stop* códon (TAA) um pouco depois do final do terceiro éxon (Figura 20). Já o segundo gene, começa no *start* códon um pouco antes do que seria o quarto éxon do gene anotado (Figura 20) e termina no *stop* códon (TAA) como anotado previamente.

TCCATGTCTACCAAAGACACCTTCCCCTTTACACGACACCAGTGATTGCCAGAAATGTC
CGATGTCACACAACAAACATCAACAATGGGGTCCAACTGATTATGGAAGTTATAATTTTA
TTTACAACGCCAGCAGTACTACCATAACTTTGTGCACGCTCCTCCTGGCTGTGGCGTTG
ACTGTGGCTTGTGGTGCATGTGGAGGTACTGGCCGGAGGTTGGCTTGGTTTCCCCTTTC
CCCAGTCTCCTCACTTGCAACCATTTCATCAAAGTCACACAACATTTACTCAACCATGGTC
GGTGTGAAACAGTTGGAGAGGAGTGCACCAGCAGTGATTGTACAAACAAGCAGTTTCCGT
TTGTATTTAATTCAACTCTCTGTCTCCTAGCTTCCCTCTTCTCTCTCTCTCTCTCTC
TCTTTCTGTCTCTCTGGATATCTTCAACTCTCATCCCATCCGACCTTTGGCGAAACACTT
GCGTAAACAGTTACTTCTTACAGCGAATGCTCGTGAGGAAATAAAAAGGGAATCCATTA
GCAATGGGAACCGGAGAAGTTGCTGGAAGTTAACCAATTATACCTGGAGTTCCTAATAGG
ATGGCCGTTAGAATGACAGTCATATTGCCGTTGGCAATGGCCTTGATCTGCCTGATGCAG
GATATGCAGCGCCTTTCGGCGCCCTTACTACATCATTCAATGCATAATTTTCGCTTCCGAT
TATTCACCTTGCTAG**GCTGAACCAGCTACGGCGGCAAAATAACCACATCAGGACCGTTCTGA**
AGCTCTTCCGCACCATTGATCTGGACGATTGAAAAAGAGCTTCTACCTAACAGCAGCCA
AGTATGGCATCCAGACGCAGCTTCGGAACCGATCATTGGAATCGTTGGAGGCTATCTTC
CATCCACTAAG**GTATGTCTATTTCGATGATGCTCTGTGATCATTAGTATCTGATCCAAC**
CGGGTCACTTGCG**CTATCAGAAGCATGCGTGAAGAAATGATCAGCGAGGTATACGAAA**
TAGAAGGCGACTTTTACTCCAAGTTCAGCTACGCGTGTGAAGACCATGCTCCCTACTCGG
TCGAATGCCTGGAGGACGCTAGGGACGACTACCTCACCCAACTGGTGGAGCTGTTCAAGG
AAACCAAGAAAT**GTTTGCGGGAATAAGATGAAGTATGTGACAACTAAAATGCAGATAAA**
CCAATAAACTGTATGCAAAGCGCATGTTCCGGTACATGGAATTATGATTGAGTTGATTGC
TTGAAACATGAGGTTTCTGTGAAGAACAGCAGGGCCTCCAAACAATATTCTATGGAAGCA
TTGACTAATGGTGTCTTAACTGGAACATTTATTACTTTGTCTGCATGTCAGCATTGA
CCTCAGAATGTATTGTTTCGTTCCATTCTGCCAATTTTCAGAACACCAGCTTCCCAACGA
GCTTCATTATTTCCCGAAGAGCGGATTCCCCCAGAGACCGACAACAGTCTTGTATTATGA
GGGATGGGATCAATATTGAGAAAGGTTTCATCATCGTCCGATCCAGGTTTGTCTACCTGGC
ATCCTATCCCATCAACCTGATACCCTATCCTGCAGAAAGTAATTGCATCAAGGCATGGTT
TCTGTTTGCCTCACAGCTAGAGATAGGTGAGCAATCATTTGGTCTGGGACTGGGCTCCA
TGCACCCTTTCTAACAAATCATTTCGACGGGGAAAAACAGTATAAGTGTAGCAATTGAACG
GAATTCATTCAATCCAGTGTGATTGTGCATCAGGATGGAACCTATTGGTACTAATGTT
GTAATGTTAG**CCGCATTTCGATTGATCAGCATAATGCAG****GTACTGGAAATGCGACGTAGC**
AGTGCTTTTCAGATACAGTACCTTCCTTGTAACCTGTCGTGATTATTGGGTTACTTCCAGT
TCAATGCCATCGATGCGACACACGAGCACGCCAACAAATGACAAACATCTTCAGGCGCG
TCAAGCTAGATAAAACGAAAAACGCAGTTTATCAAGATTACGTCCAGAAGGGAATCAAGA
CGCTGCTGAAGGATCCGCTCGTCTCGAAGGCAATGCTTCTGCCGGCCAGCAAATCG**GTAA**
GCTGAATCGGTTAACTTCGACCTCCGATCCAGTTAGTGTACTAGCTCCCTTTACTCCGT
TATTTAAG**CTTCCCGACGACTGCCTAAACGCCATGGTGGACGAAGCGAGAGAGCATGAGA**
ACAAGTTCACGCGGTTTTTACGTACGACTGCCAAGATCACATCCCCACAGCTTTCCCAT
GCTTGGAAGGGAGTAGCCACGTACTATGAGAACCTGAAAGCGCTGGAAAAATCCACTG
AAAAGTGTGCAACATGTAA**TAGCCGCTTTACCACTTTTATGATGACGATGATGATGATG**
TAAATGGTGATTGTGTTAGCATGAAATACAATGAAAATATCACAGGCAAAATTGAATGATT
GCTGTCCATTTTATCTCTCAAAACAATTTCCGATTTTCTCCCCAAAAAATAAGAAC
CGGCCATTTCGTTGTGATGGTTGGAGCACGATTCCGAGTACACTGTGACAGTTTTTGTCT
CAACCAACCGGGCGCAGATAGACTGGAAAAATTAATAAAACAAATCCTCACCCCGGAATA
TCACTGAAAGCCTCCGATGAGCCGTTGGCACGTAAACGAATCCATGAAAAAAGGGGTTG
ATTTGTGGACCATCGCAAAAAGCCACAGTCAACGGAACGTCCACCCAGGCCAGCTCAC
CCAGTGGATCATCGGGTCCACGGTCAGTTCAACCATTCTCGCTTATTCGTTCTCCAACAG
AAAGGGCTGGAAAAACGAGCAGAAGTTATTAATAATGCCACATCGAAGGGACTCTCC
CAATGAAGGAAGCACGATCCTCACGGAAAAACAATAGCTCTTACGTCCTCAGCTGGC
AAAAAACAATGGCC

Figura 19: Sequência do gene AALB001854 disponível no VectorBase.org.
Em destaque, as regiões da sequência apresentadas como codificadoras.

TCCATGTCTACCAAAGACACCTTCCCCTTTACACGACACCAGTGATTGCCAGAAATGTC
CGATGTCACACAACAAACATCAACAATGGGGTCCAACTGATTATGGAAGTTATAATTTTA
TTTACAACGCCAGCAGTACTACCATAACTTTGTGCACGCTCCTCCTGGCTGTGGCGTTG
ACTGTGGCTTGTGGTGCATGTGGAGGTACTGGCCGGAGGTTGGCTTGGTTTCCCCTTTC
CCCAGTCTCCTCACTTGCAACCATTTCATCAAAGTCACACAACATTTACTCAACCATGGTC
GGTGTGAAACAGTTGGAGAGGAGTGCACCAGCAGTGATTGTACAAACAAGCAGTTTCCGT
TTGTATTTAATTCAACTCTCTGTCTCCTAGCTTCCCTCTTCTCTCTCTCTCTCTCTC
TCTTTCTGTCTCTCTGGATATCTTCAACTCTCATCCCATCCGACCTTTGGCGAAACACTT
GCGTAAACAGTTACTTCTTACAGCGAATGCTCGTGAGGAAATAAAAAGGGAATCCATTA
GCAATGGGAACCGGAGAAGTTGCTGGAAGTTAACCAATTATACCTGGAGTTCCTAATAGG
ATGGCCGTTAGAATGACAGTCATATTGCCGTTGGCAATGGCCTTGATCTGCCTGATGCAG
GTATGCAGCGCCTTTCGGCGCCCTACTACATCACATTCAATGCATAATTTTCGCTTCCGAT
TATTCACCTTGCTAG**GCTGAACCAGCTACGGCGGCAATAACCACATCAGGACCGTTCTGA**
AGCTCTTCCGCACCATTGATCTGGACGATTGAAAAAGAGCTTCTACCTAACAGCAGCCA
AGTATGGCATCCAGACGCAGCTTCGGAACCGATCATTCGAATCGTTGGAGGCTATCTTC
CATCCACTAAGGTATGTCTATTTCGATGATGCTCTGTGATCACATTAGTATCTGATCCAAC
CGGGTCACTTGCG**CTATCAGAAGCATGCGTGAAGAATATGATCAGCGAGGTATACGAAA**
TAGAAGGCGACTTTTACTCCAAGTTCAGCTACGCGTGTGAAGACCATGCTCCCTACTCGG
TCGAATGCCTGGAGGACGCTAGGGACGACTACCTCACCCAACTGGTGGAGCTGTTCAAGG
AAACCAAGAAATGTTTTCGGGAATAGATGAAGTATGTGACAACTAAAATGCAGATAAA
CCAATAAACTGTATGCAAAGCGCATGTTCCGGTACATGGAATTATGATTGAGTTGATTGC
TTGAAACATGAGGTTTCTGTGAAGAACAGCAGGGCCTCCAAACAATATTCTATGGAAGCA
TTGACTAATGGTGTCTTAACTGGAACATTTATTACTTTGTCTGCATGTCAGCATTGA
CCTCAGAATGTATTGTTTCGTTCCATTCTGCCAATTTTCAGAACACCAGCTTCCCAACGA
GCTTCATTATTTCCCGAAGAGCGGATTCCCCCAGAGACCGACAACAGTCTTGTATTGA
GGGATGGGATCAATATTGAGAAAGGTTTCATCATCGTCCGATCCAGGTTTGTCTACCTGGC
ATCCTATCCCATCAACCTGATACCCTATCCTGCAGAAAGTAATTGCATCAAGGCATGGTT
TCTGTTTGCACCTCACAGCTAGAGATAGGTGAGCAATCATTTGGTCTGGGACTGGGCTCCA
TGCACCTTTCTAACAAATCATTTCGACGGGGAAAAACAGTATAAGTGTAGCAATTGAACG
GAATTCATTCAATCCAGTGTGATTGTGCATCAGGATGGAACCTATTGGTACTAATGTT
ATGTTAGCCGATTTCATTGATCAGCATAATGCAGGTACTGGAAATGCGACGTAGC
AGTGCTTTTCAGATACAGTACCTTCTTGTAACTGTCTGATTATTGGGTTACTTCCAG**T**
TCAATGCCATCGATGCGACACACGAGCAGCCAAACAAATGACAAACATCTTCAGGCGCG
TCAAGCTAGATAAAACGAAAAACGCAGTTTATCAAGATTACGTCCAGAAGGGAATCAAGA
CGCTGCTGAAGGATCCGCTCGTCTCGAAGGCAATGCTTCTGCCGGCCAGCAAATCGGTAA
GCTGAATCGGTTAACTTCGACCTCCGATCCAGTTAGTGTACTAGCTCCCTTTACTCCGT
TATTTAAG**CTTCCCGACGACTGCCTAAACGCCATGGTGGACGAAGCGAGAGAGCATGAGA**
ACAAGTCTACGCGGTTTTTACGTACGACTGCCAAGATCACATCCCCACAGCTTTCCCAT
GCTTGAAAAAGGGAGTAGCCACGTACTATGAGAACCTGAAAGCGCTGGAAAAATCCACTG
AAAAGTGTGCAACATGTAATAGCCGCTTTTACCCTTTTATGATGACGATGATGATGATG
TAAATGGTGATTGTGTTAGCATGAAATACAATGAAATATCACAGGCAAAATTGAATGATT
GCTGTCCATTTTATTCTCAAAACAATTTCCGATTTTCTCCCCAAAAAATAAGAAC
CGGCCATTTCGTTGTGATGGTTGGAGCACGATTCCGAGTACACTGTGACAGTTTTTGTCTC
CAACCAACCGGGCGCAGATAGACTGGAAAAATTAATAAAACAAATCCTCACCCCGGAATA
TCACTGAAAGCCTCCGATGAGCCGTTGGCACGTAAACGAATCCATGAAAAAAGGGGTTG
ATTTGTGGACCATCGCAAAAAGCCACAGTCAACGGAACGTCCACCCAGGCCAGCTCAC
CCAGTGGATCATCGGGTCCACGGTCAGTTCAACCATTTCTCGCTTATTCGTTCTCCAACAG
AAAGGGCTGGAAAAACGAGCAGAAGTTATTAATAAATGCCACATCGAAGGGACTCTCC
CAATGAAGGAAGCAGATCCTCACGGAAAAACAATAGCTCTTACGTCCTCAGCTGGC
AAAAAAAAAAAAACAATGGCC

Primeiro gene

Segundo gene

Figura 20: Sequências dos dois genes anotados como gene AALB001854 de *A. albimanus*. As letras vermelhas representam os éxons das sequências. A região destacada em amarelo marca o final do primeiro gene e o início do segundo.

O primeiro gene codifica a proteína denominada de gSG7, cuja sequência está descrita na Figura 21. Ela apresenta peptídeo sinal, com sítio de clivagem entre o 26º e 27º aminoácido. A proteína secretada (sem peptídeo sinal), tem peso molecular de 13,4 kDa, é composta por 116 aminoácidos e ponto isoelétrico 5,39.

**MAVRMTVILPLAMALICLMQAEPATAA²⁶NNHIRTVLKLFRTIDLDDSKKSFYLT
AAKYGIQTQLREPIIRIVGGYLPSTKLSEACVKNMISEVYEIEGDFYSKFSYA
CEDHAPYSVECLEDDARDDYLTQLVELFKETKKCLRE**

Figura 21: Sequência da proteína salivar gSG7 de *A. albimanus*. Em vermelho está representado o sítio de clivagem do peptídeo sinal, entre o 26º e 27º aminoácido.

Já o segundo gene codifica a proteína denominada de gSG7-2, mostrada na figura 22. Esta proteína também apresenta peptídeo sinal, sendo o sítio de clivagem entre o 18º e o 19º aminoácido. Sem o peptídeo sinal, a gSG7-2 tem peso molecular de 13,3 kDa, é composta por 116 aminoácidos e tem ponto isoelétrico 7,72.

**MLAAFALISIMQFNAIDAT¹⁸HEHANKMTNIFRRVKLDKTKNAVYQDYVQKGIKT
LLKDPLVSKAMLLPASKSLPDDCLNAMVDEAREHENKFYAVFTYDCQDHIPTA
FPCLEKGVATYYENLKALEKSTKCCNM**

Figura 22: Sequência da proteína salivar gSG7-2 de *A. albimanus*. Em vermelho está representado o sítio de clivagem do peptídeo sinal, entre o 18º e 19º aminoácido.

As proteínas gSG7 e gSG7-2 de *A. albimanus* apresentam apenas 32,6% de similaridade e, interessantemente, os peptídeos gerados na digestão por tripsina para análise por espectrometria de massa da proteína salivar de *A. albimanus* recuperada do gel apresentaram similaridade apenas com fragmentos da primeira proteína (gSG7), conforme demonstrado na Figura 23.

A.albimanus_gSG7	MAVRMTVILPLAMALICLMQAEPATAANNHIRTVLKLFRTIDLDDSKKSFYLTAAKYGIQ	60
Pep1	-----KYGIQ	5
Pep2	-----	
Pep3	-----KSFYLTAAKY---	10
Pep4	-----RTIDLDDSKS-----	11
Pep5	-----RTIDLDDSKK-----	10
Pep6	-----KYGIQ	5
A.albimanus_gSG7	TQLREPIIRIVGGYLPSTKLSEACVKNMISEVYEIEGDFYSKFSYACEDHAPYSVECLEL	120
Pep1	TQLRE-----	10
Pep2	-----RIVGGYLPSTKL-----	12
Pep3	-----	
Pep4	-----	
Pep5	-----	
Pep6	TQLREPIIRI-----	15
A.albimanus_gSG7	ARDDYLTQLVELFKETKKCLRE	142
Pep1	-----	
Pep2	-----	
Pep3	-----	
Pep4	-----	
Pep5	-----	
Pep6	-----	

Figura 23: Alinhamento das sequências dos peptídeos gerados pelo tratamento com tripsina da proteína salivar recuperada do gel com a sequência da gSG7 de *A. albimanus* obtida no VectorBase.

No NCBI, acessamos a sequência da gSG7 de *A. darlingi* (GenBank: ACI30142.1) e vimos que ela também tem peptídeo sinal (entre os aminoácidos 26 e 27 da sequência), tem peso molecular de 13,4 kDa, é composta por 116 aminoácidos e ponto isoelétrico 7,77 (Figura 24).

**MAARMTIMLPLAVALICLLQTEPGMAAHSHIRKVLQLFRSIELDDSKKSFYLT
AAKYGIQTQLREPLVRFAGGFAPSTRLSEACVKNAIARIYEIEGEFYAKFSYA
CENHDPYSVECLEEAQDDYPTKLGELFKKTKKCLRE**

Figura 24: Sequência da proteína salivar gSG7 de *A. darlingi*. Em vermelho está representado o sítio de clivagem do peptídeo sinal, entre o 26º e 27º aminoácido.

Comparando as sequências das gSG7s de *A. albimanus* e *A. darlingi*, pudemos ver que as mesmas apresentam 75% de similaridade (Figura 25). Já quando comparada com as sequências de gSG7s de *A. gambiae* (GenBank: CAC35523.1), *A. funestus* (GenBank: ABI83776.1), *A. sinensis* (GenBank: KFB36874.1) e *A. stephensi* (GenBank: AA006828.1), a proteína de *A. albimanus* apresentou apenas cerca de 40% de similaridade (Figura 25).

O produto da PCR corrido no gel apresentou apenas uma banda, em torno de 500 pares de base (Figura 26), compatível com o tamanho do amplicon gerado pelos primers utilizados (477pb). No controle negativo, não houve amplificação de nenhum material, indicando ausência de contaminação.

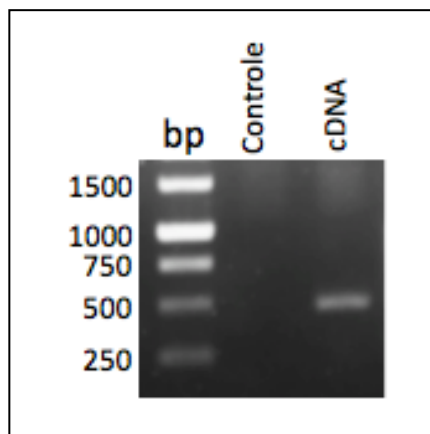


Figura 26: Eletroforese dos produtos da reação de PCR para amplificação do gene da proteína gSG7 de *A. albimanus*. Usando o cDNA produzido a partir de RNA extraído de glândulas salivares, houve amplificação apenas de um gene, que coincide com o tamanho aproximado do amplicon gerado pelos primers utilizados na reação (477pb). No tubo controle, não houve amplificação de nenhum fragmento de DNA.

5.9 Expressão e purificação das proteínas gSG7 e gSG7-2 de *A. albimanus* e gSG7 de *A. darlingi*

As proteínas gSG7 e gSG7-2 de *A. albimanus* e gSG7 de *A. darlingi* foram expressas em *E. coli* BL21 pLys e purificadas através de cromatografias de gel filtração em HPLC. Na Figura 27 estão representados os cromatogramas do último passo da purificação das recombinantes, com formação de apenas um pico, indicando a pureza das nossas amostras.

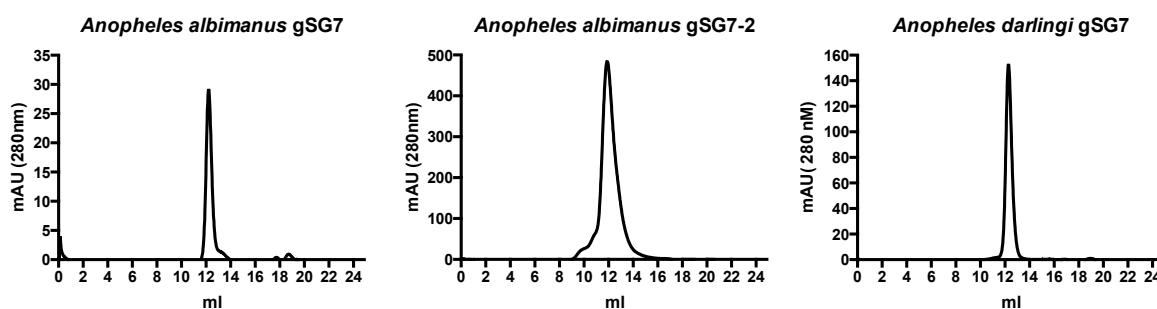


Figura 27: Última cromatografia de gel filtração para purificação das proteínas recombinantes gSG7 e gSG7-2 de *A. albimanus* e gSG7 de *A. darlingi*. Nas três cromatografias, apenas um pico foi formado, indicando pureza das amostras.

Tal pureza foi confirmada correndo uma alíquota de cada amostra em gel de poliacrilamida e corando com Comassie blue. Na Figura 28, estão apresentadas as três proteínas recombinantes, evidenciando a ausência de contaminantes nas amostras purificadas.

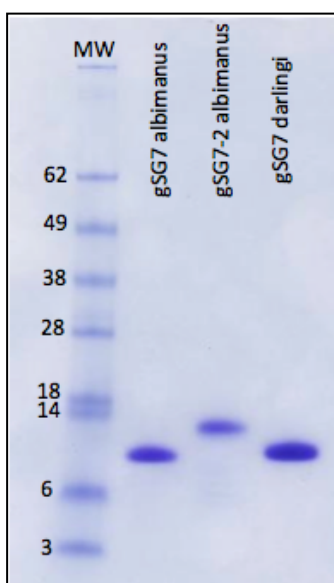


Figura 28: SDS-PAGE com as proteínas recombinantes após o último passo de purificação. A presença de apenas uma banda em cada canaleta evidencia a pureza das amostras.

As três proteínas foram testadas no ensaio hemolítico para via alternativa conforme descrito para os ensaios com EGS (25 µl de soro diluído 1:20 + 25 µl de hemácias + 12,5 µl de PBS contendo as recombinantes). As gSG7s de *A. albimanus* e *A. darlingi* inibiram significativamente a hemólise (Figura 29). A gSG7 de *A.*

albimanus apresentou uma potente atividade, sendo necessário apenas 20 nM (concentração final) da proteína para inibir 100% a via alternativa, confirmando ser realmente o inibidor presente na glândula salivar desse mosquito. A gSG7 de *A. darlingi* também apresentou atividade. Entretanto, uma concentração maior desta proteína foi exigida para inibir significativamente a hemólise. Já a gSG7-2 de *A. albimanus* não apresentou nenhuma atividade sobre a via alternativa (Figura 29).

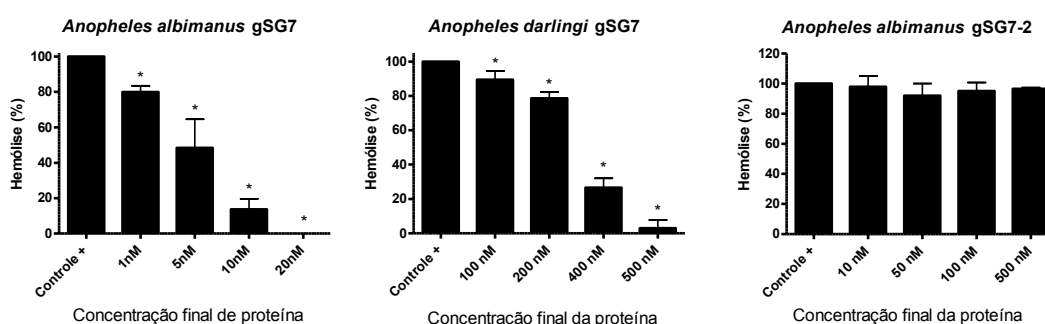


Figura 29: Ação das proteínas recombinantes gSG7 e gSG7-2 de *A. albimanus* e gSG7 de *A. darlingi* sobre a via alternativa do sistema complemento. ANOVA + Teste de Tukey, * $p < 0,05$. Os resultados são expressos como média + desvio padrão de pelo menos três repetições.

As três recombinantes também foram testadas em ensaio hemolítico da via clássica. Coincidindo com os resultados obtidos com o EGS de *A. albimanus*, nenhuma das suas proteínas recombinantes apresentou atividade sobre essa via. A gSG7 de *A. darlingi* também não apresentou atividade sobre a via clássica, mesmo com concentrações tão altas quanto 1 μ M (Figura 30).

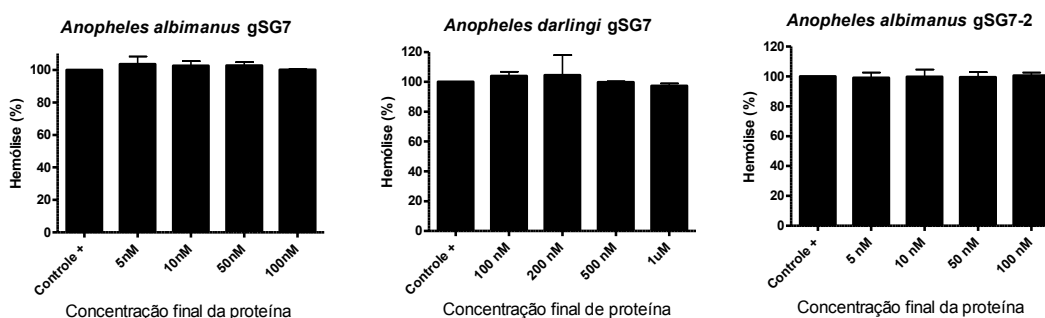


Figura 30: Ação das proteínas recombinantes gSG7 e gSG7-2 de *A. albimanus* e gSG7 de *A. darlingi* sobre a via clássica do sistema complemento. Os resultados são expressos como média + desvio padrão de pelo menos três repetições.

As proteínas recombinantes de *A. albimanus* foram testadas também no ensaio de ativação da via das lectinas. Em nenhuma das concentrações testadas as proteínas apresentaram inibição da deposição de C3b ativado por esta via (Figura 31).

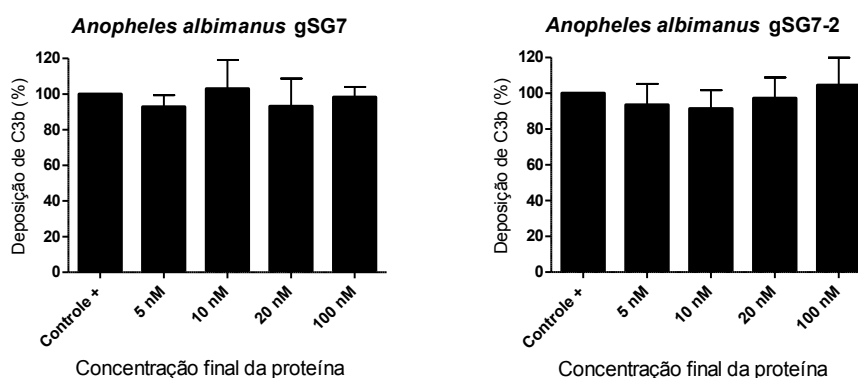


Figura 31: Efeito das proteínas gSG7 e gSG7-2 de *A. albimanus* sobre a via das lectinas. As barras representam a média e desvios padrões das porcentagens de deposição de C3b em relação ao controle positivo (sem inibidor).

Ensaio de deposição de C3b, Fator B, properdina e C9 na presença de gSG7 de *A. albimanus* e *A. darlingi* e da gSG7-2 de *A. albimanus* em placa coberta com agarose foram realizados, conforme descrito para os ensaios com EGS no Material e Métodos (Item 4.5). Houve inibição dose dependente e estatisticamente significativa da deposição de todos os componentes testados apenas na presença da proteína gSG7 (Figuras 32 e 33). A proteína de *A. albimanus* se mostrou mais potente, precisando de concentrações finais em torno de 20 nM para inibir quase 100% a deposição de todos os componentes (Figura 32).

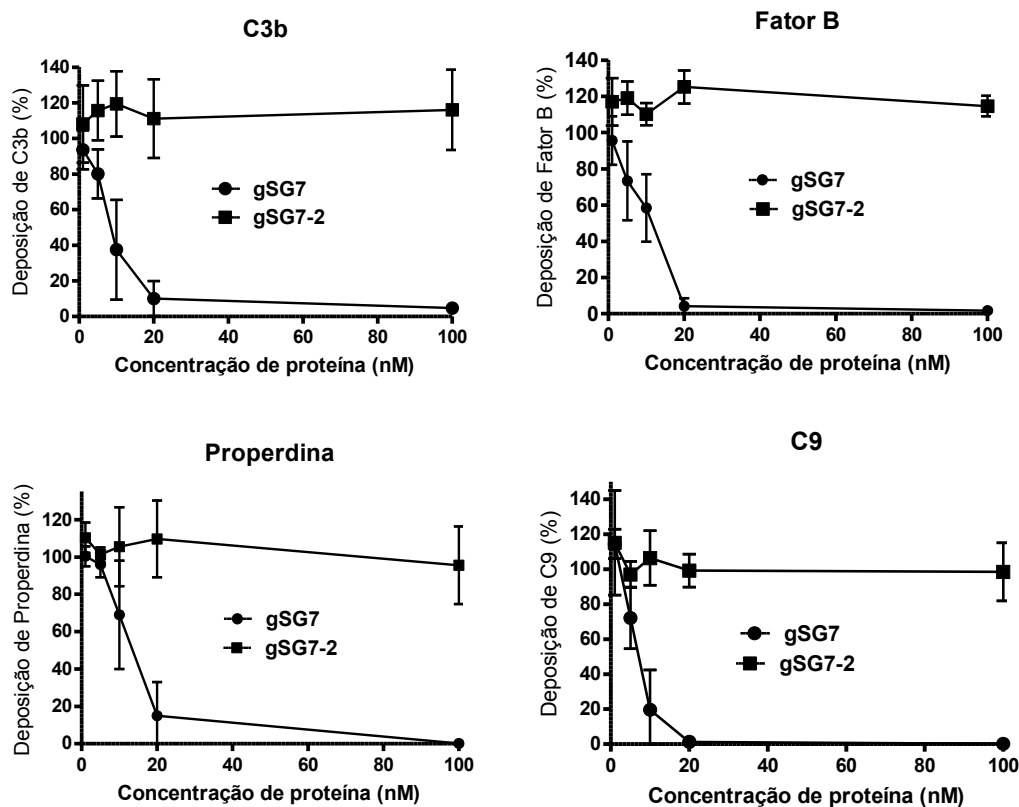


Figura 32: Efeito das proteínas gSG7 e gSG7-2 de *A. albimanus* sobre a deposição dos componentes C3, Fator B, properdina e C9 em placas cobertas com agarose. A deposição dos componentes foi avaliada através de anticorpos específicos para cada componente. Os resultados são expressos como média + desvio padrão de pelo menos três repetições.

Já a proteína recombinante de *A. darlingi* também apresentou atividade mas exigiu concentração final de 600 nM para inibir totalmente a deposição dos componentes testados (Figura 33). A proteína gSG7-2 de *A. albimanus* foi utilizada como controle negativo por não apresentar atividade inibidora sobre a via alternativa.

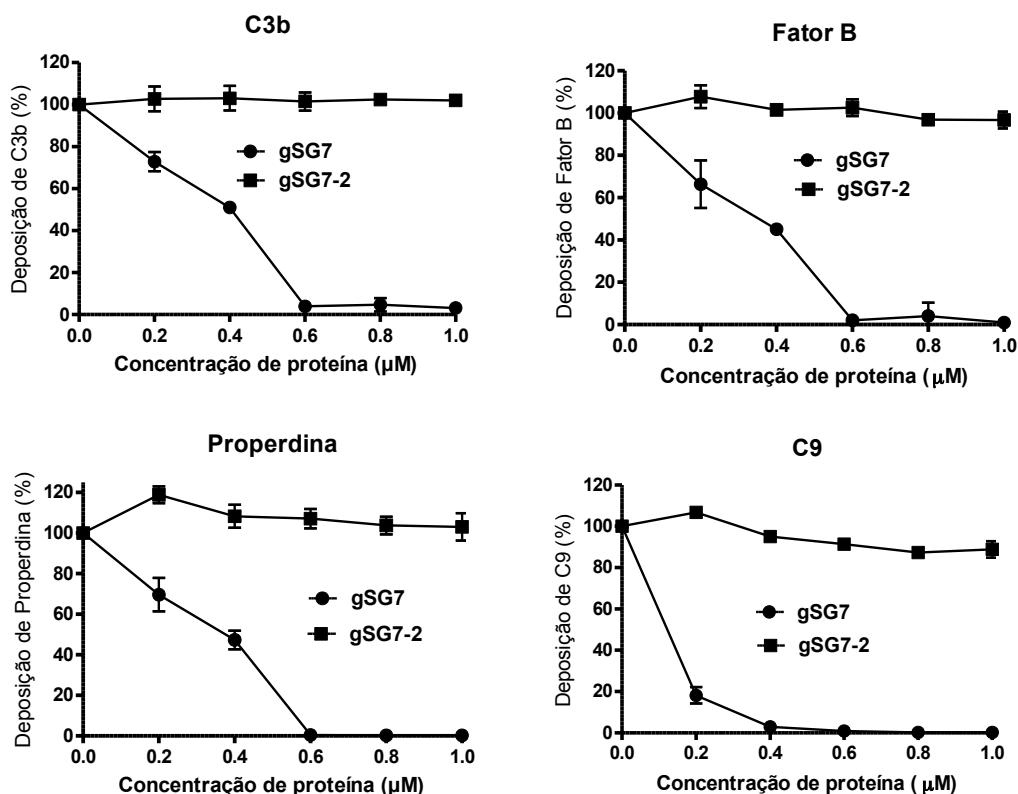


Figura 33: Efeito das proteínas gSG7 de *A. darlingi* sobre a deposição dos componentes C3, Fator B, properdina e C9 em placas cobertas com agarose. A deposição dos componentes foi avaliada através de anticorpos específicos para cada componente. Os resultados são expressos como média + desvio padrão de pelo menos três repetições.

A proteína gSG7 de *A. albimanus* foi também avaliada em ensaio de desligamento de componentes da via alternativa previamente depositados em superfície ativadora. Não houve diferença estatística entre os resultados de deposição de C3b, Fator B ou properdina na presença ou ausência do inibidor (Figura 34). Quando Fator H foi adicionado aos poços, houve diminuição estatisticamente significativa da deposição de Fator B (Figura 34).

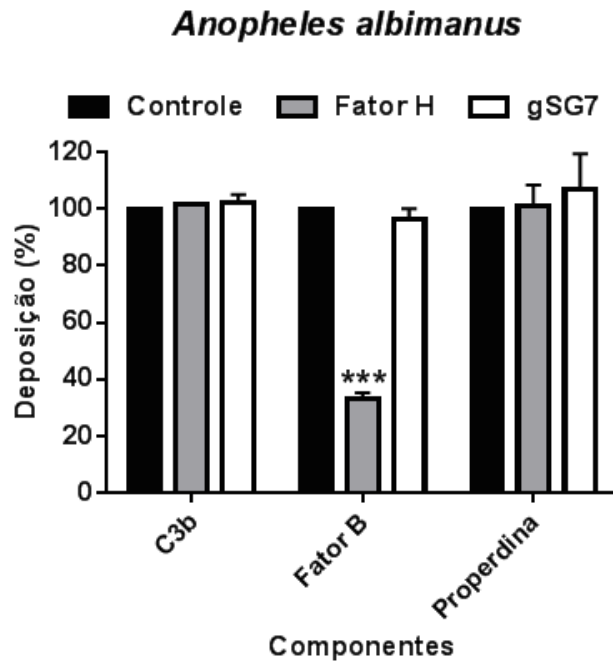
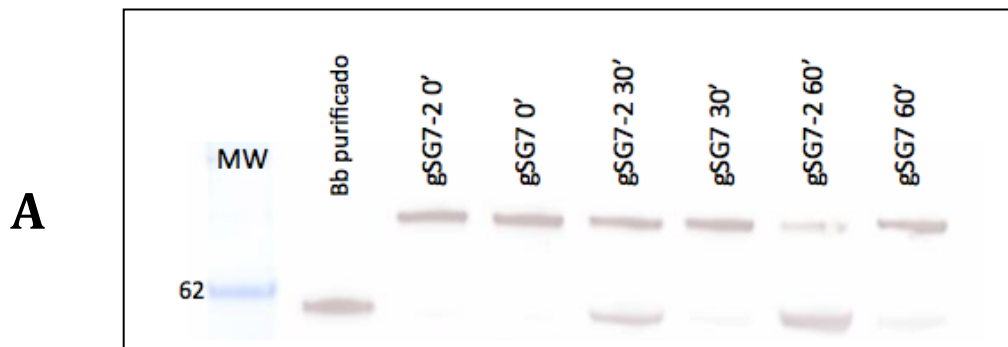


Figura 34: Efeito da gSG7 de *A. albimanus* e Fator H sobre componentes da via alternativa previamente ligados à superfície ativadora. Barras verticais representam a média e desvio padrão das repetições.

Foram realizados também os ensaios de Western blot para detectar ativação de C3 e Fator B presentes no soro humano normal na presença das proteínas gSG7 e gSG7-2 de *A. albimanus*, na concentração final de 20 nM. Repetindo os resultados obtidos com o EGS desta espécie, a gSG7 inibiu a ativação tanto do C3 quanto do Fator B (Figura 35). A recombinante gSG7-2 foi utilizada como controle negativo por não apresentar atividade inibitória.



B

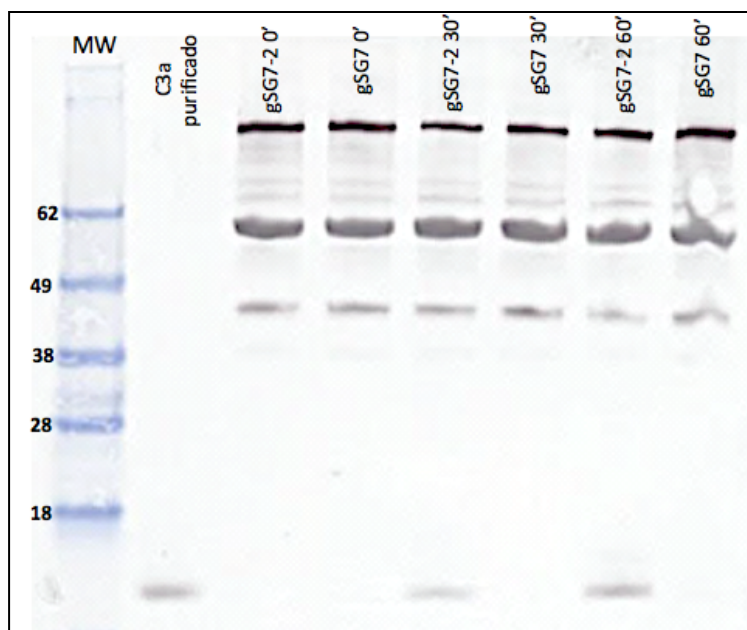


Figura 35: Efeito das proteínas gSG7 e gSG7-2 de *A. albimanus* na ativação dos componentes Fator B (A) e C3 (B). Nas canaletas com a gSG7, não houve aparecimento das bandas referentes a Bb (A) e C3a (B), produtos da ativação de Fator B e C3, respectivamente.

O Western blot com os componentes purificados C3b, Fator B e Fator D também foi repetido, substituindo o EGS pelas proteínas recombinantes na concentração final de 20 nM. Nem a gSG7 nem a gSG7-2 inibiram a ativação de Fator B nesse experimento (Figura 36).

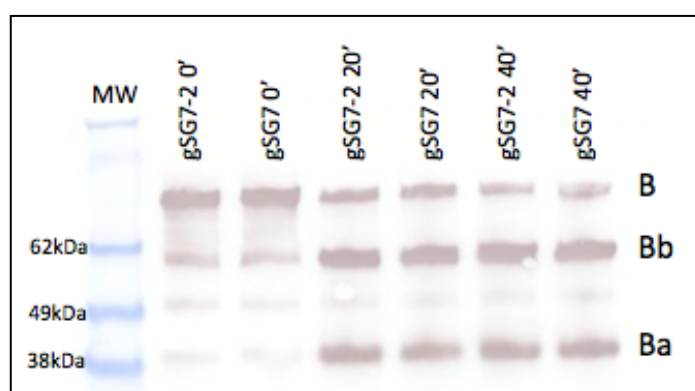


Figura 36: Ação das proteínas recombinantes gSG7 e gSG7-2 de *A. albimanus* na formação da C3-convertase com componentes C3b, Fator B e Fator D purificados. As proteínas não inibiram a ativação do Fator B, sendo observado as bandas referentes aos produtos da ativação do Fator B (Bb e Ba) nas respectivas canaletas.

5.10 Identificação do inibidor salivar de *A. aquasalis*

As proteínas gSG7 recombinantes de *A. albimanus* e de *A. darlingi* foram corridas ao lado de EGS de fêmeas de *A. aquasalis* em gel de poliacrilamida 12,5% e coradas com prata. Nas canaletas em que foram aplicadas as recombinantes, apenas uma banda com peso molecular de aproximadamente 13 kDa foi observada. Na canaleta em que o EGS foi aplicado, aproximadamente oito bandas foram detectadas, incluindo uma com peso molecular muito próximo ao das gSG7s (Figura 37).

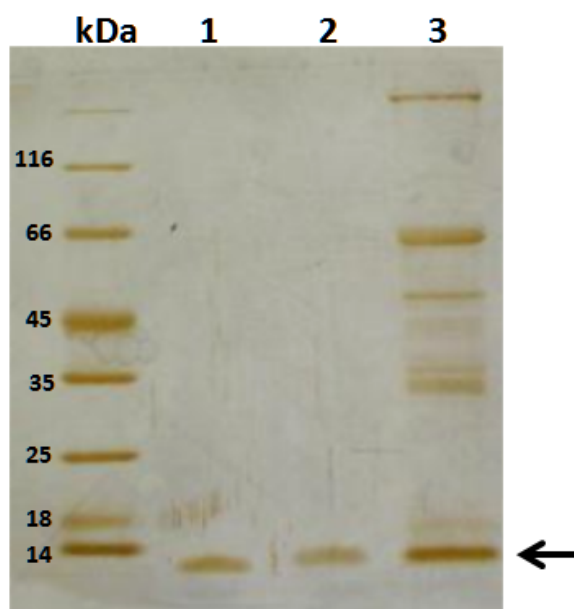


Figura 37: Eletroforese das proteínas gSG7 recombinantes de (1) *A. albimanus* e (2) *A. darlingi* e do (3) EGS de *A. aquasalis* em gel de poliacrilamida corado com prata. A seta indica uma banda no EGS com o mesmo peso molecular das proteínas recombinantes das outras espécies.

As bandas referentes à gSG7 de *A. darlingi* e a sua correspondente no EGS de *A. aquasalis* foram extraídas do gel e submetidas a tripsinização seguida de espectrometria de massa. Dos peptídeos gerados a partir da amostra de *A. darlingi*, um alinhou com 100% de similaridade de aminoácidos com a sequência da gSG7 dessa espécie. Interessantemente, um dos peptídeos gerados a partir da amostra de *A. aquasalis* também alinhou com 100% de similaridade com um fragmento diferente da sequência da gSG7 de *A. darlingi* (Figura 38).

A.darlingi_gSG7 Pep1	MAARMTIMLPLAVALICLLQTEPGMAAHSHIRKVLQLFRSIELDDSKKSFYLTAAKYGIQ -----KVLQLFR----- *****
A.darlingi_gSG7 Pep1	TQLREPLVRFAGGFAPSTRLSEACVKNAIARIYEIEGEFYAKFSYACENHDPYSVECLEE -----
A.darlingi_gSG7 Pep1	AQDDYPTKLGELFKKTKKCLRE -----

Figura 38: Alinhamento da sequência de peptídeo gerado da proteína salivar de *A. aquasalis* (Pep1) com a sequência da proteína gSG7 de *A. darlingi*.

5.11 Western blot e ensaio hemolítico com IgG anti-gSG7 de *A. albimanus*

Para verificar se o anticorpo anti-gSG7 reconheceria a proteína recombinante e a proteína presente no EGS, foi realizado Western blot usando o anticorpo na diluição de 1:10000. Como mostrado na Figura 39, o anticorpo foi capaz de identificar as duas formas testadas da proteína, apresentando uma única banda em cada canaleta.

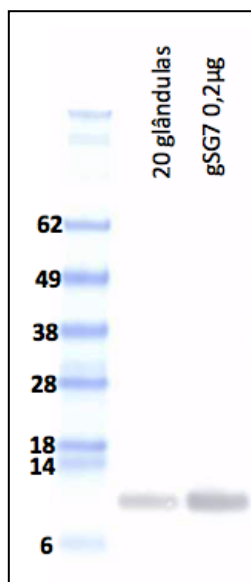


Figura 39: Western blot com anticorpo anti-gSG7 de *A. albimanus*. O IgG produzido em coelho reconheceu tanto a proteína recombinante como a proteína nativa presente no extrato de glândulas salivares.

Diferentemente, o anticorpo anti-gSG7 de *A. albimanus* não foi capaz de reconhecer outras proteínas salivares, como a gSG7-2 dessa espécie e a gSG7 de *A. darlingi*, nem proteínas do EGS de *A. aquasalis* ou *A. aegypti* (Figura 40).

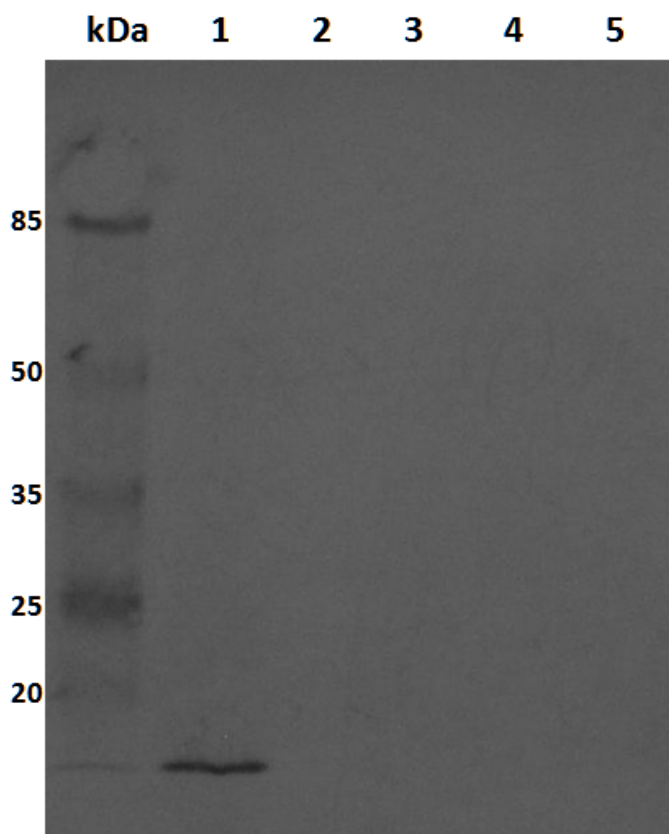


Figura 40: Western blot com IgG anti-gSG7 de *A. albimanus*. O anticorpo reconheceu a gSG7 recombinante de *A. albimanus* (1) mas não reagiu contra gSG7-2 da mesma espécie (2) nem com gSG7 de *A. darlingi* (3). O anticorpo também não reconheceu nenhuma proteína no EGS de *A. aquasalis* (4) ou EGS de *A. aegypti* (5).

O IgG anti-gSG7 foi capaz de bloquear a atividade inibidora tanto da proteína recombinante quanto da proteína no EGS. Quando testado sobre o EGS, o anticorpo foi capaz de bloquear a atividade estatisticamente significativa nas diluições de 1:10 e 1:100. Já quando testado com a proteína recombinante, o IgG bloqueou de forma estatisticamente significativa até na diluição de 1:1000 (Figura 41). Quando apenas o anticorpo diluído 1:10 foi incubado com as hemácias, nenhuma hemólise foi observada, mostrando que o anticorpo por si só não atua como hemolisina.

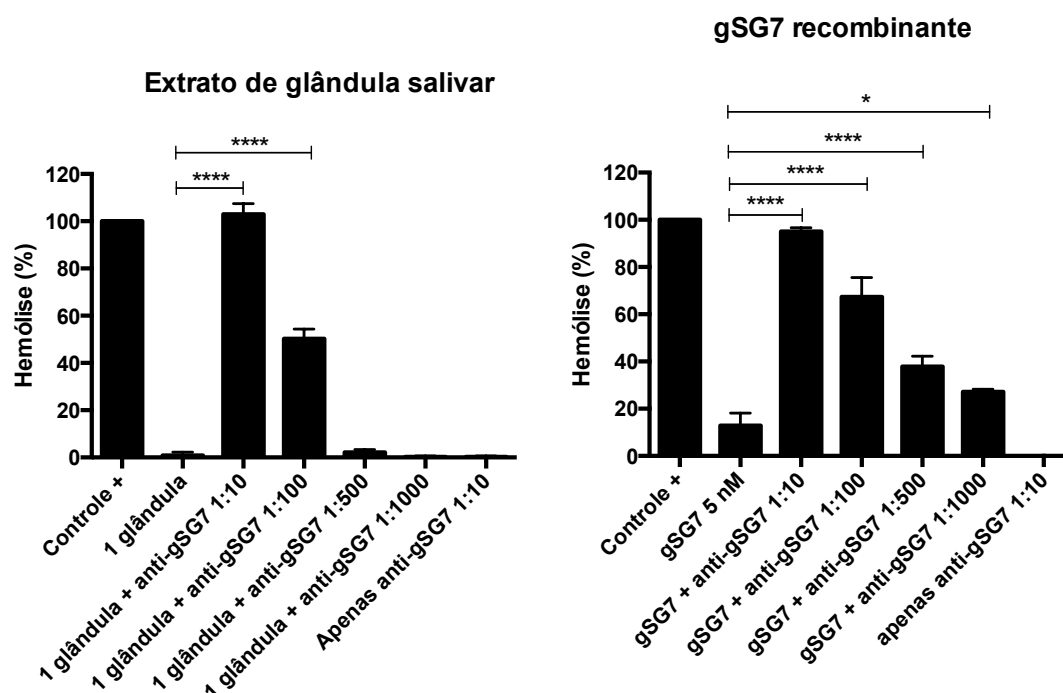


Figura 41: Efeito do IgG anti-gSG7 sobre a atividade do EGS e da proteína gSG7 recombinante. O anticorpo bloqueou de forma estatisticamente significativa tanto a atividade do EGS quanto da proteína recombinante (ANOVA + Teste de Tukey. **** $p < 0,0001$; * $p < 0,05$). As barras verticais representam média + desvio padrão das repetições.

5.12 ELISA para detectar ligação de componentes do complemento aos inibidores salivares

Na tentativa de encontrar o alvo dos inibidores do SC dos anofelinos estudados, realizamos ensaios com placas de ELISA sensibilizadas com gSG7 de *A. albimanus* ou EGS de *A. aquasalis*, gSG7-2 ou BSA e incubadas com diferentes componentes do complemento. Utilizando anticorpos primários específicos para cada componente, foi possível identificar uma forte ligação de properdina à gSG7, com diferença estatisticamente significativa em relação à gSG7-2 e BSA (Figura 42). Não foi detectada ligação das proteínas recombinantes a nenhum outro componente da via alternativa.

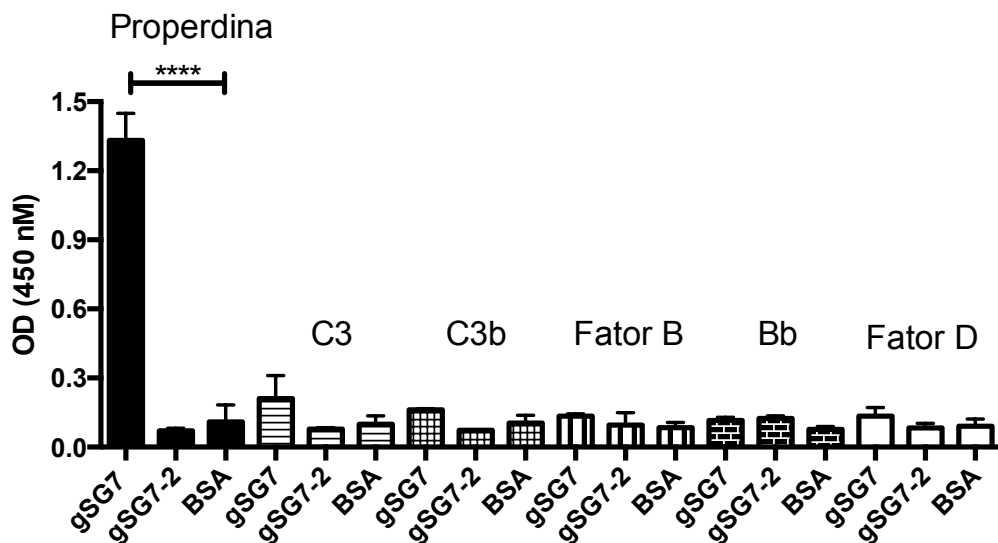


Figura 42: Ligação de componentes do complemento à gSG7 de *A. albimanus*. Através de ELISA com placas sensibilizadas com gSG7, gSG7-2 e BSA e incubadas com diferentes componentes da via alternativa, foi possível detectar ligação direta de properdina à gSG7 (ANOVA + Teste de Tukey, **** $p < 0,0001$).

Também foi detectada ligação de properdina ao EGS de *A. aquasalis* com diferença estatística em relação ao controle com BSA ($p < 0,001$) (Figura 43).

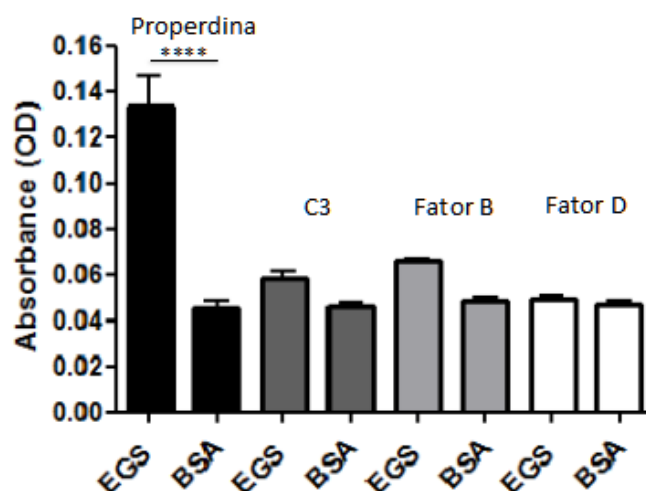


Figura 43: Ligação de componentes do complemento ao EGS de *A. aquasalis*. Através de ELISA com placas sensibilizadas com EGS e BSA e incubadas com diferentes componentes da via alternativa, foi possível detectar ligação direta de properdina ao EGS (Teste t, **** $p < 0,001$).

5.13 Ensaio de ressonância plasmônica de superfície

Confirmando a ligação observada no ELISA, no ensaio de ressonância plasmônica de superfície também foi detectada ligação de properdina à gSG7 de *A. albimanus* (Figura 44). A ligação foi consistente, com pouca dissociação após o tempo de contato e a cinética apresentou KD de 7,99 nM. Não foi observada ligação de properdina à gSG7-2 em nenhuma das concentrações testadas (Figura 44).

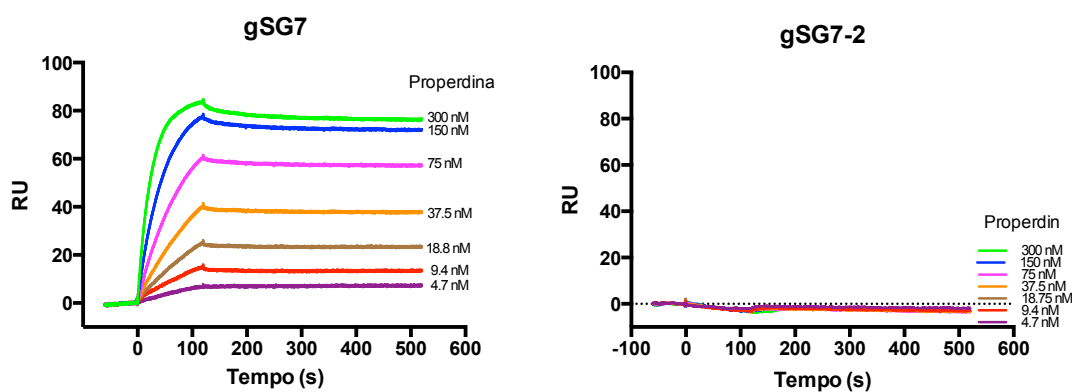


Figura 44: Ensaio de ressonância plasmônica de superfície com gSG7 e gSG7-2 de *A. albimanus*. Os sensorgramas mostram a consistente ligação de gSG7 em todas as concentrações de properdina testadas. Não houve ligação de properdina à gSG7-2.

6. Discussão

As proteínas do SC presente no sangue constituem uma importante arma do sistema imune inato contra patógenos invasores e células alteradas do hospedeiro. Uma vez ativado, o SC induz o recrutamento e ativação de fagócitos, além de formar poros na membrana celular, levando ao desequilíbrio osmótico e morte dos organismos estranhos. Para garantir sua sobrevivência, esses organismos desenvolveram mecanismos de escape do SC, sendo as formas mais comuns a secreção de inibidores de componentes específicos da cascata de ativação e a adsorção de reguladores negativos do SC presentes no sangue em sua superfície. Mecanismos de evasão do SC já foram descritos em bactérias (Potempa & Potempa 2012), fungos (Luo et al. 2013), vírus (Avirutnan et al. 2010), protozoários (Sacks & Sher 2002), helmintos (Da'dara & Krautz-Peterson 2014) e até mesmo em células cancerígenas humanas (Okroj et al. 2015).

Para inibição do SC, artrópodes hematófagos apresentam moléculas específicas na saliva ou no intestino (Schroeder et al. 2009), pois esse sistema permanece intacto por até uma hora no sangue ingerido e pode ser ativado dentro do lúmen intestinal dos insetos (Simon et al. 2013, Khattab et al. 2015), causando dano ao trato digestivo caso não seja inativado por inibidores salivares ou intestinais (Barros et al. 2009, Khattab et al. 2015). Assim, seja a nível salivar ou intestinal, a inibição do SC pode ser considerada um processo crucial para a sobrevivência de artrópodes que se alimentam de sangue.

Neste estudo, a atividade anti-complemento foi pesquisada pela primeira vez no EGS de mosquitos pertencentes ao gênero *Anopheles*. A atividade foi observada nos EGSs das espécies neotrópicas *A. albimanus*, *A. aquasalis* e *A. freeborni*. O EGS de *A. albimanus* apresentou potente atividade exclusiva sobre a via alternativa, com inibição de aproximadamente 80% com quantidade de saliva referente a apenas uma glândula (Figura 7). Quando submetido a tratamentos desnaturantes, como aquecimento e digestão por proteinase K, o EGS perdeu a atividade (Figura 8), indicando que o inibidor é de natureza proteica. O EGS de *A. aquasalis*, além de inibir a via alternativa de maneira dose-dependente, apresentou leve inibição da via clássica, embora tenha sido necessário uma

grande quantidade de saliva (referente a 10 glândulas salivares). O efeito do EGS de *A. freeborni* sobre outras vias do complemento não foi avaliado. As três espécies que apresentaram atividade anti-complemento possuem concentrações semelhantes de proteína por glândula salivar (aproximadamente 0,8 µg de proteína/glândula) e, portanto, a diferença na intensidade da inibição da via alternativa pelos EGSs das três espécies pode ser devido a outros motivos, como mecanismos diferentes de inibição, diferença na expressão do(s) inibidor(es) ou mesmo diferenças estruturais dos mesmos.

A inibição da via alternativa pelo EGS de *A. albimanus* e *A. aquasalis* foi confirmada em ensaios de deposição em placas cobertas com agarose, onde observamos a inibição da deposição de C3b, Fator B e properdina (Figura 11). Por ensaios de Western blot, demonstramos que na presença do EGS das duas espécies não há ativação dos componentes Fator B e C3 (Figura 13 e 14), corroborando os resultados observados nos ensaios de deposição. Esses dados indicam que os inibidores atuam logo no início da cascata de ativação da via alternativa. Quando o Western blot foi realizado utilizando C3b, Fator B e Fator D purificados, o EGS de *A. albimanus* não inibiu a ativação do componente Fator B (Figura 15), indicando que o inibidor não atua diretamente em nenhum dos três componentes utilizados.

A via alternativa possui grande importância na ativação do CS pois independe de moléculas ativadoras e, por ser iniciada por hidrólise espontânea do componente C3, está constantemente sendo ativada em baixos níveis na circulação (Dunkelberger & Song 2010). Além disso, ela amplifica em cerca de 80% a atividade da via clássica (produção de C5a e CAM), pois o C3b gerado por esta via pode formar as C3- e C5-convertases da via alternativa, ativando mais moléculas de C3 e C5, respectivamente, e conseqüentemente, formando mais CAM (Harboe et al. 2004). Apesar de não observado em nossos resultados (apenas com alta concentração de saliva de *A. aquasalis*), é possível que os inibidores salivares da via alternativa atuem indiretamente sobre as atividades das vias clássica e das lectinas no local da picada e dentro do intestino do mosquito, diminuindo a atividade dessas vias.

Curiosamente, os EGSs de anofelinos do Velho Mundo (*A. dirus*, *A. gambiae* e *A. stephensi*) não apresentaram atividade anti-complemento, mesmo com altas concentrações de proteínas salivares (Figura 7). Recentemente, Khattab et al (2015) demonstraram que *A. gambiae* e *A. stephensi* ligam Fator H, um regulador negativo do SC, ao seu epitélio intestinal, inativando o SC. Isso explicaria porque esses mosquitos não apresentam inibidores salivares, uma vez que os inibidores intestinais seriam suficientes para a proteção do trato digestivo desses insetos. De fato, inibidores do sistema complemento têm sido descritos no intestino de barbeiros *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis* e *Rhodnius prolixus* (Barros et al. 2009), do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (Mendes-Sousa et al. 2013), da mosca tsé-tsé *Glossina morsitans* (Ooi et al. 2015) e do ácaro *Sarcoptes scabiei* (Bergström et al, 2009). Em barbeiros e flebotomíneos, já foram descritos inibidores do complemento tanto na saliva quanto no intestino, evidenciando a importância desses inibidores para a hematofagia e sobrevivência desses vetores. É possível que existam também inibidores do complemento no intestino dos anofelinos do Novo Mundo, atuando sinergicamente com os inibidores salivares na proteção do trato digestivo desses mosquitos.

Nos ensaios hemolíticos para ativação da via alternativa, usamos 25 µl de SHN diluído 1:20. Portanto, em cada tubo utilizado havia 1,25 µl de SHN. EGS referente a uma glândula salivar de *A. albimanus* foi suficiente para inibir em torno de 80% a atividade dessa via (Figura 7). Considerando que: a) um anofelino ingere em torno de 2,5 µl de sangue (Jeffery 1956, Phasomkusolsil et al. 2015) e que o hematócrito humano permanece em torno de 45%, logo o volume de soro ingerido pelo mosquito é de aproximadamente 1,4 µl; e b) os anofelinos injetam na pele do hospedeiro até metade do conteúdo das suas glândulas salivares (portanto, o conteúdo de uma glândula) (Golenda et al. 1995), a quantidade de saliva de *A. albimanus* inoculada seria suficiente para inibir o SC ingerido no respasto sanguíneo. Já *A. aquasalis* e *A. freeborni* necessitaram de quantidades maiores de proteínas salivares para inibir significativamente o SC (em torno de 10 glândulas). Esses dados reforçam a hipótese da existência de inibidores intestinais nos anofelinos neotropicais,

sendo necessários para agir juntamente com os inibidores salivares na proteção do intestino dessas espécies contra a ativação do CAM.

O inibidor salivar de *A. albimanus* foi purificado e identificado por espectrometria de massa como pertencente à família gSG7 (*gambiae* Salivary Gene 7), que é amplamente distribuída nas glândulas salivares de anofelinos. O gene codificador dessa proteína foi descrito inicialmente no sialoma de *A. gambiae*, sendo expresso exclusivamente nas glândulas salivares de formas adultas do mosquito (Lanfrancotti et al. 2002). Posteriormente, esse gene foi também descrito em *A. stephensi* (Valenzuela et al. 2003), *A. darlingi* (Calvo et al. 2009), *A. funestus* (Calvo et al. 2007) e *A. sinensis* (Zhou et al. 2014). Esse grupo de proteínas possui pouca similaridade de sequência com outros grupos de proteínas de outros organismos, apresentam peptídeo sinal, não possuem domínios conhecidos e ainda não possui estrutura caracterizada.

A gSG7 recombinante de *A. albimanus* apresentou atividade anti-complemento de forma semelhante ao EGS dessa espécie em todos os experimentos testados (ensaio hemolítico, ensaios de deposição e Western blot), confirmando ser realmente o inibidor do complemento presente na saliva de *A. albimanus*. As sequências das gSG7s de anofelinos do Velho Mundo apresentam aproximadamente 45% de identidade de aminoácidos com a gSG7 de *A. albimanus*. As diferenças nas sequências dos aminoácidos destas proteínas devem ocorrer no sítio de ação da gSG7 dos insetos do Novo Mundo, justificando a ausência de atividade anti-complemento nos anofelinos do Velho Mundo. Já a mesma proteína madura de *A. darlingi* apresenta 77% de identidade com a de *A. albimanus* e também apresenta atividade anti-complemento. Esses dados sugerem que a atividade anti-complemento é característica das gSG7s de mosquitos do Novo Mundo e evoluíram após a divergência de formas do Novo e Velho Mundos.

No EGS de *A. aquasalis* observamos uma banda na mesma altura das gSG7s de *A. albimanus* e *A. darlingi* (Figura 37). O resultado da espectrometria de massa indicou um peptídeo com 100% de similaridade com um fragmento da sequência de aminoácidos da gSG7 de *A. darlingi*. Considerando que as três espécies pertencem ao mesmo subgênero (*Nyssorhynchus*) e são

filogeneticamente mais próximas, esses resultados sugerem a existência de uma proteína da família gSG7 no EGS de *A. aquasalis*, possivelmente o seu inibidor salivar do SC. O transcriptoma total de larvas L3, L4 e fêmeas dessa espécie alimentadas com açúcar ou sangue foi recentemente publicado (Costa-da-Silva et al. 2014), com algumas sequências depositadas nos bancos de dados virtuais. Entretanto, nenhuma sequência de *A. aquasalis* apresentou similaridade significativa com o gene ou a proteína gSG7 de outros anofelinos. RNAm de glândulas salivares dessa espécie foram extraídos e atualmente estão sendo sequenciados e analisados para a anotação do sialotranscriptoma. Quando o mesmo estiver finalizado, poderemos investigar com maior precisão a presença de alguma sequência com similaridade com a gSG7 de *A. albimanus* e *A. darlingi*.

Isawa et al (2007) produziram a gSG7 recombinante de *A. stephensi*, denominada anophensina, e demonstraram que a mesma é inibidora do sistema cinina-calicreína, ligando-se em Fator XII e cininogênio de alto peso molecular, bloqueando a produção de bradicinina, importante mediador de resposta inflamatória. Em nosso estudo, outras atividades da gSG7 de *A. albimanus*, incluindo a atividade acima descrita, não foram investigadas mas é possível que ela também apresente outras finalidades além de inibir o complemento. Considerando que esta espécie de mosquito apresenta dezesseis proteínas no seu EGS e que apenas nove delas são secretadas (Fontaine et al. 2012), não seria de se admirar que suas moléculas salivares apresentem mais de uma função, agindo sinergicamente de modo a favorecer a hematofagia.

Por ensaios de ELISA, demonstramos a ligação de properdina à gSG7 recombinante de *A. albimanus* e ao EGS de *A. aquasalis* utilizados para sensibilizar a placa. Essa ligação foi confirmada para o inibidor da primeira espécie através de ensaio de ressonância plasmônica de superfície (Figura 44), onde observamos forte ligação da properdina ao inibidor. Este componente do SC é uma glicoproteína de 53 kDa formada por 7 domínios de trombospondina, encontrada comumente na forma de oligômeros, principalmente dímeros, trimeros e tetrâmeros circulantes no plasma com concentração de 5 a 20 µg/mL (Pangburn 1989). A properdina liga-se em C3bB e C3bBb, estabilizando a C3-convertase da via alternativa, aumentando em até 10 vezes sua vida média,

permitindo a ativação de muito mais moléculas de C3 (Fearon & Austen 1975). Além disso, protege esse complexo enzimático de reguladores negativos como Fator H, que induz a dissociação de Fator B de C3b e atua como receptor de Fator I, que enzimaticamente inativa C3b em iC3b (C3b inativado) (Medicus et al. 1976, Hourcade 2006, Torreira et al. 2009). De fato, já foi demonstrado que anticorpos IgG específicos contra properdina são capazes de inibir a atividade lítica e a deposição de componentes da via alternativa, ressaltando a importância desse componente para a ativação dessa via (Gupta-Bansal et al. 2000, Pauly et al. 2014). Essa ligação explica porque o inibidor salivar de *A. albimanus* atua somente sobre a via alternativa e porque nos Western blots realizados apenas com os componentes C3b, Fator B e Fator D purificados (sem properdina) não foi observada nenhuma inibição da ativação do componente Fator B (Figuras 15 e 35).

Proteínas salivares de artrópodes hematófagos com atividade anti-complemento foram identificadas na saliva dos carrapatos *Ixodes scapularis* (Valenzuela et al., 2000) e *I. ricinus* (Tyson et al. 2008), vetores da Doença de Lyme na América do Norte e Europa, respectivamente. Na saliva de *I. scapularis* foram descritas a ISAC e a Salp20, proteínas que inibem exclusivamente a via alternativa. Duas famílias de proteínas homólogas anti-via alternativa foram encontradas na saliva de *I. ricinus*: as IRACs (Daix et al. 2007) e as IxACs (Couvreur et al. 2008). Salp20 e as IxACs inibem a via alternativa ligando em properdina (Tyson et al. 2008; Couvreur et al. 2008). A inibição da via alternativa já foi descrita também na saliva de *L. longipalpis* (Cavalcante et al., 2003). Vale (2011) caracterizou parcialmente essa atividade, demonstrando que o EGS atua no início da cascata inibindo a ativação do Fator B, mas que não age inibindo a atividade enzimática do componente Fator D. Recentemente, descobrimos que o inibidor salivar desse flebotomíneo trata-se da proteína Lufaxin, inicialmente descrita como o anti-coagulante salivar de *L. longipalpis* (Collin et al. 2012). Resultados preliminares demonstraram que essa proteína recombinante bloqueia exclusivamente a ativação da via alternativa através da ligação em properdina (manuscrito em preparação).

Por ligarem em properdina, essas proteínas salivares inibem sua ligação na C3-convertase da via alternativa, desestabilizando o complexo enzimático, acelerando sua dissociação, além de permitir a ligação de reguladores negativos da C3-convertase, como Fator I, inativando a cascata dessa via. Baseado em nossos resultados, podemos assumir que os inibidores salivares dos anofelinos apresentam um mecanismo de ação similar. Entretanto, a gSG7 inibe a deposição de Fator B e outros componentes em placas cobertas com agarose mas, diferente de ISAC e Salp20 (Valenzuela et al., 2000; Tyson et al., 2007), não remove componentes previamente depositados (Figura 34). Assim, podemos concluir que ela é capaz de bloquear a formação da C3-convertase, mas não atua sobre complexos pré-formados, assim como tem sido descrito para o EGS de *L. longipalpis* (Vale, 2011) e as SMIPPs, inibidores do complemento presentes no intestino de *Sarcoptes scabiei*, que também inibem a via alternativa ligando em properdina (Bergstrom et al., 2009).

Já foi demonstrado que a saliva de *L. longipalpis* favorece a infecção por *Leishmania* no hospedeiro vertebrado, exacerbando o tamanho e a carga parasitária na lesão cutânea (Titus & Ribeiro 1988) e que, apesar de apresentar mecanismos próprios de evasão do complemento (Späth et al. 2003), a inibição do SC pela saliva do vetor ajuda a manter a viabilidade dos parasitos quando expostos ao soro humano (Nascimento 2011). Também já se sabe que TSLPI, uma proteína salivar do carrapato *I. scapularis* que inibe o SC, é importante para a transmissão da espiroqueta causadora de Doença de Lyme, *Borrelia burgdorferi* (Schuijt et al. 2011b). O silenciamento do gene dessa proteína ou anticorpos contra ela provocaram uma diminuição da sobrevivência da bactéria tanto no hospedeiro vertebrado quanto no intestino do carrapato (Schuijt et al. 2011). Recentemente, foi demonstrado que merozoítos e gametas de *P. falciparum* captam Fator H presente no sangue circulante e no sangue ingerido pelo vetor, respectivamente, para evadir da lise pelo complemento (Simon et al. 2013, Rosa et al. 2015). Entretanto, não há relatos de como esporozoítos, as formas infectantes inoculadas pelo vetor, evadem desse sistema. Essas formas são depositadas na pele do hospedeiro durante a fase de sondagem do mosquito e após alguns minutos invadem capilares cutâneos, atingindo a corrente sanguínea

(Amino et al. 2006), permanecendo expostos ao SC durante todo esse processo. É possível e provável que esta forma evolutiva do parasito tenha seus próprios mecanismos de escape do SC, mas a presença de inibidores na saliva dos vetores do Novo Mundo deve ajudar no sucesso da infecção, tornando menos inóspito o ambiente de inoculação dos esporozoítos.

Neste trabalho demonstramos que anticorpos IgG específicos contra a gSG7 recombinante de *A. albimanus* reconhecem tanto o inibidor nativo presente no EGS quanto o recombinante (Figura 39), confirmando serem a mesma proteína. Entretanto, os anticorpos não reconheceram outras proteínas dessa mesma espécie ou de outras espécies de mosquitos, como a proteína gSG7 de *A. darlingi* ou proteínas do EGS de *A. aquasalis* ou *A. aegypti* (Figura 40), sugerindo que o sítio imunogênico da proteína é específico para cada espécie. Dessa forma, se proteínas dessa família forem imunogênicas e estimularem produção de anticorpos em indivíduos expostos aos mosquitos em áreas endêmicas para malária, elas poderiam ser bons candidatos para marcadores de exposição espécie-específicos, permitindo a identificação de espécies com maior potencial vetorial, especialmente em áreas onde diferentes espécies se sobrepõem. Adicionalmente, a detecção de anticorpos anti-saliva do vetor poderia ser usada para indicar infecção por *Plasmodium*, além de atuar como marcador da severidade da doença (Andrade et al. 2009).

Atualmente, muitos trabalhos têm focado na pesquisa para o desenvolvimento de vacinas de bloqueio de transmissão (VBT) contra parasitos transmitidos por artrópodes, cujo objetivo é impedir o desenvolvimento do patógeno no vetores e sua subsequente transmissão (Carter 2001). Antígenos de estágios sexuais do *Plasmodium* (encontrados no intestino do vetor) e moléculas salivares e intestinais do mosquito têm demonstrado potencial vacinal (Carter 2001, Lavazec & Bourgouin 2008). No caso das leishmanioses, estudos de VBT com antígenos salivares de flebotomíneos do Velho e do Novo Mundo têm sido descritos. Gomes et al. (2008) verificaram que a imunidade a uma proteína salivar específica de *L. longipalpis*, a LJM19 (que é inibidor da via clássica do SC), propiciou proteção significativa contra a leishmaniose visceral fatal em hamster. Recentemente, Oliveira et al (2015) demonstraram que a imunização de macacos

do gênero *Rhesus* com a proteína salivar PdSP-15 de *Phlebotomus duboscqi* é capaz de proteger esses animais contra o surgimento de leishmaniose cutânea provocada por *L. major*. Em estudos com carrapatos *I. scapularis*, também já foi descrito que a imunização de camundongos com a proteína inibidora do complemento TSLPI levou a diminuição da carga parasitária em diferentes tecidos do hospedeiro vertebrado (Schuijt et al. 2011). Considerando a importância da evasão do SC por esporozoítos de *Plasmodium* nos primeiros momentos da infecção, se um anofelino infectado inocular o parasito em um indivíduo imunizado com gSG7 e, portanto, com este inibidor inativado por anticorpos, os esporozoítos inoculados ficarão mais susceptíveis ao ataque do SC, resultando em diminuição da quantidade de parasitos viáveis no sangue. Além disso, os anticorpos poderiam bloquear o inibidor no intestino do mosquito, deixando o complemento ativo neste órgão, podendo causar danos ao epitélio intestinal do mesmo. Caso estas hipóteses sejam verdadeiras, a gSG7 teria potencial como um componente de vacina de bloqueio de transmissão para malária.

Atualmente, doenças auto-imunes mediadas pelo complemento têm recebido muita atenção devido à sua severidade, como a Síndrome Hemolítica Urêmica atípica (SHUa) e a Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN), doenças de caráter crônico que levam ao óbito em poucos anos se não tratadas (Botto et al. 2009, Ricklin & Lambris 2013, DeZern & Brodsky 2015). A causa dessas graves doenças é a desregulação da via alternativa do SC por diferentes razões, como ausência ou produção insuficiente de reguladores de membrana, como CD55 e CD59, e mutações em genes codificadores de reguladores do SC (como Fator H e Fator I), levando a produção de formas alteradas dessas proteínas que não apresentam a devida função (Roumenina et al. 2011). Essas alterações levam à ativação inapropriada dessa via, que ataca células próprias, provocando danos em tecidos normais do hospedeiro, principalmente eritrócitos. Atualmente, a droga disponível para o tratamento da SHUa e da HPN é um anticorpo anti-C5 (Soliris®), que bloqueia a ativação do componente C5, prevenindo a ativação do CAM na superfície de células normais (Brodsky et al. 2008). Entretanto, como C5 é um componente comum das três vias de ativação do complemento, sua inibição

leva à susceptibilidade do hospedeiro a patógenos invasores, levando a infecções respiratórias ou urinárias (Brodsky et al. 2008). Assim, a gSG7 de *A. albimanus*, uma proteína de baixo peso molecular que liga em properdina e inibe apenas a via alternativa, poderia ser um candidato promissor para testes de uma nova droga para doenças auto-imunes mediadas pelo sistema complemento, diminuindo o risco de infecções durante o tratamento, uma vez que as vias clássica e das lectinas ainda estariam ativas contra patógenos invasores.

Tendo em vista os aspectos levantados nesta discussão, o descobrimento de uma molécula da saliva de anofelinos capaz de inibir o sistema complemento constitui um grande passo no estudo da interação vetor-parasito-hospedeiro vertebrado. Além disso, nosso trabalho abre portas para novos estudos voltados para a fisiologia e evolução de insetos hematófagos, vacinas de bloqueio de transmissão, marcadores de exposição e o desenvolvimento de drogas para síndromes graves e fatais causadas pela desregulação do sistema complemento.

7. Conclusões

- EGS de *A. albimanus*, *A. aquasalis* e *A. freeborni* inibem a via alternativa do sistema complemento humano;
- O inibidor salivar de *A. albimanus*, *A. darlingi* e *A. aquasalis* pertence à família de proteínas gSG7;
- Anticorpos IgG contra a gSG7 recombinante de *A. albimanus* reconhecem e bloqueiam os inibidores recombinante e nativo desse anofelino;
- A gSG7 atua ligando-se em properdina, o regulador positivo da via alternativa impedindo que ela estabilize a C3 convertase dessa via.

8. Referências bibliográficas

- Alvarenga PH, Francischetti IMB, Calvo E, Sá-Nunes A, Ribeiro JMC, Andersen JF 2010. The function and three-dimensional structure of a thromboxane A2/cysteinyl leukotriene-binding protein from the saliva of a mosquito vector of the malaria parasite. *PLoS Biol.* 8: e1000547.
- Alves FB, Durlacher RR, Menéndez R, Kreiger H, Silva LP Da, Camargo EP 2002. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am J Trop Med Hyg* 66: 641–648.
- Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, Ménard R 2006. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat. Med.* 12: 220–224.
- Andrade BB, Rocha BC, Reis-Filho A, Camargo LMA, Tadei WP, Moreira LA, Barral A, Barral-Netto M 2009. Anti-Anopheles darlingi saliva antibodies as marker of *Plasmodium vivax* infection and clinical immunity in the Brazilian Amazon. *Malar. J.* 8: 121.
- Avirutnan P, Fuchs A, Hauhart RE, Somnuk P, Youn S, Diamond MS, Atkinson JP 2010. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *J. Exp. Med.* 207: 793–806.
- Bahia AC, Kubota MS, Tempone AJ, Araújo HRC, Guedes BAM, Orfanó AS, Tadei WP, Ríos-Velásquez CM, Han YS, Secundino NFC, Barillas-Mury C, Pimenta PFP, Traub-Csekö YM 2011. The JAK-STAT pathway controls *Plasmodium vivax* load in early stages of *Anopheles aquasalis* infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5: e1317.
- Barros VC, Assumpção JG, Cadete AM, Santos VC, Cavalcante RR, Araújo RN, Pereira MH, Gontijo NF 2009. The role of salivary and intestinal complement system inhibitors in the midgut protection of triatomines and mosquitoes. *PLoS One* 4: e6047.
- Bergström FC, Reynolds S, Johnstone M, Pike RN, Buckle AM, Kemp DJ, Fischer K, Blom AM 2009. Scabies mite inactivated serine protease paralogs inhibit the human complement system. *J. Immunol.* 182: 7809–7817.
- Billingsley PF 1990. The Midgut Ultrastructure of Hematophagous Insects. *Annu. Rev. Entomol.* 35: 219–248.
- Billker O, Lindo V, Panico M, Etienne a E, Paxton T, Dell a, Rogers M, Sinden RE, Morris HR 1998. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature* 392: 289–292.
- BILLKER O, SHAW MK, MARGOS G, SINDEN RE 1997. The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of *Plasmodium berghei* in vitro. *Parasitology* 115: 1–7.
- Boisson B, Claude J, Choumet V, Martin E, Xu J, Vernick K, Bourgouin C 2006.

- Gene silencing in mosquito salivary glands by RNAi. 580: 1988–1992.
- Botto M, Kirschfink M, Macor P, Pickering MC, Würzner R, Tedesco F 2009. Complement in human diseases: Lessons from complement deficiencies. *Mol. Immunol.* 46: 2774–2783.
- Bousema T, Okell L, Shekalaghe S, Griffin JT, Omar S, Sawa P, Sutherland C, Sauerwein R, Ghani AC, Drakeley C 2010. Revisiting the circulation time of *Plasmodium falciparum* gametocytes: molecular detection methods to estimate the duration of gametocyte carriage and the effect of gametocytocidal drugs. *Malar. J.* 9: 136.
- Bradford MM 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Breeland SG 1972. STUDIES ON THE ECOLOGY OF ANOPHELES ALBIMANUS. 21: 751–754.
- Brodsky RA, Young NS, Antonioli E, Risitano AM, Schrezenmeier H, Schubert J, Gaya A, Coyle L, Castro C de, Fu C-L, Maciejewski JP, Bessler M, Kroon H-A, Rother RP, Hillmen P 2008. Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 111: 1840–1847.
- Calvo E, Dao A, Pham VM, Ribeiro JMC 2007. An insight into the sialome of *Anopheles funestus* reveals an emerging pattern in anopheline salivary protein families. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37: 164–175.
- Calvo E, Pham VM, Marinotti O, Andersen JF, Ribeiro JMC 2009. The salivary gland transcriptome of the neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* reveals accelerated evolution of genes relevant to hematophagy. *BMC Genomics* 10: 57.
- Carter R 2001. Transmission blocking malaria vaccines. *Vaccine* 19: 2309–2314.
- Carvalho SCG de, Martins Junior A de J, Lima JBP, Valle D 2002. Temperature influence on embryonic development of *Anopheles albitarsis* and *Anopheles aquasalis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97: 1117–1120.
- Cavalcante RR, Pereira MH, Gontijo NF 2003. Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitology* 127: 87–93.
- Collin N, Assumpção TCF, Mizurini DM, Gilmore DC, Dutra-Oliveira A, Kotsyfakis M, Sá-Nunes A, Teixeira C, Ribeiro JMC, Monteiro RQ, Valenzuela JG, Francischetti IMB 2012. Lufaxin, a novel factor Xa inhibitor from the salivary gland of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* blocks protease-activated receptor 2 activation and inhibits inflammation and thrombosis in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32: 2185–2196.
- Costa-da-Silva AL, Marinotti O, Ribeiro JMC, Silva MCP, Lopes AR, Barros MS, Sá-Nunes A, Kojin BB, Carvalho E, Suesdek L, Silva-Neto MAC, James A a., Capurro ML 2014. Transcriptome Sequencing and Developmental

- Regulation of Gene Expression in *Anopheles aquasalis*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8: 1–11.
- Couvreux B, Beaufays J, Charon C, Lahaye K, Gensale F, Denis V, Charlotiaux B, Decrem Y, Prévôt P-P, Brossard M, Vanhamme L, Godfroid E 2008. Variability and action mechanism of a family of anticomplement proteins in *Ixodes ricinus*. *PLoS One* 3: e1400.
- Cox-singh J, Singh B 2010. Knowlesi malaria : newly emergent and of public health importance ? *Trends Parasitol.* 24: 406–410.
- Da'dara A a., Krautz-Peterson G 2014. New insights into the reaction of *Schistosoma mansoni* cercaria to the human complement system. *Parasitol. Res.* 113: 3685–3696.
- Daix V, Schroeder H, Praet N, Georgin J-P, Chiappino I, Gillet L, Fays K de, Decrem Y, Leboulle G, Godfroid E, Bollen a, Pastoret P-P, Gern L, Sharp PM, Vanderplasschen a 2007. Ixodes ticks belonging to the *Ixodes ricinus* complex encode a family of anticomplement proteins. *Insect Mol. Biol.* 16: 155–166.
- Das S, Radtke A, Choi Y-J, Mendes AM, Valenzuela JG, Dimopoulos G 2010. Transcriptomic and functional analysis of the *Anopheles gambiae* salivary gland in relation to blood feeding. *BMC Genomics* 11: 566.
- Demeure CE, Brahimi K, Hacini F, Marchand F, Péronet R, Huerre M, Nicolas J, Brey P, St P 2005. *Anopheles* mosquito bites activate cutaneous mast cells leading to a local inflammatory response and lymph node hyperplasia. *J. Immunol.* 174: 3932–3940.
- Depinay N, Hacini F, Beghdadi W, Peronet R, Me S 2006. Mast Cell-dependent down-regulation of antigen-specific immune responses by mosquito bites. *J. Immunol.*: 4141–4146.
- DeZern AE, Brodsky R a. 2015. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 29: 479–494.
- DiScipio RG, Schraufstatter IU 2007. The role of the complement anaphylatoxins in the recruitment of eosinophils. *Int. Immunopharmacol.* 7: 1909–1923.
- Donovan MJ, Messmore AS, Scrafford D a., Sacks DL, Kamhawi S, McDowell MA 2007. Uninfected mosquito bites confer protection against infection with malaria parasites. *Infect. Immun.* 75: 2523–2530.
- Dunkelberger JR, Song W-C 2010. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 20: 34–50.
- Faran ME 1980. A revision of the albimanus section of the subgenus *Nyssorhyncys* of *Anopheles*. 15.
- Fearon DT, Austen KF 1975. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J. Exp. Med.* 142: 856–863.
- Fontaine A, Fusaï T, Briolant S, Buffet S, Villard C, Baudalet E, Pophillat M, Granjeaud S, Rogier C, Almeras L 2012. *Anopheles* salivary gland proteomes

- from major malaria vectors. *BMC Genomics* 13: 614.
- Francischetti IMB, Ma D, Andersen JF, Ribeiro JMC 2014. Evidence for a lectin specific for sulfated glycans in the salivary gland of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *PLoS One* 9: e107295.
- Gil LHS, Tada MS, Katsuragawa TH, Ribolla PEM, Silva LHP da 2007. Urban and suburban malaria in Rondônia (Brazilian Western Amazon) II: perennial transmissions with high anopheline densities are associated with human environmental changes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102: 271–276.
- Golenda CF, Klein T, Coleman R, Burge R, Ward RA, Seeley DC 1995. Depletion of Total Salivary Gland Protein in Blood-Fed *Anopheles* Mosquitoes. *J. Med. Entomol.* 32: 300–305.
- Gomes R, Teixeira C, Teixeira MJ, Oliveira F, Menezes MJ, Silva C, Oliveira CI de, Miranda JC, Elnaïem D-E, Kamhawi S, Valenzuela JG, Brodskyn CI 2008. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 7845–7850.
- Gupta-Bansal R, Parent JB, Brunden KR 2000. Inhibition of complement alternative pathway function with anti-properdin monoclonal antibodies. *Mol. Immunol.* 37: 191–201.
- Harbach RE 2004. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bull. Entomol. Res.* 94: 537–553.
- Harboe M, Ulvund G, Vien L, Fung M, Mollnes TE 2004. The quantitative role of alternative pathway amplification in classical pathway induced terminal complement activation. *Clin. Exp. Immunol.* 138: 439–446.
- Hourcade DE 2006. The role of properdin in the assembly of the alternative pathway C3 convertases of complement. *J. Biol. Chem.* 281: 2128–2132.
- Isawa H, Orito Y, Iwanaga S, Jingushi N, Morita A, Chinzei Y, Yuda M 2007. Identification and characterization of a new kallikrein-kinin system inhibitor from the salivary glands of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37: 466–477.
- Jariyapan N, Choochote W 2007. Salivary gland proteins of the human malaria vector, *Anopheles dirus* B (Diptera: Culicidae). *Rev. do Inst. ...* 49: 5–10.
- Jeffery GM 1956. Blood meal volume in *Anopheles quadrimaculatus*, *A. albimanus* and *Aedes aegypti*. *Exp. Parasitol.* 5: 371–375.
- Josling GA, Llinás M 2015. Sexual development in *Plasmodium* parasites: knowing when it's time to commit. *Nat. Rev. Microbiol.* 13: 573–587.
- Khattab A, Barroso M, Miettinen T, Meri S 2015. *Anopheles* Midgut Epithelium Evades Human Complement Activity by Capturing Factor H from the Blood Meal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9: e0003513.
- Lacerda MV, Mourão MP, Alexandre MA, Siqueira AM, Magalhães BM, Martinez-

- Espinosa FE, Santana Filho FS, Brasil P, Ventura AM, Tada MS, Couto VS, Silva AR, Silva RS, Alecrim MG 2012. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malar. J.* 11: 12.
- Lanfrancotti A, Lombardo F, Santolamazza F, Veneri M, Castrignanò T, Coluzzi M, Arcà B 2002. Novel cDNAs encoding salivary proteins from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *FEBS Lett.* 517: 67–71.
- Lavazec C, Bourgouin C 2008. Mosquito-based transmission blocking vaccines for interrupting *Plasmodium* development. *Microbes Infect.* 10: 845–849.
- Lawrie CH, Sim RB, Nuttall P a 2005. Investigation of the mechanisms of anti-complement activity in *Ixodes ricinus* ticks. *Mol. Immunol.* 42: 31–38.
- Lewis LA, Ram S 2014. Meningococcal disease and the complement system. *Virulence* 5: 98–126.
- Luo S, Skerka C, Kurzai O, Zipfel PF 2013. Complement and innate immune evasion strategies of the human pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol. Immunol.* 56: 161–169.
- Medica DL, Innis P 2005. Quantitative Dynamics of *Plasmodium yoelii* Sporozoite Transmission by Infected Anopheline Mosquitoes. *Infect. Immun.* 73: 4363–4369.
- Medicus RG, Götze O, Müller-Eberhard HJ 1976. Alternative pathway of complement: recruitment of precursor properdin by the labile C3/C5 convertase and the potentiation of the pathway. *J. Exp. Med.* 144: 1076–1093.
- Mendes-Sousa AF, Nascimento AAS, Queiroz DC, Vale VF, Fujiwara RT, Araújo RN, Pereira MH, Gontijo NF 2013. Different host complement systems and their interactions with saliva from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) and *Leishmania infantum* promastigotes. *PLoS One* 8: e79787.
- Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK 2002. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 415: 673–679.
- Molina D, Figueroa LE 2009. [Metabolic resistance to organophosphate insecticides in *Anopheles aquasalis* Curry 1932, Libertador municipality, Sucre State, Venezuela]. *Biomedica* 29: 604–615.
- Moreira CK, Marrelli MT, Lima SP, Marinotti O 2001. Analysis of Salivary Gland Proteins of the Mosquito *Anopheles darlingi* (Diptera : Culicidae) Analysis of Salivary Gland Proteins of the Mosquito *Anopheles darlingi* (Diptera : Culicidae). 38: 763–767.
- Morgan BP, Marchbank KJ, Longhi MP, Harris CL, Gallimore AM 2005. Complement: central to innate immunity and bridging to adaptive responses. *Immunol. Lett.* 97: 171–179.
- Mota MM, Rodriguez A 2004. Migration through host cells: the first steps of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. *Cell. Microbiol.* 6: 1113–

- Nascimento A 2011. Atividade lítica pelo sistema complemento em promastigotas de *Leishmania* (*Leishmania*) infantum frente a componentes salivares de *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) longipalpis (Diptera : Psychodidae) Atividade lítica pelo sistema complemento em promastigotas de.
- Okroj M, Holmquist E, Nilsson E, Anagnostaki L, Jirström K, Blom AM 2015. Local expression of complement factor I in breast cancer cells correlates with poor survival and recurrence. *Cancer Immunol. Immunother.* 64: 467–478.
- Oliveira F, Rowton E, Aslan H, Gomes R, Castrovinci PA, Alvarenga PH, Abdeladhim M, Teixeira C, Meneses C, Kleeman LT, Guimarães-Costa AB, Rowland TE, Gilmore D, Doumbia S, Reed SG, Lawyer PG, Andersen JF, Kamhawi S, Valenzuela JG 2015. A sand fly salivary protein vaccine shows efficacy against vector-transmitted cutaneous leishmaniasis in nonhuman primates. *Sci. Transl. Med.* 7: 290ra90.
- Oliveira-Ferreira J, Lacerda MVG, Brasil P, Ladislau JLB, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT 2010. Malaria in Brazil: an overview. *Malar. J.* 9: 115.
- Ooi C-P, Haines LR, Southern DM, Lehane MJ, Acosta-Serrano A 2015. Tsetse GmmSRPN10 Has Anti-complement Activity and Is Important for Successful Establishment of Trypanosome Infections in the Fly Midgut. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9: e3448.
- Owhashi M, Harada M, Suguri S, Ohmae H, Ishii A 2001. The role of saliva of *Anopheles stephensi* in inflammatory response: identification of a high molecular weight neutrophil chemotactic factor. *Parasitol. Res.* 87: 376–382.
- Owhashi M, Harada M, Suguri S, Omae H, Ishii A 2008. Identification of an eosinophil chemotactic factor from anopheline mosquitoes as a chitinase family protein. *Parasitol. Res.* 102: 357–363.
- Pangburn MK 1989. Analysis of the natural polymeric forms of human properdin and their functions in complement activation. *J. Immunol.* 142: 202–207.
- Pauly D, Nagel BM, Reinders J, Killian T, Wulf M, Ackermann S, Ehrenstein B, Zipfel PF, Skerka C, Weber BHF 2014. A novel antibody against human properdin inhibits the alternative complement system and specifically detects properdin from blood samples. *PLoS One* 9: e96371.
- Phasomkusolsil S, Pantuwattana K, Tawong J, Khongtak W, Kertmanee Y, Monkanna N, Klein TA, Kim H, Mccardle PW 2015. Acta Tropica The relationship between wing length , blood meal volume , and fecundity for seven colonies of *Anopheles* species housed at the Armed Forces Research Institute of Medical Sciences , Bangkok , Thailand. *Acta Trop.* i: 220–227.
- Pimenta PF, Orfano AS, Bahia AC, Duarte AP, Ríos-Velásquez CM, Melo FF, Pessoa FA, Oliveira GA, Campos KM, Villegas LM, Rodrigues NB, Nacif-Pimenta R, Simões RC, Monteiro WM, Amino R, Traub-Cseko YM, Lima JB, Barbosa MG, Lacerda MV, Tadei WP, Secundino NF 2015. An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon *Anopheles* vectors. *Mem. Inst.*

- Oswaldo Cruz* 110: 23–47.
- Potempa M, Potempa J 2012. Protease-dependent mechanisms of complement evasion by bacterial pathogens. *Biol Chem* 393: 873–888.
- Póvoa MM, Conn JE, Schlichting CD, Amaral JCOF, Segura MNO, Silva ANM Da, Santos CCB Dos, Lacerda RNL, Souza RTL De, Galiza D, Santa Rosa EP, Wirtz R a 2003. Malaria vectors, epidemiology, and the re-emergence of *Anopheles darlingi* in Belém, Pará, Brazil. *J. Med. Entomol.* 40: 379–386.
- Ribeiro JM 1987. *Ixodes dammini* : Salivary Anti-complement Activity. *Exp. Parasitol.* 353: 347–353.
- Ribeiro JM, Nussenzveig RH 1993. The salivary catechol oxidase/peroxidase activities of the mosquito *Anopheles albimanus*. *J. Exp. Biol.* 179: 273–287.
- Ribeiro JM, Spielman a 1986. *Ixodes dammini*: salivary anaphylatoxin inactivating activity. *Exp. Parasitol.* 62: 292–297.
- Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD 2010. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* 11: 785–797.
- Ricklin D, Lambris JD 2013. Progress and Trends in Complement Therapeutics (JD Lambris, VM Holers, and D Ricklin, Eds.). *Adv Exp Med Biol* 734: 1–22.
- Rocha AC da, Braga ÉM, Araújo MS, Franklin BS, Pimenta PF 2004. Effect of the *Aedes fluviatilis* saliva on the development of *Plasmodium gallinaceum* infection in *Gallus (gallus) domesticus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99: 709–715.
- Rosa TFA, Flammersfeld A, Ngwa CJ, Kiesow M, Fischer R, Zipfel PF, Skerka C, Pradel G 2015. The *Plasmodium falciparum* blood stages acquire factor H family proteins to evade destruction by human complement. *Cell. Microbiol.*
- Roumenina LT, Loirat C, Dragon-Durey M-A, Halbwachs-Mecarelli L, Sautes-Fridman C, Fremeaux-Bacchi V 2011. Alternative complement pathway assessment in patients with atypical HUS. *J. Immunol. Methods* 365: 8–26.
- Sacks D, Sher A 2002. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat. Immunol.* 3: 1041–1047.
- Sampaio VS, Siqueira AM, Alecrim M das GC, Mourão MPG, Marchesini PB, Albuquerque BC, Nascimento J, Figueira ÉAG, Alecrim WD, Monteiro WM, Lacerda MVG 2015. Malaria in the State of Amazonas: a typical Brazilian tropical disease influenced by waves of economic development. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 48 Suppl 1: 4–11.
- Saúde M da 2010. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. *Bras. - Ministério da Saúde*: 36.
- Schroeder H, Skelly PJ, Zipfel PF, Losson B, Vanderplasschen A 2009. Subversion of complement by hematophagous parasites. *Dev. Comp. Immunol.* 33: 5–13.
- Schuijt TJ, Coumou J, Narasimhan S, Dai J, Deponte K, Wouters D, Brouwer M, Oei A, Roelofs JJTH, Dam AP van, Poll T van der, Van't Veer C, Hovius JW, Fikrig E

- 2011a. A tick mannose-binding lectin inhibitor interferes with the vertebrate complement cascade to enhance transmission of the lyme disease agent. *Cell Host Microbe* 10: 136–146.
- Schuijt TJJ, Narasimhan S, Daffre S, DePonte K, Hovius JWWR, Van't Veer C, Poll T van der, Bakhtiari K, Meijers JCM, Boder ET, Dam AP van, Fikrig E, Coumou J, Narasimhan S, Dai J, DePonte K, Wouters D, Brouwer M, Oei A, Roelofs JJTH, van Dam AP, van der Poll T, van't Veer C, Hovius JWWR, Fikrig E 2011b. Identification and characterization of Ixodes scapularis antigens that elicit tick immunity using yeast surface display. *Cell Host Microbe* 6: e15926.
- Silva AN Da, Santos CC Dos, Lacerda RN, Santa Rosa EP, Souza RT De, Galiza D, Sucupira I, Conn JE, Póvoa MM 2006. Laboratory colonization of Anopheles aquasalis (Diptera: Culicidae) in Belém, Pará, Brazil. *J. Med. Entomol.* 43: 107–109.
- Sim RB, Laich A 2000. Serine proteases of the complement system. *Biochem. Soc. Trans.* 28: 545–550.
- Simon N, Lasonder E, Scheuermayer M, Kuehn A, Tews S, Fischer R, Zipfel PF, Skerka C, Pradel G 2013. Malaria parasites co-opt human factor h to prevent complement-mediated lysis in the mosquito midgut. *Cell Host Microbe* 13: 29–41.
- Sinka ME, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Boeckel T Van, Kabaria CW, Harbach RE, Hay SI 2010. The dominant Anopheles vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasit. Vectors* 3: 72.
- Späth GF, Garraway L a, Turco SJ, Beverley SM 2003. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of Leishmania major infections in mammalian hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 9536–9541.
- Sturm A, Amino R, Sand C van de, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok J-M, Menard R, Heussler V 2006. Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. *Science (80-.).* 313: 1287–1290.
- Titus RG, Bishop J V, Mejia JS 2006. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunol.* 28: 131–141.
- Titus RG, Ribeiro JM 1988. Salivary gland lysates from the sand fly Lutzomyia longipalpis enhance Leishmania infectivity. *Science* 239: 1306–1308.
- Torreira E, Tortajada A, Montes T, Cordoba S, Llorca O 2009. 3D structure of the C3bB complex provides insights into the activation and regulation of the complement alternative pathway convertase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 882–887.
- Tyson KR, Elkins C, Silva a. M de 2008. A Novel Mechanism of Complement Inhibition Unmasked by a Tick Salivary Protein That Binds to Properdin. *J. Immunol.* 180: 3964–3968.

- Valenzuela JG, Charlab R, Mather TN, Ribeiro JM 2000. Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *J. Biol. Chem.* 275: 18717–18723.
- Valenzuela JG, Francischetti IMB, Pham VM, Garfield MK, Ribeiro JMC 2003. Exploring the salivary gland transcriptome and proteome of the *Anopheles stephensi* mosquito. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33: 717–732.
- Valenzuela JG, Francischetti IM, Ribeiro JM 1999. Purification, cloning, and synthesis of a novel salivary anti-thrombin from the mosquito *Anopheles albimanus*. *Biochemistry* 38: 11209–11215.
- Vaughan J a., Scheller LF, Wirtz R a., Azad AF 1999. Infectivity of *Plasmodium berghei* sporozoites delivered by intravenous inoculation versus mosquito bite: Implications for sporozoite vaccine trials. *Infect. Immun.* 67: 4285–4289.
- VLADIMIR FAZITO DO VALE 2011. Estudo da atividade inibidora do sistema do complemento humano presente na saliva e conteúdo intestinal de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae).
- Weatherall DJ, Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK, Casals-Pascual C, Roberts DJ 2002. Malaria and the red cell. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*: 35–57.
- World Health Organization 2014. World malaria report 2014.
- Yoshida S, Sudo T, Niimi M, Tao L, Sun B, Kambayashi J, Watanabe H, Luo E, Matsuoka H 2008. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline antiplatelet protein, a saliva protein from a malaria vector mosquito. *Blood* 111: 2007–2014.
- Zhou D, Zhang D, Ding G, Shi L, Hou Q, Ye Y, Xu Y, Zhou H, Xiong C, Li S, Yu J, Hong S, Yu X, Zou P, Chen C, Chang X, Wang W, Lv Y, Sun Y, Ma L, Shen B, Zhu C 2014. Genome sequence of *Anopheles sinensis* provides insight into genetics basis of mosquito competence for malaria parasites. *BMC Genomics* 15: 42.