

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

**Avaliação da atividade inibidora do sistema complemento humano  
pelo extrato de glândula salivar e conteúdo intestinal de *Aedes aegypti*  
(Diptera: Culicidae)**

**ADALBERTO ALVES PEREIRA FILHO**

**Belo Horizonte – MG**

**2018**

**ADALBERTO ALVES PEREIRA FILHO**

**Avaliação da atividade inibidora do sistema complemento humano  
pelo extrato de glândula salivar e conteúdo intestinal de *Aedes aegypti*  
(Diptera: Culicidae)**

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

Área de concentração: Entomologia

Orientador: Prof. Dr. Maurício Roberto Viana Sant'Anna

Coorientador: Prof. Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo.

Belo Horizonte – MG

2018

Trabalho realizado no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar forças, principalmente nos momentos mais difíceis desse doutorado.

À minha família pelo apoio incondicional.

Ao meu orientador, Maurício, pela orientação, confiança e espontaneidade.

Ao meu co-orientador, Seu Nelder, pela confiança, ensinamentos e chineladas.

À Juliana, pelo abraço carinhoso, pelas conversas boas, pelo papo de mãe.

Aos meus ICs que muuuuuito me ajudaram, Caio, Artur e Rafa.

Ao Lucas e Daniel, que não foram meus ICs, mas me auxiliaram também.

Aos professores do LFIH pela troca constante de conhecimento.

Aos técnicos, César e Marcita, pelas conversas e momentos de ajuda.

Aos demais colegas do LFIH por proporcionar excelente ambiente de trabalho, de conhecimento, e companheirismo, em especial, Gabriel (muso da parasito), Jéssica (rainha do Kunitz), Paula (rainha dos carrapatos) e Rafaela (rainha da Biomol).

À Naylene (rainha do complemento) que me ensinou o Ba-a-bá do sistema complemento.

À turma do Mestrado (Lado B), em especial Luísa Mourão (D. moça), Breno (Seu moço), Mariana Cunha (Mari) pela convivência agradável e amizade especial.

À Nat Saldanha (Profa. Querida) e Regina (Dinda) pelos bons momentos proporcionados.

À Andressa por sempre se preocupar comigo mesmo muito ocupada com o internato.

À Profa. Dani pelo apoio logístico.

À Mari da Dani que sempre me ajudou quando eu precisei.

Agradecimentos à coordenação do Programa de Pós Graduação em Parasitologia, Dani e Fuji e as prestativas secretárias Sumara e Sibebe, sempre dispostas a ajudar.

Às agências de fomento que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho. E as pessoas que não citei, mas tiveram seu papel no desenvolvimento dessa tese.

## RESUMO

Dengue, Chikungunya e Zika são arbovírus transmitidos aos seres humanos por mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente o *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762), causando surtos simultâneos com manifestações clínicas semelhantes, representando hoje um desafio no diagnóstico e tratamento dos doentes. Machos e fêmeas de *A. aegypti* alimentam-se de substâncias açucaradas, mas as fêmeas necessitam de um repasto sanguíneo para maturação dos ovos. Para que artrópodes hematófagos realizem um repasto sanguíneo satisfatório em hospedeiros vertebrados, os mecanismos responsáveis pela hemostasia (vasoconstrição, agregação plaquetária, coagulação e reações imunes) precisam ser sobrepostos, de modo que o inseto permaneça vivo e seja capaz de transmitir a infecção a diferentes hospedeiros. Além disso, a saliva de artrópodes hematófagos deve conter moléculas que causam imunomodulação nos hospedeiros vertebrados. Neste contexto, as moléculas presentes na saliva ou no conteúdo intestinal destes artrópodes podem ser inibidoras do sistema do complemento (SC), que constitui parte da resposta imune inata a patógenos ou parte complementar da imunidade adquirida devido aos anticorpos ligados aos microorganismos. Os inibidores salivares e intestinais do SC visam proteger as células do tubo digestivo de artrópodes hematófagos contra o ataque do complemento presente no sangue ingerido. Uma outra forma de evadir o SC de hospedeiros vertebrados seria a captação de fator H, também presente no soro. O fator H, uma vez depositado sob a superfície de células, as protege da ativação do próprio SC ao promover sua inativação pela ação da proteína regulatória chamada Fator I. O presente trabalho teve como objetivo verificar a atividade anti-complemento do extrato de glândula salivar (EGS) e conteúdo intestinal de *A. aegypti* sobre as vias alternativa, clássica e das lectinas do sistema complemento humano. Além disso, investigamos se o intestino do mosquito é capaz de captar o fator H do soro humano para se proteger contra o ataque do SC. A inibição das vias clássica e alternativa foram avaliadas através de ensaios hemolíticos assim como a captação do fator H pelo intestino foi realizado com uso de anticorpo anti-fator H humano. Os resultados mostraram que o EGS não é capaz de inibir nenhuma das vias do SC, porém o conteúdo intestinal de fêmeas de *A. aegypti* inibiu a via clássica e das lectinas, embora não tenha apresentado inibidores solúveis intestinais contra a via alternativa. O conteúdo intestinal não inibiu a deposição dos componentes C1q e MBL, porém houve uma expressiva inibição da deposição dos componentes C4b, C3b, C5b e C9. O conteúdo intestinal possui uma serino protease que foi capaz de clivar C4 em bandas menores que 80 kDa. O intestino de fêmeas de *A. aegypti* foi capaz de captar o fator H do soro humano, diferentemente de machos. Machos de *A. aegypti* apresentaram tempo de sobrevivência menor em relação às fêmeas quando submetidos aos componentes do sangue humano (soro humano normal e hemoglobina). As moléculas de C3 em fêmeas de *A. aegypti* recém alimentadas permanecem em seu estado original, mas a partir de 30 minutos se tornaram inativadas com formação de iC3b, sugerindo que essa estratégia de proteção contra o dano causado pelo complemento esteja presente em *A. aegypti*, sendo a captação de fator H primordial para inibição da via alternativa do complemento humano pelo *A. aegypti*. Diante do fato de que inibidores de complemento sejam vitais para a sobrevivência de fêmeas de insetos hematófagos, candidatos vacinais baseados em proteínas de *A. aegypti* que inibem o complemento humano tem grande potencial em interferir em aspectos relacionados à sobrevivência e à reprodução deste mosquito.

Palavras-Chave: *Aedes aegypti*, Sistema Complemento Humano, Inibidores do complemento, Fator H

## ABSTRACT

Dengue, Chikungunya and Zika are arboviruses transmitted to humans by mosquitoes of the species *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762), causing simultaneous outbreaks with similar clinical manifestations, representing a challenge in the diagnosis and patient treatment. *A. aegypti* males and females feed on plant-derived sugars but females need a blood meal for egg maturation. In order to obtain blood from vertebrate hosts, haematophagous arthropods need to overcome host hemostasis, represented by vasoconstriction, platelet aggregation and coagulation, as well as inflammation and immune reactions. In this context, molecules present in the saliva and/or intestinal contents of these arthropods may contain inhibitors of the complement system (CS), which is part of the innate immune response to pathogens. CS salivary and intestinal inhibitors are crucial to protect gut cells from haematophagous arthropods against the attack of the complement system present in the ingested blood. Another way to evade complement activation is the uptake of the regulatory protein factor H, also present in serum. Factor H, once deposited in cell surfaces, protects them from complement activation by recruiting the action of the protease called Factor I, thus inactivating the opsonin C3b, also part of the C3 convertases, which will ultimately trigger complement activation and MAC formation. The present work aimed to investigate the anticomplement activity of salivary gland extracts (EGS) and intestinal contents of *A. aegypti* on the alternative, classical and lectin pathways of the human complement system. In addition, we investigated whether the mosquito gut is capable of capturing human serum H-factor to protect itself against SC attack. Inhibition of the classical and alternative pathways were evaluated by haemolytic assays and the uptake of factor H by the *A. aegypti* gut was performed using human anti-factor H antibodies. The results showed that the *A. aegypti* salivary gland extract was not able to inhibit any of the CS pathways. However, *A. aegypti* intestinal contents inhibited the classical and the lectin pathways but not the alternative pathway. The intestinal contents did not inhibit the deposition of C1q and MBL components, but inhibited the deposition of downstream components C4b, C3b, C5b and C9. The intestinal content has a serine protease that was able to cleave C4 in bands smaller than 80 kDa. The gut of female *A. aegypti* was capable of capturing human serum H factor, unlike males. *A. aegypti* males presented lower survival rate compared to females when these were fed with human blood components (normal human serum and hemoglobin). The C3 molecules in recently blood fed *A. aegypti* females remain in their original state, becoming inactivated to iC3b as soon as 30 minutes after the blood feed, suggesting that this strategy against complement damage is present in *A. aegypti*. Considering that human complement inhibitors are vital for the survival of female *Aedes* mosquitoes, vaccine candidates based on *A. aegypti* proteins that inhibit human complement have great potential to interfere in aspects related to their survival and reproduction.

Key-words: *Aedes aegypti*, human complement system, complement inhibition, factor H

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo biológico de <i>Aedes aegypti</i> .	13
Figura 2	Mapa global da distribuição prevista de <i>Aedes aegypti</i> .	14
Figura 3	Representação das três vias de ativação do sistema complemento.	20
Figura 4	Glândula salivar de <i>Aedes aegypti</i> (A <sub>1</sub> e A <sub>2</sub> ) e aparelho intestinal de <i>A. aegypti</i> (B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> ) indicando o Intestino Médio (IM)	27
Figura 5	Sobrevivência de Machos e Fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> submetidos a diferentes tratamentos.	47
Figura 6	Atividade da Catalase em intestinos médios de machos e fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> .	48
Figura 7	Efeito do EGS de <i>Aedes aegypti</i> sobre a atividade hemolítica das vias clássica e alternativa do complemento humano.	49
Figura 8	Avaliação da ativação do complemento no intestino médio de <i>Aedes aegypti</i> em diferentes condições.	50
Figura 9	Efeito do conteúdo intestinal de <i>Aedes aegypti</i> sobre a atividade hemolítica da via clássica e alternativa do complemento humano.	51
Figura 10	Efeito do conteúdo intestinal de <i>Aedes aegypti</i> sobre a deposição de moléculas da via clássica do complemento humano.	53
Figura 11	Efeito do conteúdo intestinal de <i>Aedes aegypti</i> sobre moléculas da via clássica do complemento previamente depositadas na placa de ELISA após incubação com soro humano.	54
Figura 12	Efeito do conteúdo intestinal de machos de <i>Aedes aegypti</i> sobre a atividade hemolítica da via clássica do complemento humano.	55
Figura 13	Efeito do EGS de <i>Aedes aegypti</i> incubado sobre a deposição de moléculas da via clássica do complemento humano.	56
Figura 14	Efeito do conteúdo intestinal de <i>Aedes aegypti</i> sobre a deposição de moléculas da via das lectinas do complemento humano.	58
Figura 15	Ação do conteúdo intestinal de <i>Aedes aegypti</i> na deposição de componentes formadores do MAC.	59
Figura 16	Ação do conteúdo intestinal de <i>Aedes aegypti</i> sobre clivagem do C4 pela enzima C1s.	60
Figura 17	Natureza da protease presente no conteúdo intestinal de <i>A. aegypti</i> .	61

Figura 18	Avaliação cinética do perfil de C4 no intestino de <i>Aedes aegypti</i> após repasto sanguíneo com sangue humano.	62
Figura 19	Captação de Fator H de fêmeas pelo intestino médio de <i>Aedes aegypti</i> .	63
Figura 20	Captação de Fator H purificado pelo intestino médio de machos e fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> .	64
Figura 21	Perfil de ativação de C3 no intestino de <i>Aedes aegypti</i> recém-alimentado com sangue humano.	65



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

CI: Conteúdo intestinal

CHIKV: Chikungunya vírus

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGS: Extrato de glândula salivar

EGTA: Ácido etilenoglicol tetra-acético

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

FB: Fator B

FH: Fator H

FI: Fator I

IgG: Imunoglobulina tipo G

IgM: Imunoglobulina tipo M

MAC: Complexo de ataque à membrana

MASPs: Serino proteases associadas à MBL

MBL: Lectina ligante da manose

PAMPs: Padrões moleculares de reconhecimento de patógenos

PBS: Tampão fostato salino

pH: Potencial hidrogeniônico

PRRs: Receptores de reconhecimento padrão

PMSF: Fenilmetilsulfonil fluorido

RCF: Relative Centrifugal Force (g)

SHN: Soro humano normal

ZIKV: Zika vírus

## SUMÁRIO

1	Introdução.....	13
1.1	A ecologia de <i>Aedes aegypti</i> e sua importância médica como vetor de arboviroses.....	13
1.2	A saliva de <i>Aedes aegypti</i> .....	16
1.3	O sistema complemento .....	17
1.4	Inibidores do sistema complemento em artrópodes hematófagos.....	21
1.5	Mecanismos de evasão do sistema complemento por artrópodes e parasitos.....	22
2	Justificativa.....	24
3	Objetivos.....	25
3.1	Objetivo Geral.....	25
3.2	Objetivos específicos.....	25
4	Materiais e Métodos.....	26
4.1	Aprovação em comitê de ética.....	26
4.2	Origem e criação dos mosquitos <i>Aedes aegypti</i> .....	26
4.3	Obtenção dos extratos de glândulas salivares (EGS) e conteúdo intestinal dos mosquitos .....	28
4.4	Soros, anticorpos e proteínas.....	28
4.4.1	Obtenção de soro humano.....	28
4.4.2	Purificação da imunoglobulina G (IgG).....	28
4.4.3	Anticorpos e outras proteínas purificadas .....	29
4.5	Curva de sobrevivência de machos x fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> frente a diferentes dietas.....	30
4.6	Avaliação da presença de catalase em intestino médio de machos e fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> .....	30
4.7	Ensaio Hemolítico.....	31
4.7.1	Obtenção e preparação das hemácias de carneiro.....	31

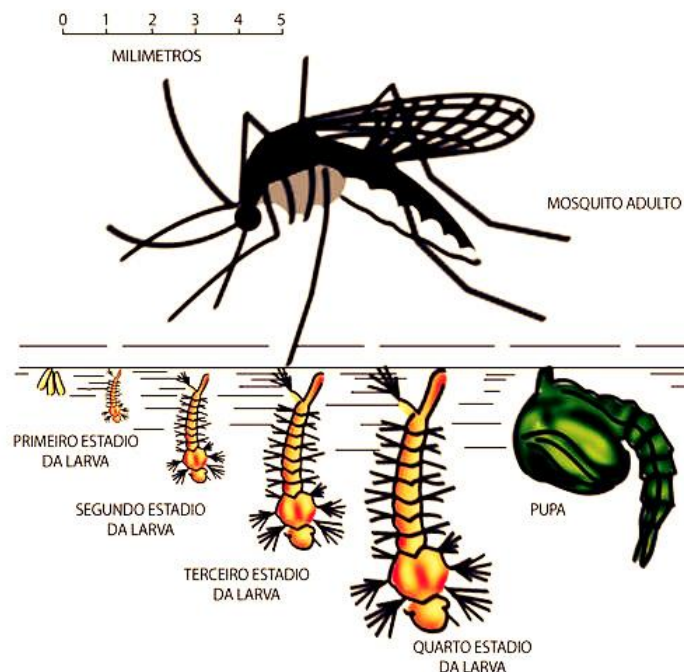
4.7.2	Ensaio hemolítico da via clássica .....	32
4.7.3	Obtenção e preparação das hemácias de coelho .....	33
4.7.4	Ensaio hemolítico da via alternativa .....	33
4.7.5	Ensaio hemolítico para avaliação da deposição dos componentes do CAM .....	33
4.8	Ensaio de imunoabsorção enzimática em microplacas.....	35
4.8.1	Avaliação da atividade inibidora do conteúdo intestinal sobre a deposição dos fatores da via clássica do sistema complemento humano.....	35
4.8.2	Avaliação da capacidade do conteúdo intestinal de <i>Aedes aegypti</i> em desligar componentes da via clássica previamente depositada na placa.....	37
4.8.3	Avaliação da inibição da deposição dos fatores da via das lectinas do sistema complemento humano pelo EGS e conteúdo intestinal.....	37
4.8.4	Ensaio para avaliar a proporção de deposição dos componentes C3 e C9 na parede intestinal de <i>Aedes aegypti</i> na presença e na ausência de molécula(s) inibidora(s).....	38
4.8.5	Avaliação da capacidade do intestino de fêmeas captar o fator H presente no Soro Humano Normal.....	39
4.8.6	Avaliação da capacidade do epitélio intestinal de <i>A. aegypti</i> na captação do fator H purificado.....	40
4.9	Avaliação da ação do conteúdo intestinal de <i>A. aegypti</i> sobre a atividade enzimática do C1s ativado sobre C4.....	42
4.10	Avaliação da natureza da protease presente no conteúdo intestinal de <i>A. aegypti</i> .....	43
4.11	Avaliação cinética do processamento de C4 no intestino de <i>Aedes aegypti</i> após repasto sanguíneo com sangue humano.....	43
4.12	Avaliação cinética do processamento de C3 no intestino de <i>Aedes aegypti</i> após repasto sanguíneo com sangue humano.....	43
4.13	Análise estatística dos dados.....	44
5	Resultados .....	45
5.1	Quantificação de proteínas do EGS e do intestino médio de <i>Aedes aegypti</i> .....	45
5.2	Curva de sobrevivência de machos e fêmeas submetidos a diferentes condições nutritivas.....	45
5.3	Avaliação da atividade de catalase em intestino médio de machos e fêmeas <i>Aedes aegypti</i> .....	48
5.4	Efeito do EGS de <i>Aedes aegypti</i> sobre a atividade hemolítica da via clássica e alternativa do complemento humano.....	49

5.5	Avaliação da proporção de deposição dos componentes C3 e C9 na parede intestinal de <i>Aedes aegypti</i> na presença e na ausência de molécula(s) inibidora(s).....	50
5.6	Efeito do conteúdo intestinal de <i>Aedes aegypti</i> sobre a atividade hemolítica da via clássica e alternativa do complemento humano.....	51
5.7	Avaliação do efeito do conteúdo intestinal de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> sobre a deposição de moléculas do sistema do complemento humano ativado pela via clássica.....	52
5.8	Avaliação da capacidade do conteúdo intestinal de <i>Aedes aegypti</i> em desligar componentes da via clássica previamente depositados .....	54
5.9	Avaliação do efeito do conteúdo intestinal de machos de <i>Aedes aegypti</i> sobre a atividade hemolítica da via clássica do complemento humano.....	55
5.10	Avaliação da inibição da deposição dos fatores da via das lectinas do sistema complemento humano pelo EGS e conteúdo intestinal.....	56
5.11	Avaliação da atuação do conteúdo intestinal sobre a formação do complexo de ataque à membrana (CAM).....	59
5.12	Avaliação da ação do conteúdo intestinal de <i>A. aegypti</i> sobre a atividade enzimática do C1s ativado sobre C4.....	60
5.13	Avaliação da natureza da protease presente no conteúdo intestinal de <i>A. aegypti</i> .....	61
5.14	Avaliação cinética do processamento de C4 no intestino de <i>Aedes aegypti</i> após repasto sanguíneo com sangue humano.....	62
5.15	Avaliação da capacidade do epitélio intestinal de fêmeas de <i>A. aegypti</i> em captar fator H presente no Soro Humano Normal.....	63
5.16	Avaliação da capacidade do conteúdo intestinal de <i>A. aegypti</i> de machos e fêmeas em captar fator H purificado.....	64
5.17	Avaliação cinética do processamento de C3 no intestino de <i>Aedes aegypti</i> após repasto sanguíneo com sangue humano.....	65
6	Discussão.....	66
7	Conclusões.....	74
8	Referência bibliográfica.....	76

## 1 – Introdução

### 1.1 – A ecologia de *Aedes aegypti* e sua importância médica como vetor de arboviroses

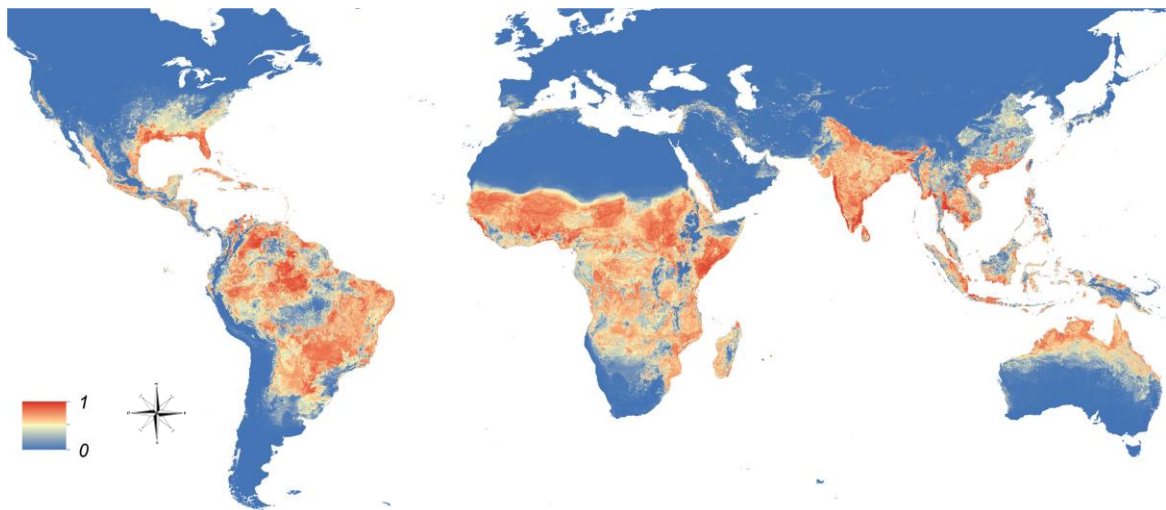
O *Aedes aegypti*, também chamado de pernilongo, pernilongo-rajado ou mosquito da dengue, é uma espécie pertencente à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Culicidae, subfamília Culicinae, tribo Aedini e gênero *Aedes* (Forattini 2002). É um inseto que apresenta desenvolvimento holometábolo, caracterizado por apresentar as fases de ovo, larva (L1, L2, L3, e L4), pupa e adulto (**Figura 1**) (Forattini 2002) e que apresenta hábito extremamente adaptado aos ambientes urbano e doméstico, sendo considerado um mosquito diurno (Natal 2002). Ambos fêmea e macho possuem o tempo médio de vida de 45 dias e nutrem-se de carboidratos encontrados em seiva de flores e frutas, porém apenas a fêmea é hematófaga, uma vez que a ingestão de sangue é necessária para o desenvolvimento dos ovos (Silva et al. 2008, Carvalho & Moreira 2016).



**Figura 1: Ciclo biológico de *Aedes aegypti*.** O *Aedes aegypti* apresenta ciclo holometábolo, compreendendo quatro fases: ovo, larva (quatro estádios larvários), pupa e adulto. Fonte: [deleonscarlett.wordpress.com](http://deleonscarlett.wordpress.com)

Acredita-se que o *A. aegypti* tenha origem no continente africano chegando às Américas através de barris d'água vindos em navios das primeiras explorações e colonizações européias (Mousson et al. 2005). Esse inseto está distribuído pelos cinco continentes (**Figura 2**) (Kraemer et al. 2015) e no Brasil está presente nos vinte e sete estados da Federação, distribuído em aproximadamente 4.523 municípios (Zara et al. 2016).

A distribuição global de *A. aegypti* é fortemente influenciada por fatores climáticos, uma vez que temperaturas de 10°C ou menores limitam o desenvolvimento larval e impactam a sobrevivência de adultos (Hopp & Foley 2001), por isso é encontrado em regiões neotropicais, onde fatores ambientais (chuva, temperatura e umidade relativa) favorecem o ciclo de vida desse inseto, tornando sua distribuição cada vez mais abrangente (Eisen et al. 2014). O rápido crescimento e urbanização das populações humanas em áreas tropicais sem infraestrutura básica de saneamento ampliaram a faixa de ocorrência das arboviroses transmitidas pelo *A. aegypti*, em razão da difusão do mosquito em áreas antes livres destas doenças (Rebêlo et al. 1999, Carvalho & Moreira 2016).



**Figura 2: Mapa global da distribuição de *Aedes aegypti*.** O mapa mostra a probabilidade de ocorrência (de 0 azul a 1 vermelho) a uma distância espacial de resolução de 5 km × 5 km. Fonte: Kraemer et al. (2015).

*Aedes aegypti* é o principal vetor urbano de Febre Amarela, sendo também o vetor primário de arbovírus que causam a Dengue, Chikungunya e Zika (Gloria-Soria et al. 2016).

A Dengue é a doença viral predominantemente transmitida por *A. aegypti*, sendo também transmitida secundariamente por *Aedes albopictus*. É causada por um dos quatro sorotipos distintos de vírus (DENV-1,-2,-3, -4) que são membros da família *Flaviviridae* (gênero: *Flavivirus*) (Ramos-Castañeda et al. 2017). A Dengue tem como sintomas: febre alta repentina acompanhada de dores de cabeça, dores por todo o corpo, seja nos músculos ou nas articulações, fraqueza, além da possível perda de peso, náuseas, vômitos ocasionais, erupção e coceira na pele (Guerdan 2010). A Dengue hemorrágica, tipo mais grave da doença, tem como sintomas iniciais são semelhantes aos da dengue clássica, e após o terceiro ou quarto dia surgem hemorragias causadas pelo sangramento de pequenos vasos da pele e outros órgãos. (Hopp & Foley 2001).

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um alfavírus que circula predominantemente em regiões tropicais e subtropicais, afetando potencialmente mais de 1 bilhão de pessoas (Goupil & Mores 2016, Graham et al. 2016). Após um período de incubação de 2-7 dias aproximadamente, 95% das pessoas infectadas desenvolverão sintomas que consistem em febre alta, dores de cabeça, erupção cutânea, mialgia e dores articulares graves (Sebastian et al. 2009, Ali Ou Alla & Combe 2011). No Brasil, os primeiros casos autóctones foram registrados no Estado de Amapá e posteriormente, Bahia e Minas Gerais no ano de 2014 (Figueredo & Figueiredo 2014).

A disseminação pandêmica do vírus Zika (ZIKV), um outro membro da família *Flaviviridae*, do gênero *Flavivirus*, transmitida às pessoas pelos mosquitos do gênero *Aedes* (Sakkas et al. 2016), principalmente por *A. aegypti* e *A. albopictus* tornou-se um grande problema de saúde pública no Brasil recentemente (Campos et al. 2015, Fellner 2016). Desde 1947, ano da descoberta do vírus Zika em Uganda, até o ano de 2016, o mesmo foi registrado em 74 países, sendo que nas décadas de 1960 e 1980, as infecções de Zika em humanos foram encontradas em toda a África e Ásia (Kay et al. 2016). A confirmação dos primeiros casos no Brasil deu-se ao início do ano de 2015 oriundos do estado do Rio Grande do Norte (Zanluca et al. 2015).

A infecção pelo vírus Zika é mais comumente caracterizada por início agudo da febre com duração de 3-7 dias, geralmente sem complicações graves, seguido de dor de cabeça, artralgia, mialgia e uma erupção maculopapular generalizada que pode envolver qualquer área do corpo (He et al. 2016, Moreira et al. 2017). Essa doença tem sido associada com a ocorrência de microcefalia e síndrome de Guillain-Barré, uveíte, mielite e meningoencefalite em adultos (Slenczka 2016).

Embora ainda não exista vacina ou tratamento específico para Zika, em um estudo publicado recentemente tem se verificado que o medicamento Sofosbuvir, utilizado para o tratamento da hepatite C, inibiu a replicação de ZIKV em diferentes células tais como: hepatoma (Huh-7), células de neuroblastoma (SH-Sy5y) e células estaminais neurais (NSC) (Sacramento et al. 2016). Especialistas em reprodução estão particularmente preocupados com a propagação do ZIKV, uma vez que se podem ter outras rotas de infecção como a sexual e transplacentária, resultando em anormalidades congênitas fetais (Novak et al. 2016).

Embora nenhum ciclo urbano novo de febre amarela tenha sido relatado nas Américas desde o final de um programa de erradicação do *Aedes* no final dos anos 1950, o alto número de indivíduos não vacinados que visitam áreas endêmicas, principalmente áreas silvestres de febre amarela e retornam a áreas urbanas infestadas por *Aedes*, tem promovido o aumento do risco de ciclos urbanos de febre amarela (Massad et al. 2018). No Brasil, a febre amarela é endêmica na Bacia Amazônica brasileira, com surtos esporádicos ocorrendo fora da área endêmica. Entretanto, desde 2016, epidemias de febre amarela estão ocorrendo no Sudeste do Brasil, com mais de 1.900 casos humanos e mais de 1.600 epizootias de primatas não humanos relatados até abril de 2018 (Rezende et al. 2018).

## **1.2 – A saliva de *Aedes aegypti***

As glândulas salivares da fêmea de *A. aegypti* apresentam uma estrutura trilobada onde se inclui um lobo medial e dois lobos laterais. Cada lobo compreende um epitélio secretor que rodeia um canal salivar no qual a saliva é liberada durante a hematofagia (Juhn et al. 2011). Essas proteínas que são produzidas nas glândulas salivares e injetadas no local da picada auxiliam o repasto sanguíneo (Almeras et al.



2010), processo de extrema necessidade para esses mosquitos uma vez que o sangue do hospedeiro vertebrado é importante na nutrição, no desenvolvimento de ovos e sobrevivência das fêmeas (Gillespie et al. 2000, Andrade et al. 2005). A saliva de artrópodes hematófagos é fundamental para o processo hematofágico, uma vez que as proteínas salivares inibem a hemostasia dos hospedeiros vertebrados (agregação plaquetária, coagulação do sangue e vasoconstricção) e o desenvolvimento da inflamação (Ribeiro JM 1995) além de modular a resposta imune do hospedeiro (Ribeiro & Francischetti 2003, Oktarianti et al. 2015).

Além de se contrapor à hemostasia do hospedeiro vertebrado, a saliva de *A. aegypti* auxilia a infecção dos vírus transmitidos por este mosquito. Segundo Schmid et al. (2016), o extrato de glândula salivar (EGS) acelera a dinâmica da patogênese da Dengue após a transmissão do vírus na pele. A presença da saliva proporciona o enfraquecimento dos vasos, tornando-os mais permeáveis, auxiliando o vírus a se espalhar mais rapidamente, promovendo assim o aumento da severidade da doença.

Com relação ao CHIKV, em um modelo *in vitro* utilizando células epiteliais HaCat, o EGS de *A. aegypti* aumentou a replicação do vírus, e inibiu a produção de IL-8 sugerindo que no sítio da picada do mosquito de *A. aegypti*, o CHIKV trabalha em conjunto com a saliva de forma a garantir que se replique nas células da pele e escape do sistema imunológico do hospedeiro pela supressão da produção de IL-8 (Puiprom et al. 2013).

### **1.3 – O Sistema Complemento**

Composto por mais de 40 proteínas plasmáticas produzidas principalmente pelo fígado ou por proteínas de membrana expressas na superfície celular, o sistema complemento (SC) é uma parte central da imunidade inata que funciona como uma primeira linha de defesa contra patógenos (Merle et al. 2015a, b). Durante a ativação do SC, algumas dessas proteínas circulantes são clivadas ao longo de uma cascata que culmina na opsonização de patógenos, com alguns desses fragmentos atuando como potentes mediadores pró-inflamatórios (anafilatoxinas) e na formação do complexo de ataque à membrana (CAM) (Dunkelberger & Song 2010, Thurman & Nester 2016).

A ativação desse sistema envolve uma seqüência de enzimas proteolíticas que

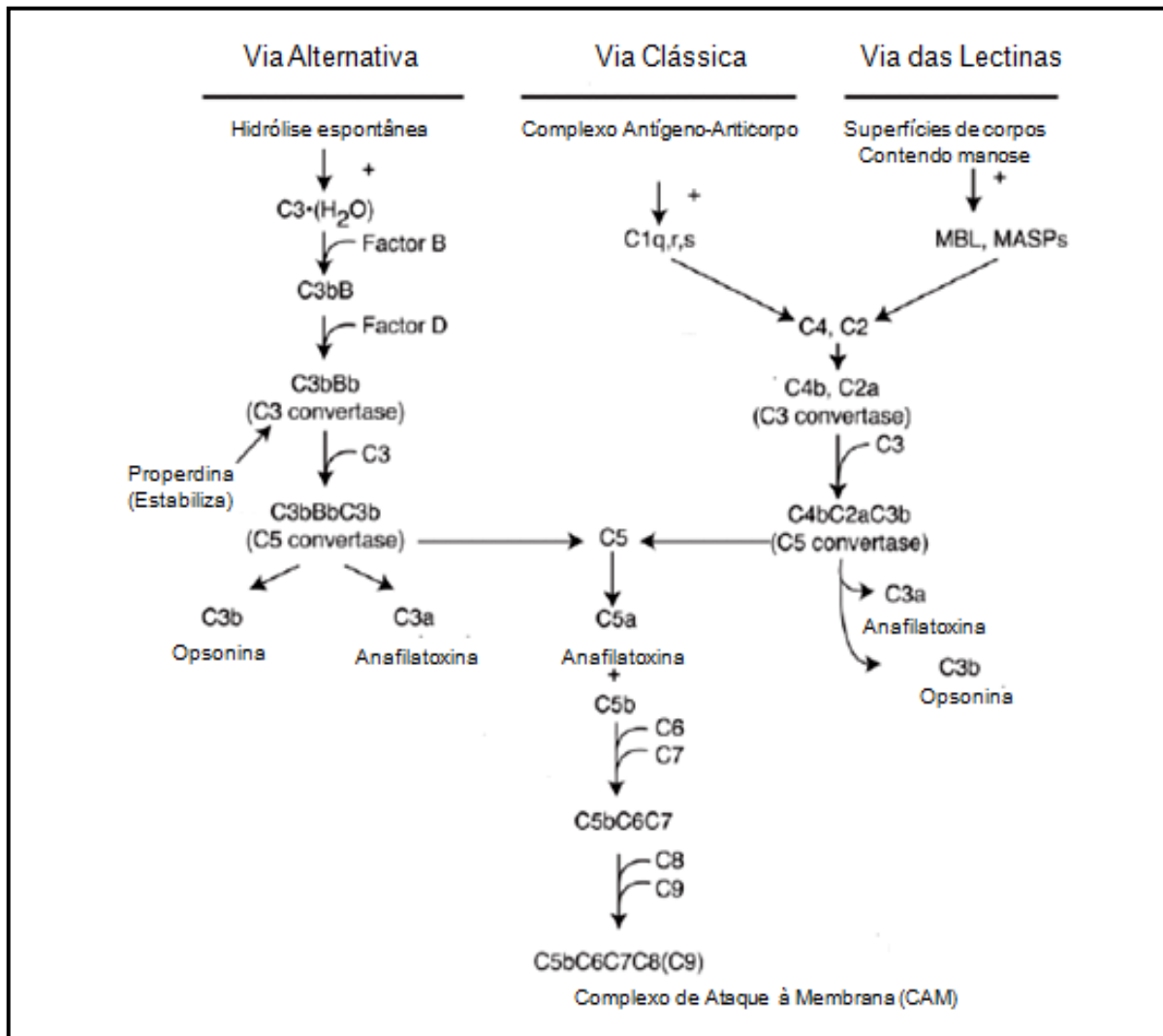
são estimuladas através do reconhecimento de distintos padrões moleculares na superfície ativadora que se desmembram em três vias: a clássica, alternativa e a das lectinas que convergem para a formação da C3 convertase (Elvington et al. 2016), culminando para a formação do complexo molecular conhecido como complexo de ataque à membrana (CAM) (Ghebrehiwet 2016) (**Figura 3**).

A via clássica do complemento é desencadeada quando a glicoproteína C1q, em complexo com as serino proteases C1r e C1s na presença de íons  $\text{Ca}^+$  (complexo C1), liga-se à região FC dos anticorpos IgM ou IgG que se encontram aderidos à superfície celular microbiana. A ligação de C1q ao anticorpo promove a ativação autocatalítica de C1r, que por sua vez ativa C1s, que por sua vez cliva C4 e C2 nos fragmentos C4a, C4b, C2a e C2b. Os fragmentos maiores C4b e C2a se associam para formação do complexo C4bC2a (que constitui na C3 convertase), ou seja, tem a capacidade de clivar C3 em C3a e C3b. Por sua vez, o C3b liga-se covalentemente à superfície ativadora próximo ao complexo C4bC2a, para formar o complexo C4b2a3b, chamado de C5 convertase. Essa convertase tem a capacidade de clivar moléculas C5 em C5a e C5b. Com a formação de C5b, esta se ligará na superfície do patógeno e servirá como local para receber os componentes C6, C7, C8 e múltiplas cópias de C9 para formar o complexo de ataque à membrana (CAM). Além disso, C5a e C3a (subprodutos solúveis da conversão de C5 e C3), respectivamente, atuam como potentes quimioatraentes para células fagocíticas, particularmente neutrófilos (Garcia et al. 2016)

A via das lectinas foi a mais recentemente descrita e é ativada de forma semelhante à via clássica, no entanto independente de anticorpos. Sua ativação ocorre pela ligação da lectina MBL (do inglês, *Mannose-binding lectin*) ou também chamada proteína ligante de manose (MBP) às superfícies de patógenos contendo manose. 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. Essas duas serino proteases possuem um papel similar a C1r e C1s. Uma vez ativadas, a MASP-2 cliva C4 e C2, formando a C3 convertase C4b2a, que por sua vez cliva o componente C3, dando continuidade à cascata proteolítica até a formação do CAM como ocorre na via clássica (Dodds & Sim 1997, Sarma & Ward 2012, Dobó et al. 2016, Garred et al. 2016). Outra lectina que também pode participar do processo de ativação do complemento pela via das lectinas é denominada Ficolina, semelhante à MBL e pode também reconhecer

motivos moleculares na superfície de patógenos (Dobó et al. 2016).

A via alternativa constitui uma rota comum de ativação independente da presença de anticorpos. Esta via é desencadeada quando C3 sofre hidrólise espontânea e lenta que permite a exposição de um grupo tioéster interno com ligação de uma molécula de água. Esta molécula (C3bH<sub>2</sub>O) contém uma ligação tioéster exposta para a ligação do Fator B (FB). Quando o FB une-se a essa ligação, tem-se a formação do complexo C3b-H<sub>2</sub>O-B. Esse complexo é então clivado pelo Fator D (FD), permitindo a formação de um complexo C3-H<sub>2</sub>O-Bb solúvel, que é a C3 convertase de iniciação, clivando assim novas moléculas de C3, em C3b e C3a. Essas moléculas de C3b, na presença de íons de Mg<sup>2+</sup>, ao se ligar covalentemente na superfície de determinado corpo estranho (bactérias, fungos, vírus, protozoários e parasitos multicelulares), irá proporcionar um sítio de ligação para o FB. O complexo C3b-B é, então, ativado pela serino protease fator D, gerando a C3 convertase de amplificação da via alternativa (C3b-Bb), que cliva novas moléculas de C3 em C3a e C3b. Essa enzima é estabilizada pela agregação de uma molécula de properdina presente no soro. As moléculas de C3b podem ingressar na chamada “alça de amplificação”, ou se ligar à C3 convertase, o que acarretará na formação de C3b-Bb-C3b (C5 convertase), que cliva o componente C5, desencadeando as clivagens sucessivas de proteínas do complemento que vão culminar na formação do CAM (Sarma & Ward 2011).



**Figura 3: Representação das três vias de ativação do sistema complemento.** A via alternativa é desencadeada quando C3 sofre hidrólise espontânea originando a C3-convertase inicial desta via na presença dos fatores B e D. A via clássica é ativada quando C1q se liga a complexos antígenos-anticorpos aderidos ao antígeno, enquanto que a via das lectinas é ativada quando a lectina ligante de manose (MBL) liga-se às superfícies de patógenos contendo o monossacarídeo manose. As três vias convergem para a formação da C3 convertase, desencadeando clivagens sucessivas de proteínas do complemento que culminam na formação da molécula conhecida como complexo de ataque à membrana (CAM). Adaptado de Sarma & Ward (2012).

#### 1.4 – Inibidores do sistema complemento em artrópodes hematófagos

Desde o fim do século XX, estudos propondo verificar em quais vias e de que forma os artrópodes hematófagos inibem o SC têm sido realizados, sendo primeiramente descrito a capacidade da saliva do gênero *Ixodes* em inibir o SC. A saliva desses artrópodes mostrou-se capaz de inibir a via alternativa do sistema complemento embora não pudesse interferir na via clássica. A saliva também foi capaz de inibir a produção de anafilotoxinas que são produzidas durante a ativação da cascata (Ribeiro & Spielman 1986, Ribeiro 1987). Desde então, algumas moléculas responsáveis pela inibição do complemento foram identificadas na saliva de carrapatos tais como *Ixodes scapularis* (Valenzuela et al 2000), *Ixodes ricinus* (Daix et al 2007; Couvreur et al 2008) e *Rhipicephalus (B.) microplus* (Silva et al 2016). No caso de *Rhipicephalus (B.) microplus*, a saliva foi capaz de inibir as duas vias testadas: via clássica e alternativa, e que essa clivagem bloqueava a clivagem e ativação de C4. Os autores sugerem que essa inibição ocorra em algum ponto entre as ativações de C1q e C4 (Silva et al. 2016). Em outro trabalho, foi observado que o extrato de glândula salivar da espécie do carrapato *Amblyomma cajennense*, apresentou atividade inibidora da via clássica (Franco et al. 2016).

Em outros artrópodes hematófagos, Cavalcante et al. (2003) observaram que a saliva de insetos é capaz de inibir o sistema do complemento humano. Dessa forma, os autores utilizando as espécies de flebotomíneos, *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia migonei* e as espécies de triatomíneos, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis* e *Rhodnius prolixus*, mostraram que a saliva de todos esses insetos inibem a via clássica do SC. A inibição da via alternativa foi testada apenas para os flebotomíneos e a atividade de inibição foi constatada em *L. longipalpis*. No que se refere a *L. longipalpis*, vários trabalhos foram feitos no sentido de tentar entender o mecanismo de inibição do SC pela saliva extraída desse inseto. Ferreira et al. (2016) descreveram o mecanismo de ação do inibidor salivar da via clássica desse vetor da leishmaniose visceral. Foi mostrado que uma proteína de aproximadamente 11 kDa, denominada de SALO (LJM19) atua ligando-se ao componente C1q, bloqueando a ativação de C1r e C1s e, conseqüentemente, o fluxo normal da cascata. A atividade da saliva desse díptero também foi estudada por Mendes-Sousa et al. (2013) com soro proveniente de outras possíveis fontes alimentares de flebotomíneos como cães, ratos, cobaias e galinhas.

Outra proteína da saliva de *L. longipalpis* denominada de Lufaxin foi capaz de inibir a via alternativa, impedindo a deposição de C3b, Bb, Properdina, C5b e capaz de inibir a clivagem do fator B pelo fator D em um C3b-B reconstituído (Mendes-Sousa et al. 2017).

Em outro estudo utilizando-se espécies de culicídeos como modelo, Mendes-Sousa et al. (2016) observaram que os mosquitos da espécie *Anopheles albimanus* apresentavam um inibidor relacionado com a proteína gSG7 de *Anopheles gambiae* e *Anopheles stephensi*. A partir da sequência dessa proteína foi produzida uma proteína recombinante em *Escherichia coli*, denominada de albicina e que apresentou uma inibição potente na lise de eritrócitos de coelho em ensaios da via alternativa. Porém não observou-se nenhum efeito inibitório sobre as vias clássica ou das lectinas. Embora já se tenha verificado a presença de inibidores na saliva de mosquitos do gênero *Anopheles*, esse padrão não ocorre com outros mosquitos como *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), de acordo com Cavalcante et al. (2003). Visto que a presença de inibidores na saliva é de importância na inativação do SC, e uma vez que mosquitos da espécie *Aedes aegypti* não os apresentam na sua saliva, Barros et al. (2009) testaram e confirmaram a hipótese de que esses inibidores poderiam estar presente no intestino desses mosquitos, visto que os próprios autores propõem pela primeira vez que o dano provocado pela ativação do complexo de ataque a membrana poderia levar a lise do intestino e a morte destes insetos.

### **1.5 – Mecanismos de evasão do sistema complemento por artrópodes e parasitos**

Os mecanismos de evasão do ataque do SC parece não se restringir apenas aos inibidores solúveis secretados pela saliva ou epitélio intestinal. Recentemente em mosquitos anofelinos foi demonstrado que a parede intestinal de fêmeas de *A. gambiae* e *A. stephensi* captam a proteína reguladora do complemento fator H (FH) do sangue do hospedeiro para se prevenirem dos possíveis danos causados pelo ataque do sistema complemento (Khatab et al. 2015). O FH funciona como um co-fator para que o Fator I (uma protease plasmática) inative o C3b. Dessa forma, o FH pode associar-se com as células do hospedeiro através do reconhecimento de marcadores celulares com o ácido siálico de superfícies celulares e, desta forma, regular negativamente o SC (Parente et al. 2016, Schmidt et al. 2016). Além do fator H, o C4bp, CR1 e o DAF (os dois últimos

ligados à membrana) aceleram o decaimento das C3 e C5 convertases, enquanto que a molécula CD59 controla a formação do complexo e ataque à membrana (Sarma & Ward 2012).

Alguns patógenos obtiveram sucesso em escapar do sistema do complemento desenvolvendo receptores capazes de captar o fator H do plasma de seus hospedeiros. Uma vez presente na superfície do patógeno, o fator H promove a inativação do complemento pelo fator I e assim o patógeno fica protegido da lise mediada pelo complemento. Isto é o que ocorre com as bactérias *Borrelia burgdorferi* (Dieterich et al. 2010), *Neisseria meningitidis* (Malito et al. 2013), *Treponema denticola* (Miller et al. 2011), com protozoários do gênero *Plasmodium* (Simon et al. 2012) e com vários outros patógenos (Inal, 2004; Serruto et al. 2010). De forma interessante, esta atividade foi recentemente descrita em fêmeas das espécies de mosquito *Anopheles stephensi* e *A. gambiae*, possivelmente para minimizar o dano intestinal do inseto após o repasto sanguíneo (Khattab et al. 2015) e sugere que a captação de fator H por fêmeas de artrópodes hematófagos vetores de patógenos para humanos poderia ser uma estratégia conservada, sendo selecionada durante a evolução para proteger estes artrópodes contra o dano causado pela ativação do complemento durante o repasto sanguíneo.

## 2 – Justificativa

Durante o processo hematofágico os insetos necessitam estar equipados com um arsenal de moléculas capazes de inibir o sistema complemento existente no sangue ingerido. De fato, os inibidores do complemento são vitais para a sobrevivência de insetos hematófagos, e, portanto, candidatos vacinais baseados em proteínas de *A. aegypti* que inibem o complemento humano têm grande potencial em interferir em aspectos relacionados à sobrevivência e à reprodução deste mosquito.

A literatura sugere que a saliva de *A. aegypti* não é capaz de inibir o sistema do complemento humano, tanto pela via clássica quanto pela via alternativa (Cavalcanti et al. 2003), sendo assim essa atividade é exercida pelo conteúdo intestinal (Barros et al. 2009). Contudo os mecanismos responsáveis por essa inibição ainda são obscuros. Além disso, não se conhece qual seria a ação da saliva ou o do conteúdo intestinal sobre a via das lectinas.

O conhecimento do mecanismo de inibição do sistema complemento pelo conteúdo intestinal de *A. aegypti* poderá também auxiliar a área da biotecnologia através do descobrimento de novas moléculas que possam apresentar atividade farmacológica contra doenças relacionadas ao mal funcionamento do sistema complemento.

Dengue, Chikungunya, Zika e febre amarela são doenças causadas por arbovírus transmitidos aos seres humanos através da picada de fêmeas de insetos hematófagos infectados do gênero *Aedes*, principalmente o *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762), causando por vezes surtos simultâneos com manifestações clínicas semelhantes. A co-circulação dos três vírus (Dengue, Chikungunya, Zika) representa hoje um desafio no diagnóstico e tratamento dos doentes. Portanto, o estudo do mecanismo de inibição do sistema complemento do mosquito torna-se importante, pois vem a contribuir no esclarecimento dos parâmetros da relação parasito-hospedeiro fomentando assim futuras alternativas que possam barrar a expansão dessas doenças.



### 3 – Objetivos

#### 3.1 – Objetivo Geral

Estudar o efeito do sistema complemento humanos em mosquitos adultos de *Aedes aegypti*.

#### 3.2 – Objetivos Específicos

- ✓ Mensurar a sobrevivência para machos e fêmeas de *A. aegypti* submetidos a diferentes dietas;
- ✓ Avaliar a presença de catalase em intestino médio de machos e fêmeas de *Aedes aegypti*;
- ✓ Investigar a atividade do extrato de glândula salivar de *A. aegypti* sobre as vias clássica, alternativa e das lectinas do sistema complemento;
- ✓ Investigar a atividade do conteúdo intestinal de *A. aegypti* sobre as vias clássica, alternativa e das lectinas do sistema complemento;
- ✓ Avaliar a atuação do conteúdo intestinal sobre a formação do complexo de ataque à membrana (CAM);
- ✓ Avaliar a atividade inibidora sobre a deposição dos fatores das vias clássica e das lectinas do sistema complemento humano;
- ✓ Avaliar a capacidade do conteúdo intestinal de *Aedes aegypti* em desligar os componentes da via clássica previamente depositados sobre a superfície ativadora;
- ✓ Averiguar a capacidade da parede intestinal de fêmeas de *A. aegypti* em captar fator H purificado e o fator H presente no soro humano normal;
- ✓ Avaliar a proporção de deposição dos componentes C3 e C9 na parede intestinal na presença e na ausência de molécula(s) inibidora(s) solúve(is) presente(s) no intestino;
- ✓ Avaliar a ação do conteúdo intestinal de *A. aegypti* sobre a atividade enzimática do C1s ativado, sobre C4;
- ✓ Verificar a classe da possível protease inibidora presente no conteúdo intestinal de *A. aegypti*;
- ✓ Avaliar o perfil do fator C3 e C4 no intestino de *Aedes aegypti* após repasto sanguíneo com sangue humano.

## **4 – Materiais 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. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG) sob número de protocolo número 001/2017.

### **4.2 – Origem e criação dos mosquitos *Aedes aegypti***

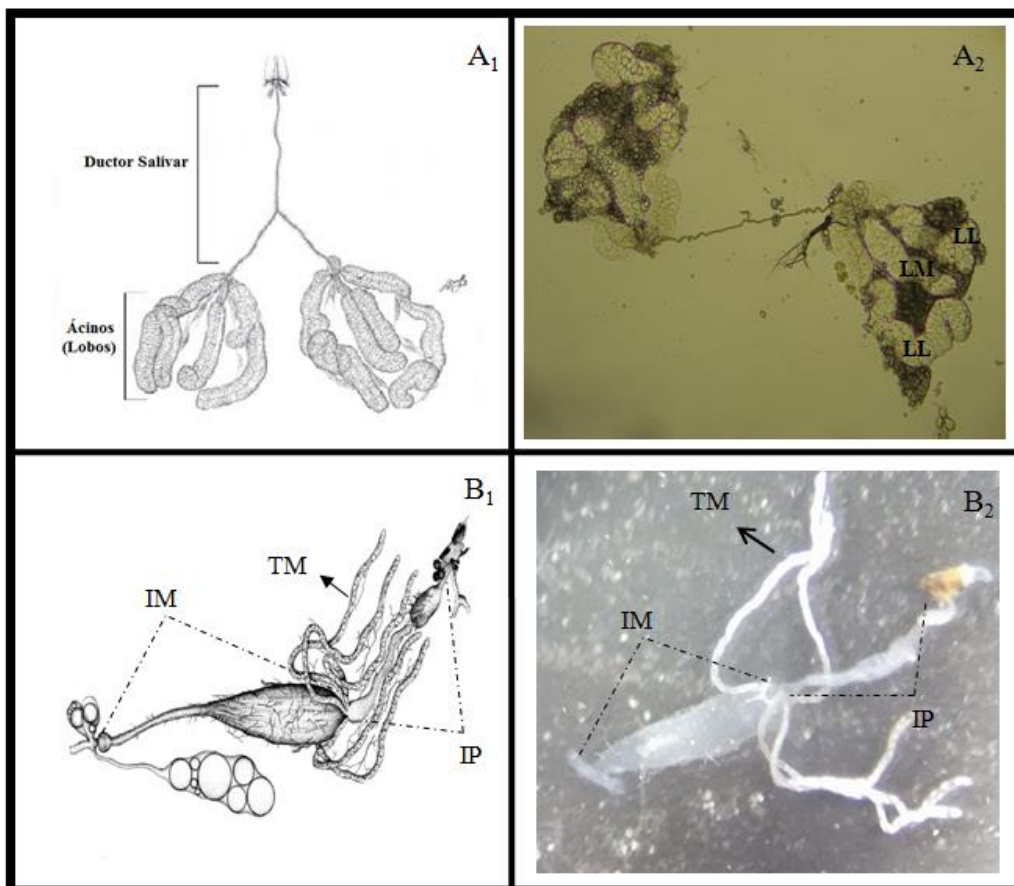
Os mosquitos utilizados nos experimentos foram da espécie *Aedes aegypti* pertencentes à linhagem Rockefeller, gentilmente cedidos pelo professor Dr. Luciano Andrade Moreira do Centro de Pesquisas Rene Rachou – CPqRR.

Os insetos adultos foram acondicionados em colônias fechadas em insetário no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos – LFIH mantidos em gaiolas cilíndricas 30 cm X 90 cm com tela na parte superior, temperatura de  $27 \pm 1$  °C, fotoperíodo de 12:12 h (L:E), umidade relativa de 75% e acesso contínuo à algodão embebido em solução de sacarose 10%. Hamsters previamente anestesiados com 0,2 mL de Thiopental® (50 mg/mL) e com o abdômen tricotomizado eram colocados sobre a tela das gaiolas para que as fêmeas realizassem o repasto sanguíneo durante 1 hora. Os ovos eram obtidos 2 dias após o repasto através do uso de papel filtro embebido em água desclorada dentro de potes de plásticos escuros. Após retirada dos papéis contendo os ovos, estes eram guardados em recipiente de plástico até colocá-los para eclodir em cubas de plástico contendo água desclorada e sendo fornecida ração de peixe *ad labtium* até a fase de pulpa. As pulpas eram então retiradas e colocadas nas gaiolas cilíndricas para a eclosão dos adultos.

### **4.3 – Obtenção dos extratos de glândulas salivares (EGS) e conteúdo intestinal dos mosquitos**

Para obtenção do EGS e do conteúdo intestinal, fêmeas de 4 a 6 dias não alimentadas com sangue foram dissecadas em lâmina de vidro escavada contendo PBS (NaCl 136,8 mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,76 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,76 mM), com auxílio de microscópio estereoscópico e estiletos entomológicos. As glândulas salivares (**Figura 4A**) foram coletadas e transferidas para tubos de polipropileno de 1,5 ml contendo PBS

e mantidos constantemente em gelo. Os tubos contendo as glândulas foram então sonicados por 60 segundos, centrifugados a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante guardado em freezer - 80 °C até utilização nos ensaios. Os intestinos médios (**Figura 4B**) foram abertos e lavados em uma gota de 2,5ul de PSB e coletados e centrifugados como descrito com os EGS. A concentração de proteínas nos extratos de glândulas salivares e conteúdo intestinal foi medida utilizando método de Bradford (Bradford 1976).



**Figura 4: Glândula salivar de *Aedes aegypti* (A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>) e aparelho intestinal de *A. aegypti* (B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>) indicando o Intestino Médio (IM). A<sub>1</sub> e B<sub>1</sub> – Adaptado de Jobling & Lewis 1987); A<sub>1</sub> – Foto tirada por Kel Martins; B<sub>2</sub> – Foto do Autor. LL – Lobo Lateral; LM – Lobo medial; IM – Intestino Médio; IP – Intestino Posterior; TM – Túbulos de Malpighi**

## **4.4 – Soros, anticorpos e proteínas**

### **4.4.1 – Obtenção de soro humano**

Amostras de sangue foram coletadas por meio da veia cefálica de 25 voluntários adultos (entre homens e mulheres) e com idade variando de 25 a 60 anos. As amostras de sangue foram deixadas por uma hora a 37 °C para coagularem e posteriormente foram centrifugadas a 500 g por 10 min para separação e retirada do soro humano normal (SHN). Os soros obtidos foram misturados, aliquotados em tubos de polipropileno contendo 0,2 mL de soro e armazenados em - 80 °C até o uso.

### **4.4.2 – Purificação da imunoglobulina G (IgG)**

IgG humano foi purificado de acordo com a metodologia proposta por Catty & Raykundalia (1989). Para cada mL de soro humano foram misturados nove mL de tampão tris (Solução Tris/HCl 1 M pH 8,0) e à essa mistura, foram adicionados 10 mL de solução saturada de sulfato de amônio, gota a gota. Após a adição da solução de sulfato de amônio, a mistura foi mantida sob agitação suave por uma hora. Após esse período de agitação, a mistura foi centrifugada a 10.000 g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com uma mistura de tampão Tris/HCl 1 M pH 8,0 e de sulfato de amônio saturado na proporção 1:1. A mistura foi então centrifugada novamente a 10.000 g por 20 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi dissolvido em 2 mL de tampão fosfato de sódio 0,02 M (pH 7,0). A essa solução foram adicionados mais 2 ml de solução de fosfato de sódio 0,02 M contendo NaCl 1,76 M. Essa solução foi então deixada à temperatura ambiente por uma hora antes de continuar a purificação. A coluna de Proteína A Sepharose foi previamente equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,02 M contendo 880 mM de NaCl pH 7,0. Aplicou-se o material preparado anteriormente e após a ligação dos anticorpos à resina, a lavagem das impurezas não ligadas foi feita com tampão fosfato de sódio 0,02 M contendo 1 M de NaCl pH 7,0. Posteriormente a coluna foi lavada 2 X com tampão fosfato de sódio 0,02 M pH 7,0. Após a ligação dos anticorpos à resina e a lavagem das impurezas não ligadas, as moléculas de IgG foram eluídas com tampão ácido cítrico/NaOH 0,1 M pH 3,0 e coletadas em tubos de microcentrífuga contendo um volume de 140 µL de tampão TRIS/HCl 1M pH 9,0, até que o volume de cada tubo chegasse a um total de 500 µL, de forma que a solução contendo os anticorpos

purificados fosse corrigida para pH 7,4.

As frações obtidas após a eluição das moléculas de IgG foram levadas ao espectrofotômetro para leitura a 280 nm. As frações contendo os maiores valores de absorvância foram selecionadas, misturadas e aliqüotadas. A determinação da concentração de proteínas foi determinada utilizando o método de Bradford (1976). As alíquotas foram estocadas em freezer – 80 °C até o seu uso.

#### **4.4.3 – Anticorpos e outras proteínas purificadas**

Os anticorpos usados para os ensaios de hemólise da via clássica foram produzidos em coelhos contra os eritrócitos de carneiro, sendo cedidos pela Dra. Marilene S.M Michalick (Antigo Laboratório de Sorologia – Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas – ICB da UFMG).

Os outros anticorpos específicos e os anticorpos secundários assim como as proteínas purificadas utilizadas nos ensaios do complemento foram adquiridos nas empresas: Sigma-Aldrich (Sigma), Complement Technology (Comp Tech), Rhea Biotech e Abcam. Os anticorpos produzidos específicos contra proteínas do complemento humano produzidos em cabra foram: anticorpo policlonal C1q (Sigma: C3900), anticorpo policlonal C4 (Comp Tech: A205), anticorpo policlonal C3 (Comp Tech: A213), anticorpo policlonal C5 (Comp Tech: A220), anticorpo policlonal C9 (Comp Tech: A226) e anticorpo policlonal Fator H (Comp Tech: A237). Os anticorpos produzidos específicos contra proteínas do complemento humano produzidos em coelho foram: anticorpo monoclonal C3c (Sigma: C6025) e anticorpo monoclonal C4b (Sigma: C3402). O anticorpo monoclonal MBL (abcam: ab26277) foi produzido em camundongo.

Os anticorpos secundários conjugados com peroxidase foram: anticorpo secundário anti-IgG de coelho produzido em cabra (IC-3R01); anticorpo secundário anti-IgG de cabra produzido em coelho (IC-1G01) e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo produzido em coelho (IC-1M01).

As proteínas purificadas usadas foram: C1s Enzima (Comp Tech: A104); C3 (Comp Tech: A113), C3b (Comp Tech: A114), iC3b (Comp Tech: A115), C4 (Comp

Tech: A105), C4b (Comp Tech: A108) e Fator H (Comp Tech: A137).

Os soros humanos depletados usados foram: Soro humano C1q/Factor D depletado (Comp Tech: A399), soro humano C5-depletado (Comp Tech: A320), soro humano C6-depletado (Comp Tech: A323), soro humano C7-depletado (Comp Tech: A324), soro humano C8-depletado (Comp Tech: A325), soro humano C9-depletado (Comp Tech: A326).

#### **4.5 – Curva de sobrevivência de machos x fêmeas de *Aedes aegypti* frente a diferentes dietas**

Para verificarmos o possível efeito tóxico do sangue em machos de *A. aegypti* realizamos experimento de curva de sobrevivência. Para isso, foram separados mosquitos machos e fêmeas em potes com 60 mosquitos cada, dividido em 4 grupos: o 1º grupo continha algodão embebido com 1 mL de solução de açúcar 10 % (sacarose dissolvido em água destilada); o 2º grupo continha algodão embebido com 1 mL de SHN + 0,1g de sacarose (concentração final de sacarose igual a 10%); o 3º grupo continha algodão embebido com 1 mL de conteúdo de hemácias hemolisadas (as hemácias foram separadas do SHN, lavadas 3x com PBS a 2000 g, o volume do sangue foi reconstituído com PBS e as hemácias foram posteriormente sonicadas por 1 min em sonicador de banho). Sacarose foi adicionada a esse material perfazendo uma concentração final de 10%. O 4º grupo continha algodão embebido com 1 mL de SHN inativado (a inativação foi feita por 30 min a 56 °C) + 0,1g de sacarose (concentração final de sacarose igual a 10%). Diariamente, os algodões de todos os grupos foram trocados, os mosquitos mortos retirados das gaiolas e sua morte era registrada.

#### **4.6 – Avaliação da presença de catalase em intestino médio de machos e fêmeas de *Aedes aegypti***

A catalase intestinal foi ensaiada medindo-se a taxa de queda da absorvância do peróxido de hidrogênio que absorve luz de comprimento de onda de 240 nm. Na medida em que a água oxigenada ia sendo degradada pela catalase a absorvância ia diminuindo proporcionalmente.

Os intestinos médios de machos e fêmeas (n = 8) foram dissecados em PBS, sendo posteriormente colocados, separadamente, em tubo contendo 200 µL de Tampão

Fosfato de Potássio [50 mM] pH 7. Após a dissecação os tubos foram sonicados em sonicador de banho por cerca de 20 segundos e submetidos à análise cinética enzimática em espectrofotômetro a 240 nm, a 30 °C por período de 2 min.

Cem microlitros de amostra foram misturados a 900 microlitros de substrato (peróxido de hidrogênio misturado ao tampão fosfato com absorvância entre 0,520 e 0,550) dentro de uma cubeta de 1 mL em um espectrofotômetro Shimadzu com temperatura de 30 °C. A absorvância foi medida em intervalos de 5 segundos no módulo cinético de modo que foi possível calcular a taxa de queda de absorvância. A atividade da catalase foi expressa em micromoles de peróxido degradados por minuto (uma unidade de atividade – U é igual a 1  $\mu\text{mol}$  de peróxido degradado por minuto). A concentração do peróxido de hidrogênio foi calculada a partir do coeficiente de extinção molar de 39,4.  $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

Uma vez que alguns materiais podem degradar não enzimaticamente o peróxido de hidrogênio, essa degradação foi avaliada no extrato de intestino fazendo um ensaio da catalase na presença de um inibidor da enzima. O inibidor 3-Amino-1,2,4-triazole foi utilizado na concentração final de 10 mM. A degradação do peróxido de hidrogênio medida neste controle foi subtraída da degradação total medida na ausência do inibidor.

## **4.7 – Ensaio Hemolíticos**

### **4.7.1 – Obtenção e preparação das hemácias de carneiro**

O sangue de carneiro foi coletado utilizando uma seringa de 10 mL contendo solução conservadora de hemácia (glicose 113,8 mM, ácido cítrico 30 mM, NaCl 72 mM, pH 7,4) de volume igual a do sangue coletado na veia jugular de carneiros adultos mantidos na Escola de Veterinária da UFMG. Após a coleta, o sangue foi aliqotado em tubos de polipropileno de 1,5 mL em capela de fluxo laminar para serem armazenados em geladeira a 4 °C até o uso por um período máximo de dois meses.

Para o preparo das hemácias de carneiro utilizadas nos ensaios da via clássica, aliqotas presentes em tubos de 1,5 mL foram lavadas e opsonizadas com anticorpo anti-hemácias de carneiro produzido em coelho, de acordo com o protocolo de Whaley

& North (1997) com algumas modificações. As hemácias foram centrifugadas uma vez por cinco min a 480 g, sendo o sobrenadante descartado e as hemácias transferidas para um novo tubo de polipropileno de 15 mL, e foram lavadas três vezes por centrifugação com 5 mL de solução de GHB-EDTA (Hepes 5 mM, NaCl 145 mM, EDTA 10 mM e gelatina 0,1%, pH 7,4) por 5 minutos a 470 g, descartando o sobrenadante e ressuspendendo o sedimento. Após esse período, as hemácias foram incubadas com anticorpo anti-hemácia de carneiro na proporção de 1:1000 a 37°C por 30 min. Após a opsonização, as hemácias foram lavadas novamente, uma vez, com 5mL de solução de GHB-EDTA e duas vezes com 5 mL de GHB<sup>+</sup>2 (Hepes 5 mM, NaCl 145 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,15 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM e gelatina 0,1%, pH 7,4), para a retirada de anticorpos não ligados. Após as lavagens, a concentração de hemácias foi medida no espectrofotômetro a 414 nm e ajustada para  $2 \times 10^8$  células por mL, cuja absorvância é igual a 0,654. As hemácias opsonizadas e lavadas permaneceram mantidas em geladeira a 8 °C até realização dos ensaios hemolíticos.

#### **4.7.2 – Ensaios hemolíticos da via clássica**

Os ensaios hemolíticos da via clássica foram realizados de acordo com Silva e colaboradores (2016) modificado a partir de Whaley & Northy (1997), sendo conduzidos num volume final de 150 µL. Dessa forma o volume de solução de EGS ou conteúdo intestinal foi adicionado aos 50 µL de SHN (diluído em GHB<sup>2+</sup> na razão de 1:60). O material coletado dos insetos utilizado nos ensaios continha 1 glândula para 2 µl de PBS e 1 intestino para cada 2,5 µl de PBS. Depois, 50 µL da suspensão de hemácias de carneiro (concentração de  $2 \times 10^8$ /ml) foram adicionados aos tubos e a reação foi incubada a 37 °C durante 30 min. Após a incubação, foram adicionados 500 µL de PBS gelado em cada tubo para interromper a hemólise. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1700 g por 1 min e 200 µL do sobrenadante foram transferidos para uma microplaca de cultura de 96 poços, onde a absorvância da hemoglobina liberada foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 414 nm (Dodds e Sim 1997).

Todos os experimentos foram realizados em duplicata com cinco repetições biológicas. Para cada experimento, foram utilizados três controles diferentes: hemólise total (solução salina foi substituída por água destilada); Controle positivo (hemólise



provocada pelo SHN sem qualquer amostra de EGS ou conteúdo intestinal); e controle negativo (sem SHN, onde somente hemólise espontânea ocorreu). A análise dos dados foi feita subtraindo a média dos controles negativos dos demais resultados e os mesmos transformados em porcentagem de hemólise, considerando o controle positivo como 100% de atividade hemolítica (o controle positivo corresponde a 90% da hemólise total).

#### **4.7.3 – Obtenção e preparação das hemácias de coelho**

O sangue de coelho foi coletado utilizando uma seringa de 10 mL contendo solução conservadora de hemácia (glicose 113,8 mM, ácido cítrico 30 mM, NaCl 72 mM, pH 7,4) de volume igual a do sangue coletado por meio de punção na veia auricular marginal de coelhos adultos mantidos no biotério do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG. Após a coleta, o sangue foi aliqotado em tubos de polipropileno de 1,5 mL em capela de fluxo laminar e armazenados em geladeira a 4 °C até o uso dentro de no máximo 2 semanas.

Para o preparo das hemácias de coelho para utilização nos ensaios da via alternativa, as aliqotas presentes em tubos de 1,5 mL foram centrifugadas uma vez por cinco min a 480 g a 4 °C, sendo o sobrenadante descartado. As hemácias foram então transferidas para um novo tubo de polipropileno de 15 mL e lavadas de acordo com Whaley & North (1997). Dessa forma, foram realizadas três lavagens usando 5 mL de solução de Mg-EGTA (Hepes 1 mM, NaCl 30 mM, EGTA 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 7 mM, glicose 3%, gelatina 0,02%, pH 7,4) centrifugando-se por cinco min a 480 g a 4 °C e descartando o sobrenadante. Após as lavagens, a concentração das hemácias foi medida no espectrofotômetro a 414 nm, ajustada para 2x10<sup>8</sup> células por mL e armazenada a 4 °C por até uma semana.

#### **4.7.4 – Ensaios hemolíticos da via alternativa**

Os ensaios hemolíticos da via alternativa foram realizados de acordo com Silva e colaboradores (2016) com protocolo modificado a partir de Whaley & Northy 1997, sendo conduzidos num volume final de 150 µL. Dessa forma o volume de solução de EGS ou conteúdo intestinal foi adicionado aos 50 µL de SHN (diluído em Mg-EGTA na razão de 1:10) de modo que a quantidade de lobos salivares ou intestinos fosse

equivalente a quantidade a ser testada. Depois 50 µL de solução de hemácias de coelho (concentração de  $2 \times 10^8$ /ml) foram adicionados aos tubos e a reação foi incubada a 37°C durante 30 min. Os outros procedimentos foram similares aos usados para o ensaio da via clássica como descrito anteriormente.

#### **4.7.5 – Ensaio hemolítico para avaliação da deposição dos componentes do complexo de ataque à membrana (CAM)**

Com o objetivo de verificar se o conteúdo intestinal de *Aedes aegypti* possui algum inibidor capaz de atuar ao nível da formação do complexo de ataque às membranas, experimentos de hemólise utilizando soros depletados de C5, C6, C7, C8 e C9 foram realizados.

Cinco grupos de 300 µL da suspensão de hemácias de carneiro sensibilizadas (item 4.5.1) foram coletados e centrifugados a 480 RFC por três minutos a 4°C. Cada grupo dessas hemácias foi então ressuscitado em 300 µL, contendo cada qual um dos soros depletados (soro depletado de C5, C6, C7, C8 e C9) diluídos a 1:10 no tampão GHB<sup>+2</sup> e incubadas a 37 °C por 15 minutos. Durante o período de incubação, o complemento foi ativado e ocorreu deposição de fatores do complemento sobre as hemácias até o ponto anterior ao correspondente fator que estava faltando em cada soro depletado.

Após a primeira incubação, as cinco suspensões de hemácias foram novamente centrifugadas a 480 g por três minutos a 4 °C para a retirada dos soros depletados e as células de cada grupo foram ressuscitadas em 300 µL de GHB-EDTA. Para continuar o ensaio, 25 µL de hemácias de cada grupo foram incubadas com 25 µL de SHN diluído 1:10 em GHB-EDTA misturados previamente com 50 µL de PBS contendo diferentes quantidades de conteúdo intestinal (equivalentes ao conteúdo de 10 ou 20 intestinos). Os tubos foram novamente incubados a 37 °C por 30 min. O EDTA impede que o complemento seja ativado, mas não impede que os complexos já formados anteriormente prossigam até a completa formação do complexo de ataque às membranas. A formação do complexo de ataque às membranas vai então se completar a não ser que exista alguma molécula presente no conteúdo intestinal que seja capaz de atuar neste nível da cascata do complemento. Depois de terminada a incubação, 500 µL

de PBS gelado foram adicionados nos tubos para parar a reação, os tubos foram centrifugados a 1700 g por um minuto e 200 µL do sobrenadante foram transferidos para uma placa de 96 poços e a leitura foi feita a 414 nm. Os controles utilizados foram: controle positivo (hemólise provocada pelo SHN sem qualquer amostra) e o controle negativo (sem SHN, onde somente hemólise espontânea está presente). A análise dos dados foi feita como descrito no **item 4.7.2**.

#### **4.8 – Ensaio de imunoabsorção enzimática em microplacas**

##### **4.8.1 – Avaliação da atividade inibidora do conteúdo intestinal de *Aedes aegypti* sobre a deposição dos fatores da via clássica do sistema complemento humano**

A metodologia utilizada para os ensaios da via clássica foi baseada em Silva e colaboradores (2016). Dessa forma cada poço de uma microplaca de 96 poços (Costar®, código 9017) foi sensibilizado com 50 µL de tampão carbonato/bicarbonato (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15 mM, NaHCO<sub>3</sub> 35 mM, pH 9,6) contendo 2 µg de IgG humano purificado durante uma noite à temperatura ambiente no interior de uma câmara úmida.

Após esse período de incubação, o conteúdo foi descartado e os poços sensibilizados foram submetidos à duas séries de bloqueios. O primeiro bloqueio com 200 µL de solução de bloqueio 1 (Tris 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 com 3% de leite desnatado) e um segundo bloqueio com 200 µL de solução de bloqueio 2 (Tris 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl<sub>2</sub> 5mM Tween-20 0,05% pH 7,4 com 3% de leite desnatado),. Ambos os procedimentos foram realizados por 30 minutos à temperatura ambiente, sob agitação constante (150 rpm). Após o bloqueio, 100 µL de solução HNCM (HEPES 4 mM, NaCl 145 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7,4) contendo SHN (1:100) e diferentes concentrações de conteúdo intestinal de *Aedes aegypti* foram adicionados à placa e esta foi incubada a 37°C durante 30 minutos sob agitação constante (150 rpm). Ao controle positivo foi adicionado SHN 1:100 em solução HNCM sem conteúdo intestinal. Ao controle negativo apenas solução HNCM sem soro ou conteúdo intestinal. Terminada a incubação, os poços foram lavados três vezes com 200 µL de PBS/Tween-20 0,05 %, à temperatura ambiente, durante 5 minutos sob agitação (150 rpm).

Os diferentes componentes do complemento depositados na superfície da placa foram avaliados usando anticorpos específicos diluídos em 50 µL/poço de solução de

anticorpo (HEPES 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4) incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos sob agitação (150 rpm). Para a identificação dos componentes foram utilizados anticorpos primários anti-C1q, anti-C5b e anti-C9 diluídos a 1: 2500 e anticorpos anti-C3b e anti-C4b diluídos a 1: 1000. Cada poço foi lavado três vezes como descrito anteriormente. Os anticorpos foram detectados nas placas por adição de anticorpos secundários conjugados com peroxidase (50 µL/poço) diluídos em solução de anticorpo. Para medir a deposição dos componentes C1q, C9 e C5b, o conjugado utilizado foi anti-IgG de cabra produzido em coelho diluído 1: 2500. Para medir a deposição dos componentes C3b e C4b o conjugado utilizado foi anti-IgG de coelho produzido em camundongos diluído 1: 1500.

Após outro ciclo de lavagem, os componentes ligados às placas foram revelados pela adição de 200 µL de solução tampão de revelação (citrato de sódio 50 mM, pH 5,5, 0,075% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Synth, código P22330) e 1 mg/ml de o-fenileno-diamina (Sigma, código P9029). As leituras foram realizadas a 450 nm num leitor de microplacas (Molecular Devices) a cada 30 segundos durante 10 minutos (método cinético) a 37°C. Os valores máximos da velocidade de crescimento da absorbância foram calculados por software SoftMax Pro 5.2 (2002). Para a geração dos gráficos e análise estatística dos resultados, os dados gerados foram transformados em porcentagem de deposição de acordo com a seguinte equação: 
$$\frac{[(V_{\text{máx.450nm amostra com conteúdo intestinal}} - V_{\text{máx.450nm solução do ensaio}})]}{[(V_{\text{máx.450nm amostra com SHN}} - V_{\text{máx.450nm solução do ensaio}})]} \times 100$$
. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da deposição em relação ao controle positivo.

#### **4.8.2 – Avaliação da capacidade do conteúdo intestinal de *Aedes aegypti* em desligar componentes da via clássica previamente depositada na placa**

Para avaliar a possibilidade do conteúdo intestinal de *Aedes aegypti* desligar fatores previamente depositados pelo sistema do complemento, ensaios de deposição de componentes da via clássica foram feitos segundo (Tyson et al. 2008), com modificações. Neste caso, todos os poços da placa foram incubados por 30 minutos a 37°C com solução de ensaio e soro, sem a adição do conteúdo intestinal. Após esse período de incubação, um processo de lavagem era feito como descrito anteriormente

para a retirada das moléculas do complemento que não se ligaram à superfície da placa. Nos poços que serviam de controle positivo era adicionada apenas a solução do ensaio. Nos poços “teste” era adicionado o conteúdo intestinal diluído na solução do ensaio. Para os testes da via clássica foram utilizadas diluições contendo o equivalente a 1, 5, 10 e 15 intestinos. Após nova incubação por 30 minutos a 37 °C a placa foi mais uma vez lavada. O processo de detecção, revelação da placa de ELISA e análise estatística dos resultados dos compostos depositados foram feitas como descrito no item **4.8.1**.

#### **4.8.3 – Avaliação da inibição da deposição dos fatores da via das lectinas do sistema complemento humano pelo EGS e conteúdo intestinal**

A metodologia utilizada para os ensaios da via clássica foi baseada em Mendes-Sousa et al. 2016, com modificações. Dessa forma cada poço de uma microplaca de 96 poços (Costar®, código 9017) foi sensibilizado com 100 µg/ml of manana de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma) em 50 µL de tampão carbonato/bicarbonato (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15 mM, NaHCO<sub>3</sub> 35 mM, pH 9,6) durante uma noite à 37°C.

Após um bloqueio de uma hora dos poços com tampão de bloqueio (BSA a 1% em PBS), adicionou-se 1% de soro depletado de C1q/FatorD diluído em solução HNCM juntamente com o volume referente a 20 glândulas salivares ou diferentes quantidades de conteúdo intestinal em PBS (volume final de 100 µL/poço) e incubada por 30 minutos a 37 °C. Ao controle positivo foi adicionado SHN 1:100 em solução HNCM e ao controle negativo apenas solução HNCM. Os poços foram lavados três vezes com 200 µL de PBS/Tween 0,05 %, à temperatura ambiente, durante 5 minutos sob agitação (150 rpm).

Os componentes depositados na superfície da placa foram avaliados usando anticorpos específicos diluídos em 50 µL/poço de solução do anticorpo HN (HEPES 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4) incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos sob agitação (150 rpm). Para a identificação dos componentes foram utilizados anticorpos, anti-C3b e anti-C4b diluídos a 1: 1000, anti-MBL, anti-C5b e anti-C9 diluídos a 1: 5000. Cada poço foi lavado três vezes como descrito anteriormente. Os anticorpos foram detectados nas placas por adição de anticorpos secundários conjugados com

peroxidase a 50 µL/poço diluídos em solução de soro depletado de C1q/FatorD. Os conjugados foram anti-IgG de cabra produzido em coelho diluído 1: 2500 para medir os componentes C1q, C9 e C5b, anti-IgG de coelho produzido em camundongos diluído 1: 1500 para medir os componentes C3b e C4b e anti-IgG de camundongo produzido em coelho diluído 1: 1500.

Após outro ciclo de lavagem a placa de ELISA foi revelada com OPD segundo descrito do **item 4.8.1** e as leituras foram realizadas a 450 nm num leitor de microplacas (Molecular Devices) a cada 30 segundos durante 10 minutos (método cinético) a 37 °C. Os valores máximos da velocidade de crescimento da absorbância foram calculados por software SoftMax Pro 5.2 (2002). Para a geração dos gráficos e análise estatística dos resultados, os dados gerados foram transformados em porcentagem de deposição de acordo com a seguinte equação:  $[(V_{\text{máx.450nm amostra com conteúdo intestinal}} - V_{\text{máx.450nm solução do ensaio}}) / (V_{\text{máx.450nm amostra com SHN}} - V_{\text{máx.450nm solução do ensaio}})] \times 100$ . Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da deposição em relação ao controle positivo.

#### **4.8.4 – Ensaio para avaliar a proporção de deposição dos componentes C3 e C9 na parede intestinal de *Aedes aegypti* na presença e na ausência de molécula(s) inibidora(s)**

Com a finalidade de verificar a importância do (s) inibidor (es) intestinais na inibição do sistema complemento no intestino de *Aedes aegypti*, foram feitos ensaios de ELISA para avaliarmos a proporção de deposição dos componentes C3 e C9 na parede intestinal na presença e na ausência de moléculas inibidoras solúveis. No primeiro grupo experimental, fêmeas de *A. aegypti* realizaram repastos sanguíneos em seres humanos e tiveram seus intestinos dissecados, abertos para a retirada do sangue e lavados em PBS. No segundo grupo experimental, os insetos em jejum tiveram seus intestinos dissecados, abertos e o conteúdo intestinal lavado em PBS, sendo posteriormente incubados com 10 µL de soro humano normal por 10 min. Nesse grupo, após a incubação, o soro foi lavado em PBS. Esse segundo grupo de insetos serve para avaliarmos como o complemento se comportaria na ausência de possíveis inibidores solúveis, salivares e/ou intestinais. No grupo controle, os intestinos de fêmeas em jejum foram abertos e lavados em PBS. Esses últimos intestinos não foram tratados com soro.

Em cada grupo haviam 4 intestinos no total. Os intestinos de cada um dos 3 grupos foram transferidos para tubos de microcentrífuga contendo 200 µL de Tampão Carbonato/Bicarbonato de Sódio (NaHCO<sub>3</sub> 15 mM/ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 35 mM pH 9,6) com inibidores de proteases (concentração final PMSF 1 mM, E64 10 µM e EDTA 2 mM), sendo cada tubo sonicado por 20 segundos. Cinquenta microlitros do material sonicado de cada grupo contendo o equivalente a 1 intestino foram transferidos para uma placa de ELISA (Costar®, cod 9017) em triplicata. A placa foi incubada durante a noite a 37°C. No dia seguinte cada poço da placa foi lavado 3X com 150µl de PBS Tween-20 0,1%. A placa foi então bloqueada com 150 µL de Albumina 5% dissolvida em PBS sob agitação durante 30min à temperatura ambiente. Após o bloqueio a placa foi lavada como descrito anteriormente e foram adicionados 100 µL de anticorpo policlonal anti-C3 ou anti-C9 diluídos na concentração de 1:1500. A placa foi incubada durante 30 min sob agitação e lavada 3X com 150 µL de PBS Tween-20 0,1%. Após o tratamento com o anticorpo primário, a placa foi lavada por 3 vezes e 100 µL de anticorpo secundário anti-cabra marcado com peroxidase e diluído a 1:3000 foram adicionados em cada poço. Essa incubação teve a duração de 30min à temperatura ambiente sob agitação. Após a incubação a placa foi lavada 3X como descrito anteriormente e revelada pela adição de 200 µL de solução tampão de revelação em cada poço (citrato de sódio 50 mM, pH 5,5, 0,075% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 1 mg/mL de o-fenileno-diamina (Sigma, código P9029). A placa foi então incubada num leitor de microplacas (Molecular Devices) a 37°C durante 10 minutos (método *end point*). Os valores da absorbância foram plotados no programa estatístico para a análise estatística e geração dos gráficos.

#### **4.8.5 – Avaliação da capacidade do intestino de fêmeas captarem o fator H presente no Soro Humano Normal**

Intestinos de fêmeas de *Aedes aegypti* provenientes da colônia foram dissecados em PBS, abertos através de um corte longitudinal, expondo assim o lúmen intestinal e o epitélio interno dos mesmos, tendo o seu conteúdo intestinal lavado e colocado em contato com SHN por 10min. Outro grupo de mosquitos teve seu intestino dissecado, porém permanecendo com seus intestinos fechados. Após 10 min de incubação, os intestinos foram lavados em PBS por 10 min e colocados em tubos de microcentrífuga contendo Tampão Carbonato pH 9,6 e inibidores de proteases (PMSF 1mM, E64 10µM e EDTA 2mM), sendo sonicados em um aparelho de ultrassom

durante 30 segundos. A placa foi deixada incubando durante a noite por 37°C. No dia seguinte a placa foi lavada 3X com 150 µL PBS Tween-20 0,1% e após 3 lavagens foram adicionados 200 µL de leite em pó desnatado 5% dissolvido em PBS Tween-20 0,1%. A placa foi agitada por 30min à temperatura ambiente. Após o bloqueio a placa foi lavada como descrito anteriormente e foram adicionados 100µl de anticorpo anti-Fator H diluído 1:1000. O anticorpo anti-fator H foi incubado por 30 min sob agitação. A placa foi lavada 3X com 150 µL de PBS Tween-20 0,1% e após 3 lavagens foram adicionados 100µl de anticorpo anti-cabra 1:3000 em cada poço. A placa foi novamente agitada durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para retirar o anticorpo não ligado, a placa foi lavada 3X como descrito anteriormente e revelada pela adição de 200 µL de solução tampão de revelação em cada poço (citrato de sódio 50 mM, pH 5,5, 0,075% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 1 mg/ml de o-fenileno-diamina (Sigma, código P9029). A placa foi então incubada num leitor de microplacas (Molecular Devices) a 37 °C durante 10 minutos (método *end point*). Os valores da absorbância foram plotados no programa estatístico para a análise estatística e geração dos gráficos.

#### **4.8.6 – Avaliação da capacidade do epitélio intestinal de *A. aegypti* na captação do fator H purificado**

Intestinos de fêmeas e machos de *Aedes aegypti* provenientes da colônia foram dissecados em PBS, abertos, lavados e colocados em contato com 20 µL de solução de fator H (0,05 µg/µL) por 10min e então os intestinos foram lavados em PBS 1X por 10 min e colocados em tubos de microcentrífuga contendo Tampão Carbonato pH 9,6 e inibidores de proteases (PMSF 1mM, E64 10µM e EDTA 2mM), sendo sonicados em um aparelho de ultrassom durante 30 segundos. Deixou-se a placa incubando durante a noite por 37°C. No dia seguinte a placa foi lavada 3X com 150 µL PBS Tween-20 0,1% e após 3 lavagens foram adicionados 200 µL de leite em pó desnatado 5% dissolvida em PBS Tween-20 0,1%. Este bloqueio foi feito sob agitação moderada durante 30min à temperatura ambiente. Após o bloqueio a placa foi lavada como descrito anteriormente e foram adicionados 100 µL de anticorpo anti-Fator H diluído 1:1000. O anticorpo anti-fator H foi incubado por 30 min sob agitação. A placa foi lavada 3X com 150 µL de PBS Tween-20 0,1% e após 3 lavagens foram adicionados 100 µL de anticorpo anti-cabra 1:3000 em cada poço deixando em incubação por 30min à temperatura ambiente agitando moderadamente. Após isso lavou-se a placa 3X como descrito anteriormente.



Ao final a placa foi revelada com OPD segundo descrito no item **4.8.5**.

#### **4.9 – Avaliação da ação do conteúdo intestinal de *A. aegypti* sobre a atividade enzimática do C1s ativado sobre C4**

Para avaliar a ação do conteúdo intestinal (CI) de *A. aegypti* sobre a atividade enzimática de C1s ativado, utilizou-se o componente C4 purificado como substrato. O padrão de clivagem de C4 (bandas produzidas) foi analisado por meio de western blot conforme descrito por (Silva et al. 2016).

Para realizar esse experimento, utilizaram-se tubos de microcentrífuga contendo cada um 25 µL de volume final com proteínas purificadas e diluídas em PBS 1X. O primeiro tubo continha somente C4 purificado (3 µg de C4 purificado que servia de controle negativo), o segundo tinha C4 + C1s (3 µg de C4 purificado + 0,3 µg de C1s ativado sem CI e servia de controle positivo), o terceiro com C4 + C1s + conteúdo intestinal (3 µg de C4 purificado + 0,3 µg de C1s ativado + 15 µL de CI contendo o equivalente a 15 intestinos), o quarto tubo tinha C4 + CI (3 µg de C4 purificado + 15 µL de CI contendo o equivalente a 15 intestinos), o quinto e o sexto tubo correspondiam ao terceiro e ao quarto tubos, respectivamente, porém o CI usado neles equivalia a 1 intestino. As amostras foram incubadas a 37°C por duas horas. Foram adicionados a cada tubo 5 µL tampão de amostra 6X redutor contendo 10% de SDS e 5% 2-β-mercaptoetanol e as amostras foram fervidas por cinco minutos. Depois disso, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (Laemmli, 1970). O procedimento foi interrompido quando o peso molecular de 25kD do padrão da Bio-Rad (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards #1610374) alcançou a base do gel. As proteínas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose durante duas horas a 100 V. Após esse tempo, a membrana foi bloqueada durante por 2 horas com uma solução de PBS contendo 0,1% de Tween 20 e 10% de leite em pó desnatado sob agitação constante. Após o bloqueio, a membrana foi lavada três vezes por cinco minutos com PBS/Tween 20.

As bandas foram reveladas utilizando o anticorpo primário policlonal anti-C4 humano diluído 1:2000 em PBS/Tween 20 e incubada à temperatura ambiente durante duas horas sob agitação constante. Em seguida, a membrana foi lavada como citada anteriormente. O anticorpo secundário usado foi o conjugado com peroxidase anti-IgG

de cabra produzido em coelho diluído 1:4000 em PBS e incubado à temperatura ambiente durante duas horas sob agitação constante, seguido de um novo ciclo de lavagens como anteriormente. A revelação das bandas foi realizada utilizando o kit de substrato DAB peroxidase (Vector Laboratories) e as imagens obtidas no Alpha DigiDoc™.

#### **4.10 – Avaliação da natureza da protease presente no conteúdo intestinal de *A. aegypti***

Uma vez que o conteúdo intestinal de *A. aegypti* apresentou ação sobre C4 purificado, clivando esse componente, foi realizado um experimento para investigar a qual classe de proteases o inibidor provavelmente pertence. Para isso o conteúdo intestinal foi misturado ao componente C4 na presença de diversos inibidores de proteases: E64 (inibidor de Cisteíno proteases), EDTA (inibidor de Metallo-proteases), PMSF (inibidor de Serino-proteases) e Pepstatina A (inibidor de Aspartil proteases).

Para realizar esse experimento, utilizaram-se 6 tubos de microcentrífuga contendo cada um 30 µL de volume final. O primeiro tubo continha somente C4 purificado (3 µg de C4 purificado que funcionava como controle negativo), o segundo continha C4 + CI (3 µg de C4 purificado + 15 µl de CI equivalentes a 15 intestinos) o terceiro continha C4 + CI + EDTA (3 µg de C4 purificado + 15 µl de CI equivalentes a 15 intestinos + 10 mM de EDTA), o quarto com C4 + CI + E64 (3 µg de C4 purificado + 15 µl de CI equivalentes a 15 intestinos + 10 µM de E64), o quinto tubo C4 + CI+ Pepstatina (3 µg de C4 purificado + 15 µl de CI equivalentes a 15 intestinos + 2 µM de Pepstatina), o sexto tubo C4 + CI+ PMSF (3 µg de C4 purificado + 15 µl de CI equivalentes a 15 intestinos + 2 mM de PMSF). As amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora. Foram adicionados a cada tubo 5 µl tampão de amostra redutor 6X contendo 10% de SDS e 5% 2-β-mercaptoetanol e as amostras foram fervidas por cinco minutos. Depois disso, as amostras foram submetidas a eletroforese em poliacrilamida num gel a 10% (Laemmli, 1970). A corrida, a transferência e a revelação das bandas foi feita conforme descrição apresentada no item **4.9**.

#### **4.11 – Avaliação cinética do processamento de C4 no intestino de *Aedes aegypti* após repasto sanguíneo com sangue humano**

Uma vez que o conteúdo intestinal de *A. aegypti* é capaz de clivar a molécula de C4 em fragmentos menores e por conseqüência inibir a deposição de C4b procurou-se investigar como se dá o processamento de C4, ao longo do tempo, após a realização do repasto sanguíneo. Mosquitos de três a cinco dias foram alimentados em voluntários e os intestinos médios dissecados nos tempos 5 min, 30 min, 1 hora e 3 horas depois de realizado o repasto sanguíneo.

Como padrões foram usados as proteínas purificadas: 1 µg de C4; 1 µg de C4b. Cada material preparado foi transferido para tubos contendo 10 µL de PBS e 5 µL tampão de amostra redutor contendo 10% de SDS e 5% 2-β-mercaptoetanol, sendo os tubos fervidos por cinco minutos.

Depois disso, as amostras foram submetidas a eletroforese em poliacrilamida num gel a 10% (Laemmli, 1970), sendo o procedimento da corrida, da transferência, do bloqueio e da incubação com anticorpo primário e secundário executado como descrito no item 4.9. As bandas foram reveladas por quimioluminescência com o reagente *Luminata Forte Western HRP substrate* (Millipore), seguindo as instruções do fabricante. As imagens foram adquiridas em Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare) e avaliadas utilizando ImageJ Software (1.47v).

#### **4.12 – Avaliação cinética do processamento de C3 no intestino de *Aedes aegypti* após repasto sanguíneo com sangue humano**

O componente C3 é o ponto para o qual convergem todas as vias de ativação do complemento. Assim, podemos avaliar o nível de ativação do complemento após o repasto sanguíneo observando o estado desse componente no interior do intestino das fêmeas.

Fêmeas de *A. aegypti* de três a cinco dias foram alimentadas em voluntários e os intestinos médio foram dissecados nos tempos 5 min, 30 min, 1 hora e 3 horas. Cada grupo de intestinos com seu conteúdo foram submetidos a eletroforese em poliacrilamida 10 % (Laemmli, 1970) usando tampão de amostra redutor. Como

padrões foram usadas as proteínas purificadas: 1 µg de C3; 1 µg de C3b e 2 µg de iC3b. A transferência, o bloqueio foram feitas conforme descrito anteriormente e a incubação foi realizada com anticorpo primário anti-C3 humano diluído 1:3000 em PBS/Tween 20. O anticorpo secundário usado foi o conjugado com peroxidase anti-IgG de cabra produzido em coelho diluído 1:4000 em PBS.

As bandas foram reveladas por quimioluminescência com o reagente *Luminata Forte Western HRP substrate* (Millipore), seguindo as instruções do fabricante. As imagens foram adquiridas em Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare) e avaliadas utilizando ImageJ Software (1.47v).

#### **4.13 – Análise estatística dos dados**

Todos os experimentos foram realizados com pelo menos cinco replicatas biológicas, e em cada uma delas foi feita em duplicata. Os dados foram organizados em planilhas no software Microsoft Excel (Office 2007). A análise estatística foi realizada através do software GraphPad Prism 5.0. Foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se as variáveis apresentam distribuição normal ( $p > 0,05$ ). As comparações entre dois grupo foram realizadas utilizando o teste T- Student. As comparações de três grupos ou mais foram realizadas utilizando one-way ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett, que compara os grupos testes com o grupo controle ou o teste de Bonferroni, que compara todas as colunas entre si. Foi utilizado o Teste Log-Rank (Mantel-Cox) para ver a diferença entre as curvas de machos versus fêmeas. Os dados foram considerados significativos quando  $p$  foi menor que 0,05. Para a representação da estatística, os seguintes símbolos foram utilizados nos gráficos: \* quando  $p < 0,05$ ; \*\* quando  $p < 0,01$  e \*\*\* quando  $p < 0,001$ .

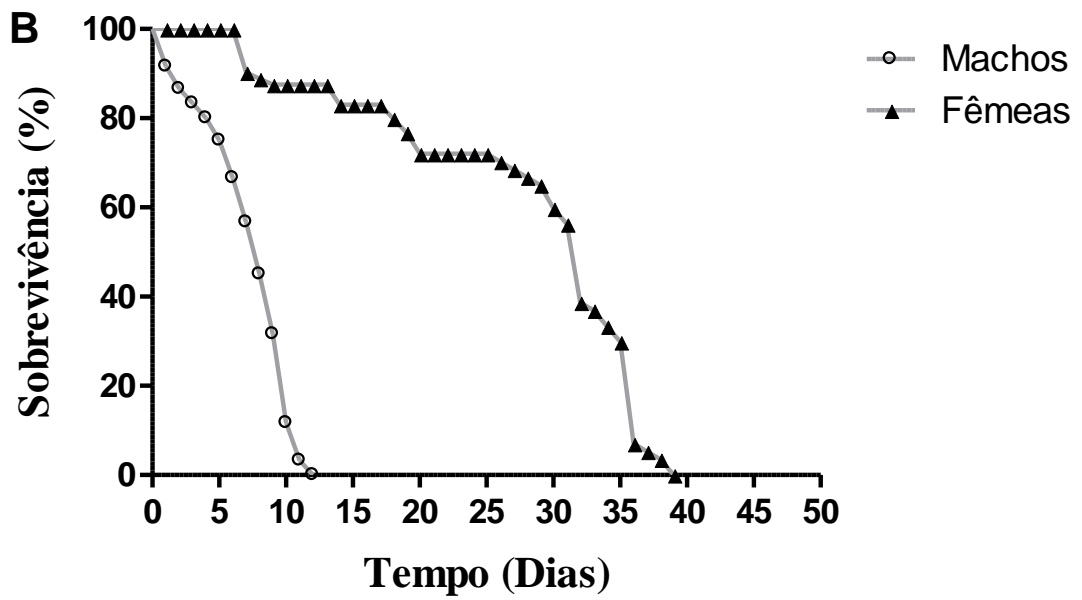
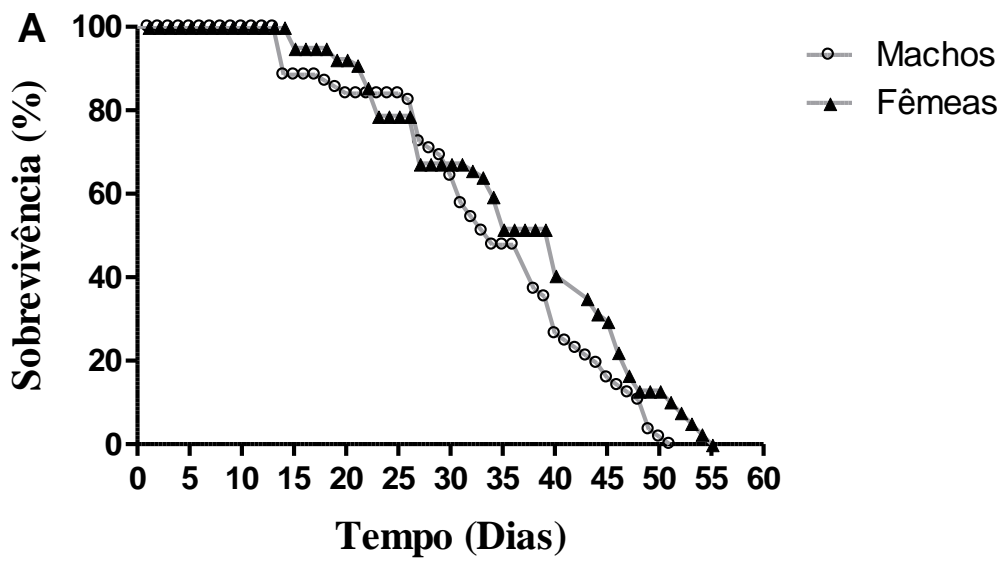
## 5 – Resultados

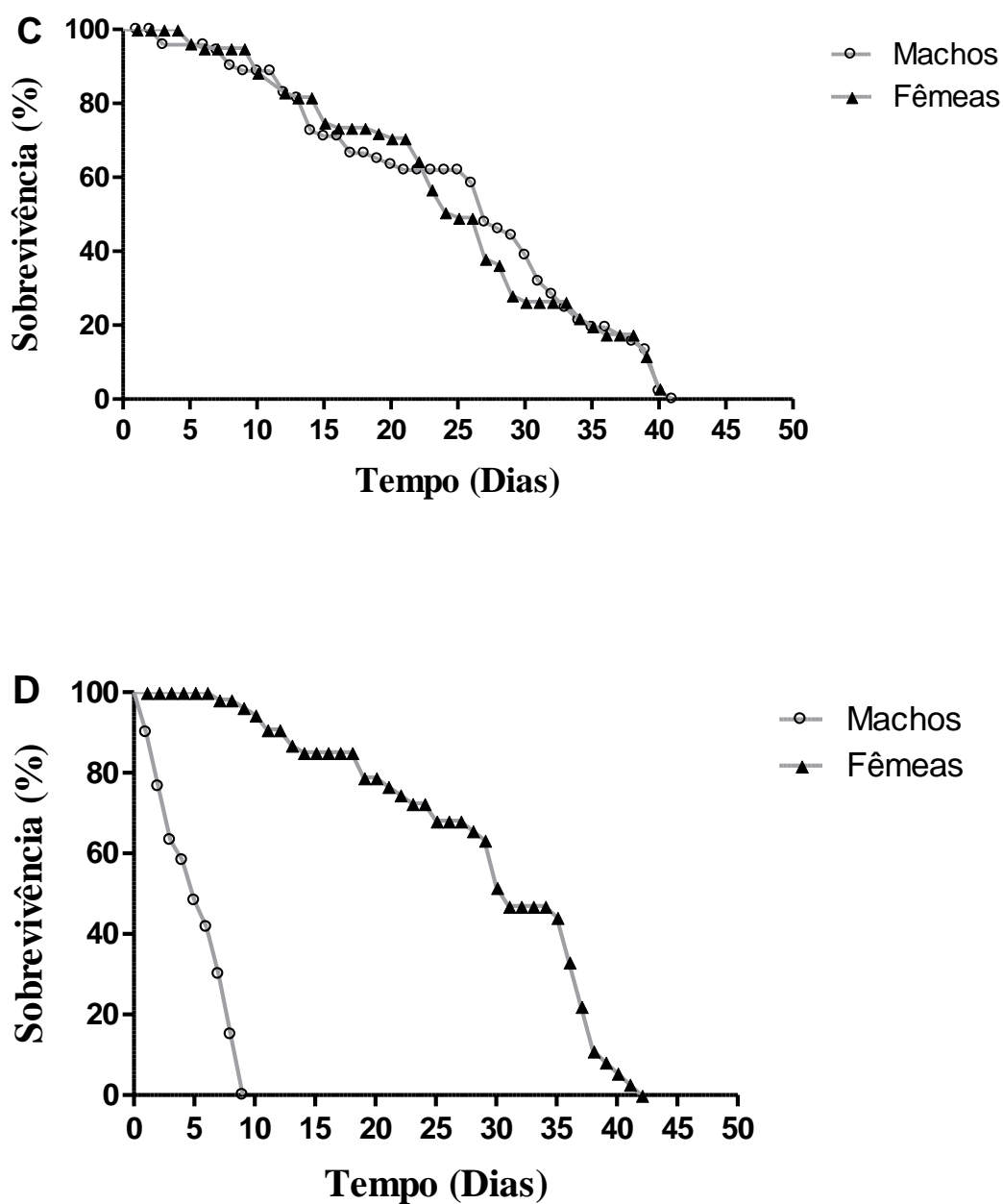
### 5.1 – Quantificação de proteínas do EGS e do intestino médio de *Aedes aegypti*

A concentração de proteínas do extrato de glândulas salivares e do intestino médio de *Aedes aegypti* em estudo foi medida pelo método de Bradford. As médias e desvios padrões das concentrações de proteínas totais do EGS e do conteúdo intestinal foram, respectivamente,  $0,81 \pm 0,02$   $\mu\text{g}/\text{glândula}$  e  $1,43 \pm 0,19$   $\mu\text{g}/\text{intestino}$ .

### 5.2 – Curva de sobrevivência de machos e fêmeas submetidos a diferentes condições nutritivas

Ao avaliar a curva de sobrevivência de machos e fêmeas de *A. aegypti* alimentados com sacarose 10%, constatou-se que não houve diferença significativa entre as duas curvas, uma vez que o tempo médio de sobrevivência de ambos se manteve em torno de 30 dias [Tempo médio de sobrevivência de machos = 34 dias e fêmeas = 40 dias ( $p > 0,05$ )] (**Figura 5A**). Já ao analisarmos o impacto do SHN na sobrevivência de machos e fêmeas de *A. aegypti*, foi observada uma diferença significativa entre as duas curvas, com tempo de vida de machos 4 vezes menor que o de fêmeas [Tempo médio de sobrevivência de machos = 8 dias e fêmeas = 32 dias ( $p < 0,001$ )] (**Figura 5B**). Entretanto, quando o SHN foi inativado essa diferença não foi observada e o tempo médio de sobrevivência de ambos se manteve em torno dos 25 dias [Tempo médio de sobrevivência de machos = 27 dias e fêmeas = 25 dias ( $p > 0,05$ )] (**Figura 5C**). Isto sugere que machos de *A. aegypti* não possuem a mesma capacidade das fêmeas para enfrentar o dano intestinal causado pela lise mediada pelo complemento humano. Essa diferença significativa de sobrevivência entre machos e fêmeas de *A. aegypti* também foi observada quando os insetos foram alimentados com sacarose mais o conteúdo de hemácias humanas hemolisadas, sendo o tempo médio de sobrevivência de machos = 5 dias e de fêmeas = 31 dias ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 5D**). Este resultado sugere que machos de *A. aegypti* não estão preparados para lidar com o stress oxidativo oriundo da digestão do sangue, de forma semelhante ao que ocorre com as fêmeas, uma vez que as mesmas necessitam lidar com a digestão de sangue para a produção dos ovos.



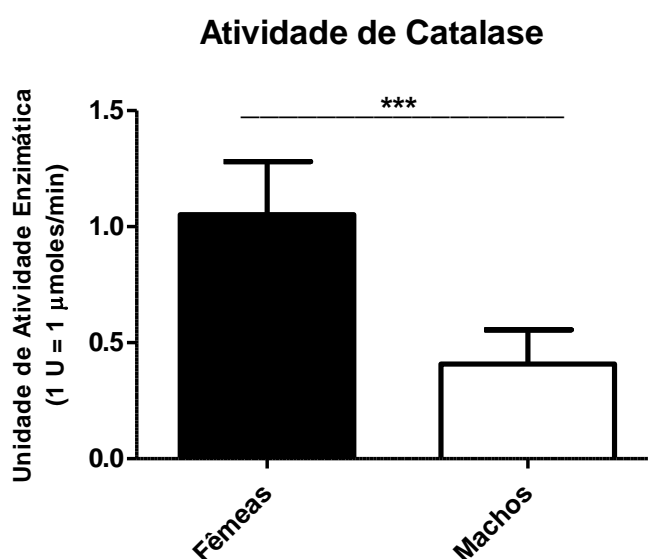


**Figura 5 – Sobrevivência de Machos e Fêmeas de *Aedes aegypti* submetidos a diferentes tratamentos.** As curvas de sobrevivência foram medidas pelo registro diário da mortalidade de machos e fêmeas em cada grupo. **A:** Curva de sobrevivência de Machos e Fêmeas de *Aedes aegypti* submetidos à sacarose 10% ( $p > 0,05$ ). **B:** Curva de sobrevivência de Machos versus Fêmeas de *Aedes aegypti* submetidos ao SHN + Sacarose 10% ( $p < 0,0001$ ). **C:** Curva de sobrevivência de Machos e Fêmeas de *Aedes aegypti* submetidos ao SHN inativado a  $56^{\circ}\text{C}$  + Sacarose 10% ( $p > 0,005$ ). **D:** Curva de sobrevivência de Machos e Fêmeas de *Aedes aegypti* submetidos ao conteúdo de hemácias humanas hemolisadas + Sacarose 10% ( $p < 0,0001$ ). As diferenças estatísticas entre as curvas foram analisadas pelo Teste Log-Rank (Mantel-Cox).

### 5.3 – Avaliação da atividade de catalase em intestino médio de machos e fêmeas *Aedes aegypti*

Ao realizar o ensaio de catalase, verificou-se que existe uma diferença significativa na atividade desta enzima observada nos intestinos de fêmeas de *A. aegypti* em comparação com machos (**Figura 6**). A digestão do sangue é acompanhada pela liberação do grupo heme da molécula de hemoglobina. Heme é um grupamento extremamente reativo e altamente indutor de stress oxidativo.

Um dos possíveis mecanismos contra os efeitos deletérios causados por heme seria a presença de enzimas antioxidantes como a catalase, que transforma  $H_2O_2$  em água e oxigênio, reduzindo a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) altamente tóxicas. A maior atividade de catalase presente no intestino de fêmeas de *A. aegypti* provavelmente seria uma adaptação ao hábito hematofágico das mesmas para lidar com o stress oxidativo gerado pela digestão de hemoglobina.

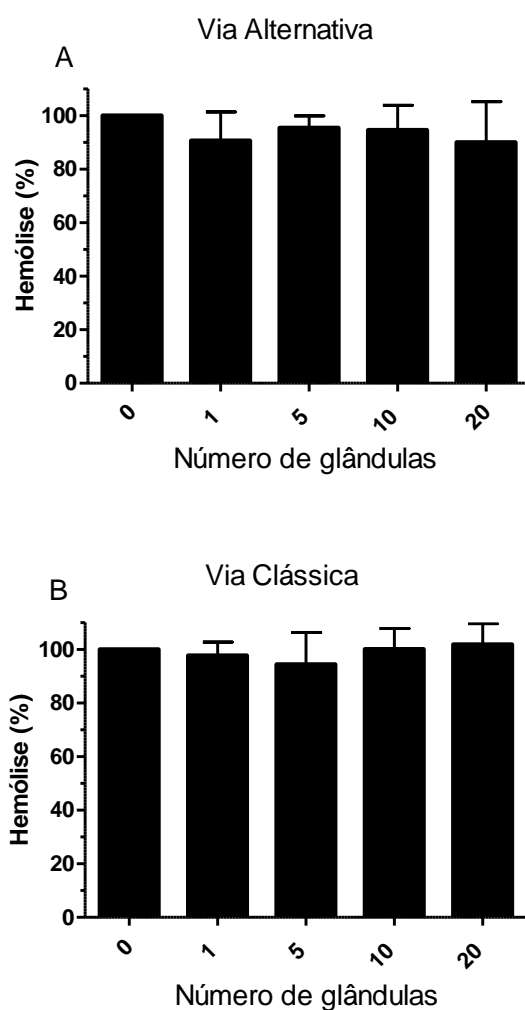


**Figura 6: Atividade da Catalase em intestinos médios (IM) de machos e fêmeas de *Aedes aegypti*.** A quantificação de catalase foi ensaiada em espectrofotômetro usando como substrato o  $H_2O_2$ . A atividade dessa enzima foi maior em fêmeas quando comparado com a de machos. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão de 5 repetições biológicas. \*\*\*representa diferença estatística entre os 2 grupos (machos x fêmeas) ( $p \leq 0.05$  Teste T' Student não pareado).



#### 5.4 – Efeito do EGS de *Aedes aegypti* sobre a atividade hemolítica da via clássica e alternativa do complemento humano

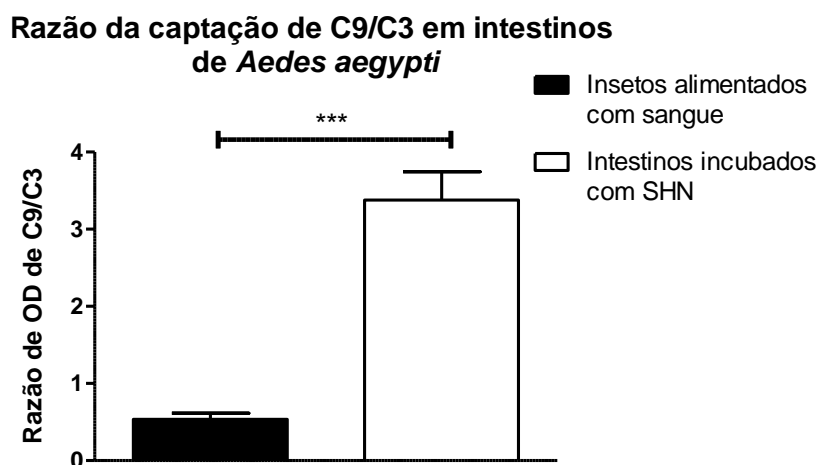
Testamos se o EGS de *A. aegypti* inibe a ativação das vias clássica e alternativa do complemento humano, através de ensaios hemolíticos utilizando-se hemácia de carneiro. O EGS não foi capaz de inibir a via alternativa e clássica, em nenhuma das quantidades de glândulas testadas, mesmo com a quantidade equivalente a 20 glândulas salivares (Figura 7).



**Figura 7: Efeito do EGS de *Aedes aegypti* sobre a atividade hemolítica das vias clássica e alternativa do complemento humano.** A avaliação da inibição da via alternativa e da via clássica pelo EGS de *Aedes aegypti* foi medida utilizando hemácias de coelho e carneiro, respectivamente. O EGS de *Aedes aegypti* não foi capaz de inibir a hemólise da Via Alternativa (A) e da Via Clássica (B) do complemento humano quando testado de forma dose dependente em relação ao controle (sem extrato salivar). As barras verticais representam média  $\pm$  desvio padrão de 5 repetições biológicas.

## 5.5 – Avaliação da proporção de deposição dos componentes C3 e C9 na parede intestinal de *Aedes aegypti* na presença e na ausência de molécula(s) inibidora(s)

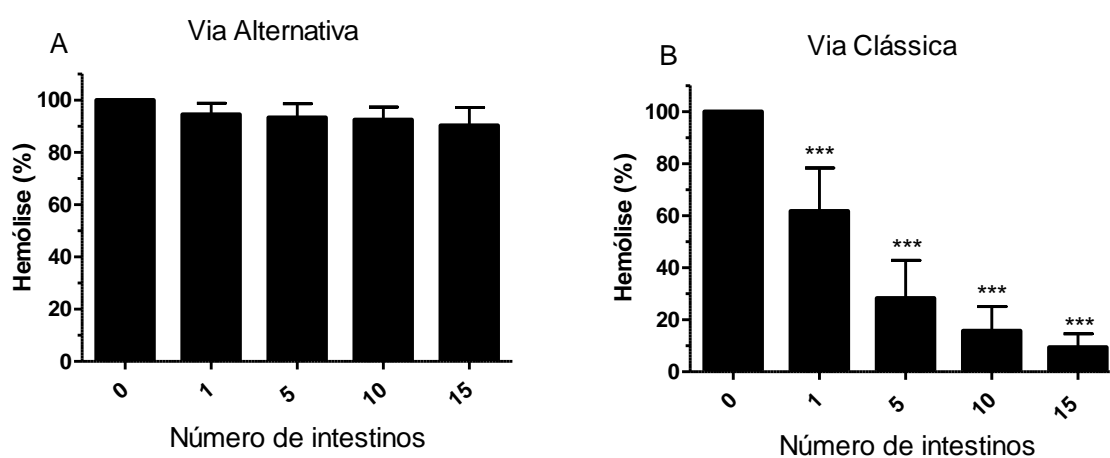
Uma vez que o EGS de *A. aegypti* não possui atividade anticomplemento em relação ao sangue humano, os experimentos apresentados a seguir tiveram a finalidade investigar se o conteúdo intestinal de *A. aegypti* possui pelo menos um inibidor solúvel do complemento humano. Para tanto, comparamos a razão de deposição dos componentes C3 (que atua no início da cascata de ativação do complemento) com a deposição do componente C9 (que se deposita no final da cascata para formação do MAC). De forma interessante, a presença dos inibidores solúveis causou uma redução na proporção de deposição de C9/C3 em insetos que se alimentaram por picada em um ser humano em comparação com a proporção de deposição de C9/C3 depositados em intestinos lavados e, portanto, sem inibidores solúveis (**Figura 8**). Nessa última condição, a proporção de C9/C3 foi 6x vezes maior, indicando que o complexo de ataque às membranas foi formado mais eficientemente sobre a superfície intestinal na ausência dos inibidores solúveis. Esse resultado também indica que sem os inibidores solúveis, o complemento humano é mais eficazmente ativado no intestino de *Ae. aegypti*.



**Figura 8: Avaliação da ativação do complemento no intestino médio (IM) de *Aedes aegypti* em diferentes condições.** A ativação do complemento no intestino médio foi verificada com base na proporção de deposição de C9 e C3 em insetos que se alimentaram normalmente em hospedeiros humanos e em intestinos lavados para retirada de qualquer inibidor solúvel do complemento e incubados com SHN. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão de 5 repetições biológicas. \*\*\*representa diferença estatística entre os grupos indicados em relação ao controle ( $p \leq 0.05$  Teste de T' Student).

## 5.6 – Efeito do conteúdo intestinal de *Aedes aegypti* sobre a atividade hemolítica da via clássica e alternativa do complemento humano

Com o intuito de testar se o conteúdo intestinal de *A. aegypti* inibe a ativação das vias clássica e alternativa do complemento humano, realizamos ensaios hemolíticos utilizando-se hemácia de carneiro. O conteúdo intestinal de *Aedes aegypti* foi capaz de inibir a via clássica do complemento humano, de forma dose dependente e estatisticamente significativa, mesmo quando utilizamos a quantidade equivalente a 1 intestino. Embora observe-se uma leve tendência de queda da porcentagem de hemólise com o número máximo de CI usado, não houve inibição significativa da via alternativa mesmo com a quantidade máxima de intestinos utilizada (15 intestinos) (**Figura 9**).

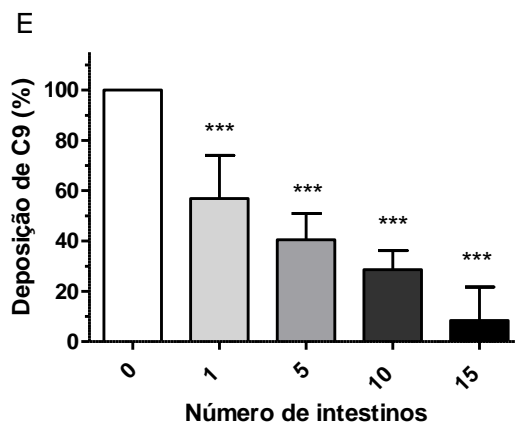
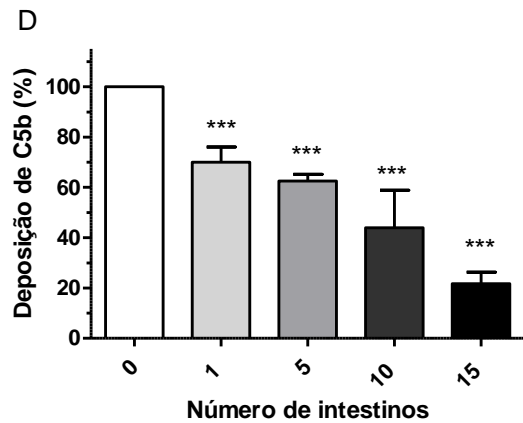
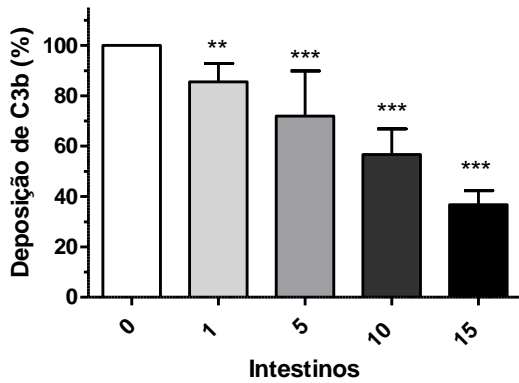
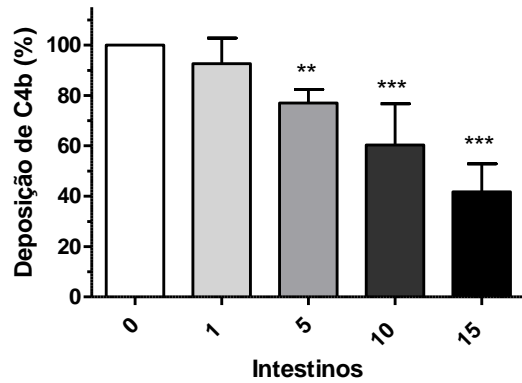
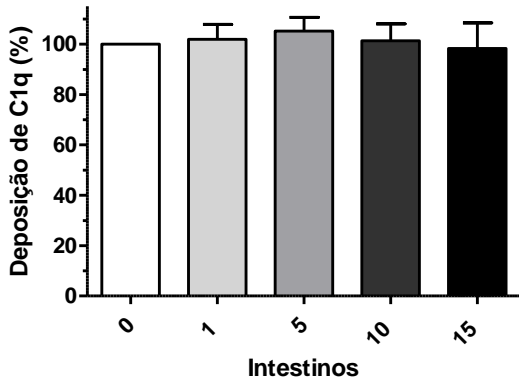


**Figura 9: Efeito do conteúdo intestinal de *Aedes aegypti* sobre a atividade hemolítica da via clássica e alternativa do complemento humano.** A avaliação da inibição da via alternativa e da via clássica pelo conteúdo intestinal de *Aedes aegypti* foi medida utilizando hemácias de coelho e carneiro, respectivamente. O CI de *Aedes aegypti* não foi capaz de inibir a hemólise da via alternativa (A). Porém, inibiu de forma dose dependente e estatisticamente significativa a via clássica do complemento humano (B). \*\*\* significam diferença estatística em  $p \leq 0.05$  (ANOVA + Teste de Dunnett's). As barras verticais representam média + desvio padrão de 5 repetições biológicas.

### **5.7 – Avaliação do efeito do conteúdo intestinal de fêmeas de *Aedes aegypti* sobre a deposição de moléculas do sistema do complemento humano ativado pela via clássica**

Os ensaios de deposição de moléculas do complemento humano em placas de ELISA mostraram que o conteúdo intestinal de *Aedes aegypti* não foi capaz de inibir a deposição do componente C1q na superfície da placa (**Figura 10A**). Nos testes, a deposição e ligação de C1q aos anticorpos IgG adsorvidos nos poços da placa de ELISA não foi significativamente menor em nenhuma das quantidades de intestino testado.

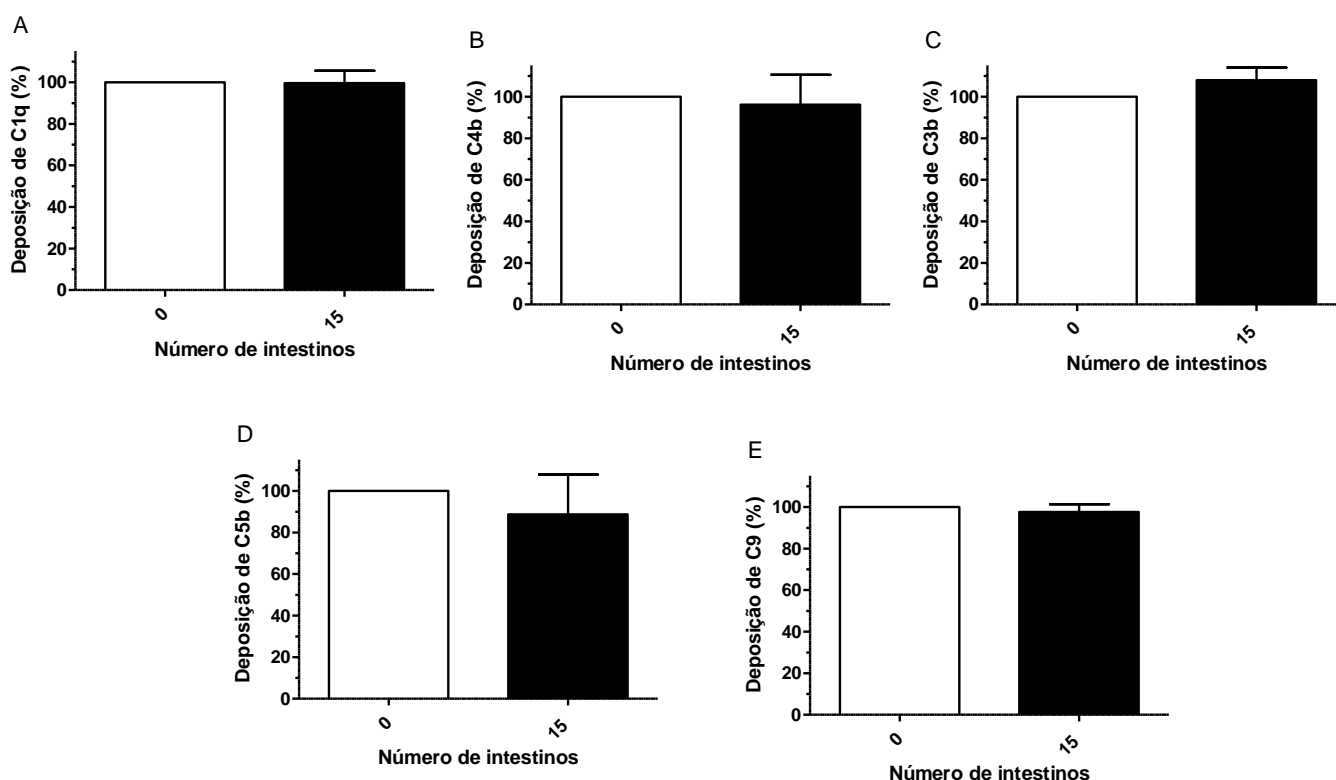
No entanto, houve uma inibição de forma significativa da deposição de C4b com um percentual de redução em torno de 66% na quantidade máxima de conteúdo intestinal utilizado neste ensaio em relação ao controle (**Figura 10B**). Além disso, como era de se esperar, todos os componentes posteriores de ativação da via clássica que foram testados, como C3b, C5b e C9 também apresentaram sua deposição diminuída quando em presença do conteúdo intestinal. A deposição de C3b também apresentou inibição em torno de 15% a partir do conteúdo intestinal equivalente a 1 intestino, atingido uma inibição próxima de 60% em relação ao controle na maior quantidade de conteúdo intestinal utilizado (15 intestinos) (**Figura 10C**). Tanto o C5b como C9 tiveram suas deposições inibidas pelo conteúdo intestinal de forma dose dependente, com um percentual de inibição próximos de 80% e 90%, respectivamente na quantidade máxima de conteúdo intestinal utilizada (**Figura 10D, e Figura 10E**).



**Figura 10: Efeito do conteúdo intestinal de *Aedes aegypti* sobre a deposição de moléculas da via clássica do complemento humano.** Gráficos mostram o percentual de redução da deposição dos componentes C1q (A), C4b (B), C3b (C) C5b (D) e C9 (E) incubados com o conteúdo intestinal de *A. aegypti* equivalente a 0, 1, 5, 10 e 15 intestinos. As barras verticais representam média  $\pm$  desvio padrão de 5 repetições biológicas. \*\*\*representa diferença estatística entre os grupos indicados em relação ao controle ( $p \leq 0.05$  ANOVA + Teste de Dunnett's).

## 5.8 – Avaliação da capacidade do conteúdo intestinal de *Aedes aegypti* em desligar componentes da via clássica previamente depositados

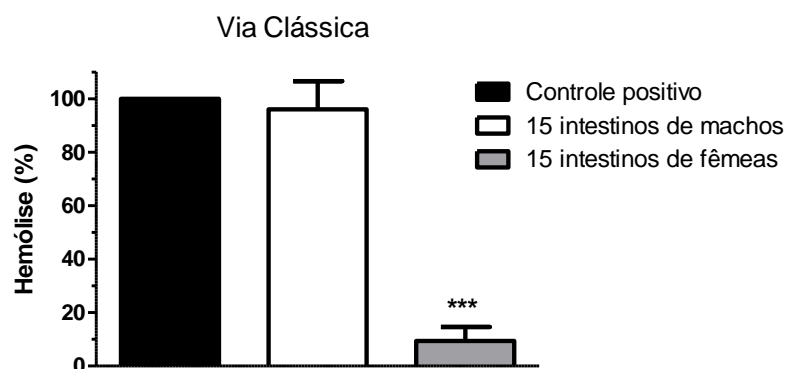
Embora o conteúdo intestinal de *Aedes aegypti* tenha apresentado eficácia em inibir a deposição das moléculas de C4b, C3b, C5b e C9 quando incubado juntamente com o soro humano normal, o conteúdo intestinal de *Aedes aegypti* não foi capaz de desligar os principais fatores do sistema complemento humano quando os mesmos foram previamente depositados na superfície da placa de ELISA, mostrando que essa inibição ocorre antes da deposição das moléculas da via clássica do complemento humano (Figura 11).



**Figura 11: Efeito do conteúdo intestinal de *Aedes aegypti* sobre moléculas da via clássica do complemento previamente depositadas na placa de ELISA após incubação com soro humano.** Gráficos mostram o percentual dos fatores C1q (A), C4b (B), C3b (C) C5b (D) e C9 (E) da via clássica do complemento humano que ainda permaneceram ligados à placa de ELISA após incubação com o conteúdo intestinal de *A. aegypti*. As barras verticais representam média ± desvio padrão de 5 repetições biológicas ( $p \leq 0.05$  Teste T' Student pareado).

## 5.9 – Avaliação do efeito do conteúdo intestinal de machos de *Aedes aegypti* sobre a atividade hemolítica da via clássica do complemento humano

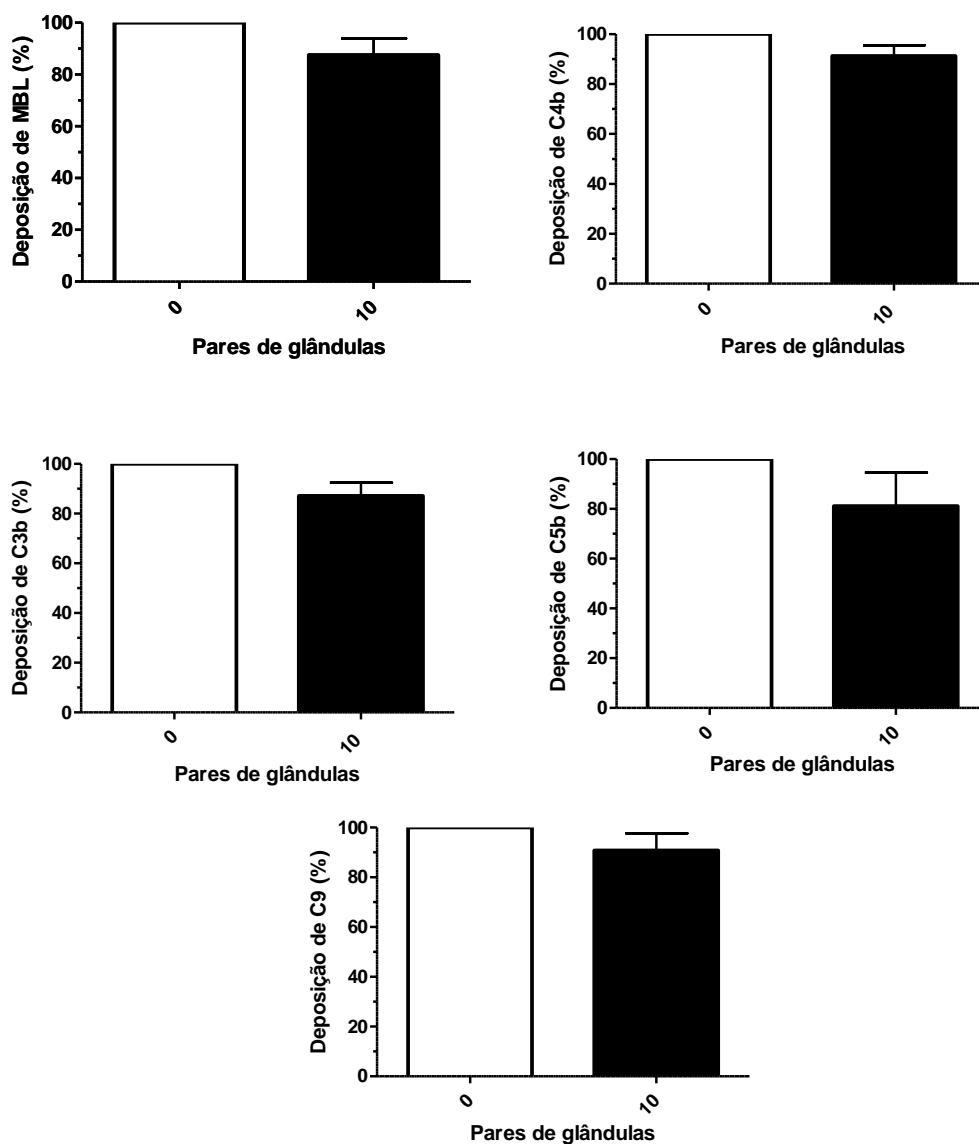
Durante seu ciclo reprodutivo, além de substâncias açucaradas, fêmeas de *A. aegypti* necessitam de sangue para maturação dos ovos, enquanto que machos se alimentam de açúcar durante toda sua vida. Para verificar se machos de *A. aegypti* também inibem a via clássica do complemento humano, realizamos ensaios hemolíticos utilizando hemácias de carneiro sensibilizadas. Os resultados mostram que intestinos de fêmeas de *A. aegypti* são capazes de inibir a via clássica do complemento humano, enquanto que os intestinos de machos desta espécie provavelmente não expressam os inibidores de ativação desta via do complemento (**Figura 12**).



**Figura 12: Efeito do conteúdo intestinal de machos e fêmeas de *Aedes aegypti* sobre a atividade hemolítica da via clássica do complemento humano.** A avaliação da inibição da via clássica pelo conteúdo intestinal de *Aedes aegypti* foi medida utilizando hemácias de carneiro. O conteúdo intestinal de *Aedes aegypti* de machos não foi capaz de inibir a hemólise da via clássica, diferentemente do observado para fêmeas \*\*\* significam diferença estatística em  $p \leq 0.05$  (ANOVA + Teste de Dunnett's). As barras verticais representam média + desvio padrão de 5 repetições biológicas.

### 5.10 – Avaliação da inibição da deposição dos fatores da via das lectinas do sistema complemento humano pelo EGS e conteúdo intestinal

O EGS de *A. aegypti* não foi capaz de inibir a ativação do complemento humano através da via das lectinas em nenhum dos pontos da via com a quantidade de 10 pares de glândulas (**Figura 13**).

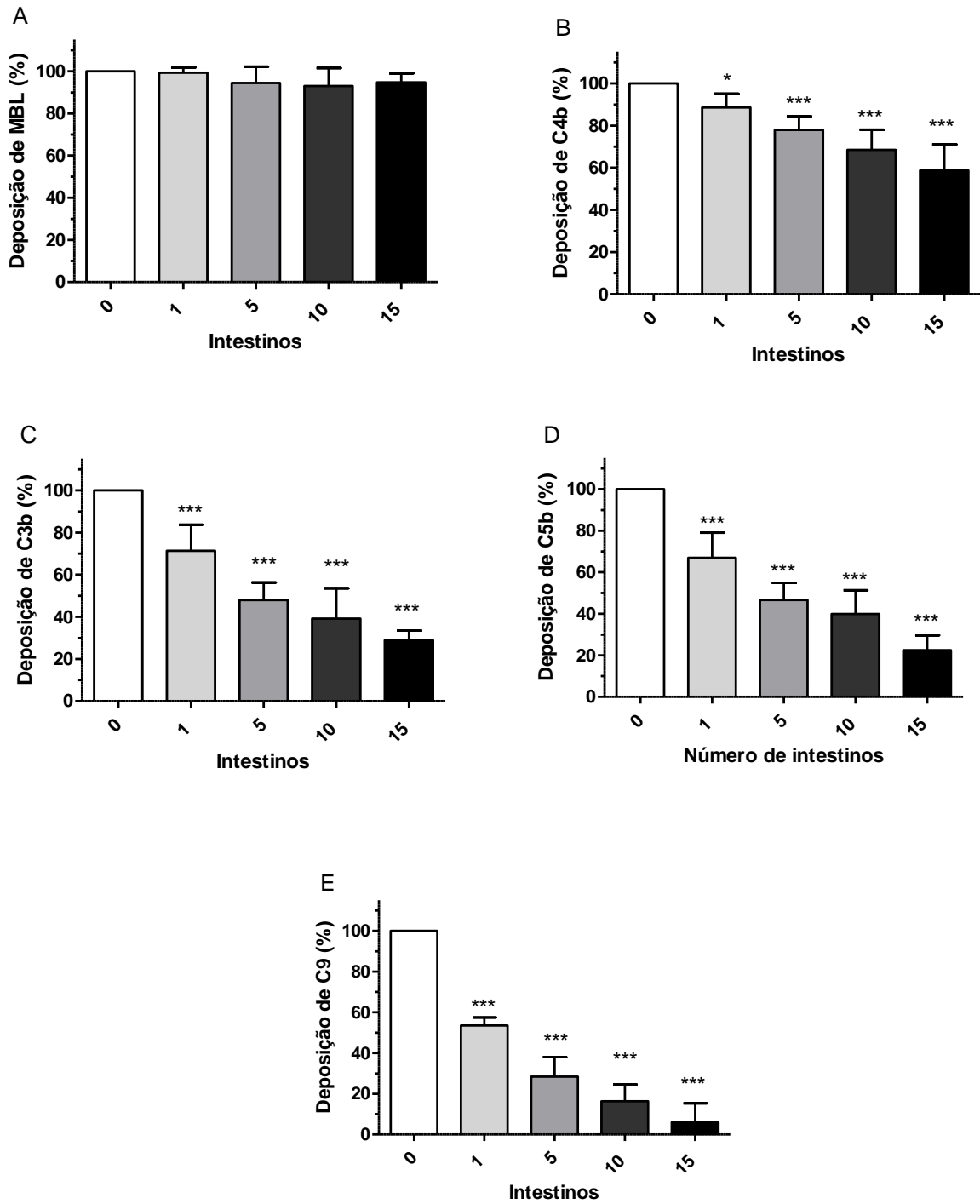


**Figura 13: Efeito do EGS de *Aedes aegypti* sobre a deposição de moléculas da via das lectinas do complemento humano.** Gráficos mostram o percentual de redução da deposição dos componentes MBL(A), C4b (B), C3b (C) C5b (D) e C9 (E) incubados com o EGS de *A. aegypti* equivalente a 10 pares de glândulas salivares. As barras verticais representam média  $\pm$  desvio padrão de 5 repetições biológicas ( $p > 0.05$  T-Student).



Os ensaios de deposição de moléculas do complemento humano em placas de ELISA mostraram que o conteúdo intestinal de *Aedes aegypti* não foi capaz de inibir a deposição do componente MBL na superfície da placa em nenhuma das quantidades de intestino testado. (**Figura 14A**).

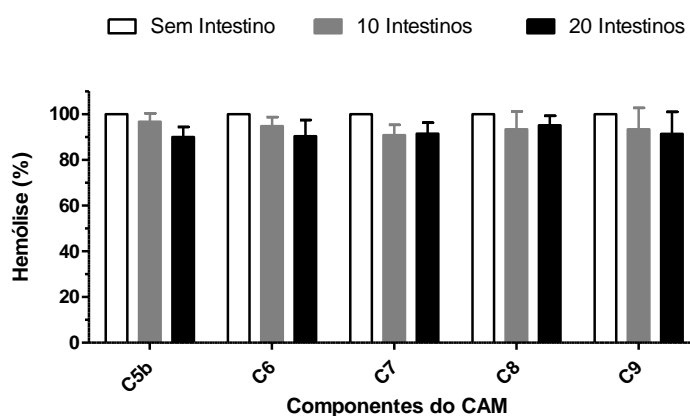
No entanto, houve uma inibição de forma significativa da deposição de C4b a partir de 1 intestino com um percentual em torno de 15% em relação ao controle (**Figura 14B**). E como era de se esperar, todos os componentes posteriores de ativação da via clássica que foram testados, como C3b, C5b e C9 também apresentaram sua deposição diminuída quando em presença do conteúdo intestinal. A deposição do C3b também apresentou inibição de em torno de 30% a partir do conteúdo intestinal equivalente a 1 intestino, atingido uma inibição na maior quantidade de material usado no ensaio (15 intestinos), com um percentual próximo de 70% em relação ao controle (**Figura 14C**). Tanto o C5b (**Figura 14D**) como C9 (**Figura 14E**) tiveram suas deposições inibidas pelo conteúdo intestinal, de forma dose dependente, com um percentual de inibição deposição próximos de 75% e 95%, respectivamente na quantidade máxima de conteúdo intestinal usada.



**Figura 14: Efeito do conteúdo intestinal de *Aedes aegypti* sobre a deposição de moléculas da via das lectinas do complemento humano.** As barras verticais representam média  $\pm$  desvio padrão de 5 repetições biológicas. . Gráficos mostram o percentual de redução da deposição dos componentes MBL (A), C4b (B), C3b (C) C5b (D) e C9 (E) incubados com o conteúdo intestinal de *A. aegypti* equivalente a 0, 1, 5, 10 e 15 intestinos \*\*\*representa diferença estatística entre os grupos indicados em relação ao controle ( $p \leq 0.05$  T-Student).

### 5.11 – Avaliação da atuação do conteúdo intestinal sobre a formação do complexo de ataque à membrana (CAM)

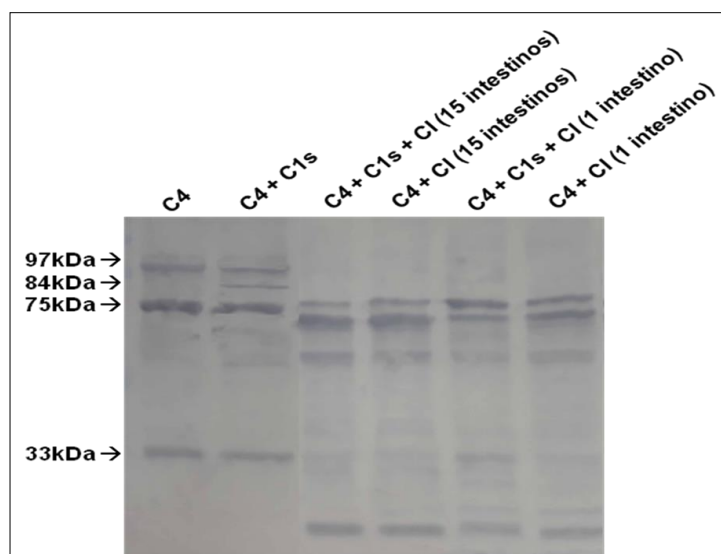
A utilização de soros depletados de C5, C6, C7, C8 e C9 na presença de cálcio e magnésio permitem que a cascata do complemento seja normalmente ativada na superfície das hemácias e ocorra a montagem das convertases até o ponto em que o fator depletado entraria em ação. A adição posterior de soro normal contendo EDTA (quelante dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ) permite que a reação continue a partir do ponto em que ela havia sido bloqueada por falta do fator depletado; mas não permite que o complemento venha a ser ativado novamente. Assim, se adicionarmos o conteúdo intestinal de *A. aegypti* a essa reação poderemos verificar se além de atuar inibindo a deposição de C4b no início da cascata, esse material é também capaz de atuar no final da cascata (a partir do ponto em que ocorre a deposição de C5, C6, C7, C8 e C9). Segundo os resultados apresentados na **Figura 15**, não existe inibidor presente no conteúdo intestinal que seja capaz de inibir a montagem do complexo de ataque às membranas a partir de C5.



**Figura 15: Ação do conteúdo intestinal de *Aedes aegypti* na deposição de componentes formadores do MAC.** Os ensaios hemolíticos pela via clássica foram feitos utilizando-se soros depletados dos fatores C5, C6, C7, C8 e C9. O soro humano normal contendo EDTA foi então adicionado ao ensaio e a hemólise foi avaliada em cada tubo. O conteúdo intestinal de *A. aegypti* não foi capaz de inibir hemólise pelo soro adicionado, sugerindo que o inibidor desta espécie de mosquito não atua nas fases posteriores de ativação do complemento humano a partir da deposição do fator C5. As barras verticais representam média ± desvio padrão de 5 repetições biológicas (p > 0.05 Two-way ANOVA + Teste de Bonferroni).

## 5.12 – Avaliação da ação do conteúdo intestinal de *A. aegypti* sobre a atividade enzimática do C1s ativado sobre C4

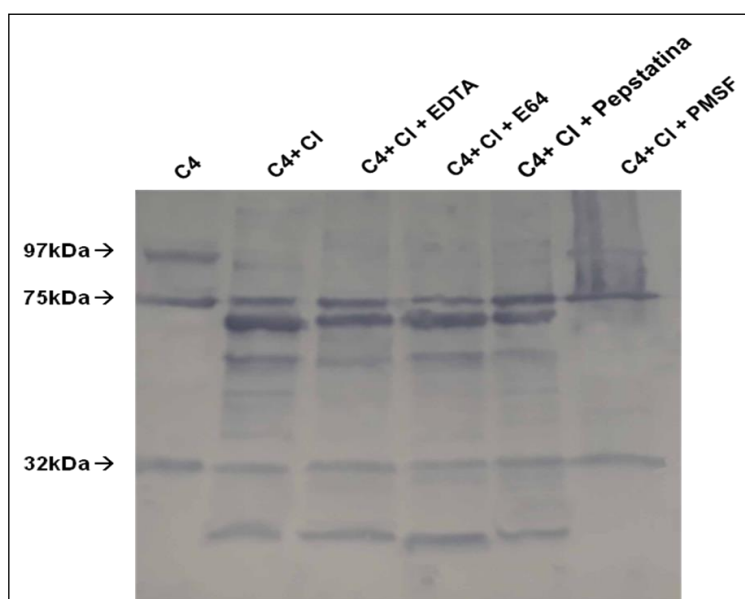
Uma vez que o conteúdo intestinal de *A. aegypti* foi capaz de inibir a deposição de C4b, uma possível explicação seria a de que o inibidor presente no conteúdo intestinal do mosquito poderia apresentar ação sobre C1s. Para a nossa surpresa, o conteúdo intestinal de *A. aegypti* apresentou ação sobre C4 purificado, clivando-o em bandas menores. Essa ação foi tão forte que mesmo quando o conteúdo intestinal foi colocado junto com C4 + C1s, as bandas menores (oriundas da clivagem de C4 pelo inibidor intestinal do mosquito) foram observadas, seja na quantidade de 1 intestino ou 15 intestinos resultando em bandas menores que 80 kDa. A banda de 84 kDa é o fragmento gerado pela ação de C1s sobre C4 (**Figura 16**).



**Figura 16: Ação do conteúdo intestinal de *Aedes aegypti* sobre clivagem do C4 pela enzima C1s.** Os componentes C4 e C1s purificados foram incubados na presença de conteúdo intestinal (1 ou 15 intestinos de *Aedes aegypti*). A eletroforese foi realizada sob condições desnaturantes e a identificação das bandas analisadas por Western blot. A identificação de C4 e seus subprodutos foi feita com anticorpo policlonal anti-C4 humano revelando as subunidades  $\alpha$  (97 kDa),  $\beta$  (75 kDa) e  $\gamma$  (33 kDa) de C4, bem como o fragmento  $\alpha'$  (84 kDa) originado a partir da clivagem de C4 por C1s. A clivagem de C4 pelo conteúdo intestinal de *Aedes aegypti* resultou em bandas menores que 80 kDa.

### 5.13 – Avaliação da natureza da protease presente no conteúdo intestinal de *A. aegypti*

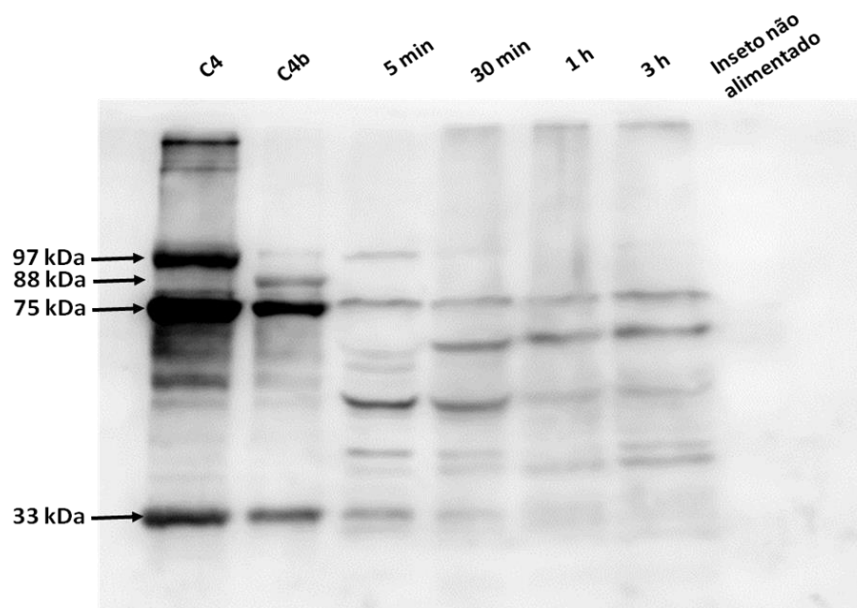
Uma vez que o conteúdo intestinal de *A. aegypti* foi capaz de clivar C4 em bandas menores, e que essa atividade pode ser atribuída a uma protease, decidimos investigar qual é a natureza da mesma. Ao incubar o PMSF (inibidor de serino proteases) juntamente com conteúdo intestinal de *A. aegypti* e C4, observamos que a banda de C4 permaneceu com suas subunidades  $\alpha$  (97 kDa),  $\beta$  (75 kDa) e  $\gamma$  (33 kDa) intactas. O mesmo não ocorreu na presença de EDTA (inibidor de metalo proteases), E64 (inibidor de cisteíno proteases) e pepstatina (inibidor de aspartil proteases), indicando que o possível inibidor do sistema complemento humano é uma serino protease (**Figura 17**).



**Figura 17: Natureza da protease presente no conteúdo intestinal de *A. aegypti*.** O componente C4 purificado foi incubado na presença de conteúdo intestinal do mosquito e 4 tipos de inibidores de proteases (PMSF - inibidor de serino proteases, EDTA - inibidor de metalo proteases, E64 - inibidor de cisteíno proteases e pepstatina - inibidor de aspartil proteases). A identificação das bandas foi realizada por Western blot utilizando-se anticorpos policlonais anti-C4 humano, revelando as subunidades  $\alpha$  (97 kDa),  $\beta$  (75 kDa) e  $\gamma$  (33 kDa) de C4, e a clivagem de C4 pelo conteúdo intestinal de *A. aegypti* resultando em bandas menores que 80 kDa na presença de EDTA, E64 e pepstatina. O mesmo não ocorreu ao incubar o conteúdo intestinal com PMSF, indicando que o inibidor intestinal de *A. aegypti* trata-se de uma serino protease.

### 5.14 – Avaliação cinética do processamento de C4 no intestino de *Aedes aegypti* após repasto sanguíneo com sangue humano

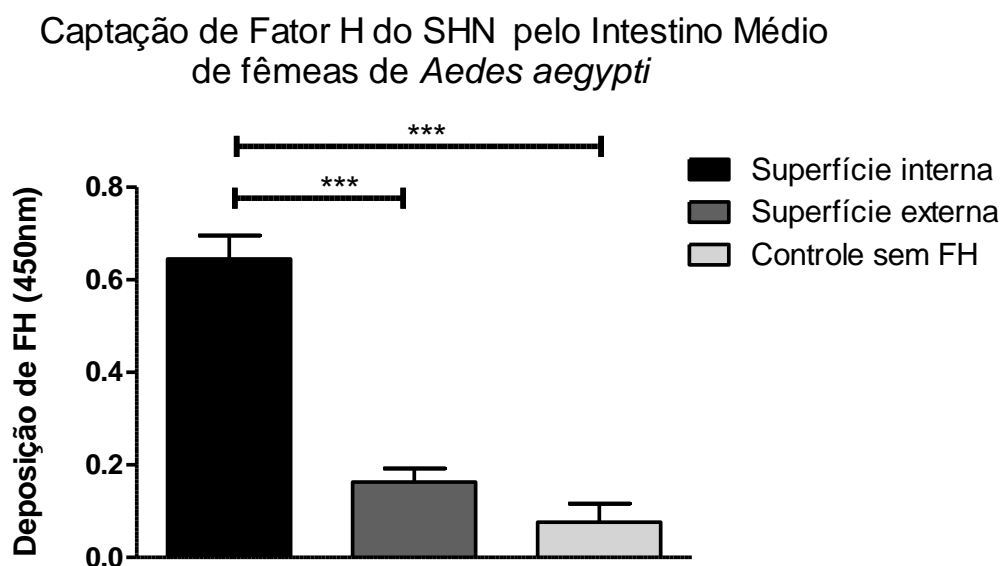
Com base na **figura 17**, investigamos a cinética de clivagem do componente C4 do soro humano pelo conteúdo intestinal de *A. aegypti*. Cinco minutos após repasto em hospedeiro humano, ainda é possível observar a estrutura de C4 preservada, com suas cadeias  $\alpha$  (97 kDa),  $\beta$  (75 kDa) e  $\gamma$  (33 kDa). A partir de 30 minutos após o repasto sanguíneo, o componente C4 do complemento foi degradado, com o aparecimento de bandas de menores que 80 kDa, perfil este também observado em mosquitos dissecados em 1 e 3 horas após o repasto sanguíneo (**Figura 18**).



**Figura 18: Avaliação cinética do perfil de C4 no intestino de *Aedes aegypti* após repasto sanguíneo com sangue humano.** O conteúdo intestinal de *Aedes aegypti* alimentados em hospedeiro humano em diferentes tempos ou em jejum foram analisados por Western blot. A identificação do C4 foi feita com anticorpos policlonais anti-C4 humano. Como padrões, foram utilizados C4 humano com suas subunidades  $\alpha$  (97 kDa),  $\beta$  (75 kDa) e  $\gamma$  (33 kDa) e C4b com as subunidades  $\alpha$  (88 kDa),  $\beta$  (75 kDa) e  $\gamma$  (33 kDa). Verifica-se a clivagem de C4 pelo conteúdo intestinal de *A. aegypti* em diferentes tempos após o repasto, resultando em bandas menores que 80 kDa.

### 5.15 – Avaliação da capacidade do epitélio intestinal de fêmeas de *A. aegypti* em captar fator H presente no Soro Humano Normal

A captação do fator H (fator presente no soro de vertebrados) pelo intestino de vetores como também por patógenos é uma estratégia para evasão da lise mediada pelo complemento, uma vez que o Fator H liga-se a C3b, estimulando a lise de C3b em iC3b pelo fator I, que é uma protease também presente no soro. Os intestinos de fêmeas de *A. aegypti* foram capazes de captar o fator H do soro humano, sugerindo que essa estratégia de proteção contra possíveis danos causados pelo complemento do soro de hospedeiros vertebrados está presente em *A. aegypti*. Este ensaio quando foi realizado com os intestinos fechados (sem exposição da superfície interna dos mesmos), verificou-se que não houve captação do fator H, mostrando que este fator do soro humano somente é captado pela camada celular voltada para o lúmen do intestino (Figura 19).

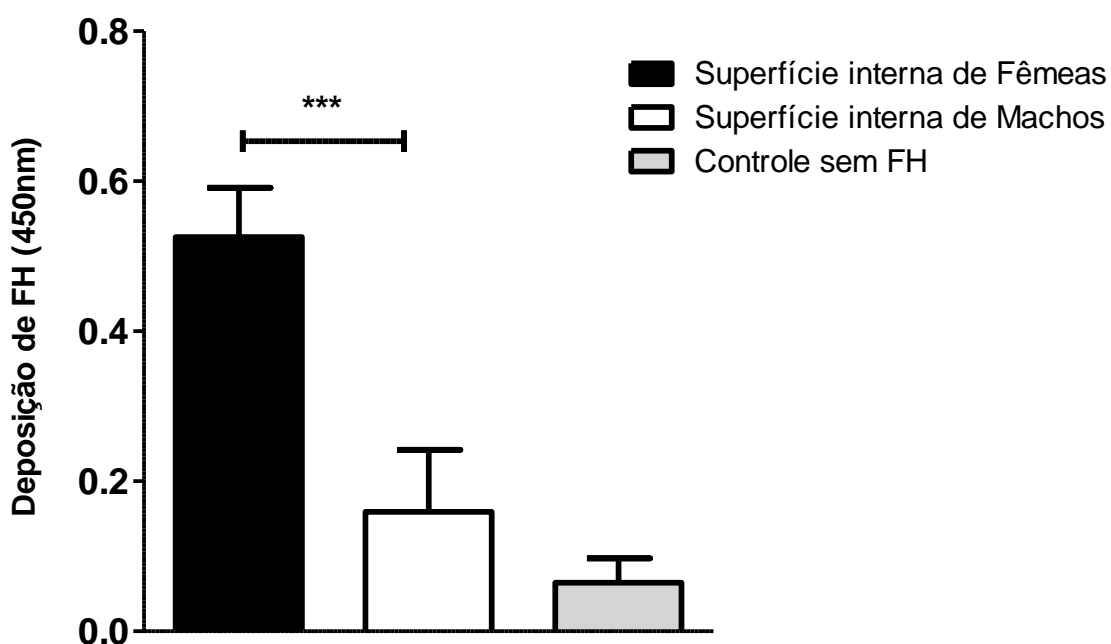


**Figura 19: Captação de Fator H de fêmeas pelo intestino médio de *Aedes aegypti*.** A captação do fator H do soro humano pela superfície intestinal foi investigada por ELISA, mostrando que o mesmo se liga à superfície interna do intestino de fêmeas desta espécie de mosquito. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão de 5 repetições biológicas. \*\*\*representa diferença estatística entre os grupos indicados em relação ao controle ( $p \leq 0.05$  ANOVA + Teste de Tukey).

### 5.16 – Avaliação da capacidade do conteúdo intestinal de *A. aegypti* de machos e fêmeas em captar fator H purificado

Em culicídeos, machos e fêmeas alimentam-se de soluções açucaradas, sendo que as fêmeas necessitam de sangue para maturação dos ovos. O intestino de fêmeas de *A. aegypti* foi capaz de captar o fator H purificado de soro humano normal. Entretanto, o epitélio intestinal dos machos captou significativamente menos fator H do que o das fêmeas de *A. aegypti* como pode ser observado na **Figura 20**, confirmando que a captação do fator H é observada somente em fêmeas.

Captação de FH purificado  
pelo Intestino Médio de machos e fêmeas de *Aedes aegypti*

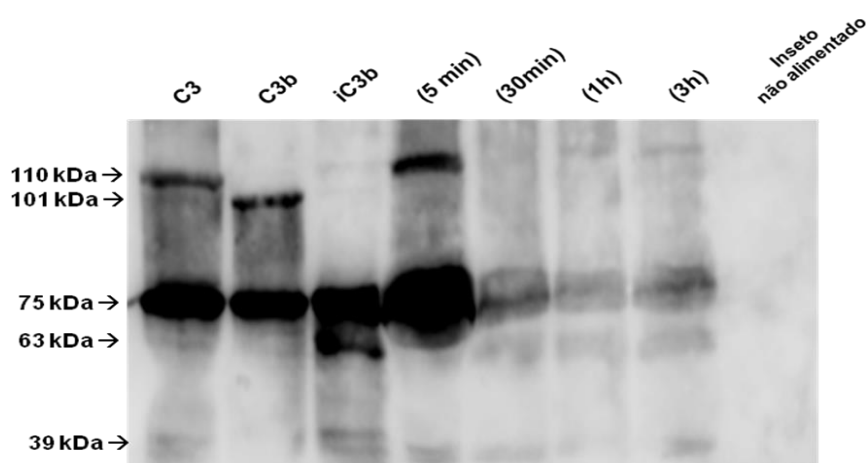


**Figura 20:** Captação de Fator H purificado pelo intestino médio de machos e fêmeas de *Aedes aegypti*. A captação do fator H purificado do Soro Humano Normal pela superfície intestinal foi investigada por ELISA. Os resultados mostram que somente o intestino de fêmeas do mosquito foi capaz de captar o fator H humano purificado. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão de 5 repetições biológicas. \*\*\*representa diferença estatística entre os grupos indicados em relação ao controle ( $p \leq 0.05$  ANOVA + Teste de Tukey).



### 5.17 – Avaliação cinética do processamento de C3 no intestino de *Aedes aegypti* após repasto sanguíneo com sangue humano

Uma vez que verificamos que o intestino de *Aedes aegypti* foi capaz de captar o FH presente no soro humano, investigamos se essa estratégia influencia na transformação de C3b em iC3b, uma vez que o FH é o co-fator que liga-se a C3b para que o fator I inative de forma proteolítica esta molécula, transformando-a em iC3b. Para isso, realizamos a cinética de clivagem do componente C3 do soro humano pelo conteúdo intestinal de *A. aegypti*. Cinco minutos após repasto em hospedeiro humano, ainda é possível observar a estrutura de C3 preservada, com suas cadeias:  $\alpha$  (110 kDa) e  $\beta$  (75 kDa). A partir de 30 minutos após o repasto sanguíneo, verifica-se uma conversão do componente C3 para iC3b, indicando que C3 foi clivado em C3a e C3b, e que C3b foi posteriormente clivado e transformado no componente inativado iC3b (**Figura 21**).



**Figura 21: Perfil de ativação de C3 no intestino de *Aedes aegypti* recém-alimentado com sangue humano.** O conteúdo de intestino de *Aedes aegypti* alimentados em diferentes tempos com sangue humano ou em jejum foram analisados por Western blot. A identificação do C3 foi feita com anticorpos policlonais anti-C3 humano. Os perfis de C3 humano estão indicados por setas. Como padrões foram utilizados: C3, que apresentam as cadeias:  $\alpha$  (110 kDa) e  $\beta$  (75 kDa); C3b: cadeia  $\alpha'$  (101 kDa) e a cadeia  $\beta$  (75 kDa); iC3b: cadeia  $\beta$  (75 kDa) e os fragmentos de 63kDa e 39 kDa resultantes da clivagem da cadeia  $\alpha'$  de C3b pelo fator I. Verifica-se a conversão do componente C3b para iC3b a partir de 30 minutos após o repasto.

## 6 – Discussão

No presente estudo, nós observamos basicamente dois mecanismos de escape do sistema complemento humano pelo *Aedes aegypti*. O primeiro foi a presença de um inibidor atuando no início da cascata da via clássica e das lectinas, identificado como uma serino protease que foi capaz de atuar em C4, clivando-o em bandas menores que 80 kDa. O segundo mecanismo descrito está relacionado à captação do fator H (o principal regulador natural da via alternativa) pela superfície interna intestinal de *A. aegypti*. A presença de mecanismos inibitórios é vital para a sobrevivência em artrópodes hematófagos, pois, caso o complemento não seja inativado por inibidores salivares ou intestinais o mesmo poderia causar dano ao trato digestivo dos mesmos (Barros et al. 2009, Khattab et al. 2015).

O intestino de fêmeas de *A. aegypti* foi capaz de captar o fator H purificado do soro humano normal, entretanto, o epitélio intestinal dos machos captou significativamente menos fator H do que o das fêmeas de *A. aegypti* (**Figura 20**), o que sugere que as fêmeas desenvolveram estratégias para lidarem com os possíveis efeitos deletérios do sangue ingerido, como o ataque do sistema complemento. Essa incapacidade dos machos de *A. aegypti* em captar o fator H e não apresentar atividade inibitória da via clássica pelo conteúdo intestinal (**Figura 12**) pode explicar o impacto do soro humano normal (SHN) na sua sobrevivência (**Figura 5B e 5C**), refletindo na diminuição do tempo de vida de machos quando comparado ao das fêmeas. Nosso trabalho corrobora o trabalho de Nikbakhtzadeh et al. 2016, onde machos da espécie *Culex quinquefasciatus* que se alimentaram com sangue tiveram a sua sobrevivência reduzida a poucos dias quando comparados com fêmeas dessa mesma espécie submetidas ao mesmo tratamento. Entretanto, neste trabalho os autores não discutiram sobre a possibilidade da existência de inibidores do complemento em fêmeas desta espécie de mosquito.

É sabido que o sangue, além de conter o sistema complemento presente no soro humano, é constituído por hemácias. As mesmas, ao serem digeridas, liberam moléculas pró-oxidantes tais como o grupamento heme oriundo da molécula de hemoglobina. O grupamento heme é extremamente reativo, promovendo a formação de radicais livres que danificam membranas, proteínas e DNA (Graça et al. 2006).

Uma vez que machos não realizam hematofagia, é provável que os mesmos não expressem e secretem proteínas destinadas a combaterem o stress oxidativo oriundo da digestão da hemoglobina. Em nossos experimentos, quando machos de *A. aegypti* ao ingerirem hemoglobina misturada à sacarose, os mesmos apresentaram uma alta taxa de mortalidade comparado com fêmeas dessa espécie de mosquito (tempo médio de sobrevivência seis vezes menor que o de fêmeas que ingeriram o mesmo alimento) sugerindo que os mesmos não possuem um mecanismo eficiente de proteção contra estresse oxidativo. (**Figura 5D**).

Ao nível anatômico, é improvável que os mosquitos machos sejam capazes de realizar hematofagia e atingir vasos sanguíneos de animais vivos (Nikbakhtzadeh et al. 2016), isso porque ao contrário das fêmeas, os machos de maneira geral, apresentam maxilas e mandíbulas mais curtas que a probóscide (Wahid et al.). Ao nível salivar, as glândulas salivares dos mosquitos machos e fêmeas têm quantidades semelhantes de enzimas associadas à alimentação com açúcar (Marinotti et al. 1990). Porém, machos têm menos enzimas com atividades relacionadas à alimentação sanguínea, como por exemplo, a enzima apirase, que tem a função de impedir a agregação plaquetária e a coagulação (Stark & James 1995).

Ao nível intestinal, nossos resultados apontam que existe uma diferença significativa na atividade da catalase observada nos intestinos de fêmeas de *A. aegypti* em comparação com machos (**Figura 6**). A catalase, uma das principais proteínas do peroxissoma, desempenha a função crítica de decompor a água oxigenada, composto este que pode ser formado pela atividade de grupos heme em espécies reativas de oxigênio (ROS) mais perigosas (No Lee et al. 2018). Na literatura já foi demonstrada a importância da catalase contra o stress oxidativo, visto que mosquitos da espécie *A. aegypti* ao ter o gene da catalase (AAEL013407 - RB) silenciado apresentaram redução da oviposição e do tempo de vida quando foram desafiados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Oliveira et al. 2017). A catalase é uma enzima que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, sendo uma das principais enzimas do sistema de defesa antioxidante presente na célula que confere proteção a células e tecidos (Grigoras 2017, Heit et al. 2017, Inanan et al. 2018).

O EGS do mosquito *A. aegypti* não foi capaz de inibir a via clássica do sistema complemento humano em nenhuma das quantidades de glândulas testadas, mesmo com a quantidade equivalente a 20 glândulas salivares (**Figura 7B**). Esse resultado corrobora o trabalho de Cavalcante e colaboradores 2003, que ao pesquisarem a capacidade da saliva de *A. aegypti* em inibir a via clássica verificaram que a mesma não apresentava essa atividade. Neste estudo, os autores não investigaram a ação da saliva sobre a via alternativa ou a via das lectinas. Por isso investigamos se o extrato de glândula salivar de *A. aegypti* inibe a via alternativa (**Figura 7A**) e das lectinas (**Figura 13A-E**) do complemento humano, não sendo observada atividade do EGS para nenhuma dessas vias. Como a inativação do complemento presente no sangue oriundo do repasto sanguíneo é crucial para evitar danos ao intestino de artrópodes hematófagos, passamos a investigar a atividade anticomplemento do intestino de fêmeas de *A. aegypti*.

A deposição de C9 nas células-alvo e conseqüentemente a formação do complexo de ataque à membrana é um sinal de que o complemento, depois de ser ativado e amplificado, chegou à sua etapa final, atacando as células e levando-as à morte. A deposição de C3 ocorre nas fases iniciais de ativação do complemento. Portanto, uma medida geral da ativação do complemento em certo tecido seria o estudo da razão de deposição dos componentes C9/C3. Para investigar se o intestino de fêmeas de *A. aegypti* possuem atividade inibitória do complemento humano, investigamos a razão C9/C3 em intestinos de fêmeas que realizaram repasto em hospedeiro humano (ou seja na presença de um possível inibidor intestinal) e em intestinos não alimentados e lavados com PBS (ou seja na ausência de qualquer inibidor intestinal solúvel). Como esperado, na ausência de inibidores solúveis, a razão C9/C3 depositada nos enterócitos foi consideravelmente maior em insetos que se alimentaram com sangue humano em comparação com aqueles que tiveram seus inibidores solúveis retirados (**Figura 8**). Este resultado reforça a idéia de que os artrópodes hematófagos que não têm inibidores salivares devem apresentar uma atividade inibitória ao nível do trato digestivo, como visto para *A. aegypti* (Barros et al. 2009), uma vez que sem os inibidores solúveis, a proteção do intestino pode ser comprometida.

O conteúdo intestinal de *A. aegypti* foi capaz de inibir a via clássica do complemento humano, de forma dose dependente e estatisticamente significativa, mesmo quanto utilizamos a quantidade equivalente a um intestino (**Figura 9B**). Embora

se observe uma leve tendência de queda da porcentagem de hemólise com o número máximo de conteúdo intestinal usado, não houve inibição significativa da via alternativa (**Figura 9A**).

Se as fêmeas de *Aedes* não possuem inibidores intestinais solúveis da via alternativa e considerando que mosquitos anofelinos das espécies *A. gambiae* e *A. stephensi* podem captar o fator H (Khattab et al. 2015), procuramos investigar se em *A. aegypti* este mesmo mecanismo é observado. Dessa forma, avaliamos a capacidade do epitélio intestinal de *A. aegypti* em captar fator H presente no soro humano normal. Os intestinos de fêmeas de *A. aegypti* foram capazes de captar o fator H do soro humano (**Figura 19**), sugerindo que essa estratégia de proteção contra possíveis danos causados pelo complemento do soro de hospedeiros vertebrados está presente em *A. aegypti*. O fator H mantém a ativação espontânea de C3 sob controle e também inibe o sistema do complemento nos seus estágios de ativação e amplificação, ligando-se aos complexos C3b e C3bBb depositados nas superfícies celulares humanas inibindo sua ativação por três mecanismos: a) competição com o fator B (FB) para ligação em C3b, impedindo a geração de C3bBb; b) aumento do decaimento dos complexos C3bBb já formados, através da dissociação de Bb da C3 convertase e c) atua como co-fator do fator I (FI), que por sua vez cliva C3b em C3b inativo (iC3b) (Sánchez-Corral et al. 2018). Pela capacidade do fator H em ligar-se na C3 convertase para promover a dissociação de Bb, procuramos avaliar a capacidade do conteúdo intestinal de fêmeas de *A. aegypti* em captar o fator H purificado. De fato, observamos, que o fator H purificado se liga à parede intestinal de fêmeas (**Figura 20**), indicando assim a existência de um possível receptor para o fator H presente na superfície dos enterócitos deste mosquito. Como era de se esperar, a ligação do fator H se deu predominantemente na superfície do lúmen intestinal.

A captação de fator H pelo intestino de *A. aegypti* poderia levar à clivagem e inativação de C3b, de maneira análoga ao que acontece em superfícies “self” de tecidos humanos. Ao investigarmos o processamento de C3 no intestino de *Aedes aegypti* após repasto sanguíneo com sangue humano (**Figura 21**), cinco minutos após o repasto em hospedeiro humano ainda é possível observar a estrutura de C3 preservada sem indícios de que tenha ocorrido ativação. Isso significa que qualquer ativação da via alternativa que tenha se iniciado no momento em que o sangue entrou em contato com o epitélio

foi prontamente inibida pela ação conjunta dos fatores H e I. Essa ação parece ser tão eficiente que o número de iC3b gerado no processo é pequeno demais para aparecer no western blotting. A partir de 30 minutos após o repasto sanguíneo, verifica-se uma conversão do componente C3 para iC3b, o que sugere que o Fator H captado na superfície luminal dos enterócitos é usado como co-fator, ligando-se a C3b para que o fator I inative por proteólise a esta molécula, transformando-a em iC3b. Esse resultado corrobora o trabalho de Khattab colaboradores 2015, onde os autores também verificaram por western blot nos mosquitos *Anopheles stephensi* (a principal espécie transmissora de *Plasmodium* na Ásia) e *Anopheles gambiae* (espécie transmissora de *Plasmodium* na África) a inativação do componente C3 em iC3b 30 minutos após o repasto em hospedeiro humano.

Nossos resultados sugerem que o inibidor intestinal de *A. aegypti* atua nas etapas iniciais da cascata da via clássica, inibindo a deposição de C4b e dos fatores subsequente pesquisados, C3b, C5b e C9 (**Figura 10**). Trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa verificaram que a saliva do carrapato do boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Silva et al. 2016) e o EGS do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (Ferreira et al. 2016) também bloqueiam a atividade da via clássica através da inibição da deposição de C4b.

Ao pesquisar a capacidade do conteúdo intestinal em inibir a via das lectinas do complemento humano, verificamos que também ocorre inibição na deposição de C4b e dos fatores subsequentes pesquisados, C3b, C5b e C9 (**Figura 14**), assim como acontece com a via clássica. Esta capacidade de alguns artrópodes possuírem em seus intestinos compostos capazes de interagir e inibir mais de uma via do complemento já foi anteriormente observada (Bergstrom et al. 2009). As proteínas D1 e I1, secretadas pelo intestino de *Sarcoptes scabiei*, são proteases não ativas, mas que têm a capacidade de inibir as três vias do complemento humano. Esse mecanismo de inibição dessas proteínas está relacionado com a ligação de C1q, MBL e properdina, impedindo a deposição dos componentes C1q, C4b, C3b e C9 (via clássica); MBL, C4b, C3b e C9 (via das lectinas); C3b e C9 (via alternativa) (Bergstrom et al. 2009).

Em nossos experimentos verificou-se também que não existe inibidor presente no conteúdo intestinal que seja capaz de inibir a montagem do complexo de ataque às

membranas (**Figura 15**). Utilizamos nestes experimentos soros humanos depletados para os fatores C5 a C9, individualmente. Nos ensaios hemolíticos adicionamos também soro humano normal na presença de EDTA como fonte de reposição dos demais componentes do sistema complemento, uma vez que a adição de EDTA (quelante de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ) previne uma nova ativação do complemento no ensaio. Desta forma, verificamos que o conteúdo intestinal de *A. aegypti* não inibe o complemento a partir do componente C5. Resultados semelhantes foram observados com a saliva de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Silva et al 2016). Contudo, uma proteína salivar, a OmCI, do carrapato *Ornithodoros moubata*, mostrou-se capaz de se ligar e inibir o componente C5, impedindo assim a formação do complexo de ataque às membranas (Nunn et al. 2005).

Tomando como base que o conteúdo intestinal de *A. aegypti* foi capaz de inibir a deposição de C4b, uma possível explicação para esse fato seria a atividade do inibidor presente no conteúdo intestinal do mosquito sobre C1s, protease que cliva C4 em C4a e C4b. Para a nossa surpresa, o conteúdo intestinal de *A. aegypti* apresentou ação sobre C4 purificado, clivando-o em bandas menores que 80 kDa (**Figura 16**), fato este que explicaria o fato de o inibidor impedir a deposição de C4b, uma vez que a molécula de C4, precursora de C4b, já não se encontra no estado íntegro, inibindo a continuação da cascata do complemento. Essa clivagem de C4 em bandas menores que 80 kDa pelo conteúdo intestinal de *A. aegypti* sugere que essa atividade possa ser atribuída a uma protease, nos estimulando a investigar a natureza da mesma. Para isso, utilizamos inibidores de proteases de acordo com a sua natureza. Os inibidores de proteases são proteínas que interagem especificamente com distintas enzimas proteolíticas, promovendo sua inibição (Laskowski Jr & Qasim 2000; Lingaraju & Gowda 2008). Ao utilizarmos o PMSF (inibidor de serino proteases) juntamente com conteúdo intestinal de *A. aegypti* e C4 verificamos que a banda de C4 permaneceu com suas subunidades  $\alpha$  (97 kDa),  $\beta$  (75 kDa) e  $\gamma$  (33 kDa) intactas, indicando que o possível inibidor do sistema complemento humano é uma serino protease.

É sabido que insetos produzem proteases abundantes que atuam na digestão de proteínas dietéticas no intestino. Proteases (peptidases) são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas em proteínas, que são divididas em: exopeptidases, que clivam um

resíduo de aminoácido terminal no final de um polipeptídeo e endopeptidases, que clivam ligações peptídicas internas (Kanost et al. 2017).

As serino-proteases são um grupo diverso de enzimas proteolíticas identificadas pelo seu resíduo nucleofílico de Ser no sítio ativo (Blow, 1997). O genoma de *A. aegypti* contém centenas de genes que codificam para serino-protease, dos quais 66 são tripsinas putativas (Venancio et al 2009). No entanto, apenas cinco proteases digestivas (três tripsinas e duas quimotripsinas) são conhecidas por serem expressas no intestino médio (Barillas-Mury e Wells 1993; Bian et al 2008; Jiang et al 1997; Kalhok et al 1993).

Brackney et al. 2010, ao realizar a análise filogenética de genes responsáveis pela transcrição de serino proteases em artrópodes hematófagos verificaram que as mesmas se separam em três clados distintos: tripsinas, quimotripsinas e serino collagenases. Embora o colágeno não seja um componente normal do sangue, verificou-se a presença de serino collagenases na digestão de artrópodes hematófagos, assim como em *A. aegypti* (Brackney et al. 2010). De forma interessante, C1q, o componente inicial da via clássica cascata do complemento, tem uma sequência de 81 resíduos que dão a essa parte da molécula um aspecto de colágeno (Kishore e Reid, 2000). É possível que essas serino collagenases atuem no mecanismo de defesa proteolítica, degradando a molécula de C1q (Brackney et al. 2010). Em teoria, essa degradação bloquearia a ativação do complemento e protegeria as células epiteliais do intestino médio contra danos induzidos pelo complemento ou impediria que a flora bacteriana nativa do intestino do inseto fosse alvo da ativação do complemento humano oriundo do sangue ingerido (Brackney et al. 2010).

Uma vez que descrevemos como ocorre a inibição do sistema complemento humano pelo conteúdo intestinal de *A. aegypti*, a identificação e o isolamento dessa(s) molécula(s) envolvida(s) na inibição do sistema complemento deste mosquito são de potencial interesse na geração de uma vacina que induza anticorpos contra a proteína inibidora da via clássica do complemento humano e contra o receptor de fator H do intestino de *A. aegypti*. Estes alvos estimulariam a produção de anticorpos em hospedeiros vertebrados vacinados contra proteínas do *A. aegypti*, capazes de interferir com o ciclo biológico do inseto e potencialmente bloquear a infecção pelos arbovírus



transmitidos por este mosquito. Na medida em que os mosquitos que se alimentassem nessas pessoas tenderiam a morrer sem transmitir os vírus. O desenvolvimento desta vacina permitiria o licenciamento por companhias especializadas em biotecnologia, da primeira vacina humana brasileira que controlaria *A. aegypti* ao induzir a morte prematura de fêmeas transmissoras de arboviroses. Do ponto de vista global, esta vacina poderia ser aplicada em diferentes regiões do mundo onde temos estes mosquitos como principal vetor. Ela poderia estar associada a vacinas dirigidas contra os próprios vírus como o vírus da dengue e outros transmitidos pela picada de *A. aegypti*.

Seja qual for à abordagem tomada daqui para frente no campo das moléculas inibidoras do sistema complemento, a luta contra o mosquito *A. aegypti* deve ser encarada de forma racional e integrada, e o incremento de outras abordagens como: educação ambiental e sanitária, o uso de inseticidas de origem natural não podem ser deixadas de lado, fomentando assim a interrupção da transmissão das diferentes arboviroses transmitidas por *A. aegypti*.

## 7 – Conclusões

- ✓ Machos de *A. aegypti* apresentaram tempo de sobrevivência menor em relação às fêmeas quando submetidos aos componentes do sangue humano (soro humano normal e hemoglobina);
- ✓ Machos de *A. aegypti* apresentaram uma menor quantidade de catalase no intestino do que as fêmeas;
- ✓ O extrato de glândula salivar de *A. aegypti* não apresentou atividade de inibição das três vias do sistema complemento humano;
- ✓ A razão de C9/C3 foi maior em intestinos de *A. aegypti* que tiveram seus inibidores removidos e incubados com soro humano normal do que em intestinos cujos insetos foram alimentados com sangue humano na presença dos inibidores intestinais;
- ✓ O conteúdo intestinal de fêmeas de *A. aegypti* apresentou atividade de inibição das vias das lectinas e clássica do sistema complemento humano;
- ✓ O conteúdo intestinal de machos de *A. aegypti* não apresentou atividade de inibição da via alternativa do sistema complemento humano;
- ✓ O conteúdo intestinal de fêmeas de *A. aegypti* apresentou atividade de inibição das vias das lectinas e clássica do sistema complemento humano a partir da deposição de C4;
- ✓ O conteúdo intestinal de fêmeas de *A. aegypti* não apresentou capacidade de desligar os componentes da via clássica do sistema complemento humano previamente depositados em placas de ELISA;
- ✓ O conteúdo intestinal de *A. aegypti* não se apresentou capaz de inibir a montagem do complexo de ataque às membranas a partir de C5;
- ✓ A parede intestinal de fêmeas de *A. aegypti* foi capaz de captar fator H, embora o mesmo não ocorreu com os machos dessa espécie;
- ✓ O conteúdo intestinal de *Aedes aegypti* apresentou atividade proteolítica sobre o componente C4 do sistema complemento humano;
- ✓ A protease de *A. aegypti* envolvida na clivagem de C4 é da classe das serino-proteases;
- ✓ A partir de 30 minutos após repasto, o componente C4 foi degradado em bandas menores que 80kDa em decorrência da atividade do inibidor intestinal da via clássica do complemento humano de *A. aegypti*;

- ✓ A partir de 30 minutos após repasto verifica-se uma conversão do componente C3 para iC3b, provavelmente em decorrência da deposição do fator H do soro humano na superfície intestinal de *A. aegypti*.

## 8 – Referências Bibliográficas

Ali Ou Alla S, Combe B 2011. Arthritis after infection with Chikungunya virus. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 25: 337–346.

Almeras L, Fontaine A, Belghazi M, Bourdon S phanie, Elodie Boucomont-Chapeaublanc, Eve Orlandi-Pradines MB, Nicole Corre-Catelin, Paul Reiter, Bruno Pradines, Thierry Fusai and CR 2010. Salivary Gland Protein Repertoire from *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 10: 65–74.

Andrade BB, Teixeira CR, Barral A, Barral-Netto M 2005. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: A tale of tear and blood. *An. Acad. Bras. Cienc.* 77: 665–693.

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.

Barillas-Mury C, Wells MA 1993. Cloning and sequencing of the blood meal-induced late trypsin gene from the mosquito *Aedes aegypti* and characterization of the upstream regulatory region. *Insect Molecular Biology* 2:7–12.

Bergstrom 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.

Bian GW, Ralkhel AS, Zhu JS 2008. Characterization of a juvenile hormone-regulated chymotrypsin-like serine protease gene in *Aedes aegypti* mosquito. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38:190–200.

Blow DM 1997. The tortuous story of Asp.His.Ser: structural analysis of [alpha]-chymotrypsin. *Trends in Biochemical Sciences* 22:405–408.

Brackney DE, Isoe J, Black WC, Zamora J, Foy B, Olson KE 2010. NIH Public Access. *J Insect Physio* 56: 736–744.

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.

Campos G, Bandeira A, Sardi S 2015. Zika Virus Outbreak, Bahia Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 21: 1881.

Carvalho F, Moreira L 2016. Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so Successful as a Species? *Neotrop Entomol* 46: 13.

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.

Dobó J, Pál G, Cervenak L, Gál P 2016. The emerging roles of mannose-binding lectin-associated serine proteases (MASPs) in the lectin pathway of complement and beyond. *Immunol. Rev.* 274: 98–111.

Dunkelberger JR, Song W 2010. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 20: 34–50.

Eisen L, Monaghan AJ, Lozano-fuentes S, Daniel F, Hayden MH, Bieringer PE, Steinhoff DF 2014. The Impact of Temperature on the Bionomics of *Aedes (Stegomyia) aegypti*, with Special Reference to the Cool Geographic Range Margins The Impact of Temperature on the Bionomics of *Aedes (Stegomyia) aegypti*, With Special Reference to the Cool Geograph. *J. Med. Entomol.* 51: 496–516.

Elvington M, Liszewski MK, Atkinson JP 2016. Evolution of the complement system: from defense of the single cell to guardian of the intravascular space. *Immunol. Rev.* 274: 9–15.

Fellner C 2016. Zika in America : The Year in Review Zika in America : The Year in Review. *P&T* 41: 778–791.

Ferreira VP, Fazito Vale V, Pangburn MK, Abdeladhim M, Mendes-Sousa AF, Coutinho-Abreu I V, Rasouli M, Brandt EA, Meneses C, Lima KF, Nascimento Araújo R, Pereira MH, Kotsyfakis M, Oliveira F, Kamhawi S, Ribeiro JMC, Gontijo NF, Collin N, Valenzuela JG 2016. SALO, a novel classical pathway complement inhibitor from saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Sci. Rep.* 6: 19300.

Figueredo MLG de, Figueiredo LTM 2014. Review Article Emerging alphaviruses in the Americas : Chikungunya and Mayaro. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47: 677–683.

Franco PF, Silva NCS, Fazito do Vale V, Abreu JF, Santos VC, Gontijo NF, Valenzuela JG, Pereira MH, Sant'Anna MR V, Gomes APS, Araujo RN 2016. Inhibition of the classical pathway of the complement system by saliva of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Exp. Parasitol.* 164: 91–96.

Garcia BL, Zwarthoff SA, M. SH, And R, Geisbrecht B V., J 2016. Complement Pathway Novel Evasion Mechanisms of the Classical Novel Evasion Mechanisms of the Classical Complement Pathway. *J Immunol Ref.* 1976: 2051–2060.

Garred P, Genster N, Pilely K, Bayarri-Olmos R, Rosbjerg A, Ma YJ, Skjoedt MO 2016. A journey through the lectin pathway of complement???MBL and beyond. *Immunol. Rev.* 274: 74–97.

Ghebrehwet B 2016. The complement system: an evolution in progress. *F1000 Research* 5: 2840.

Gillespie RD, Mbow ML, Titus RG 2000. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunol.* 22: 319–331.

Gloria-Soria A, Ayala D, Bheecarry A, Calderon-Arguedas O, Chadee DD, Chiappero M, Coetzee M, Elahee K Bin, Fernandez-Salas I, Kamal HA, Kamgang B, Khater EIM, Kramer LD, Kramer V, Lopez-Solis A, Lutomiah J, Martins A, Micieli MV, Paupy C, Ponlawat A, Rahola N, Rasheed SB, Richardson JB, Saleh AA, Sanchez-Casas RM,

- Seixas G, Sousa CA, Tabachnick WJ, Troyo A, Powell JR 2016. Global genetic diversity of *Aedes aegypti*. *Mol. Ecol.* 25: 5377–5395.
- Goupil BA, Mores CN 2016. A Review of Chikungunya Virus-induced Arthralgia: Clinical Manifestations, Therapeutics, and Pathogenesis. *Open Rheumatol. J.* 10: 129–140.
- Graça V, Maya-monteiro C, Paiva-silva GO, Paes C, Sorgine MHF, Oliveira MF, Oliveira PL 2006. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods.
- Graham BS, Repik PM, Yactayo S 2016. Chikungunya in the Americas: Recommendations and Conclusions. *J. Infect. Dis.* 214: S510–S513.
- Grigoras AG 2017. Catalase immobilization — A review. *Biochem. Eng. J.* 117: 1–20.
- Guerdan BR 2010. Dengue fever/dengue hemorrhagic fever. *Am. J. Clin. Med.* 7: 51–53.
- He A, Brasil P, Siqueira AM, Calvet GA, Kwatra SG 2016. The Emerging Zika Virus Threat: A Guide for Dermatologists. *Am. J. Clin. Dermatol.* 18: 231–236.
- Heit C, Marshall S, Singh S, Yu X, Charkoftaki G, Zhao H, Orlicky DJ, Fritz KS, Thompson DC, Vasiliou V 2017. Catalase deletion promotes prediabetic phenotype in mice. *Free Radic. Biol. Med.* 103: 48–56.
- Hopp MJ, Foley JA 2001. Global-scale relationships between climate and the dengue fever vector, *Aedes aegypti*. *Clim. Change* 48: 441–463.
- Inanan T, Tüzmen N, Karıpcin F 2018. International Journal of Biological Macromolecules Oxime-functionalized cryogel disks for catalase immobilization. *Int. J. Biol. Macromol.* 114: 812–820.
- Jiang QJ, Hall M, Noriega FG, Wells M 1997. cDNA cloning and pattern of expression of an adult, female specific chymotrypsin from *Aedes aegypti* midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27:283–289.
- Juhn J, Naeem-Ullah U, Maciel Guedes B, Majid A, Coleman J, Paolucci Pimenta P, Akram W, James A, Marinotti O 2011. Spatial mapping of gene expression in the salivary glands of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Parasit. Vectors* 4: 1.
- Kalhok SE, Tabak LM, Prosser DE, Brook W, Downe AE, White BN 1993. Isolation, sequencing and characterization of two cDNA clones coding for trypsin-like enzymes from the midgut of *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* 2:71–79
- Kanost MR, Clem RJ, States U, Cerra D 2017. Insect Proteases ☆. : 1–16.
- Kay M, Kindhauser MK, Allen T, Frank V, Shankar R, Dye C 2016. Zika : the origin and spread of a mosquito-borne virus.
- Khatab 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.*

- Kishore U, Reid KBM 2000. C1q: Structure, function, and receptors. *Immunopharmacology*;49: 159–170.
- Kraemer MUG, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQN, Shearer FM, Barker CM, Moore CG, Carvalho RG, Coelho GE, Bortel W Van, Hendrickx G, Schaffner F, Elyazar IR, Teng HJ, Brady OJ, Messina JP, Pigott DM, Scott TW, Smith DL, William Wint GR, Golding N, Hay SI 2015. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. *Elife* 4: 1–18.
- Laskowski Jr M, Qasim MA 2000. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477: 324-337.
- Lingaraju MH, Gowda LR 2008. A Kunitz trypsin inhibitor of *Entada scandens* seeds: Another member with single disulfite bridge. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1784:850-855.
- Marinotti O, James A, Ribeiro J 1990. Diet and Salivation in Female. 36: 545–548.
- 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: 1–13.
- Mendes-Sousa AF, Queiroz DC, Vale VF, Ribeiro JMC, Valenzuela JG, Gontijo NF, Andersen JF 2016. An Inhibitor of the Alternative Pathway of Complement in Saliva of New World Anopheline Mosquitoes. *J. Immunol.* 197: 599–610.
- Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT 2015a. Complement system part I - molecular mechanisms of activation and regulation. *Front. Immunol.* 6: 1–30.
- Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT 2015b. Complement system part II: Role in immunity. *Front. Immunol.* 6: 1–26.
- Moreira J, Peixoto TM, Machado de Siqueira A, Lamas CC 2017. Sexually acquired Zika virus: a systematic review. *Clin. Microbiol. Infect.* 23: 296–305.
- Mousson L, Dauga C, Garrigues T, Schaffner F, Vazeille M, Failloux A-B 2005. Phylogeography of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (L.) and *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. *Genet. Res.* 86: 1–11.
- Natal D 2002. Bioecologia do *Aedes aegypti*. *Biológico* 64: 205–207.
- Nikbakhtzadeh MR, Buss GK, Leal WS, Oliveira PL 2016. Toxic Effect of Blood Feeding in Male Mosquitoes. 7: 1–7.
- No Lee J, Kumar R, Maharjan Y, Liu Z, Lim J, Kim S, Cho D, So H, Choe S, Park R 2018. Biochemical and Biophysical Research Communications Catalase inhibition induces pexophagy through ROS accumulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 501: 696–702.

- Novak CM, Sheffield JS, Burd I 2016. Zika virus: Future reproductive concerns. *Am. J. Reprod. Immunol.*: 1–5.
- Oktarianti R, Senjarini K, Hayano T, Fatchiyah F, Aulanni'am 2015. Proteomic analysis of immunogenic proteins from salivary glands of *Aedes aegypti*. *J. Infect. Public Health* 8: 575–582.
- Oliveira HM, Paiva-silva GO, Sorgine MHF, Alvarenga H, Oliveira PL 2017. Catalase protects *Aedes aegypti* from oxidative stress and increases midgut infection prevalence of Dengue but not Zika. : 1–13.
- Parente R, Clark SJ, Inforzato A, Day AJ 2016. Complement factor H in host defense and immune evasion. *Cell. Mol. Life Sci.*
- Puiprom O, Morales Vargas RE, Potiwat R, Chaichana P, Ikuta K, Ramasoota P, Okabayashi T 2013. Characterization of chikungunya virus infection of a human keratinocyte cell line: Role of mosquito salivary gland protein in suppressing the host immune response. *Infect. Genet. Evol.* 17: 210–215.
- Ramos-Castañeda J, Barreto dos Santos F, Martínez-Vega R, Galvão de Araujo JM, Joint G, Sarti E 2017. Dengue in Latin America: Systematic Review of Molecular Epidemiological Trends. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11: e0005224.
- Rebêlo JMM, Costa JML, Silva FS, Pereira YNO, Silva JM da 1999. Distribuição de *Aedes aegypti* e do dengue no Estado do Maranhão, Brasil. *Cad. Saude Publica* 15: 477–486.
- Ribeiro JC 1987. *Ixodes dammini*: Salivary anti-complement activity. *Exp. Parasitol.* 64: 347–353.
- Ribeiro JMC, Francischetti IMB 2003. Role of arthropod saliva in blood feeding: Sialome and post-sialome perspectives. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 483–513.
- Ribeiro JMC, Spielman A 1986. *Ixodes dammini*: Salivary anaphylatoxin inactivating activity. *Exp. Parasitol.* 62: 292–297.
- Sacramento CQ, Melo GR de, Rocha N, Hoelz LVB, Mesquita M, Freitas CS de, Fintelman-Rodrigues N, Martorelli A, Ferreira AC, Barbosa-Lima G, Bastos MM, Volotao E de M, Tschoeke DA, Leomil L, Bozza FA, Bozza PT, Boechat N, Thompson FL, Filippis AMB de, Bruning K, Souza T 2016. The clinically approved antiviral drug sofosbuvir impairs Brazilian zika virus replication. *bioRxiv*: 61671.
- Sakkas H, Economou V, Papadopoulou C 2016. Zika virus infection: Past and present of another emerging vector-borne disease. *J. Vector Borne Dis.* 53: 305–311.
- Sánchez-Corral P, Pouw RB, López-Trascasa M, Józsi M 2018. Self-Damage Caused by Dysregulation of the Complement Alternative Pathway : Relevance of the Factor H Protein Family. *Front. Immunol.* 9: 1–19.
- Sarma JV, Ward P a 2012. The Complement System. *NIH Public Access author Manuscr.* 343: 227–235.
- Schmid MA, Glasner DR, Shah S, Michlmayr D, Kramer LD, Harris E 2016. Mosquito



Saliva Increases Endothelial Permeability in the Skin, Immune Cell Migration, and Dengue Pathogenesis during Antibody-Dependent Enhancement. *PLoS Pathog.* 12: 1–25.

Schmidt CQ, Lambris JD, Ricklin D 2016. Protection of host cells by complement regulators. *Immunol. Rev.* 274: 152–171.

Sebastian MR, Lodha R, Kabra SK 2009. Chikungunya infection in children. *Indian J. Pediatr.* 76: 185–189.

Silva JS, Mariano ZDF, Scopel I 2008. A dengue no Brasil e as políticas de combate ao *Aedes aegypti*: da tentativa da erradicação às políticas de controle. *Rev. Bras. Geogr. Médica e da Saúde* 3: 163–175.

Silva NCS, Vale VF, Franco PF, Gontijo NF, Valenzuela JG, Pereira MH, Sant'Anna MR V., Rodrigues DS, Lima WS, Fux B, Araujo RN 2016. Saliva of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) inhibits classical and alternative complement pathways. *Parasit. Vectors* 9: 445.

Slenczka W 2016. Zika virus disease. *Emerg. Infect.* 10: 163–173.

Stark K, James A 1995. Stark and James 1995.pdf.

Thurman JM, Nester CM 2016. All Things Complement. *Clin J Am Soc Nephrol* 3: 1–11.

Tyson KR, Elkins C, De AM, Tyson KR, Elkins C, Silva AM De 2008. Tick Salivary Protein That Binds to Properdin 1. *J. Immunol.* 180: 3964–3968.

Venancio TM, Cristofolletti PT, Ferreira C, Verjovski-Almeida S, Terra WR 2009. The *Aedes aegypti* larval transcriptome: a comparative perspective with emphasis on trypsins and the domain structure of peritrophins. *Insect Molecular Biology* 18:33–44.

Wahid I, Sunahara T, Mogi M Maxillae and Mandibles of Male Mosquitoes and Female Autogenous Mosquitoes ( Diptera : Culicidae ) Maxillae and Mandibles of Male Mosquitoes and Female Autogenous Mosquitoes ( Diptera : Culicidae ). 40: 150–158.

Zanluca C, Campos V, Melo A De, Luiza A, Mosimann P, Igor G, Nunes C, Luz K 2015. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110: 569–572.

Zara AL de SA, Santos SM dos, Fernandes-Oliveira ES, Carvalho RG, Coelho GE 2016. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiol. e Serviços Saúde* 25: 1–2.