

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Parasitologia

Laura Valeria Rios Barros

**Estratégias de Evasão do Sistema do Complemento em Protozoários Parasitos:
revisitando antigos conceitos e proposição de uma nova forma de escape**

Belo Horizonte

2021

Laura Valeria Rios Barros

**Estratégias de Evasão do Sistema do Complemento em Protozoários Parasitos:
revisitando antigos conceitos e proposição de uma nova forma de escape**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Departamento de Parasitologia – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de Concentração: Inumoparasitologia.

Orientador: Prof. Thiago Castro Gomes, Ph.D

Co-orientador: Prof. Nelder de Figueiredo Gontijo, Ph.D

Belo Horizonte

2021

- 043 Barros, Laura Valeria Rios.
Estratégias de Evasão do Sistema do Complemento em Protozoários Parasitos [manuscrito] : revisitando antigos conceitos e proposição de uma nova forma de escape / Laura Valeria Rios Barros. – 2021.
104 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Prof. Dr. Thiago Castro Gomes. Coorientador: Prof. Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.
1. Parasitologia. 2. Toxoplasma /terapia. 3. Leishmania mexicana. I. Gomes, Thiago Castro . II. Gontijo, Nelder de Figueiredo . III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



Universidade Federal de Minas Gerais



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Parasitologia

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Laura Valéria Rios Barros

429/2021/12
entrada
1º/2019
2019664466

Às quatorze horas do dia 27 de agosto do ano de 2021, reuniu-se, por videoconferência, sala <https://conferenciaweb.rnp.br/events/defesa-dissertacao-de-mestrado-laura-valeria-rios-barros>, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **“Estratégias de Evasão do Sistema do Complemento em Protozoários Parasitos: revisitando antigos conceitos e proposição de uma nova forma de escape”** área de concentração: **Protozoologia**. Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, **Dr. Thiago Castro-Gomes**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao(a) candidato(a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Thiago Castro-Gomes	UFMG	APROVADA
Dra. Maria de Fátima Martins Horta	UFMG	APROVADA
Dr. Maurício Roberto Vianna Sant'Anna	UFMG	APROVADA
Dr. Nelder Figueiredo Gontijo	UFMG	APROVADA

Expedição do resultado final.

CONSIDERAÇÕES GERAIS – SOBRE TESE APRESENTADA PELO (A) O (A) CANDIDATO (A):

Exigências	
Recomendações	
Sugestões	Todas as sugestões para o aperfeiçoamento do manuscrito foram passados à aluna pelos membros da banca examinadora.

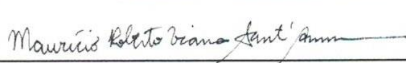
Pelas indicações, o(a) candidato(a) foi considerado(a): APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada digitalmente por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 27 de agosto de 2021.


Dr. Thiago Castro-Gomes 
(Orientador)

Dra. Maria de Fátima Martins Horta 

Dr. Maurício Roberto Vianna Sant'Anna 

Dr. Nelder Figueiredo Gontijo 
(Coordenador)

Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador


Profa. Daniella Castanheira Bartholomeu
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Parasitologia
SIAPE: 1517341

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais, Luis Carlos e Angélica Milena, que com todo o carinho e amor me ensinaram que educação é um bem precioso que ninguém pode tirar de você. Muito obrigado pelo apoio incondicional de vocês. Gostaria também de agradecer à minha irmã Luisa, que me ensina cada dia que embora a vida não seja fácil sempre é possível seguir em frente, sua responsabilidade e dedicação são uma fonte de inspiração para mim. Ao meu irmão Luis, que me ensina que cada coisa tem seu tempo e espaço, e não é possível acelerá-los segundo minha vontade. A meus avós, Oscar Rios, Marina Quiroga e Margoth Bernal, que embora não entendam muito do que eu faço sempre me incentivaram a fazer o que eu realmente gosto de fazer, a perseguir meus sonhos. Ao meu primo Camilo Fernandez, que nos dias de maior incerteza e estresse sempre me incentivava a seguir diante. A todos eles muito obrigada!

Aos meus queridos amigos Artur, Anna, Karen e Angel, os quais fizeram os dias de saudades longe de minha família mais suportáveis, meu muito obrigada! O carinho e apreciação de vocês me ajudaram a ser mais forte e superar as dificuldades. Levo todos e cada um dos momentos que passei com vocês no meu coração.

Ao meu orientador, professor Thiago Castro Gomes, que desde o primeiro momento me convidou a perguntar-me mais sobre o que é dado por fato, você despertou em mim novamente essa faísca da curiosidade, de querer indagar e descobrir, por isso serei eternamente grata.

Ao meu coorientador, o professor Nelder de Figueiredo, quem sempre se mostrou completamente à disposição para me ajudar e me explicar aquelas coisas que para mim eram um dragão de sete cabeças e tudo sem julgar, da forma mais singela e clara possível. Muito obrigada pela sua paciência!

A meus companheiros do Laboratório de Biologia Celular e Patógenos Intracelulares, os quais me acolheram de braços abertos e, com paciência e carinho, me ensinaram cada um dos seus conhecimentos. Com vocês cada experimento que sai errado, ao invés de uma frustração, era uma oportunidade de aprendizado.

À minha turma de mestrado e à coordenação do programa, especialmente à Sumara e à Sibebe, vocês fizeram aqueles primeiros dias carregados de trabalho virar uma bela lembrança!

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia pelo esforço e dedicação na tarefa educativa e investigativa, tentando sempre dar as melhores condições para seus alunos.

Às agências de fomento CNPq, FAPEMIG e CAPES pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta dissertação.

E por fim, agradeço a todos os que de alguma maneira contribuíram para formar a pessoa que eu me tornei até hoje, muito obrigada!

Resumo

Protozoários parasitos são organismos unicelulares eucariotos capazes de desenvolver parasitismo intra e extracelular em inúmeras espécies de seres vivos. No homem, estes parasitos são causadores de doenças de impacto em saúde pública. O sucesso de um parasito em estabelecer a infecção depende de uma série de intrincadas adaptações evolutivamente selecionadas, o que inclui o desenvolvimento de estratégia que permitam a evasão dos mecanismos efetores do sistema imune de seus hospedeiros. O sistema do complemento é um dos principais braços da imunidade inata de mamíferos e outros organismos, estando, assim, na linha de frente no combate a parasitos invasores. Trata-se de um conjunto de moléculas efetoras que atuam de forma regulada e cuja finalidade é o extermínio da espécie invasora. Para parasitos unicelulares, como protozoários, bactérias e alguns fungos, a ativação final do sistema do complemento culmina com a eliminação do patógeno via lise celular, através da formação de um poro lítico que despolariza a membrana plasmática do parasito. Diferentes estratégias de resistência ao ataque pelo sistema do complemento tem sido relatadas para as diferentes espécies de protozoários parasitos conhecidas, entre elas: 1- sequestro de proteínas reguladoras do sistema do complemento produzidas pelo próprio hospedeiro, 2- expressão de proteínas reguladoras do sistema do complemento pelo parasito, 3- destruição proteolítica de diferentes fatores por proteases de membrana expressas pelo parasito, 4- formação de uma barreira física glicolipídica que evita a deposição de moléculas do sistema do complemento na membrana plasmática do parasito, e 5- remoção, por endocitose, de moléculas efetoras do sistema do complemento ligadas à membrana plasmática do parasito. Neste trabalho, nós revisamos as diferentes estratégias de resistência ao sistema do complemento descritas para as principais espécies de protozoários parasitos e propomos um novo mecanismo de escape utilizando *Leishmania amazonensis* como modelo. Nossos achados mostram que as formas promastigotas do parasito são capazes de remover o poro lítico formado pela ativação final do sistema do complemento humano. De fato, a habilidade de reparar danos infligidos à membrana plasmática é um mecanismo ancestral presente nas células eucariotas. Nossos dados indicam que os protozoários parasitos preservaram este mecanismo celular ancestral e que o mesmo pode ser empregado como defesa frente ao ataque por poros líticos do sistema do complemento de seus hospedeiros, num exemplo inédito de exaptação evolutiva. **Palavras-chave:** *Leishmania amazonenses*; Reparo de membrana plasmática; Sistema Complemento; Evasão imunitária.

Abstract

Parasitic protozoa are unicellular eukaryotic organisms capable of developing intra and extracellular parasitism in numerous species of living beings. In humans, these parasites cause diseases with a great impact on public health. The success of a parasite in establishing the infection depends on a series of intricate evolutionarily selected adaptations, which include the development of molecular and cellular strategies that allow the evasion of the effector mechanisms of the immune system of its hosts. The complement system is one of the main branches of innate immunity in mammals and other organisms, and therefore it is at the forefront in the fight against invading parasites. It is a set of effector molecules that act in a finely regulated manner and whose purpose is the extermination of the invading species. For unicellular parasites, such as protozoa, bacteria and some fungi, the final activation of the complement system culminates in the elimination of the pathogen via cell lysis, through the formation of a lytic pore that depolarizes the plasmatic membrane of the parasite. Different strategies of resistance to attack by the complement system have been reported for the different species of known protozoan parasites, among them: 1- sequestration of regulatory proteins of the complement system produced by the host itself, 2- expression of regulatory proteins of the complement system by the parasite, 3- proteolytic destruction of different factors by membrane proteases expressed by the parasite, 4- formation of a physical glycolipid barrier that prevents the deposition of molecules from the complement system directly on the plasmatic membrane of the parasite, and 5- removal, by endocytosis, of effector molecules of the complement system linked to the plasmatic membrane of the parasite. In this work, we review the different resistance strategies to the complement system described for the main species of protozoan parasites and propose a new escape mechanism using *Leishmania amazonensis* as a model. Our findings show that the promastigote forms of the parasite are able to remove the lytic pore formed by the final activation of the human complement system. Indeed, the ability to repair damage inflicted on the plasma membrane is an ancestral mechanism present in eukaryotic cells. Together with findings from other groups, our data indicate that parasitic protozoans have preserved this ancestral cellular mechanism and that it can be used as a defense against attack by lytic pores in the complement system of their hosts, in an unprecedented example of evolutionary exaptation. **KEYWORDS:** *Leishmania amazonensis*; Plasma Membrane Repair; Complement System; Immune evasion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mecanismos de Evasão do Sistema do Complemento Descritos para <i>Plasmodium falciparum</i>	50
Figura 2 - Mecanismos de Evasão do Sistema do Complemento Descritos para <i>Toxoplasma gondii</i>	51
Figura 3 - Mecanismos de Evasão do Sistema do Complemento Descritos para <i>Trypanosoma cruzi</i>	54
Figura 4 - Mecanismos de Evasão do Sistema do Complemento Descritos para <i>Leishmania spp</i>	57
Figura 5 - Mecanismos de Evasão do Sistema do Complemento Descritos para <i>Entamoeba histolytica</i>	58
Figura 6 – Dinâmica da Membrana Plasmática Durante o Reparo de Danos Membranares.....	64
Figura 7 – Reparo de Poros de MAC em Fibroblastos e em Promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	73
Figura 8 – Possíveis Vias Envolvidas no Mecanismo de Reparo de Poros de MAC em <i>Leishmania spp</i>	72

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1 – Principais protozooses de importância médico-veterinária, seus agentes etiológicos e formas de transmissão.....	15
Tabela 2 - Distribuição das diferentes espécies de <i>Leishmania</i> conhecidas. LC Leishmaniose Cutânea, LCD Leishmaniose Cutânea Difusa, LMC Leishmaniose Mucocutânea.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DAMPs	Consegue reconhecer os padrões moleculares associados a danos
LPG	Lipofosfoglicano ancorado em glicosilfosfatidilinositol
MAC	Complexo de ataque a membranas
MASPs	Ligação da serino-protease associada a MBL
MBL	Lectina de ligação a manose
NSF	Fator sensível à N-etilmaleimida
PAMPs	Reconhecer padrões moleculares associados a patógenos
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
PSG	Gel secretado por promastigotas
SLO	Estreptolisina-O
SNARE	Complexo de receptores de proteínas de fixação solúvel de NSF
Syt VII	Sinaptotagmina VII
TLR	Receptores Toll-like

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Protozoários Parasitos do Homem.....	14
1.1. Os Protozoários – Um Breve Histórico.	14
1.2. As Protozooses.....	17
1.2.1. Protozooses Humanas: principais espécies patogênicas, formas evolutivas e características gerais de cada doença.	18
1.2.1.1. Malária – <i>Plasmodium</i> spp.	18
1.2.1.2. Toxoplasmose - <i>Toxoplasma gondii</i>	20
1.2.1.3. Doença de Chagas – <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
1.2.1.4. Leishmanioses - <i>Leishmania</i> spp.	26
1.2.1.5. Amebíase - <i>Entamoeba histolytica</i>	32
CAPÍTULO 2 – Mecanismos da Imunidade Inata na Frente de Defesa do Hospedeiro contra Protozoários Parasitos.....	35
2.1. Imunidade Celular.....	35
2.2 Imunidade Humoral	36
2.3. Principais Determinantes Moleculares dos Protozoários Parasitos que Ativam a Imunidade Inata.	37
CAPÍTULO 3 – O Sistema do Complemento	39
3.1. Uma Perspectiva Histórica e Evolutiva	39
3.2. O sistema do Complemento Humano e Suas Principais Vias	41
3.3. O Papel Primordial do Sistema do Complemento Frente aos Patógenos.	43
CAPÍTULO 4 – Mecanismos de Evasão ao Complemento Por Protozoários Parasitos	46
4.1. Mecanismo de Evasão do Sistema do Complemento em <i>Plasmodium falciparum</i>	48
4.2. Mecanismo de Evasão do Sistema do Complemento em <i>Toxoplasma gondii</i>	49
4.3. Mecanismo de Evasão do Sistema do Complemento em <i>Trypanosoma cruzi</i>	49
4.4. Mecanismo de Evasão do Sistema do Complemento em <i>Leishmania</i> spp.	53
4.5. Mecanismo de Evasão do Sistema do Complemento em <i>Entamoeba histolytica</i>	56
CAPÍTULO 5 – O Mecanismo de Reparo de Membrana Plasmática como Estratégia de Evasão do Complexo de Ataque a Membranas.	59
5.1. O Reparo de Membrana Plasmática - breve histórico e importância para a sobrevivência das células eucariotas.....	59
5.2. Principais Mecanismos Propostos – Endocitose e Brotamento Vesicular – A Importância da Remoção Sumária do Poro da Membrana Plasmática.	62

5.3 Proposição do Mecanismo de Reparo de Membrana Plasmática como Estratégia de Escape Utilizando <i>Leishmania</i> spp. como Modelo.....	63
5.3.1. Possíveis Vias Envolvidas no Mecanismo de Reparo de Poros de MAC em <i>Leishmania</i> spp.....	66
5.3.1.1. Remoção do Poro Lítico por Endocitose.....	66
5.3.1.2 Remoção do Poro Lítico por Brotamento Vesicular	68
CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
REFERENCIAS	75
APÊNDICE I: ARTIGO.....	96

Capítulo 1 – Protozoários Parasitos do Homem

1.1. Os Protozoários – Um Breve Histórico.

As primeiras descrições de protozoários surgiram em 1675, quando Anthony Van Leeuwenhoek, ao observar num microscópio rudimentar uma gota de água de um lago Berkelse Mere descobriu numerosos seres que denominou “animalcules”. Estes foram descritos nas cartas que Anthony enviou à Real Sociedade de Londres como pequenas criaturas de formas variadas que apresentavam uma locomoção similar à dos animais, surgindo, então, a denominação (Dobell, 1932). Em seguida, e na maior parte no século XVIII, deu-se início a vários estudos e descobertas nascendo assim a protozoologia. O termo *protozoos* foi cunhado pelo zoólogo e naturalista alemão Georg August Goldfuss (1782-1848), a origem etimológica do termo provém da junção de duas palavras gregas *πρῶτος* (*prōtos*), que significa “primeiro” ou “primitivo” e *ζῷον* (*Zōon*), que significa “animal” ou “ser vivo”, portanto, eram considerados seres primitivos sem nenhum tipo de organização ou diferenciação de tecidos (Rothschild, 1989).

Os protozoários são microorganismos unicelulares eucariontes pertencentes ao Reino Protista. O termo protozoário agrupa organismos de formas variadas, com diferentes sistemas de alimentação, locomoção, reprodução e ciclo de vida. A classificação dentro da sistemática baseia-se na locomoção destes no meio aquático, dividindo-se em sarcodíneos, ciliados, flagelados e esporozoários. Entretanto, trata-se de um grupo polifilético, não representando fielmente uma linhagem evolutiva. Atualmente tem-se conhecimento de mais de 65.000 espécies de protozoários, das quais 10.000 são consideradas de importância médico-veterinária (Levine et al., 1980) As doenças causadas por estes parasitos apresentam um amplo espectro sintomatológico, podendo causar desde uma diarreia leve até a morte, dependendo das características do parasito e do hospedeiro. Sendo tão diversificados, as formas de transmissão, a entrada no hospedeiro vertebrado e o nicho ocupado nestes variam amplamente, dificultando as formas de controle das protozoonoses (Rocha, 2020). No presente, não temos nenhuma vacina eficaz disponível para o combate destes patógenos eucariotos. Na tabela 1 encontram-se agrupadas as principais protozooses de importância médico-veterinária.

Nome popular da doença	Agente etiológico	Forma de transmissão	Importância
Acantamoebíase	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	Contato com água ou lentes contaminadas, aspiração de pó com cistos	Médica
Balantidiose	<i>Balantidium coli</i>	Ingestão de água e alimentos contaminados, hábitos de higiene inadequados	Médica e veterinária (suínos)
Ceratite	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	Contato com água ou lentes contaminadas.	Médica
Criptosporidíase	<i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>Cryptosporidium hominis</i>	Ingestão de água e alimentos contaminados,	Médica
Diarreia	<i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Giardia lamblia</i>	Infecções por parasitos devido a ingestão de água e alimentos contaminados	Médica
Disenteria amébrica ou amebíase	<i>Entamoeba histolytica</i>	Ingestão dos cistos da ameba através de água ou alimentos contaminados ou contato fecal-oral (anal-oral)	Médica
Doença de Chagas, ou tripanossomíase americana	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Contaminação de feridas com fezes do barbeiro (<i>Triatoma infestans</i>) contendo as formas tripomastigotas metacíclicas.	Médica
Doença do sono ou tripanossomíase africana	<i>Trypanosoma brucei</i>	Através da picada da mosca tsé-tsé são inoculadas as formas tripomastigotas metacíclicas	Médica
Eimeriose ou coccidiose	<i>Eimeria</i> spp.	Ingestão de água e alimentos contaminados.	Médica e veterinária (aves, ovinos jovens)

Encefalite Amebiana	<i>Naegleria fowleri</i>	Contato, via olfativa ou ocular, com água contaminada por trofozoitos.	Médica e veterinária (aves)
Giardiose ou giardíase	<i>Giardia lamblia</i>	Ingestão dos cistos dos parasitos através de água ou alimentos contaminados ou contato fecal-oral.	Médica e veterinária (cães, gatos, bovinos)
Isosporíase	<i>Isospora belli</i>	Ingestão de água e alimentos contaminados	Médica
Leishmaniose	<i>Leishmania</i> spp.	Regurgitação das promastigotas metacíclicas após picada dos flebotomíneos do gênero <i>Phlebotomus</i> (velho mundo) e <i>Lutzomyia</i> (novo mundo)	Médica
Malária ou paludismo	<i>Plasmodium</i> spp.	Inoculação de esporozoítos através da picada dos mosquitos do gênero <i>Anopheles</i>	Médica
Piroplasmose ou babesiose	<i>Babesia canis</i> , <i>Babesia equi</i> , <i>Babesia caballi</i>	Através da picada de carrapato se inoculam os esporozoítos	Médica e veterinária (Equinos, Bovinos, Caninos)
Toxoplasmose	<i>Toxoplasma gondii</i>	Oocistos em fezes de gatos jovens infectados são engolidos ou aspirados, cistos presentes em carnes ou ainda, congenitamente.	Médica e veterinária (aves, suínos, caprinos, bovinos, cães, gatos, entre outro)
Tricomoniase ou tricomoníase	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Contato sexuais, hábitos de higiene inadequados.	Médica

Tabela 1: Principais protozooses de importância médico-veterinária, seus agentes etiológicos e formas de transmissão. **Adaptada de Rocha, 2020.**

1.2. As Protozooses

As protozooses apresentam uma ampla gama de características epidemiológicas e manifestações clínicas em diferentes zonas geográficas. São responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade, afetando mais de 500 milhões de pessoas no mundo (Monzote & Siddiq, 2011). Estas doenças estão ligadas majoritariamente a condições socioeconômicas baixas, particularmente em países tropicais e subtropicais em desenvolvimento, sendo que países da Ásia, África e América Latina são os mais afetados. Das 580 milhões de pessoas que vivem na América Latina e no Caribe, aproximadamente 195 milhões vivem na pobreza (vivendo com menos de dois dólares por dia), e 71 milhões vivem na pobreza extrema (vivendo com menos de um dólar por dia) (de la Torre et al., 2012). São exatamente estas pessoas, que vivem em condições precárias, as que sofrem as maiores consequências de doenças infecciosas, incluindo as protozooses (WHO, 2007). Algumas das parasitoses causadas por protozoários, como a doença de chagas e as leishmanioses, formam parte das denominadas doenças tropicais negligenciadas. As doenças tropicais negligenciadas constituem um grupo heterogêneo de doenças que apresentam algumas características em comum: (a) uma ocorrência em populações pobres e desassistidas, levando à perda de produtividade e contribuindo para o agravamento da situação da pobreza; (b) afetam populações com pouca visibilidade, pequena capacidade de vocalização e poder político; (c) a maioria delas não é amplamente divulgada; e (d) muitas delas causam estigma e discriminação nos indivíduos afetados, contribuindo para agravar a pobreza. Estas doenças afetam mais de 1 bilhão de pessoas. Mais de 70% dos países e territórios que relatam a presença de doenças tropicais negligenciadas possuem economia de baixa ou média baixa renda (WHO/PAHO, 2016). Estas doenças também recebem este nome devido à falta de atenção dada por governos, organizações e empresas farmacêuticas por afetar majoritariamente pessoas pobres de escassos recursos econômicos (WHO/PAHO, 2016; WHO, 2012). É importante sinalizar que no mundo globalizado, as doenças tropicais negligenciadas começaram a apresentar grande relevância sendo que nenhum país está isento de apresentá-las, tornando-se cada vez mais um problema de saúde pública mundial.

1.2.1. Protozooses Humanas: principais espécies patogênicas, formas evolutivas e características gerais de cada doença.

1.2.1.1. Malária – *Plasmodium* spp.

A malária é considerada a protozoonose de maior mortalidade da atualidade. Estima-se que em 2019 houve 229 milhões de casos com 409 mil mortes, das quais 274 mil (67%) foram de crianças menores de 5 anos. Devido à sua sintomatologia de quadros de febre alta e complicações fatais, esta doença causa alta morbidade e mortalidade na população das zonas de risco, entrando na categoria de doenças negligenciadas tropicais. Sendo uma doença de transmissão vetorial, a sua distribuição está intimamente ligada à distribuição do vetor, que no caso são insetos do gênero *Anopheles* e que estão amplamente distribuídos. Das 430 espécies encontradas na atualidade, aproximadamente 30 são consideradas bons vetores (CDC, 2020). Estima-se que mais do 40% da população, cerca de 3.2 bilhões de pessoas, estejam em risco de contrair a infecção (WHO, 2020c). A malária é uma doença febril aguda, os sintomas começam a aparecer 10 a 15 dias após a picada do mosquito (WHO, 2020c). Os agentes etiológicos desta doença são parasitos do gênero *Plasmodium* (WHO, 2020). Dentre as 5 espécies causadoras de malária em seres humanos, o *Plasmodium falciparum* é o causador da malária de maior severidade no mundo. Estima-se que em 2018, 99,7% da incidência de malária na região africana, 50% na região do sudeste asiático, 71% do mediterrâneo oriental e 65% no pacífico ocidental foram causadas por *Plasmodium falciparum*, demonstrando uma ampla propagação e letalidade (WHO, 2020c).

1.2.1.1.1. Ciclo de Vida e Formas Evolutivas Sujeitas ao Ataque pelo Sistema do Complemento.

O ciclo de vida do *Plasmodium falciparum* (a título de exemplo para o Gênero) é extremamente complexo, com o parasito apresentando várias formas evolutivas. Estes protozoários são transmitidos ao ser humano através da picada de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles*. (Consoli & Oliveira, 1994; Pates, 2002; Riehle, 2006). Após o repasto sanguíneo, os esporozoítos, presentes nas glândulas salivares, são inoculados diretamente na corrente sanguínea. O esporozoíto, a forma infectante, apresenta um formato alongado medindo 11 µm de comprimento com núcleo central único e membrana plasmática de

duas camadas. Contém roptrias e micronemas organelas fundamentais para a invasão celular (Neves, 2016). Estes migram e entram no fígado atravessando a barreira sinusal através das células de Kupffer, e iniciam a fase exoeritrocítica. Após a entrada no hepatócito, os esporozoítos sofrem uma reprodução assexuada rápida por esquizogonia. Um esporozoíto pode produzir entre 10.000 a 30.000 merozoítos em 5-8 dias dentro de um hepatócito (White et al., 2014). Os merozoítos, são especializados em invadir hemácias, estes apresentam um formato igual ao dos esporozoítos, mas são de menor tamanho (1-5 μm de comprimento). Também apresentam organelas como roptrias e micronemas, especializadas em invasão celular, mas diferentemente do esporozoíto, sua membrana plasmática apresenta três camadas. Estudos recentes mostraram que a saída dos merozoítos do hepatócito é através de vesículas denominadas de Merossomas, que são revestidas com a membrana plasmática celular do hospedeiro, auxiliando na evasão da imunidade do mesmo (Sturm, 2006). Estas são liberadas no lúmen dos capilares sinusóides, atingindo a corrente sanguínea onde começa a fase eritrocítica. Nesta fase, os merozoítos invadem os eritrócitos formando uma junção móvel, o que culmina com a internalização do parasito em um vacúolo parasitóforo (Weiss et al., 2015).

O ciclo eritrocítico em *P. falciparum* é altamente coordenado e regulado através de proteínas quinase, sendo que os eritrócitos se rompem de modo sincronizado a cada ciclo de 48h (Dvorin et al., 2010; Gomes et al., 2011). Para conseguir replicar-se, o merozoíto se alimenta da hemoglobina presente no eritrócito. O grupo heme, produto da digestão da hemoglobina é potencialmente tóxico e é descartado através da cristalização mediada por lipídeos denominados hemozoína ou pigmento malárico (Sullivan et al., 1996). Entre 16 a 32 merozoítos são liberados, junto com a hemozoína, no fluxo sanguíneo após o rompimento do eritrócito, infectando novas células e continuando com o ciclo (Bannister et al., 2000). O mecanismo patogênico predominante é a ativação exacerbada do sistema imune devido à hemólise de glóbulos vermelhos ou de citoaderências destas células em órgãos vitais e parenquimatosos. A presença de merozoítos e hemozoína na corrente sanguínea leva a altos níveis de fator de necrose tumoral, explicando os sintomas como febre, cefaleia e calafrios característicos da doença (White et al., 2014). Durante várias etapas do ciclo de vida, diferentes formas evolutivas do parasito entram em contato com efetores séricos da imunidade do hospedeiro. O esporozoíto migra desde o local da picada até o fígado atravessando diferentes fluidos do hospedeiro, notadamente o sangue. Por outro lado, o merozoíto fica livre na corrente

sanguínea por cerca 10 a 30 minutos “procurando” eritrócitos disponíveis. Devido a estas circunstâncias, estas duas formas evolutivas são altamente expostas aos componentes da imunidade do hospedeiro, principalmente à imunidade inata, precisando, assim, de mecanismos eficientes de evasão imunitária, os quais serão discutidos em maior detalhe posteriormente.

1.2.1.2. Toxoplasmose - *Toxoplasma gondii*

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial com taxas de soropositividade na população que variam de menos 10% a mais do 90% dependendo do país (CDC, 2021). A toxoplasmose é a zoonose de maior prevalência ao nível mundial. Estima-se que 40 % da população humana esteja infectada (Souza & Belfort Jr., 2014). Embora seja uma doença majoritariamente assintomática, pode apresentar sintomas em imunossuprimidos, bem como, através da transmissão congênita, graves consequências para o feto em mulheres grávidas com infecção aguda (Torgerson & Mastroiacovo, 2013). Seu agente etiológico, o *Toxoplasma gondii*, apresenta um ciclo complexo com várias formas evolutivas onde o ser humano entra como hospedeiro intermediário e os felinos, como hospedeiros definitivos (CDC, 2021). A infecção acontece pelo consumo de alimentos contaminados. Só nos Estados Unidos existem aproximadamente 40 milhões de pessoas contaminadas com 1 milhão de novos casos por ano (CDC, 2021). O nome de seu gênero deriva do grego toxon, que significa “arco” referenciando sua morfologia. Foi descrito pela primeira vez em 1908 por Nicolle e Manceaux no continente africano (Jittender P. Dubey, 2008). A sintomatologia clínica causada por *Toxoplasma gondii* depende principalmente da cepa do parasito e da susceptibilidade do hospedeiro. Estima-se que 95% das pessoas infectadas com *T. gondii* são assintomáticas, algumas podem desenvolver sintomas menos pronunciados, parecidos com uma gripe, por duas semanas a um mês (WHO, 2015). Importante mencionar que contra as formas císticas não se tem drogas disponíveis até o presente.

Em imunossuprimidos, a reativação dos cistos implica na reprodução exagerada de taquizoítos causando lesões necróticas nos tecidos do hospedeiro sendo potencialmente fatal (Souza & Belfort Jr., 2014). A infecção aguda, com migração de taquizoítos, em mulheres grávidas, pode levar ao desenvolvimento de severas patologias no feto. Se a infecção acontece no terceiro trimestre, o recém-nascido pode apresentar um quadro sintomatológico generalizado como hepatoesplenomegalia, miocardite,

pneumonite, icterícia e comprometimento de outros órgãos (Apt Baruch, 2013; Souza & Belfort Jr., 2014). Se acontece no segundo trimestre pode apresentar comprometimento meningoencefálico, causando convulsões, apatia, paralisia, entre outros (Apt Baruch, 2013; Souza & Belfort Jr., 2014). Caso ocorra no primeiro semestre, pode haver má formação fetal, retardo mental, hidro ou microcefalia, calcificações cerebrais, coriorretinite ou aborto espontâneo. A toxoplasmose congênita cursa de forma assintomática em 80 a 90% dos casos, por isso, o monitoramento desta é fundamental nos cuidados pré-natais (Apt Baruch, 2013).

1.2.1.2.1. Ciclo de Vida e Formas Evolutivas Sujeitas ao Ataque pelo Sistema do Complemento.

O *Toxoplasma gondii* é um parasito digenético, tendo como hospedeiro definitivo (reprodução sexuada) vários tipos de felinos e como hospedeiro intermediário (reprodução assexuada) basicamente qualquer espécie animal de sangue quente (mamíferos e aves) (J.P. Dubey, 2020). Estudos realizados mostraram que o ácido linoléico é fundamental para a sinalização do começo do ciclo sexual em *Toxoplasma gondii*. Este ácido se acumula no intestino dos felinos devido à ausência de sua conversão metabólica nestes animais (Hofer, 2019). Sem a presença do mesmo, não há formação da fase sexual. Em camundongos “felinizados”, aos quais este ácido graxo foi artificialmente adicionado junto com seu inibidor de degradação metabólica, formas sexuais do parasito surgem, permitindo o desenvolvimento sexual de *T. gondii* (Hofer, 2019).

O ciclo de vida do *Toxoplasma*, como para a maioria dos apicomplexas, apresenta múltiplas formas evolutivas com um ciclo sexuado (no hospedeiro definitivo - felinos) e um assexuado (no hospedeiro intermediário – Animais homeotérmicos). O hospedeiro intermediário é infectado através de alimentos contaminados com oocistos ou carne contendo cistos. Tanto o oocisto como cisto resistem ao suco gástrico do hospedeiro, alcançando o intestino delgado (J.P Dubey, 1998). A invasão celular por parte deste parasito é realizada ativamente. Após uma fase de reconhecimento com ligações de baixa afinidade, as proteínas do micronema são secretadas promovendo a adesão celular, posteriormente ocorre o reposicionamento do complexo apical, formação da junção móvel e penetração celular com a formação de um vacúolo parasitóforo. O deslocamento destes parasitos, à semelhança do observado para *Plasmodium* spp., é realizado por uma estrutura motora de actina e miosina altamente especializada

característica dos apicomplexas (Souza & Belfort Jr., 2014). No ciclo assexuado realizado no hospedeiro intermediário (incluindo os seres humanos), destacam-se as formas evolutivas denominadas bradizoítos e taquizoítos. Os taquizoítos, são a forma de reprodução rápida, sendo assim denominados a forma proliferativa. Esta etapa é denominada de fase aguda e é caracterizada pela presença de uma alta carga parasitária (J.P. Dubey, 2020). Os taquizoítos medem de 4 a 8 μm de comprimento por 3 μm de largura, possuem formato de meia lua, não apresentam cílios nem flagelos, e se locomovem por deslizamento (Hogan et al., 1960).

Na fase crônica, a imunidade do hospedeiro elimina a maior parte dos taquizoítos, os restantes diferenciam-se em bradizoítos, formando os cistos. Estes são encontrados principalmente no músculo esquelético, miocárdio, cérebro e tecido ocular (CDC, 2021). Os bradizoítos, são de reprodução lenta e aparecem na fase crônica da infecção como formas de resistência em estruturas denominadas cistos. Estes cistos variam entre 5 a 60 μm de diâmetro, podendo conter entre 50 a 3,000 parasitos (Hogan et al., 1960). Os cistos apresentam uma parede elástica e resistente capaz de isolar os bradizoítos dos mecanismos efetores da imunidade do hospedeiro. Quando um felino consome a carne contaminada, desencadeia-se o ciclo sexual culminado na formação do oocisto (Ferguson, 2002). Os oocistos são esféricos, medindo aproximadamente 12,7 x 10,4 μm . Após a esporulação, cada oocisto produz dois esporocistos com quatro esporozoítos cada um (Ferguson, 2002). Os esporozoítos medem cerca de 6-8 μm x 2 μm e apresentam uma forma intermediária entre bradizoítos e taquizoítos (Souza & Belfort Jr., 2014). Uma vez eliminados no meio ambiente estes oocistos se tornarão infectantes, podendo contaminar plantações e fontes hídricas. Dentre as várias formas evolutivas presentes no ciclo do *Toxoplasma gondii*, os taquizoítos são as únicas formas que entram em contato com os efetores séricos da imunidade do hospedeiro. A migração realizada para disseminar-se a diferentes órgãos extra intestinais através de fluidos como sangue e linfa, os expõem aos componentes imunológicos presentes nestes fluidos, principalmente ao sistema do complemento.

1.2.1.3. Doença de Chagas – *Trypanosoma cruzi*.

A doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana é considerada uma doença tropical negligenciada afetando entre 6 a 7 milhões de pessoas no mundo. Sendo

reconhecida pela OMS como uma das doenças mais negligenciadas do mundo, a doença de Chagas é um grave problema de saúde pública principalmente em países Latino Americanos (WHO, 2020a). O nome desta doença é em homenagem ao médico brasileiro Carlos Chagas, quem em 1909, descobriu o *Trypanosoma cruzi* agente causador da doença, descreveu seu ciclo de vida e forma de transmissão vetorial (Chagas, 1909). Trinta por cento das pessoas que a padecem apresentam, na fase crônica da doença, sintomas graves como alterações neurológicas, digestivas, cardíacas ou mistas, podendo ser fatal se não tratada (WHO, 2020a). O parasito é transmitido quando a ferida deixada pelo Triatomíneo, ou alguma mucosa do hospedeiro, é contaminada com fezes do vetor que apresentam as formas metacíclicas do parasito. Esta via de transmissão vetorial está restrita à América Latina devido à distribuição do vetor. Entretanto, o parasito encontra-se largamente difundido para diferentes áreas do globo, sendo encontrados pacientes portadores na maioria dos continentes devido às migrações humanas e também pela possibilidade de transmissão transplacentária, sanguínea ou por transplante de órgãos (WHO, 2020a). Só nos Estados Unidos, que é uma região onde não ocorre transmissão vetorial da doença, estima-se que há 300,000 pessoas afetadas (CDC, 2019).

Pertencentes à subfamília Triatominae, *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus* e *Triatoma dimidiata* são as quatro espécies vetores mais importantes na transmissão vertical do *T. cruzi* ao homem (WHO, 2002). A comparação de outros insetos vetores, como mosquitos e flebótomos onde só a fêmea adulta transmite a infecção, nos triatomíneos os últimos quatro estádios ninfais e os adultos de ambos sexos podem manter e transmitir o parasito, dificultando amplamente o controle do patógeno. A probabilidade de um triatomíneo infectar-se aumenta de acordo com o número de repastos realizados e o volume de sangue ingerido, de modo que os maiores estádios e os adultos têm as maiores taxas de infecção (Zeledon & Rabinovich, 1981). O sucesso obtido no controle desta doença em alguns países como o Brasil deve-se ao êxito do controle do inseto vetor, sendo o tratamento quimioterápico uma opção atual só na fase aguda. Igualmente, devido à ampla gama de reservatórios que este protozoário apresenta no ambiente silvícola, a erradicação total deste parasito se torna uma tarefa impossível (WHO, 2002). Novas formas de transmissão como a infecção oral ocorrida pela ingestão de formas infectantes em alimentos processados na presença do inseto vetor têm alarmado as autoridades. Este tipo de infecção, dada a quantidade de formas infectantes que invadem o hospedeiro, apresenta-se na forma de surtos cujos pacientes

desenvolvem formas agudas graves, com maior morbidade e mortalidade, principalmente em crianças (WHO, 2020a).

Na doença de Chagas existem duas fases clínicas características: a fase aguda e a fase crônica. Logo após da infecção começa a fase aguda podendo durar de dias a meses, a infecção pode ser leve ou assintomática. Menos de 50% das pessoas infectadas desenvolvem sintomas, isto dependendo da cepa do parasito, do local da infecção, da idade da pessoa, da via de transmissão e do estado imune do paciente (WHO, 2002). Quando há sintomas, estes podem incluir febre, cefaleia, aumento dos gânglios linfáticos, palidez, dores musculares, dificuldade em respirar, inchaço, dores abdominais ou torácicas (WHO, 2020a). Normalmente, na infecção por transmissão vetorial, há uma inflamação ao redor do sítio de inoculação do parasito, conhecido como chagoma de inoculação. Quando o parasito penetra pela mucosa ocular, o olho se apresenta inchado, o que é conhecido como sinal de Romana (Dias, 1984). Em casos pouco frequentes, pode acontecer uma forte inflamação no músculo cardíaco ou no cérebro, podendo ser letal (CDC, 2019). Danos em órgãos e tecidos durante a infecção aguda por *T. cruzi* são causados pelo próprio parasito e pela resposta imune inflamatória aguda do hospedeiro.

Em 90% dos casos, as manifestações clínicas da fase aguda se resolvem de forma espontânea, sendo que posteriormente se entra em um período assintomático que dura de 10 a 30 anos (Rassi et al., 2010). Entre as pessoas infectadas, 30% apresentam sintomatologia grave na fase crônica, desenvolvendo a forma cardíaca, digestiva (megaoesôfago e megacólon) ou cardiodigestiva da doença, o que causa aproximadamente 50,000 mortes anualmente (WHO, 2020a). Embora a patogênese da doença de Chagas crônica não seja completamente compreendida, sabe-se que para o desenvolvimento da fase crônica é necessária a presença do parasito (Z. A. Andrade, 1999). Os danos causados a órgãos e tecidos nesta fase podem ser causados diretamente por fatores patogênicos do parasito, por exacerbação do sistema imune ao combater o parasito, por mecanismos autoimunes ou inclusive por uma combinação destes fatores (Kierszenbaum, 2007; Tarleton & Zhang, 1999).

1.2.1.3.1. Ciclo de Vida e Formas Evolutivas Sujeitas ao Ataque pelo Sistema do Complemento.

Como organismo pertencente à classe kinetoplastea, estes protozoários apresentam uma característica morfológica que os distingue, o cinetoplasto, uma região em forma de bastão rica em DNA mitocondrial presente na extremidade de sua única mitocôndria e próxima à bolsa flagelar. Três formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi* são reconhecidas: amastigota, epimastigota e tripomastigota. Dentro do hospedeiro mamífero são encontradas duas formas: a tripomastigota e a amastigota. A amastigota é encontrada intracelularmente, e, tal como a forma epimastigota no inseto vetor, tem uma alta capacidade de reprodução por divisão binária. As formas amastigotas apresentam-se sob uma forma esférica ou ovalada de 2-4 µm de diâmetro sem flagelo visível e, portanto, carece de motilidade (Ley et al., 1988). A tripomastigota é encontrada extracelularmente, são formas não replicativas com alta capacidade de resistência às condições adversas presentes no hospedeiro vertebrado, sendo, portanto, as formas infectantes. As tripomastigotas caracterizam-se por apresentar um flagelo longo que percorre o corpo do parasito formando uma membrana, chamada membrana ondulante. Elas possuem um aspecto fusiforme de 20 a 25 µm de comprimento e cinetoplasto subterminal posterior ao núcleo. Sendo a forma responsável pela disseminação da infecção é encontrada no sangue periférico de mamíferos infectados e fezes do vetor (Tyler & Engman, 2001).

O *T. cruzi* possui a capacidade de infectar vários tipos celulares de diferentes hospedeiros, mas para conseguir manter-se dentro da célula e reproduzir-se é necessária a presença de lisossomos nesta (L. O. Andrade & Andrews, 2004). Em comparação com *Leishmania* spp., o *Trypanosoma cruzi* não consegue sobreviver ao pH ácido da célula hospedeira. Para escapar, este parasito utiliza a toxina formadora de poro de *Trypanosoma cruzi* (Tc-Tox), uma hemolisina produzida pelo parasito que se ativa em pH ácido fazendo poros na membrana do vacúolo e permitindo o escape do mesmo para o citoplasma (Andrews & Whitlow, 1989; Ley et al., 1990). No citoplasma, se transforma em amastigota e começa a reproduzir-se. Após 24 a 35 horas de reprodução por divisão binária, as amastigotas começam a se transformar novamente em tripomastigotas. O excessivo batimento dos flagelos destas rompe a membrana plasmática da célula liberando-as. Posteriormente, estas tripomastigotas infectam outras células e o ciclo de reprodução intracelular começará novamente (Brener, 1973).

O ciclo começa quando, ao alimentar-se de um mamífero infectado, os triatomíneos consomem, junto com o sangue, as formas tripomastigotas sanguíneas. Após transformar-se em epimastigotas, estas se fixam hidrofobicamente à cutícula da parede do intestino e começam a multiplicar-se. Posteriormente estas formas se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas. A metaciclogênese permite a expressão de proteínas fundamentais para sobreviver às condições adversas encontradas no hospedeiro mamífero e torna estas formas altamente infectantes e resistentes aos efetores séricos da imunidade (Goldenberg & Ávila, 2011; Kollien & Schaub, 2000). Uma vez formados, os tripanosomas metacíclicos se destacam da cutícula cerosa e são excretados juntamente com as fezes do vetor (Bonaldo et al., 1988; Kleffmann et al., 1998). Depois do repasto sanguíneo, os triatomíneos defecam perto do local da ferida, devido ao prurido da reação alérgica causada pelos componentes da saliva do vetor, o hospedeiro vertebrado toca o local, transporta as formas tripomastigotas presentes nas fezes até a ferida, permitindo a entrada do parasito (Moffitt et al., 2003). Após a entrada no hospedeiro, as tripomastigotas metacíclicas começam a infectar células nucleadas, onde se transformam em amastigotas que se multiplicam até, em um momento determinado, transformarem-se em tripomastigotas sanguíneas. Essas, por sua vez, rompem a célula hospedeira e saem à procura novas células para serem infetadas. As formas tripomastigotas sanguíneas podem ser ingeridas pelo vetor triatomíneo quando o mesmo realiza o repasto sanguíneo num hospedeiro infectado (que pode ser um dos vários reservatórios do parasito presentes na natureza), completando o ciclo de transmissão. No hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas sanguíneas migram através da corrente sanguínea e atingem órgãos como coração, estômago, esôfago, entre outros. Estas migrações implicam o contato direto das tripomastigotas com componentes da imunidade inata como o sistema do complemento forçando-as, assim, a desenvolver diferentes mecanismos de evasão, os quais serão discutidos em detalhe mais adiante.

1.2.1.4. Leishmanioses - *Leishmania* spp.

As leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Aproximadamente 53 espécies são descritas no gênero, dentre elas 20 são consideradas patogênicas. A principal via de transmissão destes protozoários para humanos é vetorial, ocorrendo através da picada de insetos flebotomíneos. Na natureza, todas as espécies de *Leishmania* são transmitidas através da

picada de flebotomíneos fêmeas. Os flebotomíneos são insetos dípteros pertencentes a família Psychodidae (Subfamília: Phlebotominae). Estes vetores apresentam uma ampla distribuição, sendo encontrados em diferentes ambientes, climas e altitudes. As leishmanioses são consideradas endêmicas em extensas áreas dos trópicos, subtropicais e na bacia do mediterrâneo sendo que cada região apresenta uma espécie característica causadora da doença como mostrado na tabela 2 (WHO, 2020b). Nas Américas, principalmente na região tropical da América Latina, as leishmanioses são consideradas um problema grave de saúde pública, entrando na classificação de doenças tropicais negligenciadas (WHO, 2020b).

Devido a razões desconhecidas, as diferentes espécies de *Leishmania* spp. apresentam tropismos teciduais diferentes quando no hospedeiro vertebrado. Algumas espécies têm tropismo pelas vísceras, causando a leishmaniose visceral, outras espécies apresentam grande afinidade pelos tecidos epidérmicos e mucosas, causando as leishmanioses cutâneas e muco-cutâneas (Ministério da Saúde, 2017). Existem, portanto várias formas clínicas da doença. Este amplo espectro clínico deve-se a uma pluralidade de fatores como sexo, idade e estado imunitário do paciente, o local primário da infecção, a espécie de *Leishmania* envolvida, o número de parasitos inoculados, além de fatores genéticos do hospedeiro e do parasito (Sakthianandeswaren et al., 2009).

A leishmaniose cutânea é considerada um grave problema de saúde pública, estima-se que surjam de 600.000 a 1 milhão de casos novos anualmente (WHO, 2020b). Esta doença tem sido conhecida ao longo da história por diferentes nomes, o mais reconhecido é o botão-de-oriental (Hoare, 1938). Existe um amplo polimorfismo entre as lesões, mas é classicamente conhecida por uma ulceração com bordas proeminentes e endurecidas e uma depressão contendo tecido inflamado e com aspecto granuloso. A lesão começa a se formar na zona do eritema, local de picada do flebotomo, evoluindo para pápula e, por último, ulcerando (Stowers, 1919; Wright, 1903). As úlceras podem ser secas ou exudativas e frequentemente são encontradas lesões satélites (Gontijo & De Carvalho, 2003). Não apresenta sintomatologia nem dor no local, a complicação mais frequente é uma infecção secundária bacteriana (Ministério da Saúde, 2017). Dependendo da espécie de *Leishmania* e do estado imune do hospedeiro as lesões podem curar-se espontaneamente em 6-12 meses, principalmente para os casos provocados por espécies do velho mundo (Bailey & Lockwood, 2007). As principais espécies associadas à leishmaniose cutânea são *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* no novo mundo

e *L. tropica*, *L. aethiopica* e *L. major* no velho mundo (Bailey & Lockwood, 2007; Gontijo & De Carvalho, 2003).

Sendo maioritariamente considerada uma complicação da leishmaniose cutânea neotropical, a leishmaniose muco-cutânea apresenta, posteriormente à aparição da úlcera na pele, uma metástase para tecidos mucosos (Gontijo & De Carvalho, 2003). Esta metástase acontece via hematogênica podendo aparecer meses depois da formação da úlcera cutânea ou inclusive após a mesma ter desaparecido (Ministério da Saúde, 2017). Acomete principalmente tecido nasal, bucal e faringeano, se não tratada pode levar à destruição total destes tecidos e possível óbito (Laison & Shaw, 2005). Noventa por cento dos casos de leishmaniose muco-cutânea são encontrados em Brasil, Bolívia, Peru e Etiópia (WHO, 2020b). Os principais agentes etiológicos associadas a esta forma são *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. peruviana*, todos originários do novo mundo (Akhoundi et al., 2016; Laison & Shaw, 2005; Ministério da Saúde, 2017).

Outra complicação da leishmaniose cutânea recebe o nome de Leishmaniose cutânea difusa que ocorre principalmente em pacientes anérgicos ou com sistema imune debilitado. Em comparação com a úlcera única característica da leishmaniose cutânea, estes pacientes desenvolvem várias lesões nodulares, localizadas por todo o corpo, bem semelhantes à hanseníase virchowiana (Laison & Shaw, 2005). Devido à ausência de resposta celular específica para os antígenos secretados pelo parasito há uma acentuada proliferação do mesmo e sua uma ampla disseminação (Gontijo & De Carvalho, 2003). As principais espécies associadas a esta forma são *L. mexicana*, *L. pifanoi* e *L. amazonensis* no novo mundo e, no velho mundo, *L. aethiopica* (Akhoundi et al., 2016; Laison & Shaw, 2005).

Embora as diferentes formas de leishmaniose cutânea causem problemas de saúde graves, debilitantes e com forte impacto social, a leishmaniose visceral é a forma mais grave da doença, podendo levar ao óbito em 95% dos casos quando não tratada (WHO, 2020b). Em comparação com a forma cutânea, as espécies causadoras da leishmaniose visceral apresentam um alto tropismo pelas vísceras, principalmente para órgãos como fígado e baço. É caracterizada por febres irregulares, perda de peso, anemia, hepatomegalia, esplenomegalia e/ou linfadenopatia (Ministério da Saúde, 2006). Estima-se que há entre 50.000 e 90.000 novos casos anualmente, a maioria destes casos acontecem no Brasil, Leste da África e Índia (WHO, 2020b). As principais espécies

associadas a esta forma da doença são *L. donovani* e *L. infantum* (Akhoundi et al., 2016; Ministério da Saúde, 2006).

Subgênero	Espécie	Velho/Novo Mundo	Forma Clínica	Distribuição
<i>Leishmania</i>	<i>L. aethiopica</i>	Velho Mundo	LC, LCD	África Oriental (Etiópia, Quênia)
	<i>L. amazonensis</i>	Novo Mundo	LC, LMC, LCD	América do Sul (Brasil, Venezuela e Bolívia)
	<i>L. donovani</i>	Velho Mundo	LV	África Central, Sul da Ásia, Oriente Médio, Índia, China
	<i>L. infantum</i> (syn. <i>L. chagasi</i>)	Velho e Novo Mundo	LC e LV	Países Mediterrâneos (Norte de África e Europa) Sudeste da Europa, Oriente Médio, Ásia central, Norte, América Central e do Sul (México, Venezuela, Brasil, Bolívia)
	<i>L. major</i>	Velho Mundo	LC	África do Norte e Central, Oriente Médio, Ásia Central
	<i>L. mexicana</i> (syn. <i>L. pifanoi</i>)	Novo Mundo	LC, LCD	EUA, Equador, Venezuela, Peru
	<i>L. tropica</i>	Velho Mundo	LC, LV	África do Norte e Central, Oriente Médio, Ásia Central, Índia
	<i>L. venezuelensis</i>	Novo Mundo	LCD	Norte da América do sul
	<i>L. waltoni</i>	Novo Mundo	LC, LMC	República Dominicana
<i>Viannia</i>	<i>L. braziliensis</i>	Novo Mundo	LC, LMC	Bacia da Amazônia Ocidental, América do Sul (Guatemala, Brasil, Bolívia, Peru)
	<i>L. guyanensis</i>	Novo Mundo	LC	Norte da América do sul (Guiné Francesa, Suriname, Brasil, Bolívia)
	<i>L. lainsoni</i>	Novo Mundo	LC	Brasil, Bolívia, Peru
	<i>L. lindenbergi</i>	Novo Mundo	LC	Brasil
	<i>L. naiffi</i>	Novo Mundo	LC	Brasil, Guiné Francesa
	<i>L. panamensis</i>	Novo Mundo	LC, LMC	América Latina (Panamá, Colômbia, Venezuela, Brasil)
	<i>L. peruviana</i>	Novo Mundo	LC, LMC	Peru, Bolívia
	<i>L. shawi</i>	Novo Mundo	LC	Brasil
<i>Mundinia</i>	<i>L. martiniquensis</i>	Velho e Novo Mundo	LC, LV	Martinica, Tailândia

Tabela 2 - Distribuição das diferentes espécies de *Leishmania* conhecidas. LC Leishmaniose Cutânea, LCD Leishmaniose Cutânea Difusa, LMC Leishmaniose Muco-Cutânea. **Adaptada de Steverding, 2017**

1.2.1.4.1. Ciclo de Vida e Formas Evolutivas Sujeitas ao Ataque pelo Sistema do Complemento.

Igualmente ao *Trypanosoma cruzi*, o gênero *Leishmania* pertence à classe kinetoplastea, à qual tem como principal característica a presença do cinetoplasto como mencionado anteriormente. Este está principalmente envolvido na plasticidade genotípica da *Leishmania* sendo de grande importância no desenvolvimento de resistência a medicamentos (Basselin et al., 1998; Lee et al., 1993, 1992). No gênero *Leishmania* existem duas formas evolutivas: amastigota e promastigota. A forma amastigota é exclusivamente encontrada intracelularmente em vacúolos parasitóforos nos hospedeiros vertebrados. Apresenta uma forma ovóide ou esférica, medindo entre 1,5 a 6,5 μm de comprimento dependendo da espécie. Possuem um flagelo vestigial próximo à bolsa flagelar e um núcleo grande bem característico. Núcleo e cinetoplasto são altamente corados com derivados de corantes Romanowsky (Giemsa ou Leishman) (Cunningham, 2002; Leishman, 1903; Wright, 1903). A primeira visualização desta forma foi realizada pelo patologista escocês William Boog Leishman em 1903 ao realizar um exame *post-mortem* no fígado de um soldado britânico na Índia. (Leishman, 1903). No trato digestivo do inseto vetor são encontradas as diferentes formas promastigotas, cujos comprimentos variam, medindo entre 14 e 20 μm . Esta forma se caracteriza por apresentar um núcleo oval na região média, um cinetoplasto marcado e um flagelo alongado na sua região anterior, este último confere motilidade ao parasito (Cunningham, 2002; Gossage et al., 2003). As duas formas do parasito se reproduzem por divisão binária.

Durante o repasto sanguíneo em reservatórios infectados, os insetos vetores ingerem células contendo as formas amastigotas. Finalmente liberadas no intestino médio do flebotomíneo, devido à mudança no pH e temperatura encontradas no vetor invertebrado, as amastigotas começam a se transformar nas formas promastigotas. As promastigotas realizam uma migração entre o intestino do vetor e sua válvula do estomodeu, passando por diferentes fases da promastigota (procíclica, nectomonada, haptomonada e leptomonada) (Gossage et al., 2003). As formas promastigotas leptomonadas são fundamentais no processo de infecção, sendo que produzem um gel denominado gel secretado por promastigotas (PSG). Este gel é acumulado na região anterior do intestino do flebotomíneo, bloqueando sua válvula do estomodeu, fechando completamente o canal de alimentação do vetor. Quando o próximo repasto é feito, o sangue ingerido bate contra a parede criada pelo gel onde se acumulam as promastigotas

metacíclicas (formas infectantes do parasito), as quais serão regurgitadas, infectando o novo hospedeiro vertebrado (Rogers et al., 2004). A metaciclogênese é o processo que permite a expressão de proteínas fundamentais para sobreviver às condições adversas encontradas no hospedeiro mamífero transformado as promastigotas leptomonadas em formas infectantes, sem capacidade de multiplicação, denominadas promastigotas metacíclicas (da Silva & Sacks, 1987). Estas promastigotas apresentam tanto adaptações físicas, como alongação do complexo lipofosfoglicano na superfície da sua membrana plasmática através da adição de novos resíduos de carboidratos, quanto químicas, como a produção de metaloprotease gp63 (Handman & Bullen, 2002). Além destes mecanismos, as espécies do Gênero *Leishmania* também recebem ajuda da saliva do flebotomíneo. Devido ao aparelho bucal rígido que apresenta o vetor, a canulação do vaso sanguíneo não é possível, sendo assim o vetor usa seu aparelho bucal para romper o tecido adjacente, formando poços hemorrágicos. Este tipo de picada é denominada de telmofagia (Ribeiro, 1995). Para evitar os mecanismos de defesa do hospedeiro e a coagulação do sangue, a saliva dos flebotomíneos fêmeas apresenta ação vasodilatadora, antiagregação plaquetária e anticoagulante, além de potentes imunomoduladores e moléculas anti-inflamatórias, criando um ambiente perfeito para a sobrevivência de *Leishmania* até que os parasitos consigam entrar em diferentes tipos celulares (B. B. Andrade et al., 2007; Ribeiro, 1987; Rohoušová & Volf, 2006).

Anteriormente acreditava-se que *Leishmania* só conseguia sobreviver e multiplicar-se em células do sistema fagocítico mononuclear (Handman & Bullen, 2002; Kane & Mosser, 2000). No ano de 2008 foi proposto que os neutrófilos desempenham um papel fundamental no início da infecção, pois estes fagocitariam as formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* spp., mas, sendo células de vida curta, morreriam rapidamente por apoptose, originando corpos apoptóticos dentro dos quais os parasitos permanecem reclusos (Peters et al., 2008). A infecção dos macrófagos se daria principalmente num segundo momento, após a ingestão destes corpos apoptóticos neutrofílicos contendo amastigotas viáveis. Esse tipo de infecção, assim nomeada de *estratégia do cavalo de Tróia*, culmina com a penetração silenciosa do parasito no macrófago, que não ativará seus efetores imunes, facilitando, assim, a sobrevivência do parasito exatamente no interior da célula que devia matá-lo (Peters et al., 2008). Atualmente, diversos estudos têm demonstrado que *Leishmania* pode infectar diferentes tipos de células *in vivo* e *in vitro*, como células de Langerhans epidérmicas (Ritter et al.,

2004; Xavier et al., 2005), fibroblastos (Cavalcante-costa et al., 2019; Pessotti et al., 2004) e outros tipos celulares (Arango, 2017; Rittig & Bogdan, 2000).

O processo de amplificação da infecção por *Leishmania* spp. no hospedeiro vertebrado, ou seja, a infecção de novas células, permanece uma incógnita, uma vez que a liberação de formas amastigotas no meio extracelular nunca foi documentada. Sabe-se que as promastigotas metacíclicas entram em contato com os componentes do sistema imune inato do hospedeiro, principalmente o sistema do complemento, devido ao poço hemorrágico formado no local da picada do vetor, como mencionado anteriormente, e que é onde o parasito é inoculado. Para sobreviver, as promastigotas metacíclicas precisaram desenvolver adaptações evolutivas capazes de garantir sua sobrevivência.

1.2.1.5. Amebíase - *Entamoeba histolytica*

A amebíase é uma doença cosmopolita majoritariamente assintomática, que apresenta uma maior visibilidade devido à espontânea aparição da sua forma sintomática causada principalmente por cepas patogênicas de *Entamoeba histolytica*. Sendo de transmissão oral-fecal, observa-se uma maior prevalência em países em desenvolvimento, devido às más condições de higiene, falta de saneamento básico e pobreza geralmente presentes nestas regiões (WHO, 2021). As principais áreas endêmicas são o México, norte da América do Sul, África Ocidental, África do Sul e Sudeste Asiático. Aproximadamente 500 milhões de pessoas no mundo estão infectadas com *E. histolytica*, embora apenas 10% desenvolvam a doença. Anualmente, estima-se uma mortalidade de cerca de 40.000 a 110.000 pessoas por esta doença (Ackers et al., 1997; Pritt & Clark, 2008). Seu nome “*histolytica*” provém da sua habilidade citotóxica e de destruição de tecidos humanos (Kean, 1988). A amebíase é uma doença de distribuição mundial, mas dado que sua principal via de transmissão é oral-fecal, apresenta maior incidência em países com um sistema de saneamento básico deficiente (WHO, 2021). Embora a maioria das infecções sejam assintomáticas, a amebíase pode causar fortes diarreias, principalmente em idosos e crianças (Gómez et al., 2007). Segundo a UNICEF, embora seja uma doença de tratamento simples, a diarreia causa a morte de aproximadamente 480.000 crianças menores de 5 anos por ano (UNICEF, 2020).

Embora a maioria das infecções sejam assintomáticas, muitos pacientes com *E. histolytica* apresentam um quadro clínico de amplo espectro podendo ocorrer no nível

intestinal (disenteria amebiana, retocolite aguda, colite não disentérica crônica, ameboma) e extra-intestinal (abscesso hepático amebiano, abscesso cerebral e doença geniturinária) (Gómez et al., 2007; Pinilla et al., 2008). Entre a sintomatologia apresentada, podemos citar febres irregulares, diarreia, sangue em fezes, fadiga e perda de peso. A histopatogênese da amebíase é caracterizada por 3 eventos: morte de células do hospedeiro, inflamação e travessia tecidual pelo parasito. O principal fator de virulência presente na *E. histolytica* é sua capacidade de citotoxicidade mediada pela secreção de cisteíno-proteinases e por peptídeos formadores de poros, os amebaporos (Tannicht, 1998) que culminam com a destruição tecidual. Em alguns pacientes, após o rompimento do epitélio intestinal, o parasito pode chegar a diferentes órgãos por disseminação hematogênica, causando a amebíase extraintestinal. O abscesso hepático é a complicação mais comum da amebíase extraintestinal, podendo ocorrer em cerca de 4% dos pacientes. A alta taxa de mortalidade destes casos decorre da possibilidade de ruptura do abscesso na cavidade pleural ou no pericárdio.

1.2.1.5.1. Ciclo de Vida e Formas Evolutivas Sujeitas ao Ataque pelo Sistema do Complemento.

Sendo considerada uma antroponose, sua transmissão ocorre exclusivamente entre humanos. O ciclo de *Entamoeba histolytica* é relativamente simples quando comparado com outros protozoários. Este parasito apresenta duas formas características no seu ciclo biológico, o cisto e o trofozoíto. O cisto, considerado a forma de resistência, consegue sobreviver no ambiente por vários meses dependendo das condições ambientais, isto graças à formação de uma resistente parede de quitina. Estes cistos infectantes ganham o ambiente ao serem liberados através das fezes de portadores, podendo contaminar coleções de água e cultivos. Após ingestão, ao chegar ao intestino, começa o processo de desencistamento, que culmina com a liberação de trofozoítos que migram para o intestino grosso, onde se dividem por divisão binária. O trofozoíto pode ser observado em fezes disentéricas e apresenta uma forma irregular amebóide alargada com dimensões entre 10 a 40 μm . Possui um metabolismo principalmente anaeróbio, mas pode consumir até 5% de oxigênio quando necessário. No seu citoplasma são identificadas duas porções características, um ectoplasma claro e hialino cuja função é permitir a locomoção pela emissão de pseudópodes, e um endoplasma mais granuloso que contém um núcleo, organelas, vacúolos e restos de substâncias alimentares. Devido

a fatores desconhecidos, o trofozoíto de *Entamoeba histolytica* pode penetrar e atravessar o epitélio intestinal, podendo ser disseminados para vários órgãos através da circulação sanguínea. Esta migração através da corrente sanguínea implica um contato direto do parasito com os efetores séricos da imunidade do hospedeiro, entre eles o sistema do complemento. Desta forma, os trofozoítos desenvolveram ao longo da evolução, estratégias de evasão que possibilitam sua sobrevivência neste ambiente hostil e que serão discutidas mais adiante.

Capítulo 2 – Mecanismos da Imunidade Inata na Frente de Defesa do Hospedeiro contra Protozoários Parasitos.

Para que uma infecção de sucesso se estabeleça, o parasito necessita, antes de qualquer coisa, sobreviver às estratégias de defesa apresentadas pelo seu hospedeiro. Na primeira linha de defesa contra patógenos estão os mecanismos efetores da imunidade inata, que são importantes tanto para uma primeira linha de defesa quanto para o estabelecimento, mais tarde, da chamada resposta imune adaptativa. Os mecanismos efetores da imunidade inata podem ser divididos em processos que envolvem a participação direta de células de defesa, sendo assim chamada de imunidade celular, ou de moléculas solúveis no sangue e na linfa, sendo assim denominada imunidade humoral.

2.1. Imunidade Celular

O sistema de defesa humano contra patógenos externos é composto por 3 níveis: 1- barreiras físicas como a pele e mucosas, 2- a imunidade inata, 3- a imunidade adaptativa. Quando o parasito entra no organismo, atravessando as barreiras físicas, é ativada a imunidade inata. O sistema imune inato é uma forma universal e mais antiga de defesa, consiste em um conjunto de mecanismos celulares e humorais inespecíficos preexistentes capazes de responder rapidamente a invasão (Janeway & Medzhitov, 2002b). Embora apresentem um repertório limitado, os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) do sistema imune inato são especializados em reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) altamente conservados na filogenia. O sistema imune inato também consegue reconhecer os padrões moleculares associados a danos (DAMPs), estes são os componentes resultantes de lise celular ou danos teciduais causados tanto pela inflamação gerada no processo invasivo como pela infecção propriamente dita.

Os componentes celulares deste sistema podem ser divididos em células de origem hematopoiética e não hematopoiética. As células hematopoiéticas incluem neutrófilos, monócitos, células dendríticas, mastócitos, eosinófilos e células natural killer (NK). Células epiteliais do trato respiratório, gastrointestinal e geniturinário atuam na defesa do hospedeiro sendo consideradas componentes celulares do sistema inato de origem não hematopoiética (Turvey & Broide, 2010).

2.2. Imunidade Humoral

As moléculas solúveis com função imune encontradas no sangue e na linfa reconhecem e promovem respostas inflamatórias ou efectoras ao entrar em contato com patógenos. Sendo um sistema ativo de imunovigilância, proporcionam uma defesa rápida contra microrganismos. Estas moléculas se ligam aos invasores potencializando a capacidade das células fagocitárias de distinguir o próprio do não próprio. O principal componente da imunidade humoral do sistema inato é o Sistema do Complemento (Nonaka, 2001). Este é composto por mais de 30 proteínas solúveis variadas e é ativado por diferentes vias dependendo da molécula alvo reconhecida. Ainda que muitas de suas proteínas tenham a função auxiliadora de opsonização, a ativação completa do Sistema do Complemento culmina com a formação do complexo de ataque a membranas (ou MAC, do inglês, *Membrane Attack Complex*), um poro membranar protéico que despolariza a membrana plasmática do patógeno, podendo levar a sua morte (Ricklin et al., 2010). O sistema do complemento e o seu complexo de ataque às membranas serão tratados em maiores detalhes no capítulo 3.

As pentraxinas são um grupo de proteínas homopentaméricas que reconhecem padrões moleculares microbianos participando na imunidade inata como opsonizadoras (Agrawal et al., 2009). A proteína C reativa (CRP), pertence à família das pentraxinas, se liga a lipoproteínas bacterianas de baixa densidade, uma variedade de polissacarídeos, células hospedeiras com sinais apoptóticos e material nuclear (Agrawal et al., 2009). Outra proteína pertencente à família das pentraxinas é a proteína sérico amiloide (SAP), esta reconhece carboidratos, substâncias nucleares e fibrilas amiloides. Além de otimizar o rendimento dos fagócitos, estas proteínas conseguem ativar o componente C1q da via clássica do sistema do complemento (Agrawal et al., 2009). As colectinas são proteínas oligoméricas compostas por domínios de reconhecimento de carboidratos (CRDs). As três principais colectinas em seres humanos são: a lectina de ligação a manose (MBL) (pertencente ao sistema do complemento) e as proteínas surfactante pulmonar A e D (SP-A e SP-D). A lectina de ligação à manose é uma proteína sérica multimérica que reconhece principalmente patógenos ricos em manose (Kuhlman et al., 1989) sua função será abordada, também, no capítulo 3. As proteínas do surfactante pulmonar A e D são lectinas tipo C de baixa afinidade. Reconhecem antígenos lipídicos e carboidratos essenciais encontrados na superfície dos microrganismos formando estruturas multimericas capazes de opsonizar e neutralizar diversos patógenos (Holmskov et al.,

2003; Waters et al., 2009). As ficolinas são proteínas plasmáticas que apresentam um domínio glicídico do tipo fibrinogênio capaz de reconhecer carboidratos. Atuam principalmente no reconhecimento e opsonização de bactérias gram positivas (Holmskov et al., 2003). Sendo uma das moléculas que ativa o sistema do complemento pela via das lectinas, será melhor abordada também no capítulo 3.

2.3. Principais Determinantes Moleculares dos Protozoários Parasitos que Ativam a Imunidade Inata.

Os protozoários parasitos são organismos heterogêneos que induzem uma variedade de reações imunológicas. Os mecanismos da imunidade inata são especialmente importantes na fase aguda da doença causando uma reação inflamatória inespecífica gerada pelos antígenos parasitários. A descoberta de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) dedicados à detecção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) abriu um novo campo de pesquisa, identificando novos receptores, novos ligantes e mostrou as principais vias de sinalização que induzem a imunidade inata (Gazzinelli & Denkers, 2006). Nos diferentes receptores Toll-like (TLR) encontramos moléculas altamente conservadas capazes de induzir respostas antimicrobianas mais específicas para cada tipo de patógeno (Janeway & Medzhitov, 2002a). As âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e o DNA mostraram-se as principais moléculas reconhecidas pelas células do sistema imune inato através dos receptores Toll-like (TLR), o TLR2 e TLR9 respectivamente. Estudos realizados em *Leishmania major*, *T. brucei*, *T. cruzi*, *P. falciparum* e *T. gondii* têm mostrado que, tanto as âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) como as proteínas ligadas a estas, ativam células das linhagens linfóide e mielóide (Camargo et al., 1997; de Veer et al., 2003; Debierre-Grockieo et al., 2003). As GPI são moléculas muito comuns em protozoários, estas que ancoram as proteínas de superfície às membranas dos mesmos. Os âncoras de GPI do *Trypanosoma cruzi* estão covalentemente ligadas a glicoproteínas semelhantes à mucina. Estudos realizados demonstraram o complexo TLR2- TLR6-CD14 (molécula de superfície que reconhece LPS bacteriano) é necessário para reconhecer estas âncoras em *T. cruzi*, induzindo a síntese de IL-12, TNF- α e NO em macrófagos de camundongos (Campos et al., 2001). O lipofosfoglicano ancorado em glicosilfosfatidilinositol (LPG) presente na superfície de promastigotas metacíclicas de *Leishmania* ativam a produção de citocinas via TLR. Tanto o TLR-2 como TLR-4 foram relacionados à produção de TNF- α e ativação de NO em macrófagos, entretanto a produção de IL-10 estava relacionada

somente com TLR-2 (Gatto et al., 2015). Estudos realizados em camundongos incapazes de produzir receptores Toll-like, mostraram um aumento de susceptibilidade à infecção por *Leishmania* (de Veer et al., 2003). As âncoras de GPI derivadas de merozoítos de *P. falciparum* se mostraram capazes de induzir a síntese de TNF α por meio da interação destas com complexo TLR2-TLR1 (Krishnegowda et al., 2005). Igualmente, em taquizoítos de *toxoplasma gondii* foi demonstrado que o reconhecimento destas âncoras por TLR2 e TLR4 estimularam a produção de TNF α por macrófagos de camundongos (Debierre-Grockiego et al., 2003).

Existem evidências de que os receptores Toll-like também podem ser ativados por outros tipos de moléculas produzidas por protozoários como a derivada do *T. cruzi*, Tc52, a qual é reconhecida pelas células dendríticas via TLR2 (A. Ouaiissi et al., 2002). Estes receptores também reconhecem os dinucleotídeos CG não metilados, presentes frequentemente no DNA de parasitos como *T. cruzi*, *T. brucei* e *Babesia bovis*. Estudos demonstraram que essas ativações via DNA do patógeno induzem a produção de proteínas pró-inflamatórias por macrófagos e células dendríticas via TLR9 (Bafica et al., 2006; Shoda et al., 2001). Igualmente via TLR9, a hemozoína produzida por *P. falciparum* é capaz de ativar células dendríticas e estimular a produção de citocinas em macrófagos (Coban et al., 2005).

Dentre os componentes do sistema imune inato, os que apresentam maior eficiência no controle das protozooses são o sistema complemento, algumas células líticas e as células fagocíticas (Gazzinelli & Denkers, 2006). As proteínas implicadas no reconhecimento de protozoários por parte do sistema do complemento e seus respectivos ligantes serão explicados em detalhe no capítulo 3. O entendimento das interações parasito/hospedeiro a partir de uma perspectiva dos efetores imunes do hospedeiro pode ajudar no desenvolvimento de melhores estratégias de controle do parasitismo, de estratégias que aliviem a sintomatologia do paciente e também pode ajudar a elucidar processos básicos cuja compreensão pode aumentar o sucesso do estabelecimento de uma imunidade adaptativa eficaz.

Capítulo 3 – O Sistema do Complemento

3.1. Uma Perspectiva Histórica e Evolutiva

As respostas imunes em espécies animais evoluíram de mecanismos inatos para mecanismos mais elaborados. O sistema do complemento é um mecanismo de defesa muito antigo que surgiu há pelo 1300 milhões de anos atrás e constitui uma das principais frentes da imunidade inata de mamíferos e outros organismos. Os estudos sobre a história evolutiva do sistema do complemento começaram há mais de 50 anos, estes analisaram as atividades hemolíticas semelhantes às mediadas pelo sistema do complemento presentes nos fluidos de diferentes organismos, tanto vertebrados como invertebrados (Gigli & Austen, 1971). Os componentes do sistema do complemento humano apresentam domínios gênicos únicos que podem ser encontrados dentro do genoma. O estudo comparado da conservação destes domínios no genoma de outros organismos é o que permite estabelecer hipóteses sobre a sua origem (Nonaka, 2014). Segundo estes domínios, as proteínas do sistema do complemento são classificadas em 5 famílias: a família C3 (C3, C4, C5), a família fB (fB/C2), família MASP (MASP-1, MASP-2, MASP-3, C1r e C1s), família C6 (C6, C7, C8A, C8B e C9) e família fI (fI) (Nonaka, 2014).

No passado, acreditava-se que o sistema do complemento era especificamente de vertebrados, mas estudos posteriores demonstram genes homólogos às proteínas do sistema do complemento humano como C3 e Fator B em equinodermas (Smith, 1997; Al-Sharif et al., 1998) e tunicados (Ji et al., 1997), ambos invertebrados. Quando na década de 90 foi demonstrado que nem *Caenorhabditis elegans* (Nonaka, 2001; The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998) nem *Drosophila melanogaster* (Adams, 2000) apresentavam genes do sistema do complemento no seu genoma, foi inferido que o sistema do complemento pertencia só aos deuterostômios. No entanto, já foram encontrados genes homólogos à família C3 em protostômios como o caranguejo ferradura (Iwanaga, 2002), aranhas (Sekiguchi et al., 2012), moluscos (Prado-Alvarez et al., 2009) (Castillo et al., 2009) e coral (Dishaw et al., 2005). Estes estudos demonstraram que a origem do sistema do complemento é muito mais antiga do que se acreditava e que, enquanto os deuterostômios retiveram os genes de suas principais moléculas, nos

protostômios estas foram perdidas várias vezes durante a evolução, surgindo de forma independente (Sekiguchi et al., 2012).

Derivado filogeneticamente do inibidor de protease sérica α 2-macroglobulina (α 2M), o componente do complemento C3, pilar principal do sistema do complemento, foi o primeiro a surgir (Sottrup-Jensen et al., 1985). A identificação recente de genes homólogos da proteína C3 no coral (Dishaw et al., 2005), indicou que a origem do gene C3 remonta a antes da divergência entre Cnidaria e Bilateralia, aproximadamente 1.300 milhões de anos atrás. Em deuterostômios, todos os membros analisados até agora apresentaram genes homólogos para MASP, fB e C3. A conservação dos sítios ativos através da filogenia demonstra mecanismo de ativação e funções iguais às atribuídas a estas proteínas em humanos (Nonaka, 2014). Portanto, acredita-se que neste primitivo sistema de complemento, a MASP seja a primeira protease a ser ativada, clivando o fator B. Posteriormente, este clivaria C3 em C3a e C3b. O C3b atuaria como opsonizador ligando-se covalentemente aos micróbios e o C3a induziria a inflamação (Nonaka, 2014).

Estudos demonstraram que uma proteína homóloga a Lectina de Ligação a Manose (MBL) começou a aparecer a partir dos cordados, dando início a uma forma primitiva da via das lectinas (Nair et al., 2000; Vitved et al., 2000). 300 milhões de anos depois, componentes semelhantes a C1r e C1s começaram a surgir nos peixes cartilagosos junto com os primeiros indícios da imunidade adaptativa (Yano et al., 2001). A proteína C2 da família do fator B e os componentes C4 e C5 da família C3 também apareceram nesta época (Kuroda et al., 1996; Nakao et al., 1998).

O sistema do complemento primitivo tinha a função principal de opsonizar os micróbios. Atualmente, sabe-se que o sistema do complemento em humanos consegue ter uma função efetora sobre o microrganismo através da formação do complexo de ataque as membranas (mais conhecido pelo acrônimo MAC, do inglês, *membrane attack complex*). O MAC é o resultado da polimerização do componente C9 do sistema complemento, formando um poro lítico na membrana alvo. Os responsáveis pela formação do MAC são os componentes da família C6 (C6, C7, C8A, C8B e C9) (Tschopp et al., 1982).

3.2. O sistema do Complemento Humano e Suas Principais Vias

O sistema do complemento é formado por várias proteínas presentes em fluidos corporais como sangue e linfa (J. Lambris & Holers, 2000). Este tem como propósito proteger o corpo humano contra patógenos invasores. É chamado de sistema do complemento pois anteriormente existia a crença de que só atuava ajudando na resposta imunológica e opsonizando moléculas, sem entrar diretamente em contato com o patógeno e esperando a atuação da imunidade adaptativa. Atualmente, sabe-se que o sistema do complemento sozinho consegue eliminar patógenos, funcionando, portanto, como primeira linha de defesa do corpo. Neste contexto, agentes patogênicos que tenham estágios de vida na linfa ou no sangue de hospedeiros vertebrados precisam de estratégias de defesa ou evasão ao mesmo.

O sistema do complemento opera através de cascatas proteolíticas. Para sua ativação, se faz necessário que uma enzima precursora, previamente ativada, clive a próxima proteína da cascata, ativando-a. A ativação final de todas as etapas leva à formação do Complexo de Ataque à Membrana ou MAC. Dependendo da enzima precursora que é ativada, existem três vias conhecidas do sistema complemento, a Via Clássica, a Via Alternativa e a Via das Lectinas. Caso não sofram inibição, todas convergem para formação do MAC ou Complexo de Ataque à Membrana (Ricklin et al., 2010).

O componente C1q do complexo C1qrs, complexo ativador da via clássica, reconhece padrões carregados principalmente e pode se ligar a mais de 100 moléculas-alvo diferentes (Kishore et al., 2004), incluindo padrões moleculares associados a patógenos, como lipopolissacarídeo (LPS) (Roumenina et al., 2008) e porinas bacterianas (Albertí et al., 1996). O C1q também pode se ligar a anticorpos naturais, devido à sua polireatividade, principalmente com IgM e IgG. C1q se liga à moléculas de anticorpo depositadas sobre o antígeno alvo. C1r e C1s se ligam a este complexo e C1r sofre uma mudança conformacional tornando-se uma protease ativa. Assim que é ativado, C1r cliva C1s ativando esta protease que é capaz agora de clivar C4 em C4b e C4a. O C4b é o encarregado de se ligar na membrana do agente externo, através de uma ligação tioéster, atraindo a proteína C2 na superfície da membrana. Quando clivada por C1s, a porção C2a se junta a C4b e formam a C3 convertase da via clássica e das lectinas (C4bC2a). Na via alternativa, a interação de C3b com o fator B, que sofre proteólise pelo fator D, formam

a C3 convertase no formato $2C3bBb$, esta é estabilizada pela properdina. Se esta convertase não for regulada, a deposição de C3 será acelerada e o loop de amplificação será ativado. A partir deste ponto, todas as vias de ativação convergem. Inicia-se aqui o processo de formação do MAC ou complexo de ataque à membrana (C5-C9_n). A ligação de duas moléculas de C3b na proximidade imediata da C3 convertase, forma a C5 convertase ($C4bC2aC3b$) a qual cliva C5 em C5a e C5b. Na superfície da membrana, C5b se associa a C6 e C7, estas proteínas conseguem penetrar na bicamada lipídica, sendo assim inseridas na membrana da célula alvo. Posteriormente, se une ao complexo a proteína C8, que transpassa a membrana plasmática e induz a formação do poro propriamente dito, recrutando várias proteínas C9. As proteínas C9 ancoram-se na membrana plasmática e formam um polidímero tubular com aproximadamente 10 nm de largura, um poro lítico estável transmembranar (Muller-Eberhard, 1985).

A ativação do complemento pela via das lectinas é iniciada por moléculas de reconhecimento colectinas: MBL (lectina de ligação a manose) e as ficolinas. A MBL se liga a uma ampla gama de matrizes repetidas de carboidratos comumente apresentadas por muitos microrganismos, incluindo estruturas de manose em superfícies fúngicas e resíduos de N- acetilglucosamina nas paredes celulares de bactérias, a fim de iniciar a neutralização desses organismos (Takahashi & Ezekowitz, 2005). As ficolinas atuam como receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que reconhecem predominantemente os padrões de carboidratos. Estas moléculas circulam no sangue e outros fluidos associados às serino proteases MASP-1 e MASP-2. As MASP possuem atividade enzimática e são as principais responsáveis pela clivagem dos componentes C2 e C4, para a formação da C3 convertase na forma $C4bC2a$. A partir deste momento começa a fase de amplificação mencionada anteriormente.

A última via de ativação é denominada de via alternativa, mas recentemente foi descoberto que esta pode representar de 80 a 90% da ativação total do complemento, mesmo quando inicialmente desencadeado pela via das lectinas ou pela via clássica. Em comparação com as outras vias de ativação, a molécula central de reconhecimento desta via é o componente C3, por esta razão, sem a devida regulação, a via alternativa pode causar grandes danos ao corpo devido a sua rápida amplificação. A proteína C3 em estado nativo é pouco reativa, para aumentar a capacidade de ligação desta molécula uma pequena parte é hidrolisada ($C3_{H2O}$), esta modificação permite a união do fator B, que por sua vez é clivado pelo fator D, formando a C3 convertase no formato ($C3_{H2O}Bb$) e,

posteriormente, continuando com a fase de amplificação. Este complexo é pouco efetivo na ativação de novas moléculas de C3, mas é o suficiente para manter uma baixa taxa de ativação em todos os lugares onde se encontram estas moléculas. Caso as novas moléculas de C3b que vão sendo formadas se liguem à superfície de uma célula do próprio organismo o erro deve ser reconhecido e ela deve ser imediatamente inativada. Caso se ligue na superfície de um patógeno, o mecanismo de inativação de C3b não é inibido e a amplificação da via alternativa ocorre rapidamente. Este processo é finamente regulado em células humanas, pois a ativação excessiva do complemento nos tecidos próprios tem efeitos graves e pode levar ao desenvolvimento de várias doenças autoimunes (J. Lambris & Holers, 2000; Pangburn et al., 2008).

3.3. O Papel Primordial do Sistema do Complemento Frente aos Patógenos.

Atualmente, sabe-se que o sistema do complemento é a primeira linha de defesa do corpo, mediando processos de inflamação, opsonização e lise de patógenos. Para o reconhecimento de patógenos, o sistema do complemento utiliza receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) específicos para a detecção de padrões moleculares associados a patógenos ou micróbios (PAMPs). As PAMPs apresentam três características fundamentais (i) são geralmente expressos por micróbios e não por células hospedeiras; (ii) apresentam pouca variação entre os microrganismos de uma determinada classe; e (iii) sua expressão é essencial para a sobrevivência do patógeno.

Durante a resposta imune contra protozoários parasitos, na fase inicial da infecção, a primeira via de ativação do sistema do complemento é a via das lectinas (Cestari et al., 2009; Evans-Osses et al., 2010; Gillin & Sher, 1981; Holbrook et al., 1980). O MBL e as Ficolinas, principais componentes da via das lectinas, são especializadas em reconhecer PAMPs. Estas proteínas possuem sequências semelhantes ao colágeno ligadas ao domínio de reconhecimento de carboidratos do tipo C (CRD) e ao domínio de homologia β – gama do fibrinogênio (FBG) permitindo-lhes o reconhecimento de carboidratos específicos presentes na membrana do patógeno (McGuinness et al., 2003). O MBL é a coletina prototípica que reconhece especificamente lipofosfoliglicanos ricos em manose através de uma interação cálcio dependente (Takahashi & Ezekowitz, 2005; Weis et al., 1992). Dentro dos protozoários essa coletina reconhece o LPG de *Leishmania* spp. (Green et al., 1994), proteínas do

Plasmodium falciparum em eritrócitos infectados (Klabunde et al., 2002) e de amastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Klabunde et al., 2002). A ligação de MBL a anticorpos, como na via clássica, também pode resultar na ativação da via das lectinas em uma fase tardia da infecção. Entre as proteínas importantes para a ativação do sistema do complemento estão L-ficolina e H-ficolina, que se ligam a carboidratos acetilados e neutros como N-acetilglucosamina (GlcNAc) e galactose (Garlatti et al., 2007; Krarup et al., 2008; Thielens et al., 2007). Estas moléculas glicosiladas são encontradas na superfície de diversos parasitos como tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* (Cestari et al., 2009). Quando ativadas, estas proteínas se unem às MASP, clivando C2 e C4 formando a C3 convertase levando a formação do poro lítico e posterior morte do patógeno. A ativação do complemento usando soro humano depletado de MBL e ficolinas resultou em uma redução de aproximadamente 70% da deposição de C3b e C4b na superfície do parasito e uma diminuição significativa (quase 70%) da lise mediada pelo complemento (Cestari et al., 2009; Cestari & Ramirez, 2010).

A segunda via a ser ativada numa infecção por protozoários parasitos é a alternativa. Sendo a via de maior eficiência no loop de amplificação, a via alternativa utiliza o C3b depositado pela C3 convertase da via das lectinas para sua ativação. O fator B se liga em duas moléculas de C3b depositadas na membrana do parasito, posteriormente a protease fator D cliva o fator B em Bb, ativando-o e formando a enzima C3 convertase da via alternativa, esta cliva C3 em C3b aumentando o número de C3 convertases de maneira exponencial (Lesavre & Müller-Eberhard, 1978). O feedback positivo dependente de C3b é uma característica única da via alternativa. Cada molécula de C3b recém-produzida tem o potencial de formar uma nova C3 convertase, por sua vez, cada C3 convertase montada, se não regulada, pode se transformar em um poro lítico (Müller-Eberhard & Götze, 1972; Pangburn & Müller-Eberhard, 1984). Dentre as três vias, é a via alternativa que apresenta melhor eficiência na fase de amplificação devido à sua simplicidade, abundância de fatores e facilidade de montagem de sua C3 convertase. A ativação da via clássica por ligação a anticorpos, em uma fase mais tardia da infecção, também gera deposição de C3b desencadeando a via alternativa e aumentando o loop de amplificação.

A via clássica tem como principal receptor de reconhecimento de padrões e ativador da cascata de completo o componente C1q. C1q pode envolver uma ampla gama de ligantes devido a domínio globular heterotrimérico (gC1q) (Malhotra et al., 1993).

Embora a via clássica seja ativada principalmente por imunoglobulinas, atualmente sabe-se que outros ligantes como as fibromodulinas conseguem ativar a cascata do complemento pela via clássica (Sjöberg et al., 2005). Estudos realizados com *T. cruzi*, em soro não imune deficiente em C1q, demonstram que a presença de anticorpos para a ativação desta via em infecção por protozoários é fundamental (Cestari et al., 2009; Cestari & Ramirez, 2010). A eficácia da ativação da via clássica através de anticorpos já foi comprovada (Konishi, 1993; Schreiber & Feldman, 1980). Uma vez que a via clássica é efetivamente ativada na presença de anticorpos específicos como IgM ou IgG, sua atividade é provavelmente mais pronunciada posteriormente, durante a infecção por protozoários parasitos.

Capítulo 4 – Mecanismos de Evasão ao Complemento Por Protozoários Parasitos

O sucesso dos parasitos em estabelecer infecção depende de uma série de intrincadas e bem desenvolvidas adaptações ao seu hospedeiro, as quais os permitem evadir a destruição pelo sistema imune. O sistema do complemento, em especial suas vias alternativas e das lectinas, representam a primeira linha de defesa do organismo vertebrado contra os parasitos e microrganismos patogênicos (J. Lambris & Holers, 2000). Em comparação a vírus e bactérias, os protozoários parasitos são organismos altamente complexos com diversas formas evolutivas ao longo de seus ciclos de vida. Sendo espécimes altamente otimizados, só as formas evolutivas que estejam expostas à ação do sistema do complemento no curso da infecção é que apresentam estratégias e adaptações específicas para evadir as ações líticas do mesmo (Jokiranta et al., 1995). Isto é claramente exemplificado em tripanossomatídeos onde a transformação de formas susceptíveis em formas não susceptíveis ao sistema do complemento acontece através da metaciclogênese, no vetor invertebrado, antecipando-se à e procurando o sucesso da infecção no hospedeiro vertebrado (Franke et al., 1985; Muniz & Borriello, 1945; Puentes et al., 1988).

O processo de formação do MAC pode ser, como citado anteriormente, dividido em duas partes, a de ativação e a de amplificação. Na ativação, se observam três vias: clássica, alternativa e das lectinas. Todas elas têm como propósito formar a C3 convertase. A partir desta é formada a C5 convertase, a qual apresenta a mesma funcionalidade em todas as vias, unificando-as. Esta fase recebe o nome de amplificação e culmina na formação do MAC (Complexo C5b-C9,) na membrana plasmática da célula alvo (Muller-Eberhard, 1985; Takahashi & Ezekowitz, 2005). Sendo uma maquinaria altamente letal para as células, o sistema do complemento precisa ser regulado através de vários mecanismos. Como mencionado previamente, a ativação excessiva do complemento nos tecidos do próprio corpo tem efeitos graves e pode levar ao desenvolvimento de várias doenças (J. Lambris & Holers, 2000; Pangburn et al., 2008). Existem diferentes tipos de moléculas reguladoras do sistema do complemento em seres humanos, podendo ser estas proteínas solúveis ou ligadas à membrana. A proteína C1 esterase (C1-INH) inibe a formação do complexo C1 ao ligar-se à porção C1q evitando a associação dos componentes C1r/C1s iniciadores da via clássica e, homologicamente, evita

a ligação da serino-protease associada a MBL (MASPs) à lectina de ligação a manose (MBL), iniciadores da via das lectinas (Chesne et al., 1982; Matsushita et al., 2000). O fator (fH), formalmente denominado β 1H, é outra proteína solúvel fundamental na regulação do complemento, ele inativa a C3 convertase da via alternativa, removendo por competição a porção Bb da mesma. Também atua como cofator do fator I (fI), que cliva C4b e C3b em iC4b e iC3b, sendo que o iC3b atua como opsonizador, induzindo a fagocitose (Weiler et al., 1976). Entre os reguladores solúveis também encontra-se a proteína de ligação a C4b (C4Bp), a qual se liga ao C4b e, mediante a ação do fator I, cliva C4b em iC4b inibindo a formação da C3 convertase pela via das lectinas e pela via clássica (Gigli et al., 1979; Scharfstein et al., 1978). Nas células humanas existem receptores específicos que inibem a ativação do sistema do complemento na sua superfície. Tanto o Receptor de Complemento 1 (CR1) como o Fator de Aceleração do Decaimento (DAF) dissociam o fator Bb da C3 convertase, evitando a fase de amplificação (Medof et al., 1982, 1984; Nicholson-Weller et al., 1982). Além do CR1, a Proteína Cofator de Membrana (MCP) também atua como cofator do fator I, inativando o fragmento C3b do complemento como explicado anteriormente (Liszewski et al., 1991; Lublin et al., 1988; Medof et al., 1982). Caso seja formado, o complexo C5b-C8 na superfície da célula ainda existem proteínas que detêm a formação do poro como a CD59, Vitronectin ou Clusterin evitando, assim, a morte celular (Brooimans et al., 1992; Milis et al., 1993; Tschopp et al., 1993).

No decorrer da evolução os protozoários parasitos adquiriram adaptações que permitem sua sobrevivência no hospedeiro vertebrado. Muitos destes mecanismos apresentam similaridades com as vias de regulação do sistema do complemento presentes no próprio hospedeiro, como a inativação do componente C3b ou C4b por proteínas secretadas pelos parasitos (Brittingham et al., 1995; Ferreira, Valck, et al., 2004; Fischer et al., 1988; Inal & Schifferli, 2002), a expressão de proteínas homólogas do DAF e outros receptores que atuam como fatores de aceleração do decaimento das convertases (Norris et al., 1991; Norris & Schrimpf, 1994; Rimoldi et al., 1988; Tambourgi et al., 1993), a inativação do MAC por proteínas de superfície e a produção de moléculas capazes de inativar os componentes da fase fluida do sistema do complemento (Braga et al., 1992). Outras estratégias são mais originais como a variação de antígenos de superfície (Roberts et al., 1992), o recrutamento de proteínas reguladoras do sistema do complemento produzidas pelo próprio hospedeiro (Kennedy et al., 2016, 2017; Sikorski et al., 2020), a

montagem do MAC longe da membrana celular (Puentes et al., 1990), a rápida internalização do parasito em células (Rowe et al., 1997, 2000) e, como discutido em detalhes mais à frente, a endocitose do poro formado pelo MAC (Ramírez et al., 2019). A evasão do parasito ao ataque do sistema do complemento é uma etapa crucial para a sobrevivência do parasito e para o sucesso da infecção. A seguir serão resumidas as principais estratégias de escape do sistema do complemento apresentadas por protozoários parasitos do homem.

4.1. Mecanismo de Evasão do Sistema do Complemento em *Plasmodium falciparum*.

A malária é causada por protozoários parasitos do gênero *Plasmodium*, entre eles a maior mortalidade é causada pelo *P. falciparum*. Tal como *T. gondii*, esses parasitos apicomplexos apresentam um ciclo de vida bastante complexo, com diferentes formas evolutivas. Os merozoítos são formas evolutivas encontradas no sangue e que têm como função a invasão de glóbulos vermelhos sendo um estágio crítico para a sobrevivência do parasito no hospedeiro humano. Estas formas evolutivas são extraordinariamente adaptadas para evasão imunológica, conseguindo sobreviver fora de suas células hospedeiras, no sangue, entre 10 a 30 minutos (Boyle et al., 2010). Quando os merozoítos rompem o glóbulo vermelho infectado, saindo para o ambiente extracelular, os parasitos expõem-se diretamente ao sistema do complemento e demais efetores da imunidade. Os estudos sobre a resistência ao sistema do complemento por *P. falciparum* são recentes. Atualmente, tem-se conhecimento de duas proteínas de superfície do merozoíto fundamentais na evasão do MAC, a Pf92 e PfMSP3.1. A Pf92, descoberta em 2016, é um membro da família das proteínas 6-cys de *P. falciparum*, atua na evasão do sistema do complemento ao recrutar para a superfície do merozoíto o fator H, componente regulador do complemento humano produzido pelo próprio hospedeiro. O fator H, como mencionado anteriormente, dissocia a C3 convertase e atua como cofator do fator I, levando à inativação do fragmento C3b, clivando-o em iC3b, inibindo a ativação da cascata na sua fase de amplificação (Kennedy et al., 2016). Já a proteína de superfície de merozoítos da família 3 de *P. falciparum* (PfMSP3.1) descoberta um ano depois, tem como função o recrutamento do componente regulador do complemento C1 esterase (C1-INH), o qual inibe as proteinases C1r/C1s do complexo do Componente 1 (C1) iniciadoras da Via Clássica e as serino-proteases associadas a MBL (MASPs) iniciadoras da Via das

Lectinas (Kennedy et al., 2017). Essas vias de inibição presentes em *P. falciparum* estão representadas na figura 1.

4.2. Mecanismo de Evasão do Sistema do Complemento em *Toxoplasma gondii*

A toxoplasmose é uma doença de distribuição mundial, seu agente etiológico, o *Toxoplasma gondii* apresenta um ciclo complexo com várias formas evolutivas (CDC, 2021). O taquizoíto é a única forma que entra em contato direto com o sistema do complemento. Embora seja um dos parasitos melhor adaptados a humanos, pouco se sabe sobre seus mecanismos de evasão ao complemento. Estudos demonstraram que os taquizoítos apresentam uma molécula que converte o C3b em iC3b depositado em sua superfície, inabilitando a formação da C3 convertase e portanto, a formação do poro lítico (Fuhrman & Joiner, 1989). A natureza desta molécula permanece desconhecida até hoje, mas estudos realizados demonstraram que a mesma tem a capacidade de recrutar os componentes reguladores de complemento C4BP e fH, inibindo a ativação do complemento na superfície do taquizoíto tanto pela via alternativa como pela via clássica (Sikorski et al., 2020). As vias de inibição do sistema do complemento presentes em *Toxoplasma gondii* estão representadas na figura 2.

4.3. Mecanismo de Evasão do Sistema do Complemento em *Trypanosoma cruzi*.

É consenso entre os cientistas que a metaciclogênese concede as ferramentas necessárias à tripomastigota para sobreviver ao sistema imunitário do hospedeiro (Jokiranta et al., 1995). Ao passar por esta transformação, o *Trypanosoma cruzi* adquire proteínas de membrana que permitem a sua sobrevivência (Jokiranta et al., 1995). As primeiras proteínas relacionadas à evasão do *T cruzi*, foram encontradas na década de 70. O T-DAF descoberto em 1988 é uma proteína de superfície de 87–93 kDa presente tanto na tripomastigota metacíclica como na tripomastigota sanguínea (Rimoldi et al., 1988). Esta proteína recebeu seu nome devido ao comportamento semelhante ao componente regulador do complemento humano, o DAF. Semelhante ao DAF, o T-DAF acelera a

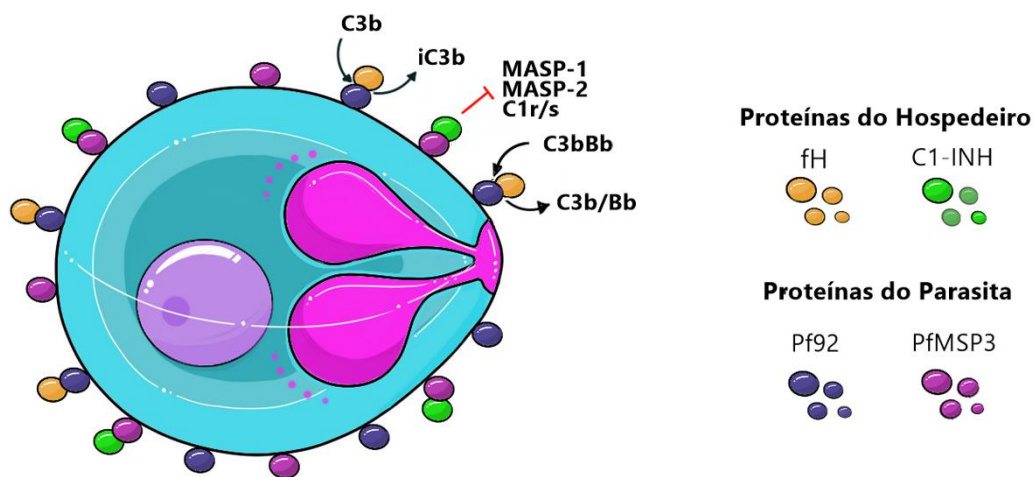


Figura 1 – Mecanismos de Evasão do Sistema do Complemento Descritos para *Plasmodium falciparum*. Os merozoítos de *Plasmodium falciparum*, formas evolutivas sanguíneas, entram em contato com o sistema do complemento, esta forma evolutiva do parasito apresenta na sua superfície, proteínas capazes de recrutar o fator H (fH) e o componente regulador de complemento C1 esterase (C1-INH) provenientes do próprio hospedeiro. A proteína de superfície 92 de *Plasmodium falciparum* (Pf92) recruta o fH para a superfície do parasito, inativando os componentes C3b do sistema do complemento, os quais são fundamentais para a ativação da via Alternativa. A proteína de superfície de merozoítos da família 3 de *Plasmodium falciparum* (PfMSP3.1) recruta o componente C1-INH, inativando as proteinases C1r/C1s, iniciadoras da Via Clássica e as serino-proteases associadas a MBL (MASPs), iniciadoras da Via das Lectinas.

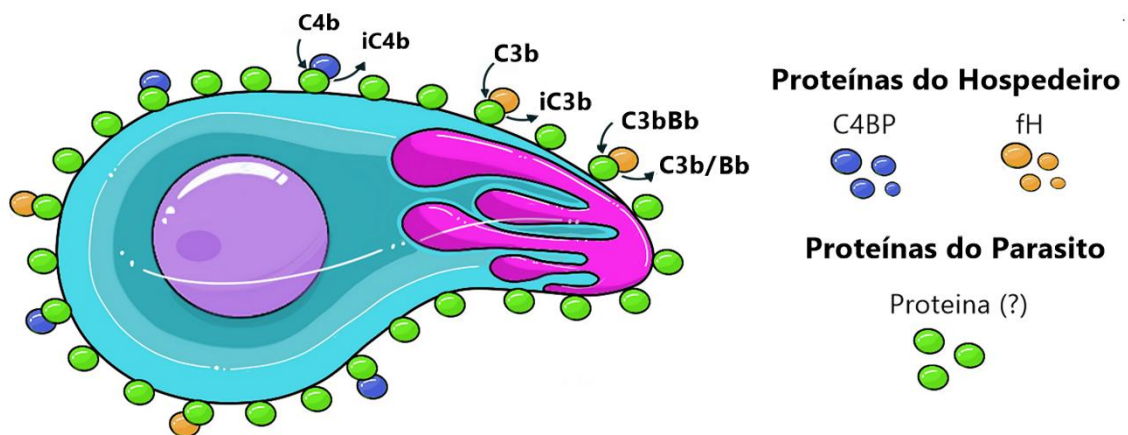


Figura 2 - Mecanismos de Evasão do Sistema do Complemento Descritos para *Toxoplasma gondii*. Os taquizoitos de *Toxoplasma gondii*, formas evolutivas que podem ser encontradas no sangue e na linfa, entram em contato direto com o sistema do complemento. Estes parasitos expressam em sua superfície, proteínas ainda não caracterizadas capazes de recrutar a proteína de ligação a C4b (C4BP) e o fator H (fH) do hospedeiro, ambos atuam inativando os componentes C4 e C3, evitando a ativação do sistema do complemento tanto pela Via Clássica como a Via das Lectinas.

dissociação das C3 convertases. Além disso, evita a montagem de novas C3 convertases, atuando como cofator do fator I na clivagem do C3b, depositado na membrana, em iC3b, conseguindo, assim, inibir a fase de ativação tanto da via alternativa como da via clássica (Tambourgi et al., 1993). Também descoberta em 1988, a proteína gp 58/68 de *T. cruzi* é uma glicoproteína reguladora de complemento de peso molecular aparente de 58 kDa (não reduzido) e 68 kDa (reduzido), mas, ao contrário de outras proteínas reguladoras do complemento, como T-DAF, a gp58/68 não possui atividade de cofator do fator I (Fischer et al., 1988). Esta proteína é encontrada na superfície das tripomastigotas ou é liberada para o meio extracelular, sua ação reguladora recai na ligação desta ao fator B evitando, portanto, a formação da C3 convertase da via alternativa. A gp58/68 faz parte do receptor fibronectina/colágeno importante na fixação do *T. cruzi* na célula de mamíferos (Fischer et al., 1988; M. A. Ouaisi et al., 1986; Velge et al., 1988). Um ano depois, em 1989, outra proteína reguladora presente em *T. cruzi* também análoga a DAF, foi descoberta: a Glicoproteína 160 (gp160) (Norris et al., 1989). A gp160 é uma glicoproteína de 160 kDa ancorada na membrana de tripomastigotas via âncora de glicosilfosfatidilinositol, mas que também é liberada espontaneamente em meio de cultura (Norris & Schrimpf, 1994). Tanto a proteína solúvel como a ligada à membrana, apresentam a capacidade de unir-se aos fragmentos C3b e C4b evitando a formação da C3 convertase tanto da via alternativa como da via clássica (Norris et al., 1991; Norris & Schrimpf, 1994).

Posteriormente, nos anos 2000, novas proteínas foram descobertas e implicadas no mecanismo de evasão ao sistema do complemento em *T. cruzi*. A proteína inibidora do receptor C2 do complemento tri-funcional de *Trypanosoma cruzi* (TcCRIT), uma proteína trans-membrana de 32 kDa encontrada na superfície de tripomastigotas, apresenta um domínio extracelular N-terminal que inibe a clivagem de C2 seja por MASP2 ou C1s, prejudicando a formação da C3 convertase tanto da via clássica como da via das lectinas (Inal & Schifferli, 2002). Estudos realizados demonstraram que os parasitos que superexpressam a CRIT são altamente resistentes à lise mediada pelo sistema do complemento (Inal et al., 2005). Algum tempo depois foi descoberta uma outra proteína envolvida no escape, uma calreticulina (CRT) ligada à superfície da tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* (TcCRT). Nos estágios iniciais da infecção, o TcCRT é capaz de se ligar ao domínio de reconhecimento de carboidratos da MBL, evitando a clivagem do C4 e, assim, inativando a cascata do complemento durante sua fase de ativação pela via das lectinas (Ferreira, Molina, et al., 2004). Estudos realizados

com a proteína TcCRT recombinante demonstraram que quando há ativação da via clássica por anticorpo, em um estágio mais avançado da infecção, a TcCRT compete com os fragmentos C1r/C1s na ligação com a proteína C1q para a formação do complexo C1, inibindo, assim, a via clássica (Ferreira, Valck, et al., 2004).

Anteriormente consideradas artefatos, as microvesículas foram propostas desde 1984 como meio de comunicação entre células eucariotas (Bastida et al., 1984). A mais recente estratégia descoberta na evasão do sistema do complemento pelo *Trypanosoma cruzi* implica a indução de formação de microvesículas pelas células do hospedeiro que, após liberação, se ligam à C3 convertase da via das lectinas e da via clássica (C4bC2a) e inibem sua atividade catalítica, conferindo proteção contra a lise mediada pelo complemento (Cestari et al., 2012). Os autores deste trabalho acreditam que receptores reguladores de complemento, como CR1 o DAF, presentes na membrana plasmática da célula do hospedeiro estejam nas microvesículas podendo estar envolvidas na inibição da C3 convertase. Estudos mais aprofundados demonstraram que a resistência ao complemento por microvesículas é dependente da cepa do parasito envolvida, aumentando de 50% a 80% a resistência à lise pelo complemento (Wyllie & Ramirez, 2017). Na figura 3 estão representados os mecanismos de evasão do sistema do complemento descritos para *Trypanosoma cruzi*.

4.4. Mecanismo de Evasão do Sistema do Complemento em *Leishmania* spp.

Os parasitos deste gênero apresentam no seu ciclo de vida duas formas evolutivas, destas, a promastigota metacíclica é a única forma que entra diretamente em contato com o sistema do complemento devido natureza da picada do vetor. Estudos realizados demonstraram que o processo de metaciclogênese confere às formas promastigotas maior resistência à lise mediada pelo sistema do complemento (Bandyopadhyay et al., 1991). Estudos realizados em 1990 encontraram diferenças notáveis quando comparadas a duas promastigotas (procíclicas e metacíclicas) na elongação dos lipofosfoglicanos (LPG) (D L. Sacks et al., 1990; D L Sacks, 1992). Estes lipofosfoglicanos filamentosos, um glicoconjugado presente na superfície das promastigotas, formam um glicocálice denso que parece evitar a inserção de proteínas solúveis do complemento diretamente na membrana plasmática do parasito (Puentes et al

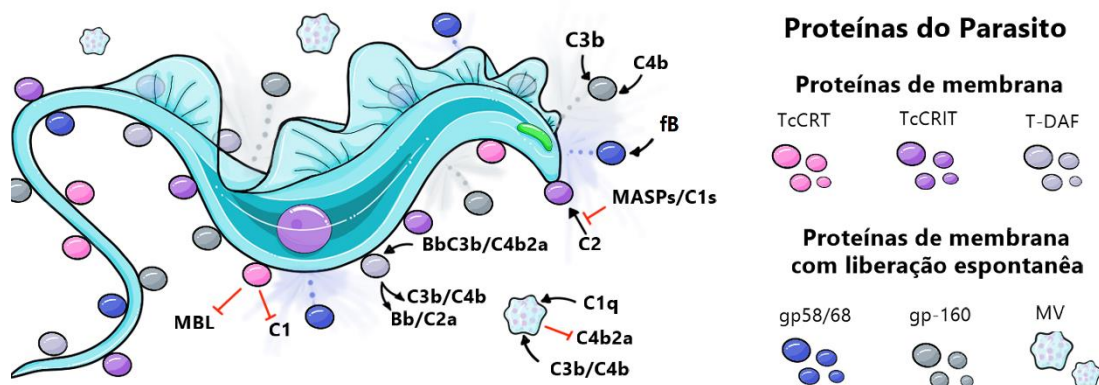


Figura 3 - Mecanismos de Evasão do Sistema do Complemento Descritos para *Trypanosoma cruzi*. As tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, formas evolutivas sanguíneas que entram em contato com o sistema do complemento do hospedeiro, apresentam em sua superfície, proteínas transmembranas e proteínas de liberação espontânea envolvidas na resistência à lise pelo Sistema do Complemento. A Proteína Calreticulina de *T. cruzi* (TcCRT) interage com o componente C1 e a proteína de ligação a manose (MBL) e as inativa, inibindo, assim, tanto a Via Clássica, como a Via das Lectinas. A proteína Trispanning inibidora do receptor do complemento C2 de *Trypanosoma cruzi* (TcCRIT), se liga ao componente C2 evitando sua clivagem e posterior transformação em convertase, o componente C2 é fundamental na Via das Lectinas e para a Via Clássica. A proteína homóloga ao fator de aceleração do decaimento de *T. cruzi* (T-DAF) dissocia os componentes das C3 convertases inativando, assim, as três vias do sistema do complemento. Entre as proteínas de superfície com liberação espontânea encontra-se a glicoproteína 58/68 (gp58/68) que sequestra os componentes Bb evitando a formação de novas convertases. De modo similar, a glicoproteína 160 (gp-160) sequestra os componentes C3b e C4b com o mesmo propósito. As microvesículas inativam os componentes C1q, C3b e C4b, além de interagir com as C3 convertases (C4b2a), inibindo a clivagem dos componentes C3.

1990). A depleção do gene que codifica o LPG provocou uma maior susceptibilidade à lise pelo complemento e menor infectividade de macrófagos (Ryan et al., 1993; Spath et al., 2000). Outra molécula fundamental para a evasão do sistema do complemento foi encontrada cinco anos depois, a glicoproteína 63 (gp36), uma metaloprotease ancorada à membrana do parasito e que atua na proteína C3b e a cliva na sua forma inativa iC3b, evitando a formação da C5 convertase e, portanto, a lise do parasito devido a formação do MAC (Brittingham et al., 1995). Em 1997, quando analisadas frações de membrana plasmática de promastigotas de *L. amazonensis* resistentes ao soro, mostrou-se que a deposição de C9 na membrana do parasito era reduzida em comparação com as formas susceptíveis (Nunes et al., 1997). Aparentemente, na membrana do parasito resistente, complexos carregadores de C9 estavam majoritariamente expostos na membrana do parasito. Quando as amostras eram tratadas com anti-C9, estes se ligavam prontamente à membrana da promastigota resistente em comparação com os parasitos susceptíveis (Nunes et al., 1997). Devido à afinidade desta proteína inibidora por C9, este estudo concluiu que a inibição do sistema do complemento era realizada na fase final da cascata podendo ou evitar inserção do MAC na membrana plasmática ou sua correta montagem. A proteína então assinalada como possível responsável por este mecanismo é a glicoproteína 46 (gp46), a qual é expressa em maior quantidade em promastigotas resistentes de *L. amazonensis* (Nunes et al., 1997).

Estudos realizados demonstraram que as formas promastigotas de *Leishmania* spp. conseguem produzir endogenamente inibidores de serino proteinases (ISP) (Alam et al., 2016). As ISP são inibidores naturais de serino-peptidases como a elastase neutrofilica, a tripsina e a quimiotripsina, sendo consideradas um fator de virulência em tripanosomatídeos (Eschenlauer et al., 2009; Paula C.A. Lima, 2010). Em *Leishmania donovani* foram identificadas duas ISPs, a LdISP1 e a LdISP2. Um estudo de interação realizado *in silico* avaliou a interação proteína-proteína entre o domínio SP catalítico (dobra de tripsina) de C1r, C1s, MASP1, MASP2 e as LdISPs de *L. donovani* (LdISP1 / LdISP2). Estas proteínas do complemento pertencem à família S1A e carregam os domínios catalíticos com atividade semelhante à tripsina ou quimiotripsina. Os resultados inferiram uma forte interação entre LdISP (LdISP1 e LdISP2) e peptidases S1A (C1r, C1s, MASP1, MASP2) do sistema do complemento. Ensaio enzimático realizados mostraram que as LdISPs inibem a atividade enzimática das MASP, principalmente via uma ligação direta entre a LdISP2 e a MASP 2, evitando a formação da C3 convertase da

via das lectinas. Comprovou-se, também, que esta inibição diminuía a produção das anafilotoxinas C3a e C5a, importantes no desencadeamento da inflamação. A figura 4 mostra um resumo das adaptações desenvolvidas por estes parasitos para a evasão do sistema do complemento humano.

4.5. Mecanismo de Evasão do Sistema do Complemento em *Entamoeba histolytica*.

E. histolytica apresenta duas formas evolutivas no seu ciclo de vida, trofozoíto e cisto. A amebíase é causada quando os trofozoítos invadem o epitélio colônico, ativando o sistema imune do hospedeiro. Para sobreviver, o trofozoíto faz uso de diferentes estratégias, conseguindo driblar o ataque do sistema do complemento entre outros componentes imunológicos do hospedeiro. O primeiro mecanismo de evasão do sistema do complemento descrito para esses organismos envolve a lectina específica de galactose e N-acetil-d-galactosamina (Gal/GalNAc lectin). A lectina Gal/GalNAc é uma proteína que se encontra ancorada na membrana do trofozoíto. Ela compartilha semelhanças de sequência genética e reatividade cruzada antigênica com CD59, sugerindo mimetismo molecular e funções de inibição idênticas (Braga et al., 1992). Portanto, a lectina Gal/GalNAc atua evitando a ligação do C8 e C9 ao complexo C5b-C7 inibindo, assim, a formação do complexo lítico na membrana do parasito. Cisteíno-proteases secretadas pelo trofozoíto também atuam inibindo as anafilotoxinas liberadas na ativação do sistema complemento, especificamente os fragmentos C3a e C5a (Reed et al., 1995). Atualmente, sabe-se que, se todas estas estratégias falharem, os trofozoítos amebianos conseguem resistir o ataque do sistema do complemento por meio do mecanismo de reparo de membrana plasmática (discutido em detalhes abaixo). Quando o MAC é formado na membrana plasmática do trofozoíto, ele pode ser removido da mesma por endocitose num processo similar ao utilizado por várias células eucarióticas para resistir a ataques à membrana (Corrotte & Castro-Gomes, 2019; Ramírez et al., 2019). Estes mecanismos de evasão estão esquematizados na figura 5.

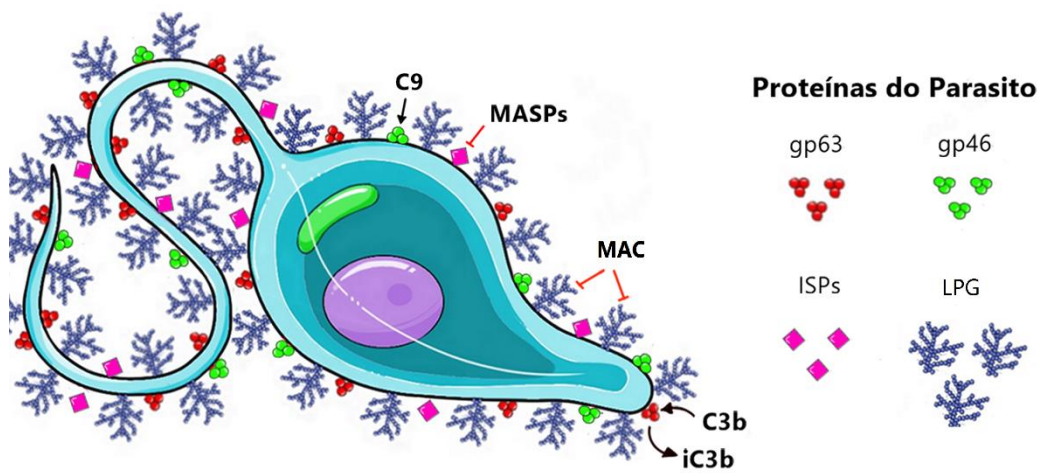


Figura 4 - Mecanismos de Evasão do Sistema do Complemento Descritos para *Leishmania* spp. As promastigotas metacíclicas, formas evolutivas que, ao serem inoculadas, entram em contato com o sistema complemento, apresentam na sua superfície uma densa camada de lipofosfoglicanos (LPG) que pode evitar a formação do Complexo de Ataque a Membranas (MAC) na membrana do parasito. Por outro lado, a glicoproteína 63 (gp63), uma metaloprotease extremamente abundante na superfície de *Leishmania* spp., interage com os componentes C3b inativando-os por clivagem proteolítica. Igualmente abundante na membrana da promastigota, a glicoproteína 46 (gp46) é suspeita de evitar a formação do MAC na superfície ligando-se diretamente ao componente C9. As proteínas inibidoras de serino proteinases (ISP) interagem com as serino proteinases (MASPs) do sistema do complemento, principalmente a MASP2 inibindo-as - como consequência, a formação da C3 convertase da via das lectinas é inibida

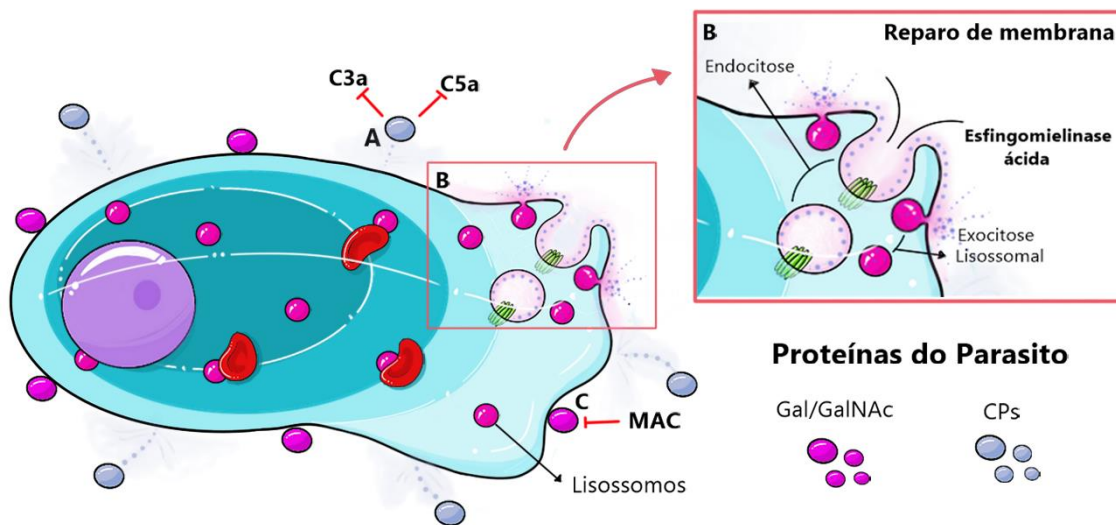


Figura 5 - Mecanismos de Evasão do Sistema do Complemento Descritos para *Entamoeba histolytica*. Os trofozoitos de *Entamoeba histolytica*, formas evolutivas que entram em contato com o sangue e linfa do hospedeiro, apresentam três estratégias conhecidas para a evadir a lise pelo sistema do complemento. A) Liberação de cisteino-proteases que inibem as anafilotoxinas C3a e C5a originadas da clivagem dos componentes C3 e C5 do sistema complemento. B) Reparo da membrana lesionada pelo MAC, após a exocitose lisossômica dependente de cálcio. A enzima lisossômica esfingomielinase ácida induz a invaginação membrana na área afetada pelo poro levando à endocitose do mesmo C) Os trofozoitos apresentam na sua superfície a lectina específica de galactose e N-acetil-d-galactosamina (Gal/GalNAc) que evita a ligação dos componentes C8 e C9 ao complexo C5b-C7, impossibilitando a polimerização do C9 e a formação do poro lítico, do complexo de ataque as membranas (MAC).

Capítulo 5 – O Mecanismo de Reparo de Membrana Plasmática como Estratégia de Evasão do Complexo de Ataque a Membranas.

5.1. O Reparo de Membrana Plasmática - breve histórico e importância para a sobrevivência das células eucariotas.

O reparo da membrana plasmática é um processo fisiológico realizado por todas as células eucariotas nucleadas e é fundamental para a sobrevivência destas (Corrotte & Castro-Gomes, 2019). Tem sido observado em diferentes espécies do reino Animalia e em diferentes tipos celulares, desde neurônios de lagostins (Eddleman et al., 1998), ovos de equinoderma (Heilbrunn, 1956) passando por células intestinais do nematodo *C. elegans* (Los et al., 2011) até tecidos e variadas células de mamíferos (Corrotte et al., 2013). Quando sofrem danos na membrana plasmática, as células necessitam responder rapidamente para evitar o extravasamento do conteúdo citoplasmático para o meio extracelular e posterior morte (Corrotte & Castro-Gomes, 2019). Este processo é especialmente importante para tecidos em situações de estresse fisiológico mecânico ou que sofram ataque por fatores secretados por patógenos. Estes fatores podem incluir perfurinas ou toxinas formadoras de poros, as quais podem gerar danos membranares, desencadeando o mecanismo de reparo de membrana plasmática que evita a morte celular (Horn & Jaiswal, 2018; McNeil, 1993). Do ponto de vista dos organismos unicelulares, a necessidade de reparar danos infringidos à membrana plasmática torna-se ainda mais urgente, posto que a despolarização irreversível pode levar a morte do indivíduo. Caso este organismo seja um parasito, a despolarização irreversível da membrana plasmática pode significar o fim da linha para o patógeno que não conseguirá estabelecer uma infecção de sucesso.

Sem saber onde e quando haverá uma lesão, a célula precisa de estratégias eficazes para realizar um processo rápido e eficiente para evitar a morte celular. O mecanismo de reparo de membrana plasmática é um processo tão complexo quanto rápido. Pelo fato de levar menos de trinta segundos para ser concluído, requer sinalização e sincronização perfeitas entre seus componentes (Horn & Jaiswal, 2018). Este mecanismo começou a ser estudado na década de 50, quando foi observado que ovos de ouriço-do-mar, na presença de cálcio, conseguiam reparar lesões membranares em poucos segundos, permanecendo vivos e inclusive produzindo um indivíduo totalmente

saudável após fecundação (Heilbrunn, 1956). A importância deste experimento foi central no campo da biologia celular e marca um consenso até hoje intocado: o mecanismo de reparo de membrana é um processo dependente de cálcio. O influxo de cálcio para o interior da célula atingida sinaliza o dano de membrana, sua localização e permite a ativação do processo de reparo (Andrews et al., 2015; Corrotte & Castro-Gomes, 2019).

Trabalhos dos laboratórios de McNeil e Steinhardt na década de 1990 (Bi et al., 1995; Miyake & McNeil, 1995) demonstraram, através de análises de imagem de microscopia eletrônica, que existia a migração de uma grande quantidade de vesículas intracelulares para o local da “ferida”. Devido à natureza dos corantes lipofílicos usados, os quais coram membranas de muitas organelas celulares diferentes, a origem das vesículas não pôde ser definida à época. Entretanto, conseguiu-se inferir a pré-existência das mesmas devido ao escasso tempo entre a lesão e o aparecimento destas (Horn & Jaiswal, 2018). Estudos subsequentes procuraram estabelecer a origem destas vesículas. Sabendo-se que as mesmas precisavam ser responsivas a cálcio, buscou-se dentre as células eucariotas possíveis organelas que respondessem a este íon. À medida que as pesquisas avançaram foi observado que um tipo específico de organela citoplasmática, os lisossomos, eram altamente responsivos a influxos de cálcio e que os mesmos possuíam um sensor para o cálcio chamado de sinaptotagmina VII (Syt VII), localizado na face citosólica da membrana lisossômica e que era capaz de regular a exocitose da vesícula (Jaiswal et al., 2004). A exocitose lisossômica dependente de cálcio foi visualizada pela primeira vez em 2002, por microscopia de fluorescência de reflexão interna total (TIRF-M) (Jaiswal et al., 2002). Estes experimentos demonstraram a identificação da proteína LAMP 1 na membrana plasmática celular, indicativo de exocitose da vesícula, após a remodelação da membrana (Reddy et al., 2001). Posteriormente, foi visualizada a migração das populações de lisossomos periféricos em direção à lesão presente na membrana plasmática (Jaiswal et al., 2002). Tomados em conjunto, estes dados foram revolucionários uma vez que atribuíram aos lisossomos, organelas até então conhecidas por seus papéis intracelulares, funções exocíticas até então desconhecidas e um papel central na reparação membranar.

Em 2008, experimentos de reparo de membrana utilizando estreptolisina-O (SLO), uma toxina formadora de poro de origem bacteriana, permitiram visualizar uma quantidade massiva de vesículas não revestidas e de formato irregular no interior celular

logo após a exocitose lisossômica (Idone et al., 2008), no final do processo de reparo da membrana plasmática. Estes endossomos apareciam entre 12 a 20 segundos após a indução da lesão. Quando a endocitose era inibida através da depleção de esteróis, o reparo também era inibido, demonstrando que o sucesso no processo exigia dois momentos fundamentais: 1- uma exocitose lisossômica e, 2- uma posterior endocitose (Idone et al., 2008). Se comprovou em seguida que estas vesículas eram originadas pela invaginação da membrana plasmática, pois as mesmas retiveram no seu interior partículas de BSA (albumina bovina sérica) conjugada com ouro e adicionadas extracelularmente - sendo um marcador não permeável, a única possibilidade de chegada no interior do endossomo seria por endocitose, durante o processo de remodelação na membrana plasmática que ocorria após a exocitose lisossômica dependente de cálcio (Idone et al., 2008).

Observações mais detalhadas desses endossomos (Idone et al., 2008) compararam os mesmos com as vesículas formadas na superfície da membrana quando a mesma se encontra exposta à enzima esfingomielinase (Zha et al., 1998) e percebeu-se que eram morfológicamente semelhantes. Desta observação surgiu pela primeira vez a ideia de que o reparo de membrana poderia envolver a remodelação da membrana plasmática e a indução da endocitose via ação da enzima esfingomielinase ácida (Tam et al., 2010) uma vez que esta se encontra no interior dos lisossomos e é secretada pelos mesmos nas proximidades do dano de membrana durante o processo de reparo membranar (Tam et al., 2010).

A esfingomielina é o principal esfingolípido das células animais, presente em alta concentração no folheto externo das membranas plasmáticas (Li et al., 1999). Esta é encontrada em associação com o colesterol, em domínios da membrana conhecidos como balsas lipídicas (Simons & Toomre, 2000). A esfingomielinase, uma fosfolipase tipo C, cliva a esfingomielina gerando a ceramida. Sendo assim, esta reação resulta na formação de microdomínios enriquecidos em ceramida. Estes microdomínios induzem a condensação local dos folhetos da membrana externa causando uma invaginação, culminando na formação de uma cavidade fechada (Holopainen et al., 2000). Existem evidências substanciais de experimentos realizados em vários laboratórios mostrando que a adição de C6-ceramida ou esfingomielinase em células fagocíticas ou não fagocíticas, como macrófagos e fibroblastos, resulta igualmente na formação de endossomos (Bai & Pagano, 1997; Zha et al., 1998).

5.2. Principais Mecanismos Propostos – Endocitose e Brotamento Vesicular – A Importância da Remoção Sumária do Poro da Membrana Plasmática.

É consenso que o reparo de membrana plasmática é um processo dependente de cálcio como mostrado nos experimentos realizados por Heilbrunn (1956) em ovos de ouriço-do-mar, mas ainda é bastante discutido os eventos resultantes desta sinalização e como exatamente a célula faz para ficar livre da lesão. Trabalhos posteriormente realizados nos anos 1990 (Bi et al., 1995; Miyake & McNeil, 1995) demonstraram que o mecanismo de reparo membranar era um processo que precisava da exocitose de vesículas internas. A partir destes resultados duas hipóteses foram formuladas, ambas apresentando em comum a necessidade de um aporte de membranas intracelulares para auxiliar o processo de selagem da membrana plasmática.

A primeira hipótese postula que o evento de exocitose massiva dependente de cálcio liberaria a tensão presente na membrana plasmática, aproximando as bordas da ferida e permitiria uma selagem espontânea da bicamada lipídica (Steinhardt et al., 2000). Esta teoria seria válida para lesões causadas por agentes mecânicos, mas não para poros estáveis, inseridos na membrana plasmática, como os poros formados por porinas bacterianas ou qualquer outro tipo de proteína formadora de poros. A segunda hipótese, denominada de "patch-like", postulava que a fusão homotípica de vesículas exocíticas pré-existentes ativadas pelo influxo de cálcio, formaria uma grande vesícula que funcionaria como uma espécie de rolha ou tampão membranoso que ocluiria a lesão, fechando-a (McNeil et al., 2000). Posteriormente, esta grande vesícula se fundiria com a membrana plasmática nas cercanias da lesão levando à selagem da ferida (McNeil & Kirchhausen, 2005). Na atualidade, ambas as hipóteses podem ser refutadas para o processo de reparo membranar em células de mamíferos, notadamente pelo simples fato de que ambas falham ao explicar a capacidade das células eucariotas de se livrarem de poros estáveis inseridos na membrana plasmática. Experimentos realizados em 2008 demonstraram claramente que o processo de exocitose é, na verdade, seguido de uma massiva endocitose e que, esta sim, é o passo final de remoção da porção lesionada da membrana que é internalizada em endossomos (Idone et al., 2008). Estes achados foram fundamentais e demonstraram, pela primeira vez, que o processo de reparo de membrana plasmática envolve a remoção sumária da lesão eventualmente infringida à membrana plasmática. Trabalhos mais recentes demonstraram que a remoção destes danos, notadamente os provocados por proteínas formadoras de poros, também podem acontecer por brotamento membranar,

numa topologia oposta à endocitose e que culmina com liberação destes poros em microvesículas por parte das células atacadas (Jimenez et al., 2014). O interessante é que, seja por endocitose da lesão ou por sua liberação em vesículas, ambos os trabalhos apontam para o objetivo final do processo: a remoção sumária da lesão presente na membrana plasmática é fundamental para a recuperação da integridade membranar.

Não se sabe ainda se os mecanismos demonstrados, endocitose e brotamento, ocorrem concomitantemente. Acredita-se que o tamanho da lesão, entretanto, pode influenciar neste balanço. Para lesões pequenas (<100nm), como as provocadas por proteínas formadoras de poros, o brotamento vesicular mediado por proteínas do complexo ESCRT, principalmente ESCRT III, mostrou-se fundamental para o processo de reparação membranar (Jimenez et al., 2014). Por outro lado, a formação de invaginações ricas em caveolinas e sua posterior endocitose carregando poros para o interior da célula, mostrou-se também eficaz em remover tanto poros membranares quanto lesões mecânicas (Corrotte et al., 2013). Ambos os mecanismos encontram-se ilustrados na figura 6.

5.3 Proposição do Mecanismo de Reparo de Membrana Plasmática como Estratégia de Escape Utilizando *Leishmania* spp. como Modelo.

Na evolução, o sistema do complemento é um dos mecanismos imunes mais antigos conhecidos tendo co-evoluído com os protozoários parasitos atuais. De fato, os protozoários parasitos têm desenvolvido muitos mecanismos para evitar a lise pelo sistema do complemento. O reparo de membrana plasmática é um processo celular que, assim como o sistema do complemento, está presente ancestralmente na filogenia dos organismos. Estudos recentes demonstraram que *Entamoeba histolytica* conseguem

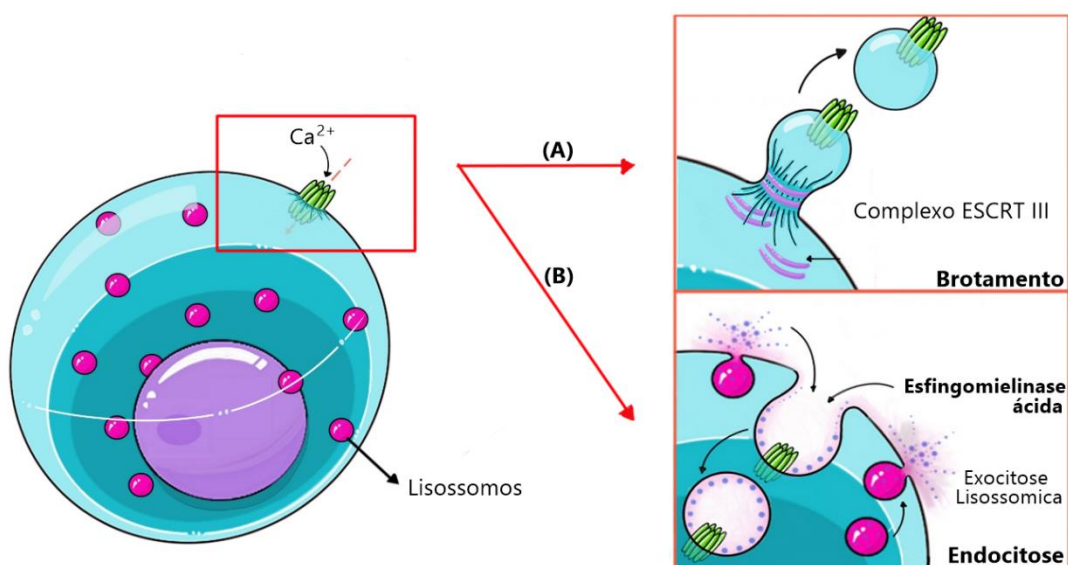


Figura 6 – Dinâmica da Membrana Plasmática Durante o Reparo de Danos Membranares. **A-** O recrutamento Ca^{2+} dependente do complexo ESCRT para o sítio de lesão gera um brotamento vesicular e remoção da membrana lesionada para o meio extracelular. **B** - A exocitose Ca^{2+} dependente de lisossomos libera a enzima esfingomielinase ácida no meio extracelular, provocando a endocitose da lesão e sua degradação intracelular.

reparar poros formados na membrana plasmática (Ramírez et al., 2019). De modo idêntico ao que ocorre com as células de mamífero, o processo de reparo de membrana plasmática observado nas amebas é mediado por esfingomielinase ácida excitada por lisossomos e termina com a endocitose do poro lítico. Embora o processo aconteça de forma semelhante, a esfingomielinase ácida de *Entamoeba histolytica* apresenta uma baixa homologia quando comparada à das células de eucariotos superiores, porém, apresentam em comum as sequências de sítios catalíticos fundamentais para o processo de reparo de membrana, mostrando uma alta conservação filogenética (Ramírez et al., 2019). Portanto, é possível que protozoários parasitos apresentem um mecanismo homólogo para evadir a morte lítica causada pelo MAC do sistema do complemento evadindo assim, a primeira linha de defesa da imunidade inata.

Como qualquer patógeno de sucesso, as espécies do Gênero *Leishmania* desenvolveram estratégias para driblar os mecanismos imunológicos do hospedeiro e conseguir sobreviver. A resistência à lise pelo complemento neste parasito é dependente da espécie, amastigotas de *L. donovani* são mais resistentes que as amastigotas de *L. tropica* (Hoover et al., 1984), e dependente também da forma evolutiva do parasito, promastigotas procíclicas são mais susceptíveis ao complemento do que promastigotas metacíclicas (Puentes et al., 1990). Acredita-se que essa diferença específica de evasão se deve ao alongamento do lipofosfoglicano (LPG) nas formas metacíclicas infectantes (David L Sacks et al., 1995) e à expressão aumentada de proteínas que inibem os componentes C3, C5 e C9 do sistema do complemento (Hermoso et al., 1991). Entre elas, a principal é a glicoproteína 63 (GP63) como mencionado anteriormente no capítulo 5. (Brittingham et al., 1995). Tendo em vista que as estratégias de evasão de *Leishmania* não as fazem totalmente resistentes ao complemento e, que, ainda assim, uma parte dos parasitos consegue escapar, é possível que existam estratégias ainda desconhecidas que capacitem os parasitos para a sobrevivência, entre elas, possivelmente a capacidade de reparar poros de complemento.

5.3.1. Possíveis Vias Envolvidas no Mecanismo de Reparo de Poros de MAC em *Leishmania* spp.

5.3.1.1. Remoção do Poro Lítico por Endocitose.

Nos tripanosomatídeos a membrana plasmática está disposta sobre um arcabouço de microtúbulos, estabilizados por ligações cruzadas e associados à própria membrana denominados de microtúbulos subpeliculares (Landfear & Ignatushchenko, 2001). Devido a este arranjo particular, invaginações de membrana são dificultadas no corpo do protozoário e processos endocíticos, dificultados. Exatamente por esta razão, processos endocíticos são realizados na bolsa flagelar onde há ausência de microtúbulos. A bolsa flagelar é uma estrutura proeminente e complexa que pode ser facilmente visualizada por microscopia eletrônica, é a região onde emerge o flagelo em tripanosomatídeos (Landfear & Ignatushchenko, 2001). Epimastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi*, também apresentam o citóstomo como organela endocítica. Esta se abre na bolsa flagelar ou próximo a ela e penetra profundamente na célula (Milder & Deane, 1969). Cadeias pesadas e leves de clatrina são expressas em *T. cruzi* sendo estas implicadas no tráfego de albumina em epimastigotas, através de endossomas revestidos, mostrando a conservação filogenética desta via endocítica (Kalb et al., 2014). Estudos realizados com microscopia eletrônica de transmissão mostraram que *T. cruzi* usa diferentes vias de secreção para excretar/secretar proteínas. Foram encontradas vesículas maiores brotando da membrana plasmática de epimastigotas não infecciosos e tripomastigotas metacíclicos infecciosos, bem como vesículas menores dentro da bolsa flagelar de ambas as formas (Bayer-Santos et al., 2013). Sabe-se que a *Leishmania* apresenta vias endocíticas e exocíticas que funcionam na região da bolsa flagelar, mas os mecanismos por trás destes processos têm sido pouco estudados.

A relevância desta via na evasão à imunidade foi descoberta em 2003, quando dentro dos endossomos foram identificadas glicoproteínas variantes de superfície (VSG) normalmente presentes na membrana plasmática de *T. brucei* (Pal et al., 2003). Estes parasitos apresentam uma alta taxa de endocitose e fluxo de proteínas conseguindo uma rápida renovação de toda sua membrana plasmática (M. Engstler, 2004). Além da variação antigênica, esta rápida renovação também é usada para a remoção de marcadores opsonizados da superfície do parasito como imunoglobulinas, colocando o processo de

endocitose em posição de destaque para evasão da imunidade do hospedeiro (Markus Engstler et al., 2007). A eficiência na rápida remoção de marcadores em toda membrana plasmática por endocitose sugere a possibilidade de que os parasitos também possam conseguir fazer o mesmo com eventuais poros de MAC inseridos na membrana plasmática do patógeno. Sendo que esta via endocítica é altamente conservada, é possível que este mecanismo também seja usado por parasitos do gênero *Leishmania*.

Em células de mamífero, o reparo de membrana plasmática via endocitose requer a previa exocitose de lisossomos. Este tipo de reparo já foi descrito em protozoários parasitos como *Entamoeba histolytica* (mencionado anteriormente). Devido a inexistência de lisossomos característicos em parasitos do gênero *leishmania*, outras organelas precisariam desempenhar esta função. Estudos realizados observaram que após formado o endossomo, este trafega pelo citoplasma até chegar a uma espécie de tubo lisossômico multivesicular (MVT). O MVT, rico em cisteíno-proteases, é um tubo compreendido por uma membrana limitadora contendo um grande número de vesículas internas que se estende desde a bolsa flagelar até a extremidade posterior da *Leishmania* (Mullin et al., 2001). Este compartimento foi identificado pela primeira vez em promastigotas de *Leishmania mexicana* (Ilgoutz, 1999). Marcadores endocíticos utilizados para marcar os endossomos foram encontrados nesta organela tubular, que é, portanto, o último compartimento na via endossomal da promastigota (Mullin et al., 2001; Weise et al., 2000). Outros estudos demonstraram que, embora seja fracamente acidificada, a sua capacidade hidrolítica melhora substancialmente em pH ácidos similar aos lisossomos encontrados em células de mamífero (Mullin et al., 2001).

Outra possível organela capaz de cumprir função exocítica em um eventual reparo de poros de MAC em *Leishmania* spp. são os acidocalcissomos. Estas organelas estão altamente conservadas na árvore filogenética, são encontrados desde bactérias até células humanas (Docampo et al., 2005), incluindo vários protozoários entre eles parasitos do gênero *Leishmania* (Marchensini et al., 2000; Moreno & Zhong, 1996). Embora não reconhecidos tipicamente na via endocítica, estudos realizados mostraram que marcadores endocíticos foram internalizados nesta organela em *Leishmania amazonensis* (Vannier-Santos et al., 1999). Os acidocalcissomos são pequenos grânulos altamente eletrodensos de pH ácido amplamente distribuídos no citoplasma, mas principalmente concentrados na região da bolsa flagelar (Miranda et al., 2004). Estas organelas armazenam o cálcio intracelular, além de apresentarem uma alta concentração

de fósforo na forma de pirofosfato (PPi) e polifosfato (poli P) e de outros íons como magnésio, sódio e zinco (Scott et al., 1997); entre suas funções está a regulação do pH e da osmolaridade (Miranda et al., 2004). Em situações de estresse, esta organela se funde com o vacúolo contrátil ajudando a *Leishmania* a adaptar-se às condições ambientais e sobreviver (Miranda et al., 2004). Os acidocalcissomos são conhecidos como lisossomos primitivos, uma vez que o reparo de membrana plasmática envolve processos exocíticos e endocíticos e é dependente de cálcio, é possível que, existindo em *Leishmania* spp., o mesmo envolva esta organela.

Para que vesículas do parasito participem de um eventual processo de reparo de membrana plasmática dependente de cálcio, é necessário que as mesmas sejam 1- sensíveis ao cálcio, que possuam algum sensor para este íon e 2- possuam a maquinaria necessária que permita sua fusão com a membrana plasmática, logo, sua exocitose. Com relação ao segundo item, proteínas homologas às utilizadas por células de mamíferos para fusão de membrana foram encontradas em *Leishmania* spp., especificamente, o fator sensível à N-etilmaleimida (NSF) e o complexo de receptores de proteínas de fixação solúvel de NSF (SNARE) (Nichols & Pelham, 1998). Estudos realizados com anticorpos anti-NSF de mamíferos mostraram o reconhecimento de uma proteína específica de 70 kDa em *Leishmania*. Sem esta proteína a via exocítica é significativamente inibida, demonstrando o papel desta proteína semelhante a NSF na exocitose em *Leishmania* (Singh, 2003). Proteínas homólogas a SNARE também foram encontradas *in silico* (Besteiro et al., 2006). Em células de mamífero, este mecanismo de fusão de vesículas é fundamental para a exocitose lisossômica dependente de cálcio, processo presente na fase inicial do reparo de membrana plasmática (Bi et al., 1995; Corrotte & Castro-Gomes, 2019).

5.3.1.2 Remoção do Poro Lítico por Brotamento Vesicular

Quando um poro lítico é formado na membrana plasmática de células de mamífero, normalmente acontece a endocitose do mesmo (Corrotte & Castro-Gomes, 2019). Porém, alguns trabalhos também demonstraram a possibilidade de que este seja liberado da membrana em brotamentos vesiculares semelhantes a exossomos (vesículas extracelulares ou EV's, do inglês, *extracellular vesicles*), num processo mediado pela maquinaria de fissão de membranas ESCRT-III (Castro-Gomes et al., 2014). Atualmente, sabe-se que a produção de vesículas extracelulares para comunicação celular é fundamental em muitas infecções e patologias. Embora os mecanismos pelos quais estas

são formadas não estejam claros para todos os microrganismos, em *Toxoplasma gondii* e em *Plasmodium falciparum* a produção das mesmas é realizada via ESCRT-III, exatamente a mesma maquinaria molecular que está relacionada com o mecanismo de reparo por brotamento em células de eucariotos superiores (Castro-Gomes et al., 2014; Jimenez et al., 2014). *Plasmodium falciparum*, por exemplo, apresenta uma maquinaria ESCRT-III altamente funcional envolvendo a ação das proteínas PfBro1 e PfVps32 / PfVps60. O silenciamento do gene produtor da proteína Pfvps60, associada à ESCRT-III, levou a uma redução significativa na quantidade de EVs formados, demonstrando ser uma via de brotamento altamente funcional (Avalos-Padilla et al., 2021).

O processo de formação de exossomos requer a ação sequencial de vários complexos de proteínas referidos como complexos de seleção endossômica necessários para a maquinaria de transporte (ESCRTs) (Katzmann et al., 2001), a mesma envolvida no reparo de membrana plasmática em células de mamífero. Em tripanosomatídeos, a conservação funcional do sistema ESCRT foi confirmada, tendo sido encontradas em *T.brucei* as proteínas homólogas de seleção vacuolar (VSP) 23 e 28 que fazem parte do complexo ESCRT I (J. S. Silverman et al., 2013). De fato, a análise genômica comparativa extensiva indicou uma origem precoce do complexo ESCRT na filogenia, indicando sua conservação em toda a linhagem eucariótica (Leung et al., 2008).

Os exossomos secretados por *Leishmania* apresentam uma correlação proteômica de aproximadamente 50% com os exossomos de células de mamíferos (J. M. Silverman et al., 2010). Estes resultados sugerem que a composição dos exossomos e a via pela qual são formados está altamente preservada ao longo da evolução. Não é de se espantar que tenham sido implicados num mecanismo tão crucial para a sobrevivência celular como o reparo de membrana plasmática. Estudos realizados demonstraram que a produção de exossomos por promastigotas de *Leishmania* aumenta mais do dobro quando o parasito é submetido a uma temperatura de 37°C, mimetizando o ambiente encontrado no hospedeiro vertebrado (J. M. Silverman et al., 2010). Portanto, é provável que o complexo ESCRT, já implicado como responsável por reparar poros em células de mamífero via brotamento vesicular, também exerça esta mesma função em patógenos eucariotos, munindo-os de mais uma arma contra o ataque pelos poros de MAC do sistema do complemento.

Experimentos piloto realizados no nosso laboratório (figura 7) demonstraram que promastigotas de *L. amasonensis* conseguem reparar os poros líticos formados pelo MAC. Assim como as células de mamífero, as promastigotas foram capazes de remover de modo dependente cálcio, danos feitos pelo sistema do complemento humano na membrana plasmática do parasito. Desta forma, nós já sabemos que o processo de reparo de membrana plasmática encontra-se conservado nestes parasitos. Experimentos futuros definirão se os poros de MAC são endocitados ou desprendidos da membrana plasmática por brotamento vesicular, se ambos os processos ocorrem e quais os efetores celulares e moleculares envolvidos nesta nova estratégia de escape do sistema do complemento descoberta para este parasito. Coletivamente, os estudos mencionados anteriormente demonstram que as características básicas das vias exo e endocíticas dos tripanossomatídeos são muito semelhantes às encontradas em outros eucariotos, em que pese o fato destes organismos representarem uma das linhagens eucarióticas mais divergentes. As possíveis vias exo e endocíticas com potencial envolvimento no reparo de membrana plasmática em *Leishmania* spp estão representadas na figura 8.

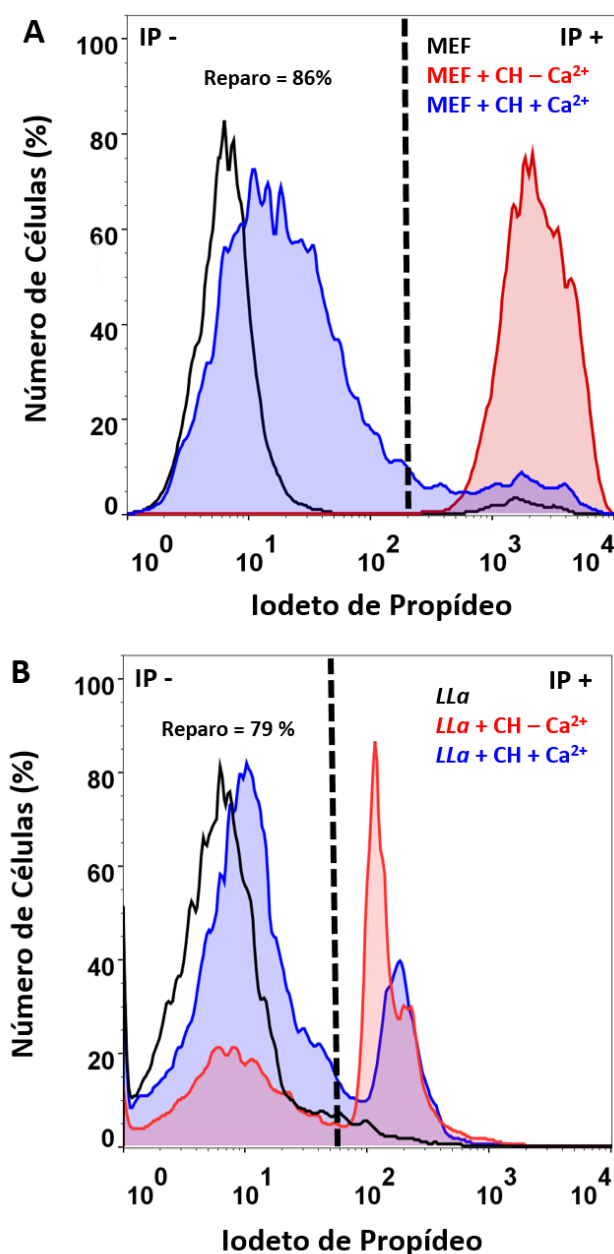


Figura 7 – Reparo de Poros de MAC em Fibroblastos e em Promastigotas de *Leishmania amazonensis*. 1×10^6 Fibroblastos murinos de camundongo (MEF) ou promastigotas de *Leishmania amazonensis* (LLa) foram incubados com complemento humano fresco (CH) a 1:6 e 1:8, respectivamente, em 1 mL de HBSS contendo EGTA e Mg²⁺ de modo a permitir a lise pela Via Alternativa do Complemento. Após 20 min de incubação a 37°C, os fibroblastos e as promastigotas foram centrifugados, divididos em 2 tubos idênticos que eram, em seguida, incubados ou não em HBSS 20 μ M CaCl₂ a 37°C. Após 5 min de incubação, o marcador de permeabilidade da membrana plasmática iodeto de propídeo (IP) era adicionado e a população celular era analisada ao FACS. A porcentagem de reparo observada refere-se à porcentagem da população celular que recuperou a integridade de membrana após a incubação na presença do íon cálcio. As curvas em preto mostram MEF e LLa não tratados. A linha pontilhada mostra o posicionamento do *gating*.

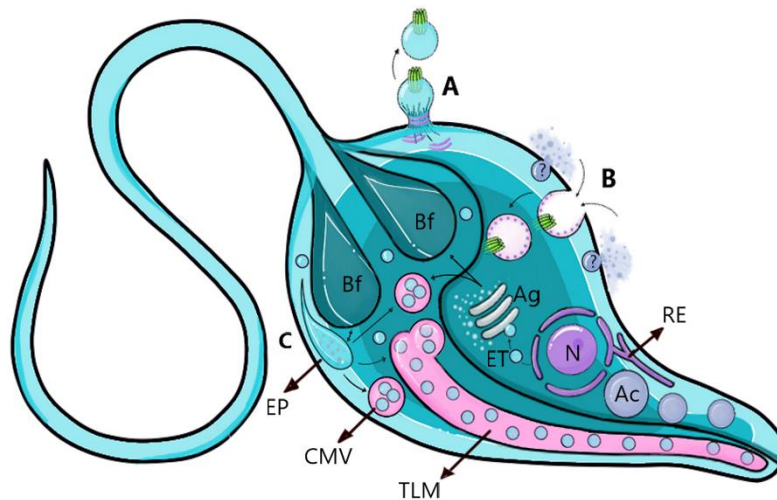


Figura 8 – Possíveis Vias Envolvidas no Mecanismo de Reparo de Poros de MAC em *Leishmania* spp. **A** - O recrutamento Ca^{2+} dependente do complexo ESCRT para o sítio de lesão gera um brotamento vesicular e remoção da membrana lesionada para o meio extracelular. **B** - A exocitose Ca^{2+} dependente de lisossomos libera a enzima esfingomielinase ácida no meio extracelular, provocando a endocitose da lesão e sua degradação intracelular. **C**- Endocitose via bolsa flagelar, na região anterior do parasita a ambos lados do flagelo é encontrada a bolsa flagelar, nesta região há formação de endossomos tubulares 'precoces' (EP) estão intimamente associados à bolsa flagelar (fp). Um único aparelho de Golgi também é proximal à bolsa flagelar e é flanqueado por um retículo endoplasmático (RE) e o aparelho de Golgi (AG). Os corpos multivesiculares (CMV) podem ser vistos surgindo próximo ao AG. O compartimento do lisossomo, denominado túbulo lisossômico multivesicular (TLM) se estende a partir da bolsa flagelar, em estreita proximidade com CMV, até a extremidade posterior da célula. Os acidocalcisomos (Ac) são encontrados perto do núcleo (N) também na extremidade posterior.

Considerações Finais

Os protozoários parasitos são definidos como organismos unicelulares eucariotos capazes de causar uma vasta gama de doenças, a maioria acometendo pessoas em condições de miséria, carecendo de saneamento básico e com difícil acesso a centros de saúde (D. Sacks & Sher, 2002). A coexistência ancestral entre estes parasitos e o sistema imune, remonta a antigas bases filogenéticas. Os mecanismos de evasão por parte dos parasitos surgiram de processos co-evolutivos, foram se aperfeiçoando ao longo do tempo, sendo conservados e altamente efetivos contra as defesas do hospedeiro. À semelhança do sistema do complemento, o mecanismo de reparo de membrana plasmática tem estado presente na árvore filogenética dos organismos desde tempos antigos. A habilidade de reparar danos infligidos à membrana plasmática tem sido comprovada desde equinodermas até mamíferos (McNeil, 1993; Ramírez et al., 2019).

As adaptações são reconhecidas como características evoluídas e aperfeiçoadas através de pressões seletivas para a função específica que atualmente cumprem (Gould & Vrba, 1982). O termo exaptação, ao contrário, representa uma característica evoluída através de pressões seletivas, mas que atualmente cumpre uma função que não pode ser especificamente relacionada a estas pressões, ou seja, foi cooptada a cumprir uma nova função (Gould & Vrba, 1982). O melhor exemplo deste termo são as penas das aves. Estas surgiram como mecanismo de termo-regulação, mas atualmente cumprem a função específica de garantir a propulsão e sustentação das aves no voo (Gould & Vrba, 1982). Sendo o sistema de reparo de membrana altamente conservado como mencionado anteriormente, uma forma primitiva deste provavelmente está presente nos parasitos protozoários. Este trabalho propõe o reparo de membrana plasmática como uma característica exaptativa cooptada pelos protozoários parasitos para evitar a morte lítica desencadeada pelo complexo de ataque as membranas do sistema complemento.

Deste modo, parasitos do Gênero *Leishmania* spp. (assim como demais protozoários que entram em contato com os efetores séricos da imunidade inata) podem apresentar uma variante deste mecanismo que os possibilite sobreviver ao ataque membranar feito por poros de MAC. Neste trabalho, além de uma extensiva revisão sistemática da literatura, demonstramos pela primeira vez que promastigotas de *Leishmania* são capazes de remover de suas membranas plasmáticas poros formados pelo sistema do complemento humano. O estudo detalhado deste mecanismo em *Leishmania*

spp. apresenta-se como um fascinante tópic de estudo para a protozoologia básica. A definição das bases celulares e bioquímicas que regem o processo de reparo de membrana plasmática nestes patógenos poderá fornecer informações cruciais sobre a biologia básica deste parasito unicelular e de seu comportamento frente às defesas do hospedeiro.

Referencias

- Adams, M. D. (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461), 2185–2195. <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2185>
- Agrawal, A., Singh, P. P., Bottazzi, B., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2009). *Pattern Recognition by Pentraxins* (pp. 98–116). https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0901-5_7
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., & Marty, P. (2016). *A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies*. 1–40. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- Al-Sharif, W. Z., Sunyer, J. O., Lambris, J. D., & L.C., S. (1998). Sea urchin coelomocytes specifically express a homologue of the complement component C3. *Journal of Immunology*, 160(6), 2983–2997.
- Alam, M. N., Das, P., De, T., & Chakraborti, T. (2016). Identification and characterization of a *Leishmania donovani* serine protease inhibitor: Possible role in regulation of host serine proteases. *Life Sciences*, 144, 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.12.004>
- Albertí, S., Marqués, G., Hernández-Allés, S., Rubires, X., Tomás, J. M., Vivanco, F., & Benedí, V. J. (1996). Interaction between complement subcomponent C1q and the *Klebsiella pneumoniae* porin OmpK36. *Infection and Immunity*, 64(11), 4719 LP – 4725. <http://iai.asm.org/content/64/11/4719.abstract>
- Andrade, B. B., de Oliveira, C. I., Brodskyn, C. I., Barral, A., & Barral-Netto, M. (2007). Role of Sand Fly Saliva in Human and Experimental Leishmaniasis: Current Insights. *Scandinavian Journal of Immunology*, 66(2–3), 122–127. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2007.01964.x>
- Andrade, L. O., & Andrews, N. W. (2004). Lysosomal Fusion Is Essential for the Retention of *Trypanosoma cruzi* Inside Host Cells. *Journal of Experimental Medicine*, 200(9), 1135–1143. <https://doi.org/10.1084/jem.20041408>
- Andrade, Z. A. (1999). Immunopathology of Chagas disease. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(suppl 1), 71–80. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000700007>
- Andrews, N. W., Corrotte, M., & Castro-Gomes, T. (2015). Above the fray: Surface remodeling by secreted lysosomal enzymes leads to endocytosis-mediated plasma membrane repair. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 45, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.09.022>
- Andrews, N. W., & Whitlow, M. B. (1989). Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 33(3), 249–256. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(89\)90086-8](https://doi.org/10.1016/0166-6851(89)90086-8)
- Apt Baruch, W. (2013). *Parasitología humana. México, DF: McGraw-Hill Interamericana Editores.*
- Avalos-Padilla, Y., Georgiev, V. N., Lantero, E., Pujals, S., Verhoef, R., N. Borgheti-Cardoso, L., Albertazzi, L., Dimova, R., & Fernández-Busquets, X. (2021). The ESCRT-III machinery participates in the production of extracellular vesicles and protein export during *Plasmodium falciparum* infection. *PLOS Pathogens*, 17(4),

e1009455. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009455>

- Bafica, A., Santiago, H. C., Goldszmid, R., Ropert, C., Gazzinelli, R. T., & Sher, A. (2006). Cutting Edge: TLR9 and TLR2 Signaling Together Account for MyD88-Dependent Control of Parasitemia in *Trypanosoma cruzi* Infection. *The Journal of Immunology*, *177*(6), 3515–3519. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.6.3515>
- Bai, J., & Pagano, R. E. (1997). Measurement of spontaneous transfer and transbilayer movement of BODIPY- labeled lipids in lipid vesicles. *Biochemistry*, *36*(29), 8840–8848. <https://doi.org/10.1021/bi970145r>
- Bailey, M. S., & Lockwood, D. N. J. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *Clinics in Dermatology*, *25*(2), 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.clinidematol.2006.05.008>
- Bandyopadhyay, P., Ghosh, D. K., De, A., Ghosh, K. N., Chaudhuri, P. P., Das, P., & Bhattacharya, A. (1991). Metacyclogenesis of *Leishmania* spp: Species-Specific In vitro Transformation, Complement Resistance, and Cell Surface Carbohydrate and Protein Profiles. *The Journal of Parasitology*, *77*(3), 411. <https://doi.org/10.2307/3283129>
- Bannister, L. ., Hopkins, J. ., Fowler, R. ., Krishna, S., & Mitchell, G. . (2000). A Brief Illustrated Guide to the Ultrastructure of *Plasmodium falciparum* Asexual Blood Stages. *Parasitology Today*, *16*(10), 427–433. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01755-5](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01755-5)
- Basselin, M., Badet-Denisot, M. A., & Robert-Gero, M. (1998). Modification of kinetoplast DNA minicircle composition in pentamidine-resistant *Leishmania*. *Acta Tropica*, *70*(1), 43–61. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(98\)00007-2](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(98)00007-2)
- Bastida, E., Ordinas, A., Escolar, G., & Jamieson, G. (1984). Tissue factor in microvesicles shed from U87MG human glioblastoma cells induces coagulation, platelet aggregation, and thrombogenesis. *Blood*, *64*(1), 177–184. <https://doi.org/10.1182/blood.V64.1.177.177>
- Bayer-Santos, E., Aguilar-Bonavides, C., Rodrigues, S. P., Cordero, E. M., Marques, A. F., Varela-Ramirez, A., Choi, H., Yoshida, N., da Silveira, J. F., & Almeida, I. C. (2013). Proteomic Analysis of *Trypanosoma cruzi* Secretome: Characterization of Two Populations of Extracellular Vesicles and Soluble Proteins. *Journal of Proteome Research*, *12*(2), 883–897. <https://doi.org/10.1021/pr300947g>
- Besteiro, S., Coombs, G. H., & Mottram, J. C. (2006). The SNARE protein family of *Leishmania major*. *BMC Genomics*, *7*(1), 250. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-250>
- Bi, G. Q., Alderton, J. M., & Steinhardt, R. A. (1995). Calcium-regulated exocytosis is required for cell membrane resealing. *Journal of Cell Biology*, *131*(6 II), 1747–1758. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.6.1747>
- Bonaldo, M. C., Souto-Padron, T., de Souza, W., & Goldenberg, S. (1988). Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Journal of Cell Biology*, *106*(4), 1349–1358. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.4.1349>
- Boyle, M. J., Wilson, D. W., Richards, J. S., Riglar, D. T., Tetteh, K. K. A., Conway, D. J., Ralph, S. A., Baum, J., & Beeson, J. G. (2010). Isolation of viable *Plasmodium falciparum* merozoites to define erythrocyte invasion events and advance vaccine

- and drug development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(32), 14378–14383. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009198107>
- Braga, L. L., Ninomiya, H., McCoy, J. J., Eacker, S., Wiedmer, T., Pham, C., Wood, S., Sims, P. J., & Petri, W. A. (1992). Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesion of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Investigation*, 90(3), 1131–1137. <https://doi.org/10.1172/JCI115931>
- Brener, Z. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Reviews in Microbiology*, 27(1), 347–382.
- Brittingham, A., Morrison, C. J., McMaster, W. R., McGwire, B. S., Chang, K. P., & Mosser, D. M. (1995). Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *The Journal of Immunology*, 155(6), 3102 LP – 3111. <http://www.jimmunol.org/content/155/6/3102.abstract>
- Brooimans, R. A., van der Ark, A. A. J., Tomita, M., van Es, L. A., & Daha, M. R. (1992). CD59 expressed by human endothelial cells functions as a protective molecule against complement-mediated lysis. *European Journal of Immunology*, 22(3), 791–797. <https://doi.org/10.1002/eji.1830220324>
- Camargo, M. M., Almeida, I. C., Pereira, M. E., Ferguson, M. A., Travassos, L. R., & Gazzinelli, R. T. (1997). Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *The Journal of Immunology*, 158(12), 5890–5901. <https://www.jimmunol.org/content/158/12/5890>
- Campos, M. A. S., Almeida, I. C., Takeuchi, O., Akira, S., Valente, E. P., Procópio, D. O., Travassos, L. R., Smith, J. A., Golenbock, D. T., & Gazzinelli, R. T. (2001). Activation of Toll-Like Receptor-2 by Glycosylphosphatidylinositol Anchors from a Protozoan Parasite. *The Journal of Immunology*, 167(1), 416–423. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.1.416>
- Castillo, M. G., Goodson, M. S., & McFall-Ngai, M. (2009). Identification and molecular characterization of a complement C3 molecule in a lophotrochozoan, the Hawaiian bobtail squid *Euprymna scolopes*. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(1), 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.07.013>
- Castro-Gomes, T., Koushik, A. B., & Andrews, N. W. (2014). ESCRT: Nipping the wound in the bud? *Trends in Biochemical Sciences*, 39(7), 307–309. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.06.001>
- CDC. (2019). *Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease)*. <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/disease.html>
- CDC. (2020). *Malaria Biology*. Global Health, Division of Parasitic Diseases and Malaria. <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html#tabs-1-6>
- CDC. (2021). *Toxoplasmosis (Toxoplasma infection)*. Biology. <https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html>
- Cestari, I., Ansa-Addo, E., Deolindo, P., Inal, J. M., & Ramirez, M. I. (2012). *Trypanosoma cruzi* Immune Evasion Mediated by Host Cell-Derived Microvesicles. *The Journal of Immunology*, 188(4), 1942–1952.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102053>

- Cestari, I., Krarup, A., Sim, R. B., Inal, J. M., & Ramirez, M. I. (2009). Role of early lectin pathway activation in the complement-mediated killing of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular Immunology*, *47*(2–3), 426–437. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.08.030>
- Cestari, I., & Ramirez, M. I. (2010). Inefficient Complement System Clearance of *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Trypomastigotes Enables Resistant Strains to Invade Eukaryotic Cells. *PLoS ONE*, *5*(3), e9721. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009721>
- Chagas, C. (1909). Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *1*(2), 159–218. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761909000200008>
- Chesne, S., Villiers, C. L., Arlaud, G. J., Lacroix, M. B., & Colomb, M. G. (1982). Fluid-phase interaction of C1 inhibitor (C1 Inh) and the subcomponents C1r and C1s of the first component of complement, C1. *Biochemical Journal*, *201*(1), 61–70. <https://doi.org/10.1042/bj2010061>
- Coban, C., Ishii, K. J., Kawai, T., Hemmi, H., Sato, S., Uematsu, S., Yamamoto, M., Takeuchi, O., Itagaki, S., Kumar, N., Horii, T., & Akira, S. (2005). Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *Journal of Experimental Medicine*, *201*(1), 19–25. <https://doi.org/10.1084/jem.20041836>
- Consoli, R. A. G. B., & Oliveira, R. L. de. (1994). *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Editora FIOCRUZ. <https://doi.org/10.7476/9788575412909>
- Corrotte, M., Almeida, P. E., Tam, C., Castro-Gomes, T., Fernandes, M. C., Millis, B. A., Cortez, M., Miller, H., Song, W., Maugel, T. K., & Andrews, N. W. (2013). Caveolae internalization repairs wounded cells and muscle fibers. *ELife*, *2013*(2), 1–30. <https://doi.org/10.7554/eLife.00926>
- Corrotte, M., & Castro-Gomes, T. (2019). Lysosomes and plasma membrane repair. In *Current Topics in Membranes* (1st ed., Vol. 84). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2019.08.001>
- Cunningham, A. C. (2002). Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Experimental and Molecular Pathology*, *72*(2), 132–141. <https://doi.org/10.1006/exmp.2002.2418>
- da Silva, R., & Sacks, D. L. (1987). Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infection and Immunity*, *55*(11), 2802 LP – 2806. <http://iai.asm.org/content/55/11/2802.abstract>
- de la Torre, A., Ize, A., & Schmukler, S. L. (2012). El Desarrollo Financiero en America Latina y el Caribe El Camino por Delante. In *Latin America and Caribbean Studies*. The World Bank. <https://doi.org/doi:10.1596/978-0-8213-9490-8>
- de Veer, M. J., Curtis, J. M., Baldwin, T. M., DiDonato, J. A., Sexton, A., McConville, M. J., Handman, E., & Schofield, L. (2003). MyD88 is essential for clearance

- of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *European Journal of Immunology*, 33(10), 2822–2831.
<https://doi.org/10.1002/eji.200324128>
- Debierre-Grockiego, F., Azzouz, N., Schmidt, J., Dubremetz, J.-F., Geyer, H., Geyer, R., Weingart, R., Schmidt, R. R., & Schwarz, R. T. (2003). Roles of Glycosylphosphatidylinositols of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(35), 32987–32993. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304791200>
- Dias, J. C. P. (1984). Acute Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 79(suppl), 85–92.
- Dishaw, L. J., Smith, S. L., & Bigger, C. H. (2005). Characterization of a C3-like cDNA in a coral: phylogenetic implications. *Immunogenetics*, 57(7), 535–548.
<https://doi.org/10.1007/s00251-005-0005-1>
- Dobell, C. (1932). Antony van Leeuwenhoek and his "Little Animals.". In *John Bale, Sons & Danielsson, Ltd.* John Bale, Sons & Danielsson, Ltd.
- Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., & Moreno, S. N. J. (2005). Acidocalcisomes? conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 251–261. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1097>
- Dubey, J.P. (2020). The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*. In *Toxoplasma gondii* (pp. 1–19). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815041-2.00001-3>
- Dubey, J.P. (1998). Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 28(7), 1019–1024. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00023-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00023-X)
- Dubey, Jittender P. (2008). The History of *Toxoplasma gondii*—The First 100 Years. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 55(6), 467–475.
<https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00345.x>
- Dvorin, J. D., Martyn, D. C., Patel, S. D., Grimley, J. S., Collins, C. R., Hopp, C. S., Bright, A. T., Westenberger, S., Winzeler, E., Blackman, M. J., Baker, D. A., Wandless, T. J., & Duraisingh, M. T. (2010). A Plant-Like Kinase in *Plasmodium falciparum* Regulates Parasite Egress from Erythrocytes. *Science*, 328(5980), 910–912. <https://doi.org/10.1126/science.1188191>
- Eddleman, C. S., Ballinger, M. L., Smyers, M. E., Fishman, H. M., & Bittner, G. D. (1998). Endocytotic formation of vesicles and other membranous structures induced by Ca²⁺ and axolemmal injury. *Journal of Neuroscience*, 18(11), 4029–4041. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-11-04029.1998>
- Engstler, M. (2004). Cold shock and regulation of surface protein trafficking convey sensitization to inducers of stage differentiation in *Trypanosoma brucei*. *Genes & Development*, 18(22), 2798–2811. <https://doi.org/10.1101/gad.323404>
- Engstler, Markus, Pfohl, T., Herminghaus, S., Boshart, M., Wiegertjes, G., Heddergott, N., & Overath, P. (2007). Hydrodynamic Flow-Mediated Protein Sorting on the Cell Surface of Trypanosomes. *Cell*, 131(3), 505–515.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.046>
- Eschenlauer, S. C. P., Faria, M. S., Morrison, L. S., Bland, N., Ribeiro-Gomes, F. L., DosReis, G. A., Coombs, G. H., Lima, A. P. C. A., & Mottram, J. C. (2009).

- Influence of parasite encoded inhibitors of serine peptidases in early infection of macrophages with *Leishmania major*. *Cellular Microbiology*, *11*(1), 106–120. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01243.x>
- Evans-Osses, I., Ansa-Addo, E. A., Inal, J. M., & Ramirez, M. I. (2010). Involvement of lectin pathway activation in the complement killing of *Giardia intestinalis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *395*(3), 382–386. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.025>
- Ferguson, D. J. . (2002). *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? *Trends in Parasitology*, *18*(8), 351–355. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02330-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02330-9)
- Ferreira, V., Molina, M. C., Valck, C., Rojas, Á., Aguilar, L., Ramírez, G., Schwaeble, W., & Ferreira, A. (2004). Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts. *Molecular Immunology*, *40*(17), 1279–1291. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.11.018>
- Ferreira, V., Valck, C., Sánchez, G., Gingras, A., Tzima, S., Molina, M. C., Sim, R., Schwaeble, W., & Ferreira, A. (2004). The Classical Activation Pathway of the Human Complement System Is Specifically Inhibited by Calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Immunology*, *172*(5), 3042–3050. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.3042>
- Fischer, E., Ouaiissi, M. A., Velge, P., Cornette, J., & Kazatchkine, M. D. (1988). gp 58/68, a parasite component that contributes to the escape of the trypomastigote form of *T. cruzi* from damage by the human alternative complement pathway. *Immunology*, *65*(2), 299–303. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2973433>
- Franke, E. D., McGreevy, P. B., Katz, S. P., & Sacks, D. L. (1985). Growth cycle-dependent generation of complement-resistant *Leishmania* promastigotes. *The Journal of Immunology*, *134*(4), 2713 LP – 2718. <http://www.jimmunol.org/content/134/4/2713.abstract>
- Fuhrman, S. A., & Joiner, K. A. (1989). *Toxoplasma gondii*: mechanism of resistance to complement-mediated killing. *The Journal of Immunology*, *142*(3), 940–947.
- Garlatti, V., Belloy, N., Martin, L., Lacroix, M., Matsushita, M., Endo, Y., Fujita, T., Fontecilla-Camps, J. C., Arlaud, G. J., Thielens, N. M., & Gaboriaud, C. (2007). Structural insights into the innate immune recognition specificities of L- and H-ficolins. *The EMBO Journal*, *26*(2), 623–633. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601500>
- Gatto, M., de Abreu, M. M., Tasca, K. I., de Assis Golim, M., da Silva, L. D. M., Simão, J. C., Fortaleza, C. M. C. B., de Campos Soares, Â. M. V., & Calvi, S. A. (2015). The Involvement of TLR2 and TLR4 in Cytokine and Nitric Oxide Production in Visceral Leishmaniasis Patients before and after Treatment with Anti-Leishmanial Drugs. *PLOS ONE*, *10*(2), e0117977. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117977>
- Gazzinelli, R. T., & Denkers, E. Y. (2006). Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nature Reviews Immunology*, *6*(12), 895–906. <https://doi.org/10.1038/nri1978>
- Gigli, I., & Austen, K. F. (1971). Phylogeny and Function of the Complement System. *Annual Review of Microbiology*, *25*(1), 309–332.

<https://doi.org/10.1146/annurev.mi.25.100171.001521>

- Gigli, I., Fujita, T., & Nussenzweig, V. (1979). Modulation of the classical pathway C3 convertase by plasma proteins C4 binding protein and C3b inactivator. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(12), 6596–6600. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.12.6596>
- Gillin, F. D., & Sher, A. (1981). Activation of the alternative complement pathway by *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity*, 34(1), 268 LP – 273. <http://iai.asm.org/content/34/1/268.abstract>
- Goldenberg, S., & Ávila, A. R. (2011). Aspects of *Trypanosoma cruzi* Stage Differentiation. In *Advances in Parasitology* (pp. 285–305). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385863-4.00013-7>
- Gomes, A. P., Vitorino, R. R., Costa, A. de P., Mendonça, E. G. de, Oliveira, M. G. de A., & Siqueira-Batista, R. (2011). Malária grave por *Plasmodium falciparum*. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, 23(3), 358–369. <https://doi.org/10.1590/S0103-507X2011000300015>
- Gómez, J., Cortés, J., Cuervo, S., & López, M. C. (2007). Amebiasis intestinal. *Infectio*, 11(1), 36–45.
- Gontijo, B., & De Carvalho, M. de L. R. (2003). American cutaneous leishmaniasis. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(1), 71–80. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822003000100011>
- Gossage, S. M., Rogers, M. E., & Bates, P. A. (2003). Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies : implications for understanding the life cycle. *International Journal for Parasitology*, 33(11), 1027–1034. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(03\)00142-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00142-5)
- Gould, S. J., & Vrba, E. S. (1982). Exaptation—a Missing Term in the Science of Form. *Paleobiology*, 8(1), 4–15. <https://doi.org/10.1017/S0094837300004310>
- Green, P. J., Feizi, T., Stoll, M. S., Thiel, S., Prescott, A., & McConville, M. J. (1994). Recognition of the major cell surface glycoconjugates of *Leishmania* parasites by the human serum mannan-binding protein. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 66(2), 319–328. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(94\)90158-9](https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)90158-9)
- Handman, E., & Bullen, D. V. . (2002). Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. In *Trends in Parasitology* (Vol. 18, Issue 8, pp. 332–334). [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02352-8](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02352-8)
- Heilbrunn, L. V. (1956). *The Dynamics of Living Protoplasm*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-12539-1>
- Hermoso, T., Fishelson, Z., Becker, S. I., Hirschberg, K., & Jaffe, C. L. (1991). Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system. *The EMBO Journal*, 10(13), 4061–4067. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb04982.x>
- Hoare, C. A. (1938). Early discoveries regarding the parasite of oriental sore. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 32(1), 66–92. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(38\)90097-5](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(38)90097-5)

- Hofer, U. (2019). The cat is out the bag about *Toxoplasma* host range. *Nature Reviews Microbiology*, *17*(11), 646–647. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0266-6>
- Hogan, M., Yoneda, C., Feeney, L., Zweigart, P., & Lewis, A. (1960). Morphology and Culture of *Toxoplasma*. *Archives of Ophthalmology*, *64*(5), 655–667. <https://doi.org/10.1001/archopht.1960.01840010657006>
- Holbrook, T. W., Boackle, R. J., Parker, B. W., & Vesely, J. (1980). Activation of the alternative complement pathway by *Naegleria fowleri*. *Infection and Immunity*, *30*(1), 58 LP – 61. <http://iai.asm.org/content/30/1/58.abstract>
- Holmskov, U., Thiel, S., & Jensenius, J. C. (2003). Collectins and Ficolins: Humoral Lectins of the Innate Immune Defense. *Annual Review of Immunology*, *21*(1), 547–578. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.140954>
- Holopainen, J. M., Angelova, M. I., & Kinnunen, P. K. J. (2000). Vectorial budding of vesicles by asymmetrical enzymatic formation of ceramide in giant liposomes. *Biophysical Journal*, *78*(2), 830–838. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76640-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76640-9)
- Hoover, D. L., Berger, M., Nacy, C. A., Hockmeyer, W. T., & Meltzer, M. S. (1984). Killing of *Leishmania tropica* amastigotes by factors in normal human serum. *The Journal of Immunology*, *132*(2), 893 LP – 897. <http://www.jimmunol.org/content/132/2/893.abstract>
- Horn, A., & Jaiswal, J. K. (2018). Cellular mechanisms and signals that coordinate plasma membrane repair. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *75*(20), 3751–3770. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2888-7>
- Idone, V., Tam, C., Goss, J. W., Toomre, D., Pypaert, M., & Andrews, N. W. (2008). Repair of injured plasma membrane by rapid Ca²⁺ dependent endocytosis. *Journal of Cell Biology*, *180*(5), 905–914. <https://doi.org/10.1083/jcb.200708010>
- Ilgoutz, S. C. (1999). Glycosylphosphatidylinositol biosynthetic enzymes are localized to a stable tubular subcompartment of the endoplasmic reticulum in *Leishmania mexicana*. *The EMBO Journal*, *18*(13), 3643–3654. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.13.3643>
- Inal, J. M., Hui, K.-M., Miot, S., Lange, S., Ramirez, M. I., Schneider, B., Krueger, G., & Schifferli, J.-A. (2005). Complement C2 Receptor Inhibitor Trispanning: A Novel Human Complement Inhibitory Receptor. *The Journal of Immunology*, *174*(1), 356–366. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.1.356>
- Inal, J. M., & Schifferli, J. A. (2002). Complement C2 Receptor Inhibitor Trispanning and the β -Chain of C4 Share a Binding Site for Complement C2. *The Journal of Immunology*, *168*(10), 5213–5221. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.10.5213>
- Iwanaga, S. (2002). The molecular basis of innate immunity in the horseshoe crab. *Current Opinion in Immunology*, *14*(1), 87–95. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(01\)00302-8](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(01)00302-8)
- Jaiswal, J. K., Andrews, N. W., & Simon, S. M. (2002). Membrane proximal lysosomes are the major vesicles responsible for calcium-dependent exocytosis in nonsecretory cells. *Journal of Cell Biology*, *159*(4), 625–635. <https://doi.org/10.1083/jcb.200208154>

- Jaiswal, J. K., Chakrabarti, S., Andrews, N. W., & Simon, S. M. (2004). Synaptotagmin VII restricts fusion pore expansion during lysosomal exocytosis. *PLoS Biology*, 2(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020233>
- Janeway, C. A., & Medzhitov, R. (2002a). Innate Immune Recognition. *Annual Review of Immunology*, 20(1), 197–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>
- Janeway, C. A., & Medzhitov, R. (2002b). Innate Immune Recognition. *Annual Review of Immunology*, 20(1), 197–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>
- Ji, X., Azumi, K., Sasaki, M., & Nonaka, M. (1997). Ancient origin of the complement lectin pathway revealed by molecular cloning of mannan binding protein-associated serine protease from a urochordate, the Japanese ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(12), 6340–6345. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.12.6340>
- Jimenez, A. J., Maiuri, P., Lafaurie-Janvore, J., Divoux, S., Piel, M., & Perez, F. (2014). ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. *Science*, 343(6174). <https://doi.org/10.1126/science.1247136>
- Jokiranta, T. S., Jokipii, L., & Meri, S. (1995). Complement Resistance of Parasites. *Scandinavian Journal of Immunology*, 42(1), 9–20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1995.tb03620.x>
- Kalb, L., Antunes Frederico, Y., Batista, C., Eger, I., Fragoso, S., & Soares, M. (2014). Clathrin expression in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Cell Biology*, 15(1), 23. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-15-23>
- Kane, M. M., & Mosser, D. M. (2000). Leishmania parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Current Opinion in Hematology*, 7(1). https://journals.lww.com/co-hematology/Fulltext/2000/01000/Leishmania_parasites_and_their_ploys_to_disrupt.6.aspx
- Kean, B. H. (1988). A history of amebiasis. *Amebiasis; Human Infection by Entamoeba Histolytica*, 1–10.
- Kennedy, A. T., Schmidt, C. Q., Thompson, J. K., Weiss, G. E., Taechalertpaisarn, T., Gilson, P. R., Barlow, P. N., Crabb, B. S., Cowman, A. F., & Tham, W.-H. (2016). Recruitment of Factor H as a Novel Complement Evasion Strategy for Blood-Stage *Plasmodium falciparum* Infection. *The Journal of Immunology*, 196(3), 1239–1248. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501581>
- Kennedy, A. T., Wijeyewickrema, L. C., Huglo, A., Lin, C., Pike, R., Cowman, A. F., & Tham, W.-H. (2017). Recruitment of Human C1 Esterase Inhibitor Controls Complement Activation on Blood Stage *Plasmodium falciparum* Merozoites. *The Journal of Immunology*, 198(12), 4728–4737. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700067>
- Kierszenbaum, F. (2007). Mechanisms of pathogenesis in Chagas disease. *Acta Parasitologica*, 52(1), 1–12. <https://doi.org/10.2478/s11686-006-0048-y>
- Kishore, U., Ghai, R., Greenhough, T. J., Shrive, A. K., Bonifati, D. M., Gadjeva, M.

- G., Waters, P., Kojouharova, M. S., Chakraborty, T., & Agrawal, A. (2004). Structural and functional anatomy of the globular domain of complement protein C1q. *Immunology Letters*, *95*(2), 113–128. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2004.06.015>
- Klabunde, J., Uhlemann, A.-C., Tebo, A. E., Kimmel, J., Schwarz, R. T., Kremsner, P. G., & Kun, J. F. (2002). Recognition of Plasmodium falciparum proteins by mannan-binding lectin, a component of the human innate immune system. *Parasitology Research*, *88*(2), 113–117. <https://doi.org/10.1007/s00436-001-0518-y>
- Kleffmann, T., Schmidt, J., & Schaub, G. A. (1998). Attachment of Trypanosoma cruzi Epimastigotes to Hydrophobic Substrates and Use of this Property to Separate Stages and Promote Metacyclogenesis. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, *45*(5), 548–555. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1998.tb05115.x>
- Kollien, A., & Schaub, G. (2000). The Development of Trypanosoma cruzi in Triatominae. *Parasitology Today*, *16*(9), 381–387. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01724-5](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01724-5)
- Konishi, E. (1993). Naturally occurring antibodies that react with protozoan parasites. *Parasitology Today*, *9*(10), 361–364. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(93\)90083-R](https://doi.org/10.1016/0169-4758(93)90083-R)
- Krarup, A., Mitchell, D. A., & Sim, R. B. (2008). Recognition of acetylated oligosaccharides by human L-ficolin. *Immunology Letters*, *118*(2), 152–156. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2008.03.014>
- Krishnegowda, G., Hajjar, A. M., Zhu, J., Douglass, E. J., Uematsu, S., Akira, S., Woods, A. S., & Gowda, D. C. (2005). Induction of Proinflammatory Responses in Macrophages by the Glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(9), 8606–8616. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413541200>
- Kuhlman, M., Joiner, K., & Ezekowitz, R. A. (1989). The human mannose-binding protein functions as an opsonin. *Journal of Experimental Medicine*, *169*(5), 1733–1745. <https://doi.org/10.1084/jem.169.5.1733>
- Laison, R., & Shaw, J. J. (2005). New World leishmaniasis. In F.E.G. Cox (Ed.), *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections* (10th ed., p. 883).
- Lambris, J., & Holers, V. (2000). *Therapeutic Interventions in the Complement System* (J. D. Lambris & V. M. Holers. (eds.); Humana Pre). <https://doi.org/https://doi.org.ez27.periodicos.capes.gov.br/10.1007/978-1-59259-017-9>
- Landfear, S. M., & Ignatushchenko, M. (2001). The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *115*(1), 1–17. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00262-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00262-6)
- Lee, S. T., Tarn, C., & Chang, K. P. (1993). Characterization of the switch of kinetoplast DNA minicircle dominance during development and reversion of drug resistance in Leishmania. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *58*(2), 187–203. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(93\)90041-U](https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90041-U)

- Lee, S. T., Tarn, C., & Wang, C. Y. (1992). Characterization of sequence changes in kinetoplast DNA maxicircles of drug-resistant *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *56*(2), 197–207. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(92\)90169-K](https://doi.org/10.1016/0166-6851(92)90169-K)
- Leishman, W. B. (1903). On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *British Medical Journal*, *1*(2213), 1252–1254. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.2213.1252>
- Lesavre, P. H., & Müller-Eberhard, H. J. (1978). Mechanism of action of factor D of the alternative complement pathway. *Journal of Experimental Medicine*, *148*(6), 1498–1509. <https://doi.org/10.1084/jem.148.6.1498>
- Leung, K. F., Dacks, J. B., & Field, M. C. (2008). Evolution of the Multivesicular Body ESCRT Machinery; Retention Across the Eukaryotic Lineage. *Traffic*, *9*(10), 1698–1716. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00797.x>
- Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E. G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., Leedale, G. F., LOEBLICH, A. R., LOM, I. J., LYNN, D., Merinfeld, E. G., Page, F. C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., & Wallace, F. G. (1980). A Newly Revised Classification of the Protozoa*. *The Journal of Protozoology*, *27*(1), 37–58. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1980.tb04228.x>
- Ley, V., Andrews, N. W., Robbins, E. S., & Nussenzweig, V. (1988). Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *Journal of Experimental Medicine*, *168*(2), 649–659. <https://doi.org/10.1084/jem.168.2.649>
- Ley, V., Robbins, E. S., Nussenzweig, V., & Andrews, N. W. (1990). The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *Journal of Experimental Medicine*, *171*(2), 401–413. <https://doi.org/10.1084/jem.171.2.401>
- Li, R., Blanchette-Mackie, E. J., & Ladisch, S. (1999). Induction of endocytic vesicles by exogenous C6-ceramide. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(30), 21121–21127. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.30.21121>
- Lidani, K. C. F., Andrade, F. A., Bavia, L., Damasceno, F. S., Beltrame, M. H., Messias-Reason, I. J., & Sandri, T. L. (2019). Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Frontiers in Public Health*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00166>
- Liszewski, M. K., Post, T. W., & Atkinson, J. P. (1991). Membrane Cofactor Protein (MCP or CD46): Newest Member of the Regulators of Complement Activation Gene Cluster. *Annual Review of Immunology*, *9*(1), 431–455. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.09.040191.002243>
- Los, F. C. O., Kao, C. Y., Smitham, J., McDonald, K. L., Ha, C., Peixoto, C. A., & Aroian, R. V. (2011). RAB-5- and RAB-11-dependent vesicle-trafficking pathways are required for plasma membrane repair after attack by bacterial pore-forming toxin. *Cell Host and Microbe*, *9*(2), 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.01.005>
- Lublin, D. M., Liszewski, M. K., Post, T. W., Arce, M. A., Le Beau, M. M., Rebentisch, M. B., Lemons, L. S., Seya, T., & Atkinson, J. P. (1988). Molecular cloning and chromosomal localization of human membrane cofactor protein (MCP). Evidence

- for inclusion in the multigene family of complement-regulatory proteins. *Journal of Experimental Medicine*, 168(1), 181–194. <https://doi.org/10.1084/jem.168.1.181>
- Marchensini, N., Luo, S., Rodrigues, C. O., Moreno, S. N. J., & Docampo, R. (2000). Acidocalcisomes and a vacuolar H⁺-pyrophosphatase in malaria parasites. *Biochemical Journal*, 347(1), 243–253. <https://doi.org/10.1042/bj3470243>
- Matsushita, M., Thiel, S., Jensenius, J. C., Terai, I., & Fujita, T. (2000). Proteolytic Activities of Two Types of Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease. *The Journal of Immunology*, 165(5), 2637–2642. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.5.2637>
- McGuinness, D. H., Dehal, P. K., & Pleass, R. J. (2003). Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites. *Trends in Parasitology*, 19(7), 312–319. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(03\)00123-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(03)00123-5)
- McNeil, P. L. (1993). Cellular and molecular adaptations to injurious mechanical stress. *Trends in Cell Biology*, 3(9), 302–307. [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(93\)90012-P](https://doi.org/10.1016/0962-8924(93)90012-P)
- McNeil, P. L., & Khakee, R. (1992). Disruptions of muscle fiber plasma membranes: Role in exercise-induced damage. *American Journal of Pathology*, 140(5), 1097–1109.
- McNeil, P. L., & Kirchhausen, T. (2005). An emergency response team for membrane repair. *Molecular Cell*, 6, 499–505.
- McNeil, P. L., Vogel, S. S., Miyake, K., & Terasaki, M. (2000). Patching plasma membrane disruptions with cytoplasmic membrane. *Journal of Cell Science*, 113(11), 1891–1902.
- Medof, M. E., Iida, K., Mold, C., & Nussenzweig, V. (1982). Unique role of the complement receptor CR1 in the degradation of C3b associated with immune complexes. *Journal of Experimental Medicine*, 156(6), 1739–1754. <https://doi.org/10.1084/jem.156.6.1739>
- Medof, M. E., Kinoshita, T., & Nussenzweig, V. (1984). Inhibition of complement activation on the surface of cells after incorporation of decay-accelerating factor (DAF) into their membranes. *Journal of Experimental Medicine*, 160(5), 1558–1578. <https://doi.org/10.1084/jem.160.5.1558>
- Milder, R., & Deane, M. P. (1969). The Cytostome of *Trypanosoma cruzi* and *T. conorhini**. *The Journal of Protozoology*, 16(4), 730–737. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1969.tb02335.x>
- Milis, L., Morris, C. A., Shennan, M. C., Charlesworth, J. A., & Pussell, B. A. (1993). Vitronectin-mediated inhibition of complement: evidence for different binding sites for C5b-7 and C9. *Clinical & Experimental Immunology*, 92(1), 114–119. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1993.tb05956.x>
- Ministério da Saúde. (2006). *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. Secretaria de Vigilância em Saúde.
- Ministério da Saúde. (2017). *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. In *Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde*.

- Miranda, K., Docampo, R., Grillo, O., Franzen, A., Attias, M., Vercesi, A., Plattner, H., Hentschel, J., & de Souza, W. (2004). Dynamics of polymorphism of acidocalcisomes in *Leishmania* parasites. *Histochemistry and Cell Biology*, *121*(5), 407–418. <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0646-4>
- Miyake, K., & McNeil, P. L. (1995). Vesicle accumulation and exocytosis at sites of plasma membrane disruption. *Journal of Cell Biology*, *131*(6 II), 1737–1745. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.6.1737>
- Moffitt, J. E., Venarske, D., Goddard, J., Yates, A. B., & DeShazo, R. D. (2003). Allergic reactions to *Triatoma* bites. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, *91*(2), 122–128. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)62165-5](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)62165-5)
- Monzote, L., & Siddiq, A. (2011). Drug Development to Protozoan Diseases. *The Open Medicinal Chemistry Journal*, *5*, 1–3. <https://doi.org/10.2174/1874104501105010001>
- Moreno, S. N. J., & Zhong, L. (1996). Acidocalcisomes in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Biochemical Journal*, *313*(2), 655–659. <https://doi.org/10.1042/bj3130655>
- Muller-Eberhard, H. J. (1985). The killer molecule of complement. *Journal of Investigative Dermatology*, *85*(SUPPL. 1), S47–S52. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12275445>
- Müller-Eberhard, H. J., & Götze, O. (1972). C3 PROACTIVATOR CONVERTASE AND ITS MODE OF ACTION. *Journal of Experimental Medicine*, *135*(4), 1003–1008. <https://doi.org/10.1084/jem.135.4.1003>
- Mullin, K. A., Foth, B. J., Ilgoutz, S. C., Callaghan, J. M., Zawadzki, J. L., McFadden, G. I., & McConville, M. J. (2001). Regulated Degradation of an Endoplasmic Reticulum Membrane Protein in a Tubular Lysosome in *Leishmania mexicana*. *Molecular Biology of the Cell*, *12*(8), 2364–2377. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.8.2364>
- Muniz, J., & Borriello, A. (1945). Estudo sobre a ação Litica De Diferentes soros sobre as Formas De Cultura E Sanguícolas Do *Schizotrypanum Cruzi*. *Revista Brasileira de Biologia*, *5*, 563–576.
- Nair, S. V., Pearce, S., Green, P. L., Mahajan, D., Newton, R. A., & Raftos, D. A. (2000). A collectin-like protein from tunicates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *125*(2), 279–289. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(99\)00180-7](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(99)00180-7)
- Neves, D. P. (2016). *PARASITOLOGIA HUMANA* (13 ed). Editora Atheneu.
- Nichols, B. J., & Pelham, H. R. . (1998). SNAREs and membrane fusion in the Golgi apparatus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1404*(1–2), 9–31. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(98\)00044-5](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(98)00044-5)
- Nicholson-Weller, A., Burge, J., Fearon, D. T., Weller, P. F., & Austen, K. F. (1982). Isolation of a human erythrocyte membrane glycoprotein with decay-accelerating activity for C3 convertases of the complement system. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *129*(1), 184–189. <http://europepmc.org/abstract/MED/6211481>

- Nonaka, M. (2001). Evolution of the complement system. *Current Opinion in Immunology*, 13(1), 69–73. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(00\)00184-9](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(00)00184-9)
- Nonaka, M. (2014). Evolution of the Complement System. In *MACPF/CDC Proteins - Agents of Defence, Attack and Invasion* (pp. 31–43). https://doi.org/10.1007/978-94-017-8881-6_3
- Norris, K. A., Bradt, B., Cooper, N. R., & So, M. (1991). Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. *The Journal of Immunology*, 147(7), 2240–2247.
- Norris, K. A., Harth, G., & So, M. (1989). Purification of a *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein which elicits lytic antibodies. *Infection and Immunity*, 57(8), 2372–2377. <https://doi.org/10.1128/IAI.57.8.2372-2377.1989>
- Norris, K. A., & Schrimpf, J. E. (1994). Biochemical analysis of the membrane and soluble forms of the complement regulatory protein of *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*, 62(1), 236 LP – 243. <http://iai.asm.org/content/62/1/236.abstract>
- Nunes, A. C., Almeida-campos, F. R., Horta, M. F., & Ramalho-pinto, F. J. (1997). *Leishmania amazonensis* promastigotes evade complement killing by interfering with the late steps of the cascade. *Parasitology*, 115(6), 601–609. <https://doi.org/10.1017/S0031182097001704>
- Ouaissi, A., Guilvard, E., Delneste, Y., Caron, G., Magistrelli, G., Herbault, N., Thieblemont, N., & Jeannin, P. (2002). The *Trypanosoma cruzi* Tc52-Released Protein Induces Human Dendritic Cell Maturation, Signals Via Toll-Like Receptor 2, and Confers Protection Against Lethal Infection. *The Journal of Immunology*, 168(12), 6366–6374. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.12.6366>
- Ouaissi, M. A., Cornette, J., & Capron, A. (1986). Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 19(3), 201–211. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(86\)90002-2](https://doi.org/10.1016/0166-6851(86)90002-2)
- Pal, A., Hall, B. S., Jefries, T. R., & Field, M. C. (2003). Rab5 and Rab11 mediate transferrin and anti-variant surface glycoprotein antibody recycling in *Trypanosoma brucei*. *Biochemical Journal*, 374(2), 443–451. <https://doi.org/10.1042/bj20030469>
- Pangburn, M. K., Ferreira, V. P., & Cortes, C. (2008). Discrimination between host and pathogens by the complement system. *Vaccine*, 26(SUPPL. 8), 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.11.023>
- Pangburn, M. K., & Müller-Eberhard, H. J. (1984). The alternative pathway of complement. *Springer Seminars in Immunopathology*, 7(2–3), 163–192. <https://doi.org/10.1007/BF01893019>
- Pates, H. V. (2002). *Zoophilic and anthropophilic behaviour in the Anopheles gambiae complex* [London School of Hygiene & Tropical Medicine]. <https://doi.org/DOI:https://doi.org/10.17037/PUBS.00682251>
- Paula C.A. Lima, A. (2010). Trypanosomatid-Encoded Inhibitors of Peptidases: Unique

Structural Features and Possible Roles as Virulence Factors. *The Open Parasitology Journal*, 4(1), 132–138.
<https://doi.org/10.2174/1874421401004010132>

- Peters, N. C., Egen, J. G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., Lawyer, P., Fay, M. P., Germain, R. N., & Sacks, D. (2008). In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. *Science*, 321(5891), 970–974. <https://doi.org/10.1126/science.1159194>
- Pinilla, A. E., López, M. C., & Viasus, D. F. (2008). Historia del protozoo *Entamoeba histolytica*. *Revista Médica de Chile*, 136(1). <https://doi.org/10.4067/S0034-98872008000100015>
- Prado-Alvarez, M., Rotllant, J., Gestal, C., Novoa, B., & Figueras, A. (2009). Characterization of a C3 and a factor B-like in the carpet-shell clam, *Ruditapes decussatus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 26(2), 305–315.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.11.015>
- Puentes, S. M., Da Silva, R. P., Sacks, D. L., Hammer, C. H., & Joiner, K. A. (1990). Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *The Journal of Immunology*, 145(12), 4311 LP – 4316.
<http://www.jimmunol.org/content/145/12/4311.abstract>
- Puentes, S. M., Sacks, D. L., da Silva, R. P., & Joiner, K. A. (1988). Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. *Journal of Experimental Medicine*, 167(3), 887–902. <https://doi.org/10.1084/jem.167.3.887>
- Ramírez, F., Mendoza-Macías, C., Andrade-Guillén, S., Rangel-Serrano, A., Páramo-Pérez, I., Rivera-Cuéllar, P. E., España-Sánchez, B. L., Luna-Bárceñas, G., Anaya-Velázquez, F., Franco, B., & Padilla-Vaca, F. (2019). Plasma membrane damage repair is mediated by an acid sphingomyelinase in *Entamoeba histolytica*. In *PLoS Pathogens* (Vol. 15, Issue 8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008016>
- Rassi, A., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
- Reddy, A., Caler, E. V., & Andrews, N. W. (2001). Plasma membrane repair is mediated by Ca²⁺-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell*, 106(2), 157–169.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00421-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00421-4)
- Reed, S. L., Ember, J. A., Herdman, D. S., DiScipio, R. G., Hugli, T. E., & Gigli, I. (1995). The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylatoxins C3a and C5a. *The Journal of Immunology*, 155(1), 266–274.
- Ribeiro, J. M. (1987). Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annual Review of Entomology*, 32(1), 463–478.
- Ribeiro, J. M. (1995). Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infectious Agents and Disease*, 4(3), 143–152.
- Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., & Lambris, J. D. (2010). Complement: A key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature Immunology*, 11(9), 785–797. <https://doi.org/10.1038/ni.1923>

- Riehle, M. M. (2006). Natural Malaria Infection in *Anopheles gambiae* Is Regulated by a Single Genomic Control Region. *Science*, *312*(5773), 577–579. <https://doi.org/10.1126/science.1124153>
- Rimoldi, M. T., Sher, A., Heiny, S., Lituchy, A., Hammer, C. H., & Joiner, K. (1988). Developmentally regulated expression by *Trypanosoma cruzi* of molecules that accelerate the decay of complement C3 convertases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *85*(1), 193–197. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.1.193>
- Ritter, U., Meißner, A., Scheidig, C., & Körner, H. (2004). CD8 α - and Langerin-negative dendritic cells, but not Langerhans cells, act as principal antigen-presenting cells in leishmaniasis. *European Journal of Immunology*, *34*(6), 1542–1550. <https://doi.org/10.1002/eji.200324586>
- Roberts, D. J., Craig, Berendt, A. R., Pinches, R., Nash, G., Marsh, K., & Newbold, C. I. (1992). Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. *Nature*, *357*(6380), 689–692. <https://doi.org/10.1038/357689a0>
- Rocha, L. L. (2020). *Parasitologia 2: Protozoários de Interesse Médico*.
- Rogers, M. E., Ilg, T., Nikolaev, A. V., Ferguson, M. A. J., & Bates, P. A. (2004). Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*, *430*(6998), 463–467. <https://doi.org/10.1038/nature02675>
- Rohoušová, I., & Volf, P. (2006). Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. *Folia Parasitol*, *53*(3), 161–171.
- Rothschild, L. J. (1989). Protozoa, Protista, Protoctista: what's in a name? *Journal of the History of Biology*, *22*(2), 277–305.
- Roumenina, L. T., Popov, K. T., Bureeva, S. V., Kojouharova, M., Gadjeva, M., Rabheru, S., Thakrar, R., Kaplun, A., & Kishore, U. (2008). Interaction of the globular domain of human C1q with *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, *1784*(9), 1271–1276. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.04.029>
- Rowe, J. A., Moulds, J. M., Newbold, C. I., & Miller, L. H. (1997). *P. falciparum* rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. *Nature*, *388*(6639), 292–295. <https://doi.org/10.1038/40888>
- Rowe, J. A., Rogerson, S. J., Raza, A., Moulds, J. M., Kazatchkine, M. D., Marsh, K., Newbold, C. I., Atkinson, J. P., & Miller, L. H. (2000). Mapping of the Region of Complement Receptor (CR) 1 Required for *Plasmodium falciparum* Rosetting and Demonstration of the Importance of CR1 in Rosetting in Field Isolates. *The Journal of Immunology*, *165*(11), 6341–6346. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.11.6341>
- Ryan, K. A., Garraway, L. A., Descoteaux, A., Turco, S. J., & Beverley, S. M. (1993). Isolation of virulence genes directing surface glycosyl-phosphatidylinositol synthesis by functional complementation of *Leishmania*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*(18), 8609–8613. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.18.8609>
- Sacks, D., & Sher, A. (2002). Evasion of innate immunity by vaccinia virus. *Nature*

- Immunology*, 3(11), 1041–1047. <https://doi.org/10.1017/S0031182005008127>
- Sacks, D L., Brodin, T. N., & Turco, S. J. (1990). Developmental modification of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes during metacyclogenesis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 42(2), 225–233. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(90\)90165-I](https://doi.org/10.1016/0166-6851(90)90165-I)
- Sacks, D L. (1992). The structure and function of the surface lipophosphoglycan on different developmental stages of *Leishmania* promastigotes. *Infectious Agents and Disease*, 1(4), 200–206.
- Sacks, David L, Pimenta, P. F. P., McConville, M. J., Schneider, P., & Turco, S. J. (1995). Stage-specific binding of *leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *Journal of Experimental Medicine*, 181(2), 685–697. <https://doi.org/10.1084/jem.181.2.685>
- Sakthianandeswaren, A., Foote, S. J., & Handman, E. (2009). The role of host genetics in leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, 25(8), 383–391. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.05.004>
- Scharfstein, J., Ferreira, A., Gigli, I., & Nussenzweig, V. (1978). Human C4-binding protein. I. Isolation and characterization. *Journal of Experimental Medicine*, 148(1), 207–222. <https://doi.org/10.1084/jem.148.1.207>
- Schreiber, R. D., & Feldman, H. A. (1980). Identification of the Activator System for Antibody to *Toxoplasma* as the Classical Complement Pathway. *Journal of Infectious Diseases*, 141(3), 366–369. <https://doi.org/10.1093/infdis/141.3.366>
- Scott, D. A., Docampo, R., Dvorak, J. A., Shi, S., & Leapman, R. D. (1997). In Situ Compositional Analysis of Acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(44), 28020–28029. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.44.28020>
- Sekiguchi, R., Fujito, N. T., & Nonaka, M. (2012). Evolution of the thioester-containing proteins (TEPs) of the arthropoda, revealed by molecular cloning of TEP genes from a spider, *Hasarius adansonii*. *Developmental & Comparative Immunology*, 36(2), 483–489. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.05.003>
- Shoda, L. K. M., Kegerreis, K. A., Suarez, C. E., Roditi, I., Corral, R. S., Bertot, G. M., Norimine, J., & Brown, W. C. (2001). DNA from Protozoan Parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei* Is Mitogenic for B Lymphocytes and Stimulates Macrophage Expression of Interleukin-12, Tumor Necrosis Factor Alpha, and Nitric Oxide. *Infection and Immunity*, 69(4), 2162–2171. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2162-2171.2001>
- Sikorski, P. M., Commodaro, A. G., & Grigg, M. E. (2020). *Toxoplasma gondii* Recruits Factor H and C4b-Binding Protein to Mediate Resistance to Serum Killing and Promote Parasite Persistence in vivo. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03105>
- Silverman, J. M., Clos, J., De'Oliveira, C. C., Shirvani, O., Fang, Y., Wang, C., Foster, L. J., & Reiner, N. E. (2010). An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *Journal of Cell Science*, 123(6), 842–852. <https://doi.org/10.1242/jcs.056465>

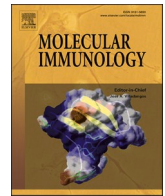
- Silverman, J. S., Muratore, K. A., & Bangs, J. D. (2013). Characterization of the Late Endosomal ESCRT Machinery in *Trypanosoma brucei*. *Traffic*, *14*(10), 1078–1090. <https://doi.org/10.1111/tra.12094>
- Simons, K., & Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *NATURE REVIEWS*, *1*, 31–41. <https://doi.org/10.1002/sita.200600113>
- Singh, S. B. (2003). Rab5-mediated endosome-endosome fusion regulates hemoglobin endocytosis in *Leishmania donovani*. *The EMBO Journal*, *22*(21), 5712–5722. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg557>
- Sjöberg, A., Önerfjord, P., Mörgelin, M., Heinegård, D., & Blom, A. M. (2005). The Extracellular Matrix and Inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(37), 32301–32308. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504828200>
- Smith, L. C. (1997). Sea urchin coelomocytes specifically express a C3 complement component and a complement receptor or regulatory protein. *Developmental & Comparative Immunology*, *21*(2), 143. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(97\)88610-7](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(97)88610-7)
- Sottrup-Jensen, L., Stepanik, T. M., Kristensen, T., Lonblad, P. B., Jones, C. M., Wierzbicki, D. M., Magnusson, S., Domdey, H., Wetsel, R. A., & Lundwall, A. (1985). Common evolutionary origin of alpha 2-macroglobulin and complement components C3 and C4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *82*(1), 9–13. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.1.9>
- Souza, W. de, & Belfort Jr., R. (2014). *Toxoplasmose & Toxoplasma gondii*. Editora FIOCRUZ. <https://doi.org/10.7476/9788575415719>
- Spath, G. F., Epstein, L., Leader, B., Singer, S. M., Avila, H. A., Turco, S. J., & Beverley, S. M. (2000). Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(16), 9258–9263. <https://doi.org/10.1073/pnas.160257897>
- Steinhardt, R. A., Togo, T., & Krasieva, T. B. (2000). A Decrease in Membrane Tension Precedes Successful Cell-Membrane Repair. *Molecular Biology of the Cell*, *11*(December), 4339–4346.
- Steverding, D. (2017). The history of leishmaniasis. In *Parasites and Vectors* (Vol. 10, Issue 1, pp. 1–10). Parasites & Vectors. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>
- Stowers, J. H. (1919). Case of Delhi Boil or Sore (Syn.: Oriental Sore; Aleppo Boil). *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, *13*, 81–83.
- Sturm, A. (2006). Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. *Science*, *313*(5791), 1287–1290. <https://doi.org/10.1126/science.1129720>
- Sullivan, D. J., Gluzman, I. Y., & Goldberg, D. E. (1996). Plasmodium Hemozoin Formation Mediated by Histidine-Rich Proteins. *Science*, *271*(5246), 219–222. <https://doi.org/10.1126/science.271.5246.219>
- Takahashi, K., & Ezekowitz, R. A. B. (2005). The Role of the Mannose-Binding Lectin in Innate Immunity. *Clinical Infectious Diseases*, *41*(Supplement_7), S440–S444. <https://doi.org/10.1086/431987>

- Tam, C., Idone, V., Devlin, C., Fernandes, M. C., Flannery, A., He, X., Schuchman, E., Tabas, I., & Andrews, N. W. (2010). Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. *Journal of Cell Biology*, *189*(6), 1027–1038. <https://doi.org/10.1083/jcb.201003053>
- Tambourgi, D. V., Kipnis, T. L., da Silva, W. D., Joiner, K. A., Sher, A., Heath, S., Hall, B. F., & Ogden, G. B. (1993). A partial cDNA clone of trypomastigote decay-accelerating factor (T-DAF), a developmentally regulated complement inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, has genetic and functional similarities to the human complement inhibitor DAF. *Infection and Immunity*, *61*(9), 3656 LP – 3663. <http://iai.asm.org/content/61/9/3656.abstract>
- Tannicht, E. (1998). *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*: comparison of molecules considered important for host tissue destruction. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *92*(6), 593–596. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(98\)90777-5](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(98)90777-5)
- Tarleton, R. ., & Zhang, L. (1999). Chagas Disease Etiology: Autoimmunity or Parasite Persistence? *Parasitology Today*, *15*(3), 94–99. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(99\)01398-8](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(99)01398-8)
- The C. elegans Sequencing Consortium. (1998). Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science*, *282*(5396), 2012–2018. <https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2012>
- Thielens, N. M., Gaboriaud, C., & Arlaud, G. J. (2007). Ficolins: innate immune recognition proteins for danger sensing. *Inmunología*, *26*(3), 145–156. [https://doi.org/10.1016/S0213-9626\(07\)70084-7](https://doi.org/10.1016/S0213-9626(07)70084-7)
- Tschopp, J., Chonn, A., Hertig, S., & French, L. E. (1993). Clusterin, the human apolipoprotein and complement inhibitor, binds to complement C7, C8 beta, and the b domain of C9. *The Journal of Immunology*, *151*(4), 2159 LP – 2165. <http://www.jimmunol.org/content/151/4/2159.abstract>
- Tschopp, J., Müller-Eberhard, H. J., & Podack, E. R. (1982). Formation of transmembrane tubules by spontaneous polymerization of the hydrophilic complement protein C9. *Nature*, *298*(5874), 534–538. <https://doi.org/10.1038/298534a0>
- Turvey, S. E., & Broide, D. H. (2010). Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2), S24–S32. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.016>
- Tyler, K. M., & Engman, D. M. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, *31*(5–6), 472–481. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00153-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00153-9)
- UNICEF. (2020). *Diarrhoea*. UNICEF Data. <https://data.unicef.org/topic/child-health/diarrhoeal-disease/#>
- Vannier-Santos, M. A., Martiny, A., Lins, U., Urbina, J. A., Borges, V. M., & de Souza, W. (1999). Impairment of sterol biosynthesis leads to phosphorus and calcium accumulation in *Leishmania acidocalcisomes*. *Microbiology*, *145*(11), 3213–3220. <https://doi.org/10.1099/00221287-145-11-3213>
- Velge, P., Ouaiissi, M. A., Cornette, J., Afchain, D., & Capron, A. (1988). Identification

- and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote collagen-binding proteins: possible role in cell-parasite interaction. *Parasitology*, 97(2), 255–268.
<https://doi.org/DOI: 10.1017/S0031182000058467>
- Vitved, L., Holmskov, U., Koch, C., Teisner, B., Hansen, S., & Skjødt, K. (2000). The homologue of mannose-binding lectin in the carp family Cyprinidae is expressed at high level in spleen, and the deduced primary structure predicts affinity for galactose. *Immunogenetics*, 51(11), 955–964.
<https://doi.org/10.1007/s002510000232>
- Waters, P., Vaid, M., Kishore, U., & Madan, T. (2009). *Lung Surfactant Proteins A and D as Pattern Recognition Proteins* (pp. 74–97). https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0901-5_6
- Weiler, J. M., Daha, M. R., Austen, K. F., & Fearon, D. T. (1976). Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(9), 3268–3272.
<https://doi.org/10.1073/pnas.73.9.3268>
- Weis, W. I., Drickamer, K., & Hendrickson, W. A. (1992). Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. *Nature*, 360(6400), 127–134. <https://doi.org/10.1038/360127a0>
- Weise, F., Stierhof, Y. D., Kuhn, C., Wiese, M., & Overath, P. (2000). Distribution of GPI-anchored proteins in the protozoan parasite *Leishmania*, based on an improved ultrastructural description using high-pressure frozen cells. *Journal of Cell Science*, 113(24), 4587 LP – 4603. <http://jcs.biologists.org/content/113/24/4587.abstract>
- Weiss, G. E., Gilson, P. R., Taechalerpaisarn, T., Tham, W.-H., de Jong, N. W. M., Harvey, K. L., Fowkes, F. J. I., Barlow, P. N., Rayner, J. C., Wright, G. J., Cowman, A. F., & Crabb, B. S. (2015). Revealing the Sequence and Resulting Cellular Morphology of Receptor-Ligand Interactions during *Plasmodium falciparum* Invasion of Erythrocytes. *PLOS Pathogens*, 11(2), e1004670.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004670>
- White, N. J., Pukrittayakamee, S., Hien, T. T., Faiz, M. A., Mokuolu, O. A., & Dondorp, A. M. (2014). Malaria. *The Lancet*, 383(9918), 723–735.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60024-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60024-0)
- WHO/PAHO. (2016). *Neglected infectious diseases in the Americas: Success stories and innovation to reach the neediest*. PAHO.
<https://iris.paho.org/handle/10665.2/31250?locale-attribute=es>
- WHO. (2002). Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 905.
- WHO. (2007). *Global plan to combat neglected tropical diseases 2008–2015*.
https://www.who.int/neglected_diseases/resources/who_cds_ntd_2007.3/en/
- WHO. (2012). *Neglected tropical diseases*. <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/neglected-tropical-diseases>
- WHO. (2015). *WHO Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases*.
https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0011/294599/Factsheet-Toxoplasmosis-en.pdf

- WHO. (2020a). *Chagas disease (also known as American trypanosomiasis)*. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- WHO. (2020b). *Leishmaniasis*. World Health Org Fact Sheet. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- WHO. (2020c). *Malaria*. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
- WHO. (2021). *Amoebiasis*. <https://www.who.int/ith/diseases/amoebiasis/en/>
- Wright, J. H. (1903). Protozoa in a case of tropical ulcer (“Delhi Sore”). *The Journal of Medical Research*, 10, 472.
- Wyllie, M. P., & Ramirez, M. I. (2017). Microvesicles released during the interaction between *Trypanosoma cruzi* TcI and TcII strains and host blood cells inhibit complement system and increase the infectivity of metacyclic forms of host cells in a strain-independent process. *Pathogens and Disease*, 75(7). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx077>
- Xavier, M. B., Silveira, F. T., Demachki, S., Ferreira, M. M. R., & do Nascimento, J. L. M. (2005). American tegumentary leishmaniasis: A quantitative analysis of Langerhans cells presents important differences between *L. (L.) amazonensis* and *Viannia* subgenus. *Acta Tropica*, 95(1), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2005.04.016>
- Yano, T., Nakao, M., Osaka, K., Kato, Y., & Fujiki, K. (2001). Molecular cloning of the complement C1r/C1s/MASP2-like serine proteases from the common carp (*Cyprinus carpio*). *Immunogenetics*, 52(3–4), 255–263. <https://doi.org/10.1007/s002510000273>
- Zeledon, R., & Rabinovich, J. E. (1981). Chagas Disease: an Ecological Appraisal With Special Emphasis on its Insect Vectors. *Annual Review of Entomology*, 26(1), 101–133. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.26.010181.000533>
- Zha, X., Pierini, L. M., Leopold, P. L., Skiba, P. J., Tabas, I., & Maxfield, F. R. (1998). Sphingomyelinase treatment induces ATP-independent endocytosis. *Journal of Cell Biology*, 140(1), 39–47. <https://doi.org/10.1083/jcb.140.1.39>

Apêndice I: Artigo



How to get away with murder: The multiple strategies employed by pathogenic protozoa to avoid complement killing

Laura Valeria Rios-Barros^a, Anna Luiza Silva-Moreira^a, Maria Fatima Horta^b,
Nelder Figueiredo Gontijo^{a,*}, Thiago Castro-Gomes^{a,*}

^a Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Complement system
Parasitic protozoa
Protozoal infection
Immune evasion
Complement regulation

ABSTRACT

Parasitic protozoa are eukaryotic unicellular organisms that depend on a variety of living organisms and can develop intra- and extracellularly inside their hosts. In humans, these parasites cause diseases with a significant impact on public health, such as malaria, toxoplasmosis, Chagas disease, leishmaniasis and amebiasis. The ability of a parasite in establishing a successful infection depends on a series of intricate evolutionarily selected adaptations, which include the development of molecular and cellular strategies to evade the host immune system effector mechanisms. The complement system is one of the main effector mechanisms and the first humoral shield of hosts innate immunity against pathogens. For unicellular pathogens, such as protozoa, bacteria and fungi, the activation of the complement system may culminate in the elimination of the invader mainly via 1- the formation of a pore that depolarizes the plasma membrane of the parasite, causing cell lysis; 2- opsonization and killing by phagocytes; 3- increasing vascular permeability while also recruiting neutrophils to the site of activation. Numerous strategies to avoid complement activation have been reported for parasitic protozoa, such as 1- sequestration of complement system regulatory proteins produced by the host, 2- expression of complement system regulatory proteins, 3- proteolytic cleavage of different complement effector molecules, 4- formation of a physical glycolipid barrier that prevents deposition of complement molecules on the plasma membrane, and 5- removal, by endocytosis, of complement molecules bound to plasma membrane. In this review, we revisit the different strategies of blocking various stages of complement activation described for the main species of parasitic protozoa, present the most recent discoveries in the field and discuss new perspectives on yet neglected strategies and possible new evasion mechanisms.

1. Introduction

Protozoa are single-celled eukaryotic microorganisms belonging to the Kingdom Protista. The term protozoa groups organisms of different forms, with different feeding, locomotion, reproduction and life cycles. The traditional classification within the systematics is based on their locomotion in the aquatic environment, dividing them into sarcodines, ciliates, flagellates and sporozoans. Therefore, it is a polyphyletic group, not faithfully representing an evolutionary lineage and, for this reason, the classification of these organisms has undergone major changes as more accurate phylogenetic analysis have emerged. More than 65 000 species of protozoa are currently known, 10 000 of which are considered to be of medical and veterinary importance (Levine et al., 1980). The

diseases they cause have a wide spectrum of symptoms, which can range from a mild diarrhea to death, depending on the characteristics of the parasite and its respective host. Being so diverse, the forms of transmission, the entry into the vertebrate host and the niche occupied within the host vary widely, making difficult a broad-based control for the different protozooses. Importantly, at the present, we have no fully effective vaccine available to combat these eukaryotic pathogens. They are responsible for high rates of morbidity and mortality, affecting more than 500 million people worldwide (Monzote and Siddiq, 2011). The different diseases they cause are mostly linked to low socioeconomic conditions, particularly in tropical and subtropical developing countries, the most affected ones in Asia, Africa and Latin America.

For a successful infection to establish, parasites first need to survive

* Corresponding authors.

E-mail addresses: lvriosb@gmail.com (L.V. Rios-Barros), anna.luiza.sm3@gmail.com (A.L. Silva-Moreira), phorta@ufmg.br (M.F. Horta), nelder@ufmg.br (N.F. Gontijo), tcg@ufmg.br (T. Castro-Gomes).

<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2022.05.118>

Received 15 February 2022; Received in revised form 16 May 2022; Accepted 24 May 2022

Available online 13 June 2022

0161-5890/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

the host's cellular and humoral innate effector mechanisms. Therefore, they have evolved a myriad of strategies to bypass the quick response hosts are endowed with. One of the first of such responses is the activation of the complement system, the main component of the humoral immunity of the innate system, which can lead to the elimination of the invader mainly through cell lysis or opsonization and killing by phagocytes.

2. The complement system

The complement system is a tightly regulated network comprising more than 50 soluble circulating or membrane-bound proteins, among activators, regulators and receptors (Ricklin et al., 2010; Zipfel and Skerka, 2009). Complement can be activated by different pathways, depending on the initiator and the recognized target molecule (Nonaka, 2001). Although many of its proteins can opsonize, promote local inflammation or immune complex clearance, the full activation of the complement system culminates in the formation of the membrane attack complex (MAC), a multiprotein pore-forming complex that traverses pathogen's plasma membrane, eventually leading to lysis (Müller-Eberhard, 1984).

Many of the reactions triggered by complement activation operates through proteolytic cascades, initiated by precursor proteases. There are three major pathways of the complement activation: the classical, the alternative and the lectin pathways. The triggering of each of these cascades depends on the initial precursor enzyme and on the binding of an initiator to specific target molecules (Nonaka, 2001), such as the region of certain antibodies known as fragment crystallizable (Fc) or a pathogen-associated molecular pattern (PAMP) (Medzhitov and Janeway, 1997), or even more promiscuously to any unprotected surface via a spontaneous low-rate activation (Pouw and Ricklin, 2021). All three pathways, if not inhibited, converge to the formation of MAC (Müller-Eberhard, 1986, 1984).

2.1. The classical pathway (CP)

The initiator of this pathway is the complex C1, containing three different subunits C1q, C1r and C1s. C1q is a versatile soluble pattern recognition molecule (PRM) that recognizes charged patterns thus binding to multiple target molecules (Kishore et al., 2004), including PAMPs such as lipopolysaccharide (LPS) (Roumenina et al., 2008), pentraxins (such as C-reactive protein) (Volanakis and Kaplan, 1974), bacterial porins (Albertí et al., 1996), and many others (Kishore and Reid, 2000; Ricklin et al., 2010). Because C1q can also bind to Fc region of antibody molecules, mainly IgG and IgM, deposited on the target antigen, it is often referred to as antibody-dependent (Burton et al., 1980; Swanson et al., 1988; Ricklin et al., 2010). Upon C1q binding to its target, C1r undergoes conformational changes, and by a yet undefined mechanism, becomes an active protease (Reid, 2018). Once activated, C1r cleaves C1s into fragments that remain bound by disulfide bond, which, in turn, expose a proteolytic site whose substrate are C4 and C2. By limited proteolysis, C4 is then cleaved into two fragments C4a and C4b. C4b remains bound to the pathogen/IgM/C1q complex while undergoing a drastic conformational change, exposing a region, the thioester domain (TED), containing a highly reactive thioester bond, which covalently binds to the pathogen surface. C2, when cleaved by C1s into C2a and C2b, leaves its C2a fragment attached to the membrane-bound C4b, forming a new heterodimer protease complex that cleaves C3 into C3a and C3b, the so-called C3 convertase of the classical and lectin pathways (C4bC2a). Cleavage of C3 also results in a conformational change of C3b with exposure of TED, resulting in a covalent thioester bond to pathogen surface, much like in C4 cleavage. With continuous C3 cleavage, and accumulation of membrane-bound C3b, C3-convertase gather a C3b molecule (C4b2a3b), a complex, which, now, changes its substrate to C5, cleaving it into C5a and C5b. Here starts the step-by-step MAC (C5b-9) assembly. Although C5 is homologous to C3 and C4, it

lacks the typical TED with thioester bond and C5b do not covalently deposit on cell surface. Instead, being a metastable molecule, it readily binds to C6, forming a soluble C5b-6 complex, which in a stepwise assembly, subsequently binds to C7, C8 and C9, forming a hydrophobic complex that binds to lipid membranes (Hadders et al., 2012). After C8 joins C5b-C7, the complex crosses the plasma membrane and recruits several C9 monomers, which circularly multimerize into a stable tubular transmembrane lytic pore with approximately 21 nm in diameter (Loos, 1985; Müller-Eberhard, 1986, 1985, 1984). Apart from C5b and the γ chain of C8, all MAC components share a common 40 kDa Membrane Attack Complex Perforin (MACPF) domain, which is essential for membrane insertion (Rosado et al., 2008).

2.2. The lectin pathway (LP)

This pathway is a homologous of the CP differing only by the initiator molecule. PRMs that initiate lectin pathway comprise two protein families: the first, the collagen-containing C-type lectins or collectins, comprising mannose-binding lectin (also named MBL or mannan-binding lectin or protein), (Malhotra et al., 2008), collectin-10 (also named CL-10, collectin liver-1, or CL-L1) and collectin-11 (also named CL-11 or collectin kidney-1, or CL-K1), encoded by the *MBL2*, *COLEC10*, and *COLEC11* genes, respectively. CL-10 and CL-11 are largely found as heteromeric complexes in the circulation (CL-10/CL-11 also named CL-LK). The second is the family of ficolins, including ficolin-1, ficolin-2, and ficolin-3, formerly known as M-ficolin, L-ficolin, and H-ficolin, encoded by the *FCN1*, *FCN2*, and *FCN3* genes, respectively (Bohls et al., 2019). Initiator PRMs of the LP can bind to several ligands, mainly repeating carbohydrate matrices commonly present in microorganisms, such as mannose structures on fungal surfaces, N-acetylglucosamine residues like LPS and Lipoteichoic acid (LTA) on bacterial cell walls and DNA (Frederiksen et al., 2005; Lawson and Reid, 2000; Matsushita, 2013). Collectins and ficolins circulate in the blood and other fluids associated with a set of serine proteases, the mannose-binding lectin-associated serine proteases (MASP), MASP-1, MASP-2 and MASP-3 (Matsushita et al., 2000; Matsushita and Fujita, 2001). MASPs are homologous to C1r and C1s and, likewise, cleaves C2 and C4 components, for the formation of C3 convertase C4bC2a. From this point on, complement activation follows exactly as in CP. MASP-1 and – 2 trigger the activation of the lectin pathway and MASP-3 may be involved in the activation of the alternative pathway of complement (Garred et al., 2016).

2.3. The alternative pathway (AP)

Even though the name suggests a secondary role, this pathway seems to represent 80–90 % of the total complement activation (Harboe and Mollnes, 2008), even when initially triggered by the LP or the CP (see below). Unlike the other two activation pathways, the central recognition molecule in the AP is the C3 component. Without a high serum concentration and a rapid turn-over of C3, as well as a tight regulation (Ricklin et al., 2016), the AP can deplete serum C3 due to the quick amplification of the reaction. Although the thioester bond in native C3 is not very reactive, it can be very slowly hydrolyzed (C3_{H2O}), changing the conformation of the protein to a form capable of binding to another complement component, factor B (FB). C3_{H2O} bound FB, after changing its molecular conformation, can be now recognized and cleaved by the serine protease factor D (FD) into fragments Ba and Bb, the latter retained bound to C3_{H2O}. Newly formed soluble C3_{H2O}Bb, whose catalytic site resides in the Bb portion, cleaves native C3 into C3a and C3b, just like CP and LP C3 convertase (C4b2a) does (Pangburn and Müller-Eberhard, 1983). This complex, which is unstable, maintains a low generation rate C3b, which is also rapidly inactivated if remains unbound (reacting with H₂O) or bound to non-activating cell surfaces, such as host own cells (see below). However, if C3b attaches to the surface of pathogens devoid of regulatory proteins, it rapidly binds FB, then

becoming susceptible to cleavage by FD (Pangburn and Müller-Eberhard, 1983). The surface-bound C3 convertase C3bBb, now stabilized by properdin (aka FP), if not finely regulated (Lambris and Holers, 2000; Pangburn et al., 2008), continuously generate C3b molecules, each one being able to bind to pathogen surface, to anchor FB, generating more C3bBb. A loop is then formed, which amplifies the reaction until membrane-bound C3b molecules interact with C3bBb, modulating its catalytic site to recognize and cleave C5, originating the AP C5 convertase (C3bBbC3b or 2C3bBb). From this point on, formation of MAC occurs just like in the other two pathways. It is worth noticing that, regardless of the pathway that generates C3b, the AP takes place, initiating the amplifying loop, which makes it, in fact, the predominant complement activation pathway. The activation pathways of the complement system and the molecules involved are summarized in Fig. 1.

2.4. Complement system regulation

Physiologically, the slow-acting soluble C3 convertase C3_{H2O}Bb continuously generates the fragment C3b. Since C3b thioester is a more promiscuous group, reacting toward nucleophiles, such as OH and NH₂ groups, although with preferences for OH groups on polysaccharides (Sahu et al., 1994), it can bind to virtually any cell, including host cells. However, hosts cells are not harmed unless they lack, such as apoptotic or tumor cells, a fine and precise regulation of complement activation. To prevent self-cytolysis, hosts are endowed with a variety of soluble or membrane-bound inhibitors proteins that abort complement cascade at several checkpoints, particularly the amplifying step of C3 cleavage (Merle et al., 2015; Zipfel and Skerka, 2009). Activation of CP and LP is controlled by a serin esterase inhibitor (serpin), C1-INH, which binds and inactivates C1r, C1s, MASP-1 and MASP-2, leading to dissociation of the C1 or MBL/MASP-1/MASP-2 complex, and liberation of free C1q or MBL, respectively (Petersen et al., 2000). LP can be specifically inhibited by the proteins MASP-3, Mannose-binding lectin-associated protein of 44 kDa (MAP44), and Mannan-binding-lectin associated protein of 19 kDa (MAP19), which interact with MBL, competing with MASP-1 and -2, but are unable to cleave C2 and C4 preventing further activation of the LP cascade (Merle et al., 2015). Several proteins accelerate the decay of the convertases by binding to C3b or C4b, namely soluble factor H (FH) (for C3b) and C4-binding protein (C4BP) (for C4b), and the cell

membrane proteins decay accelerating factor (DAF/CD55), complement receptor 1 (CR1/CD35), and membrane cofactor protein (MCP/CD46), the three latter for both C3b and C4b. In addition, FH for C3b, C4BP for C4b, CR1 and MCP for both C3b and C4b act as cofactors, making these molecules prone to be cleaved and inactivated by factor I (FI), a soluble plasma protease. Cleavage of C3b initially generates the membrane-bound iC3b and the soluble C3f fragments and, afterward, the soluble C3c and the short membrane-bound C3dg fragment, while cleavage of C4b generates the soluble C4c and the short membrane-bound C4d fragments. What defines whether bound C3b will bind to FB or to FH in a cell surface is the amount of glycosaminoglycans and sialic acid-containing glycans, important constituents of host cell membranes. FH exhibit a domain that recognize negatively charged heparan sulfate moieties on the host cell membrane, allowing the interaction with membrane-bound C3b. C4BP acts in a similar way as a cofactor for FI to cleave C4b (Merle et al., 2015). MAC formation is also tightly regulated in host cells. For instance, clusterin and vitronectin may scavenge C5b-7, C5b-8 or C5b-9 that may be generated in the fluid phase in the absence of a cell membrane. Membrane CD59, expressed on most cell types, blocks membrane perforation by C5b-8 and C5b-9, interacting with the MACPF domain of each protein upon conformational changes. Furthermore, MAC can be removed of target cells either by exocytosis or endocytosis (Morgan et al., 1987). One peculiarity of many functionally identified complement inhibitors is the presence of multiple, consecutive short consensus repeats (SCR) or complement control protein (CCP) domains, alternatively known as or Sushi domains. By genome sequencing, a vast list of CCP-containing proteins, which raised the possibility that they may also regulate complement activation. These include the Sushi domain-containing (SUSD) protein family, the human CUB (from C1r/C1s, Urchin epidermal growth factor-Uegf, Bone morphogenetic protein – BMP1) and sushi multiple domains (CSMD) family, the extracellular matrix (ECM) macromolecules (Gialeli et al., 2018). Moreover polydom (also known as SVEP1 - Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1), a multidomain protein containing 34 CCP, highly expressed in human and mouse placenta, has been recently identified as containing a signature of specifically ordered 5-motif pattern present in regulatory CCPs of known complement regulatory proteins (Ojha et al., 2019). Among the six SUSD proteins, and the three

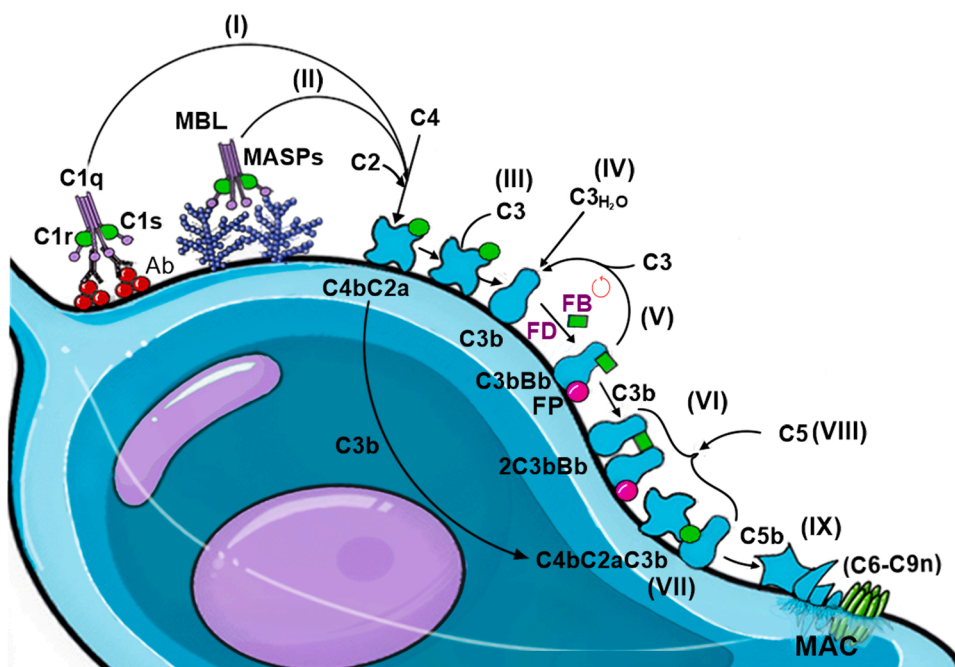


Fig. 1. Activation Pathways of the Complement Systems on Pathogens Plasma Membrane. (I) Classic Pathway (CP): C1 complex (C1q, C1r and C1s) recognizes pathogen-bound antibodies (Ab), inducing the formation of C3 convertase (C4bC2a) through the cleavage of C2 and C4. (II) Lectin Pathway: mannose-binding protein (MBL) associated with serine proteinases (MASPs) binds to pathogen carbohydrates, cleaving C2 and C4 and forming the same convertase as the CP. (III and IV) C3b generated by soluble C3 (H₂O) or by membrane-bound C4bC2a is covalently deposited on pathogen surface, thus binding to Factor B (FB), which is cleaved by Factor D (FD), forming the Alternative Pathway C3 convertase (C3bBb). (V) This C3 convertase, stabilized by properdin (FP), amplifies the reaction by generating more C3b and, therefore, more C3bBb. (VI and VII) Increasing surface C3b density originates the C5 convertases (C4bC2aC3b or 2C3bBb). (VIII) C5 convertases cleave C5 and membrane-inserted C5b initiates MAC (C6-C9n) assembly (IX), which spans the target membrane.

CSMD proteins, only SUSD4 (Holmquist et al., 2013) and CSMD1 (Escudero-Esparza et al., 2013) have been shown to exhibit complement inhibitory activity. Expression and functional characterization of the CCP domains of polydom/SVEP1 that encompass the regulatory motifs showed that it possesses cofactor activity for FI (Ojha et al., 2019). However, the vast majority of CCP-containing proteins awaits direct experimental evidence of complement regulatory activities (Gialeli et al., 2018; Ojha et al., 2019). The Complement system regulation proteins important for parasitic protozoa evasion are summarized in Fig. 2.

3. Pathogens and their fight against the complement killing

Whether bacteria, virus or eukaryotes, pathogens have evolved an array of strategies to avoid complement killing. In bacteria, complement efficacy depend on the type of bacteria involved and their cellular structures, notably the presence or not of a cell wall. In Gram-positive bacteria, MAC can be formed upon formation of C5 convertase and the bacteria can also be targeted to phagocytosis following C3b deposition (Serruto et al., 2010). The presence of a cell wall in Gram-negative bacteria impairs the formation of MAC. However, recent studies carried out in different strains of *Escherichia coli* showed that the rapid interaction of C7 with C5b-6 is crucial to efficiently anchor C5b-7 to the bacterial cell envelope and form complete MAC pores, guaranteeing pathogen death (Doorduyn et al., 2020). Gram-negative bacteria can also be opsonized by C3, triggering their phagocytosis, processing and antigen presentation by specialized cells, a process that is also facilitated by the presence of C5a (Serruto et al., 2010). Studies have also shown that several species of bacteria such as *N. meningitidis*, *B. burgdorferi*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* among others, have the ability to sequester complement regulators from the host (such as FH or C4BP) and use it on their surfaces to prevent lysis (Haupt et al., 2008; Hellwage et al., 2001; Janulczyk et al., 2000; Jarva et al., 2004; Kirjavainen et al., 2008; Krafczyk et al., 2004; Pizza et al., 2008).

In the context of viral infections, the complement system has several effector functions such as the direct neutralization of the virus through opsonization and formation of MAC on the virus membrane (Huber et al., 2006) or on the plasma membrane of infected cells, preventing viral replication (Terajima et al., 2011). Complement deposition on a virion can block interactions with host cell receptors, aggregate viral particles, trigger intracellular signaling to induce an antiviral state and enhance phagocytosis (Jayasekera et al., 2007; Ji et al., 2005). To prevent complement killing, some species of Gammaherpesviruses,

including Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, saimiri herpesvirus and murine γ -herpesvirus 68 (γ HV68) encode proteins that have structural and functional homology to host complement regulatory proteins and which can act both in the direct protection of the virus or on infected host cells, preventing their destruction (Albrecht and Fleckenstein, 1992; Kapadia et al., 1999; Stoermer and Morrison, 2011). Some viruses such as human immunodeficiency virus-1 (HIV-1), human T-lymphotropic virus-1 (HTLV-1), human cytomegalovirus (HCMV), simian virus 5 (SV5) and mumps virus (MuV) even manage to incorporate complement regulatory proteins from the host (such as DAF, CD59 and MCP) into their virions to prevent complement-mediated destruction (Johnson et al., 2008; Saifuddin et al., 1995).

Undoubtedly, pathogens lacking a cell wall, such as parasitic protozoa, which present their plasma membranes to direct contact with host's sera, are likely targets to complement killing. For this reason, these eukaryotic pathogens will need an array of countermeasures to escape complement attack. In this review we focus on the molecular and cellular mechanisms that helps pathogenic protozoa to fight complement killing.

3.1. Getting away with murder: an imperative for several evolutionary forms of pathogenic protozoa

During evolution, parasitic protozoa have adapted to survive within their hosts. Many of the adaptive mechanisms show similarities with the host complement system regulatory mechanisms previously discussed, which prevent cytolysis. Probably, for each species of parasite, there are redundant mechanisms of complement inhibition to ensure its survival. Some of these mechanisms remain unknown. The main escape strategies presented by human parasitic protozoa to prevent complement activation are described below.

3.2. *Plasmodium* spp

Plasmodium spp. is the causative agent of malaria, which is considered the protozoanosis with the highest mortality rate today. It is estimated that, in 2020, there were 241 million cases with 627 000 deaths worldwide (WHO, 2022a). Malaria is an acute febrile disease, with the predominant pathogenic mechanism being the exacerbated activation of the immune system due to hemolysis with release of hemozoin into bloodstream or cytoadherence of red blood cells in tissues such as brain vessels (CDC, 2019a). *Plasmodium* spp. are apicomplexan parasites with a complex life cycle, with different evolutionary forms and two hosts,

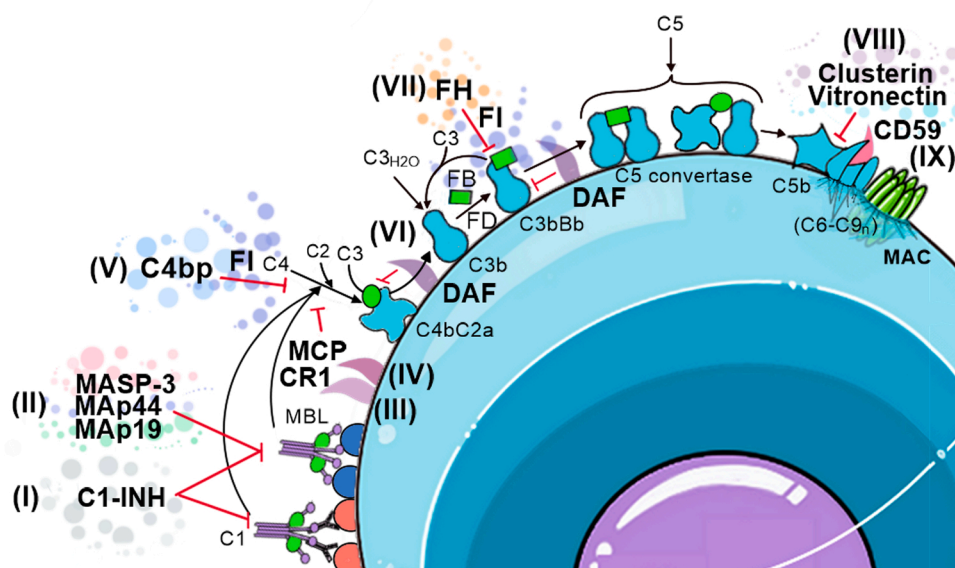


Fig. 2. Regulatory Proteins of the Human Complement System. (I) C1 esterase inhibitor protein (C1-INH) inhibits the formation of C1 and MBL initiation complexes; (II) MASP-3, MASP-4 and MASP-19 binds to MBL, competes with MASPs, preventing further activation of the Lectin Pathway. (III and IV) cell membrane CR1 (CD35) and MCP (CD46) accelerates the decay of convertases and acts as a cofactor for Factor I (FI), cleaving C3b into iC3b prevent the C3 convertase formation. (V and VII) soluble C4BP and Factor H (FH) binds to C4b or C3b, respectively, acting as cofactor for FI, preventing the formation of the C3 convertases for the three pathways; (VI) cell membrane DAF dissociate, by competition, C3 convertases from all pathways (VII) clusterin and vitronectin may scavenge C5b-7, C5b-8 or C5b-9 (IX) CD59 prevents the multimerization of the C9 and formation of the lytic pore in the target membrane.

one invertebrate from the genus *Anopheles*, which is the biological vector, and other vertebrate (CDC, 2019a).

In human hosts, different evolutionary forms of the parasite, mainly the sporozoite, the merozoite and the gametocytes, confront the serum effectors of the host's immune system. Gametocytes are exposed to the complement system when, after erythrocyte disruption, they meet complement in the blood pool within the vector's midgut. Sporozoites migrate from insect vector bite site to the liver, passing through different host fluids, notably the blood. Merozoites are found in the blood and invade red blood cells, a critical step for their survival in the host. When merozoites rupture the infected red blood cells, gaining the extracellular environment, they are directly exposed to the complement system. They are extraordinarily adapted for immune evasion, managing to survive in the blood for up to 10 min (Boyle et al., 2010).

Although merozoites are the evolutive forms that come into a more intimate and prolonged contact with the complement system as they circulate in host's blood stream, other evolutive forms of *Plasmodium* spp. can also suffer complement attack under specific situations, such as gametocytes, oocysts and sporozoites living or circulating in the digestive tract of the invertebrate host when the vector takes a blood meal. Touray et al. (1994) showed that complement evasion by *P. gallinaceum* sporozoites is stage-dependent. Oocysts collected from the abdomen of mosquitoes 10 days after the blood meal lack infective capacity for the vertebrate host (chicken), as compared to sporozoites collected days later from salivary glands which were highly infectious (Touray et al., 1994). The mechanism by which sporozoites were able to inhibit complement activation through the alternative pathway of the complement system was not elucidated, but they showed that the expression of parasite-like DAF in salivary gland sporozoites was related to their resistance to lysis (Touray et al., 1994).

Recently, it was demonstrated that during gametogenesis the parasites of the genus *Plasmodium* remain covered by the cellular remnants of infected erythrocytes for approximately 15 min, thus mimicking the host cell and facilitating gametes immune evasion (Sologub et al., 2011). Studies carried out in 2001 showed that 30–50 % of the stages of *P. berghei* gametocytes in the mosquito intestine managed to survive the first 3 h of exposure to the complement system (Margos et al., 2001). Later it was demonstrated that *P. falciparum* gametocytes were able to sequester human FH to their surfaces using the protein PfGAP50 (*Plasmodium falciparum* gamete protein 50), thus preventing lysis by avoiding the formation and insertion of MAC on their plasma membranes (Simon et al., 2013).

Studies on *P. falciparum* resistance to the complement-mediated lysis are recent. To date, two *P. falciparum* merozoite surface proteins,

fundamental for MAC evasion, are known: surface protein 92 from *P. falciparum* (Pf92) and surface protein of merozoites from the *P. falciparum* family 3 (PfMSP3.1). Pf92 is a member of the parasite 6-cys protein family and acts by recruiting FH to the merozoite surface (Kennedy et al., 2016), mimicking host cells by dissociating C3 convertase and allowing the inactivation of C3b by FI (Loos, 1985; Whaley and Ruddy, 1976). Likewise, PfMSP3.1 block complement activation by recruiting C1-INH (Kennedy et al., 2017) inhibiting the formation of CP and LP initiator complexes (Arlaud et al., 1979; Matsushita et al., 2000). *P. falciparum* complement inhibition mechanisms are summarized in Fig. 3.

3.3. *Toxoplasma gondii*

T. gondii is also an apicomplexan protozoa and causes toxoplasmosis, the most prevalent world zoonosis, with seropositivity rates in the population ranging from less than 10 % to more than 90 % depending on the country (Torgerson and Mastroiacovo, 2013). Although is a mostly asymptomatic disease, it can produce symptoms in immunosuppressed patients, as well as serious consequences for the fetus in pregnant women with acute infection (CDC, 2018). *T. gondii* presents a complex cycle, with several evolutionary forms, where humans enter as intermediate hosts and felines, as main hosts (CDC, 2018). Among the various *T. gondii* evolutive forms, tachyzoites are the only ones that directly meet the host's complement system during migration to intestinal organs through fluids such as blood and lymph.

Although *T. gondii* is one of the parasites best adapted to humans, little is known about its complement inhibitory mechanisms. It has been shown that tachyzoites produce a molecule that converts surface C3b into iC3b, disabling the formation of C3 convertase and aborting the final steps of the cascade (Fuhrman and Joiner, 1989). The nature of this molecule still remains unknown, but this inactivation is mediated by the recruitment of host FH and C4BP by tachyzoites, as has been recently reported (Sikorski et al., 2020). This mechanism is represented in Fig. 4.

3.4. *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi is the etiologic agent of Chagas disease or American trypanosomiasis, a tropical disease affecting 6–7 million people worldwide (WHO, 2022b). Chagas disease is a serious public health problem, particularly in Latin American countries (WHO/PAHO, 2016). It is mainly transmitted to vertebrate hosts through feces/urine of infected blood-sucking triatomine bugs (WHO, 2022b). In the vertebrate host, blood trypomastigote forms also migrate through the bloodstream and

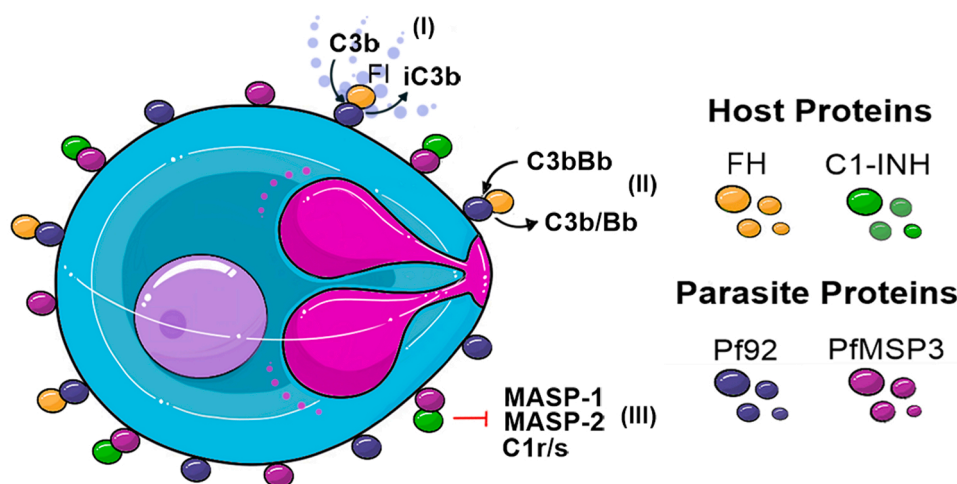


Fig. 3. Mechanisms of Complement System evasion present in *Plasmodium falciparum*. (I) Pf92 recruits Factor H (FH) making C3b or C4b prone to be cleaved by Factor I (FI) and (II) dissociating C3 convertase of the Alternative Pathway. (III) PfMSP3.1 recruits C1-INH dissociating C1r/C1s and MASPs proteinases, initiators of Classic and Lectin pathways, respectively.

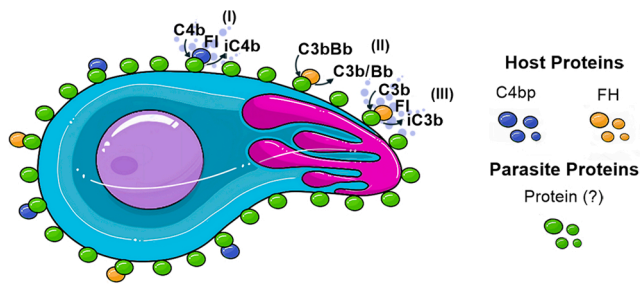


Fig. 4. Mechanisms of Complement System evasion present in *Toxoplasma gondii*. (I) C4BP and (II) Factor H (FH) is recruited to the surface of parasite by yet uncharacterized molecule, which dissociate C3 convertases and (I and III), act as cofactor for Factor I (FI) which mediates inactivation of C4b and C3b, respectively, preventing full activation of the three pathways.

reach organs such as the heart, stomach, esophagus, among others.

During the transformation of epimastigote forms into metacyclic trypomastigotes in the digestive tract of the insect vector, *T. cruzi* produce membrane proteins that allow its survival in the blood lytic milieu (Ramírez-tolosa et al., 2017). A long-known protein is the *T. cruzi* decay accelerating factor (T-DAF), a 87–93 kDa surface protein found in both metacyclic and blood trypomastigotes (Joiner et al., 1988; Tambourgi et al., 1993). This protein, named after its structural and functional similarity to human DAF, accelerates the dissociation of the C3 convertases, inhibiting all three pathways of complement activation (Tambourgi et al., 1993). Another DAF-related protein found in *T. cruzi*, also structurally and functionally related to human DAF is the 160 kDa complement regulatory protein (CRP, gp160) (Norris et al., 1989; Norris et al., 1991). CRP is tethered to the membrane of trypomastigotes via a glycosylphosphatidylinositol anchor (GPI), but it is also spontaneously released as a soluble form. Both forms bind to C3b and C4b fragments, also preventing the formation of AP and CP C3 convertases (Norris et al., 1991; Norris and Schrimpf, 1994). *T. cruzi* gp 58/68 is a complement-regulating glycoprotein, with an apparent molecular weight of 58 kDa (non-reduced) and 68 kDa (reduced). This protein is part of the parasite fibronectin/collagen receptor, important for the attachment of *T. cruzi* to mammalian cells. Like CRP, it is found on the surface of trypomastigotes or is released to the extracellular environment, inhibiting complement activity by binding to FB, thus preventing the formation of AP C3 convertase (Fischer et al., 1988; Velge et al., 1988). Although gp 58/68 function is similar to human regulatory proteins with decay-dissociation activity, it does not play a cofactor role for FI (Fischer et al., 1988). Human FH can also bind to C3b on parasite surface, inhibiting AP. The binding of FH to trypomastigotes is facilitated by its surface sialic acid, transferred to parasites from serum glycoconjugates by the action of parasite transsialidases (Schenkman et al., 1991; Tomlinson et al., 1994). A calreticulin linked to the surface of *T. cruzi* trypomastigote (TcCRT) has been also implicated in *T. cruzi* complement evasion. In the early stages of infection, this protein is able to bind to the MBL carbohydrate recognition domain, preventing C4 cleavage and thus blocking the LP pathway (Ferreira et al., 2004a). Studies performed with the recombinant TcCRT have also shown that, when CP is activated by antibody, at a more advanced stage of the infection, TcCRT competes with the C1r/C1s fragments in binding C1q protein, blocking complement cascade at the very beginning of CP activation (Ferreira et al., 2004b). Also involved in escape of the *T. cruzi* to complement activation is the complement C2 receptor trispanning (TcCRIT), a transmembrane trypomastigote surface protein. TcCRIT has an N-terminal extracellular domain that inhibits C2 cleavage either by MASP2 or C1s, impairing the formation of CP and LP C3 convertases (Cestari et al., 2009; Inal et al., 2005). It has been shown that overexpressing TcCRIT parasites are highly resistant to lysis mediated by the complement system (Cestari et al., 2009). Some *T. cruzi* surface molecules such as gp82 and oligopeptidase B induce a transient

increase of intracellular Ca^{2+} in host cells, inducing plasma membrane-derived vesicles release, which bind to and inhibit the CP and LP C3 convertase (Cestari et al., 2012). Recently, it has been shown that a low virulence *T. cruzi* strain express lower levels of T-DAF, CRP, TcCRIT, gp82 mRNAs as compared to a high virulence strain. Moreover, knocking down TcCRT decreases parasite invasion in mammalian cells in both strains, but only increases activation of the complement system by low virulence strain trypomastigotes, suggesting a role for the regulation of this proteins in the differential virulence (Arroyo-Olarte et al., 2020; Arroyo-Olarte and Gupta, 2016; Henrique et al., 2016). Amastigotes, which can also be found in the bloodstream during acute stages of the infection (Ley et al., 1988), although efficient in activating AP, are also resistant to complement-mediated lysis. Although they can bind MAC, it does not insert into the plasma membrane lipid bilayer (Iida et al., 1989). Despite all these mechanisms to avoid complement-mediated damage, the ability to prevent complement activation differs among strains and even among individuals of the same strains (Ramírez-tolosa et al., 2017). Fig. 5 shows the evasion mechanisms of the complement system described for *T. cruzi*.

3.5. *Leishmania* spp

Several species of the genus *Leishmania* are responsible for a group of parasitic diseases collectively known as leishmaniasis. Approximately 53 species are described in the genus, among which 20 are considered pathogenic to humans (Akhoundi et al., 2016; WHO, 2022c). Due to unknown reasons, the different species of *Leishmania* have different tissue tropisms in the vertebrate host. Some species cause visceral leishmaniasis (VL), while others cause cutaneous (CL) or mucocutaneous leishmaniasis (MCL). An estimated 50.000–90.000 new cases of VL and 600.000–1 million new cases of CL occur annually (WHO, 2022c). Immediately upon infection, through the bite of infected phlebotomine sandflies and in the blood pool formed at the bite site, metacyclic promastigotes meet the components of the complement system at the dermis of the vertebrate host. As in *T. cruzi*, the metacyclogenesis process renders promastigote resistant to complement-mediated lysis (Bandyopadhyay et al., 1991; Sacks et al., 1990).

Complement resistance may be mediated by several molecules and mechanisms. A widely described protein is gp63, a 63 kDa GPI-anchored surface metalloprotease (Chang et al., 1986). This protein is able to cleave parasite-bound C3b into its inactive form iC3b, which could prevent the formation of C3 and C5 convertase and, therefore, the MAC-mediated lysis of the parasite (Brittingham et al., 1995; Chaudhuri and Chang, 1988). However, it was also shown that, in *L. amazonensis*, inhibitors specific for several classes of parasite proteases, including metalloproteases, did not interfere with the resistance to complement-mediated killing of promastigotes (Nunes and Ramalho-Pinto, 1996), suggesting that gp63 is not critical for resistance to complement-mediated lysis and other mechanisms may be involved. A remarkable change that occurs on *Leishmania* promastigote surface during metacyclogenesis is the elongation of lipophosphoglycan (LPG) molecules (McConville et al., 1992) and the thickening of the glycocalyx (Pimenta et al., 1991). LPG changes have been implicated in the complement resistance of *L. major* metacyclic promastigotes, since LPG-deficient promastigotes become susceptible to human complement-mediated lysis (Spath et al., 2003a), as previously anticipated by Puentes et al. (1988). This LPG-deficient susceptible phenotype still had the abundant surface protease gp63 (Spath et al., 2003b), again suggesting that gp63 does not seem to protect parasites from complement-mediated lysis. Puentes et al., (1989a), (1988b), (1988) have also suggested that the complement regulation for the acquired resistance of *L. major* (Puentes et al., 1988) or *L. donovani* (Puentes et al., 1989b) metacyclic promastigotes to complement-mediated lysis should occur at later steps in the cascade, since complement was efficiently activated in both susceptible and resistant parasites, equally generating hemolytic C3 fragments on the parasite surface. The group also

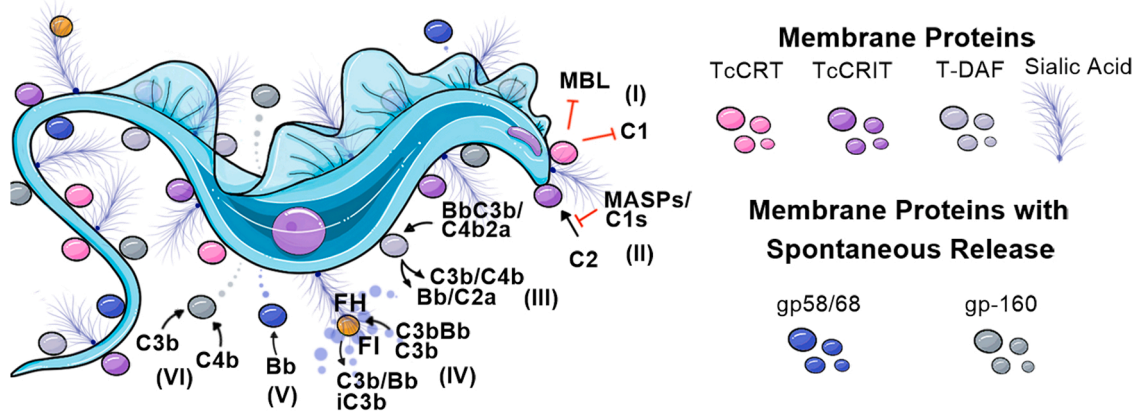


Fig. 5. Mechanisms of Complement System evasion present in *Trypanosoma cruzi*. (I) TcCRT interacts with C1 and MBL inactivating them, thus inhibiting both the Classic Pathway (CP) and Lectin Pathway (LP). (II) TcCRIT binds to C2, preventing its cleavage and subsequent formation of C3 convertase, inhibiting both CP and LP. (III) T-DAF binds to C3b and C4b, dissociating the C3 convertases, thus preventing activation of the three complement system pathways. (IV) Sialic acid binds to the human Factor H (FH) on trypomastigote surface, dissociating C3 convertase of the Alternative Pathway (AP) and allowing inactivation of C3b by Factor I (FI). (V and VI) Membrane-bound and soluble gp58/68 and gp160 sequester Bb and C3b/C4b, respectively, preventing the formation of the C3 convertases of the AP and CP, respectively.

postulated that the developmental change in the LPG renders C5b-9 incapable of inserting into the metacyclic promastigotes membrane (Puentes et al., 1990). Indeed, a similar observation was made by Nunes et al. (1997), who showed that in complement-resistant stages of *L. amazonensis* promastigotes C9-bearing complexes are superficially attached to the parasite, readily available for recognition by anti-C9 antibodies. On the contrary, in serum-susceptible parasites these complexes seem to be buried in the membrane, being recognized by anti-C9 antibodies only after mild trypsinization of the parasite surface (Nunes et al., 1997). *L. amazonensis* complement-resistant promastigotes bind C3b fragments to the same extent and with similar kinetics as the complement-susceptible forms, again in contrast to the suggestion that native gp63 may accelerate C3b inactivation (Brittingham et al., 1995). However, unlike *L. major* and *L. donovani*, *L. amazonensis* does not spontaneously shed C3 from their surface (Nunes et al., 1997). Results from the same studies have also indicated that complement-resistant

promastigotes contain membrane-associated protein inhibitors, capable of blocking the lytic activity of AP, impairing C9, but not C3, binding to complement-activating complexes, indicating that the inhibitor blocks complement activation after C3b deposition, probably at the stage of C9 deposition. They suggest gp46, expressed in greater amounts in resistant promastigotes of *L. amazonensis*, as the putative inhibitor (Nunes et al., 1997).

More recent studies have shown that *Leishmania* promastigotes can endogenously produce serine proteinase inhibitors (ISP) (Alam et al., 2016; Eschenlauer et al., 2009). ISPs inhibit host serine-peptidases such as neutrophil elastase, trypsin, cathepsin and chymotrypsin (Lima and Mottram, 2010). *Leishmania* ISPs interact with host C1r, C1s, MASP-1 and MASP-2, inhibiting the formation of CP and LP initiators (Fernandez, 2018; Lima and Mottram, 2010). Enzymatic assays in *L. donovani* ISP (LdISPs) have shown that MASP inhibition occurs mainly by the binding of LdISP2 to MASP 2, preventing the formation of C3

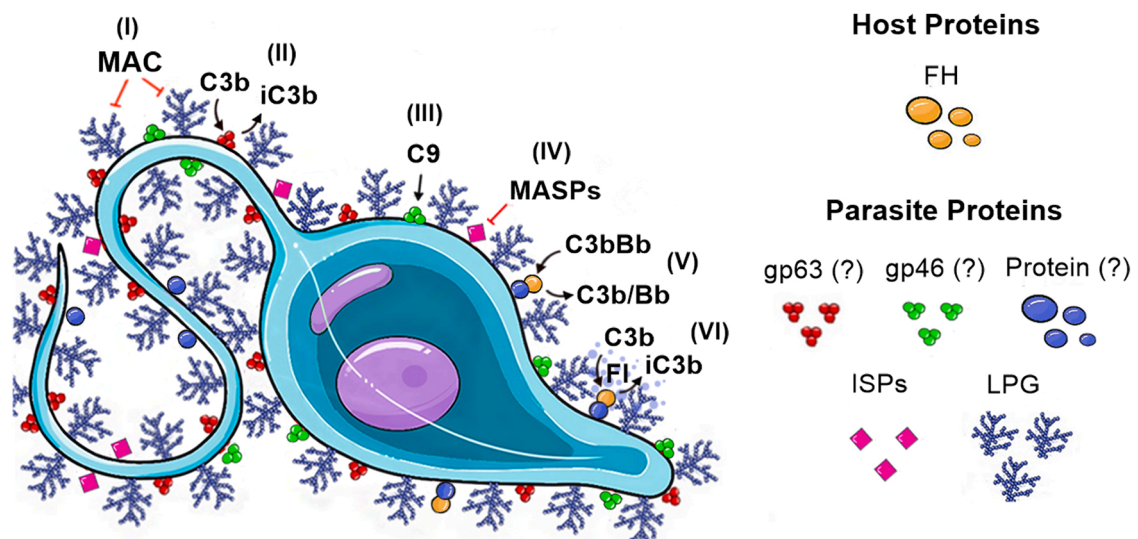


Fig. 6. Mechanisms of Complement System evasion present in *Leishmania* spp. (I) promastigotes surface LPG can prevent the formation of MAC in the parasite's membrane. (II) gp63 metalloprotease, interacts and cleaves C3b, but its role is still controversial (III) gp46 is suspected of preventing the formation of MAC on the surface by binding directly to the C9 component. (IV) ISPs interact with MASPs, mainly MASP2 inhibiting the formation of the Lectin Pathway initiator. (V and VI) uncharacterized molecule capable of recruiting human Factor H (FH) to promastigotes surface, which dissociates C3 convertase of the Alternative Pathway and act as cofactor for proteolytic cleavage of C3b by (Factor I) FI.

convertase. It was also shown that this inhibition reduced the production of the anaphylotoxins C3a and C5a, important in triggering inflammation (Fernandez, 2018). A newly described mechanism that also acts through C3b inactivation involves the binding of host serum FH to promastigotes and axenic amastigote-like forms. This mechanism, identified in *L. infantum*, *L. amazonensis* and *L. braziliensis*, emulates the host complement regulation, by using FH as cofactor for FI-mediated C3b cleavage. It works independently of gp63, since parasites that had gp63 inhibited still inactivate surface-bound C3b. The nature of this FH-binding surface molecule still remains unknown (Filho et al., 2021). Fig. 6 shows a summary of the adaptations developed by *Leishmania* spp. to evade the human complement system.

3.6. *Entamoeba histolytica*

E. histolytica is the etiologic agent of amebiasis, a mostly asymptomatic cosmopolitan disease, which acquired great visibility due to the appearance of its symptomatic form. Approximately 500 million people worldwide are infected, but only 10 % develop the disease. Although most infections are asymptomatic, many patients with *E. histolytica* have a broad-spectrum clinical picture that can occur at the intestinal level (amebic dysentery, acute recto colitis, chronic non-dysenteric colitis, ameboma) and extra-intestinal (amebic liver abscess, brain abscess and genitourinary disease) (CDC, 2019b; WHO Expert Committee, 1969). The *E. histolytica* cycle is relatively simple when compared to other protozoa, with only two evolutionary forms, trophozoites and cysts whose transmission occurs exclusively among humans. Due to unknown factors, *E. histolytica* trophozoite can penetrate and cross the intestinal epithelium and can be disseminated to various organs through the bloodstream, with a direct contact with the complement system.

One complement evasion mechanism involves the specific lectin that binds galactose and N-acetyl-D-galactosamine (Gal/GalNAc lectin). This molecule is anchored to the trophozoite membrane and shares genetic sequence and antigenic similarities with human CD59, which suggested molecular and inhibition functions mimicry. Indeed, the Gal/GalNAc lectin acts, like CD59, by preventing the binding of C8 and C9 to the C5b-C7 complex, thus inhibiting the formation of MAC in the parasite membrane (Braga et al., 1992). Other studies have shown that cysteine-proteases secreted by the trophozoite also act by inhibiting the anaphylotoxins C3a and C5a released during complement activation (Reed et al., 1995). Recently, it was found that the *E. histolytica* trophozoite can avoid complement lysis by trophocytosis, a mechanism that involves the ingestion of host red blood cells by the trophozoite. In

this process, parasites export the host FI cofactor CD46 and the MAC inhibitor CD59 to the outer leaflet of their plasma membranes (Miller et al., 2021). *E. histolytica* trophozoites can also resist complement activation by repairing their injured plasma membrane by removing the lytic pore through endocytosis induced by the secretion of acid sphingomyelinases from lysosomes in a process similar to that used by many eukaryotic cells to resist plasma membrane attacks (Corrotte and Castro-Gomes, 2019; Ramírez et al., 2019). These evasion mechanisms are shown in Fig. 7.

4. Concluding remarks and perspectives

Parasitic protozoa are defined as single-celled eukaryotic organisms capable of causing a wide range of diseases, most affecting people living in poverty, lacking basic sanitation and having difficult access to health centers (CDC, 2020). The ancestral coexistence between these parasites and the immune system dates to ancient phylogenetic bases. The parasites evasion mechanisms arose from co-evolutionary processes, being conserved and highly effective against the host's defenses.

Avoiding MAC formation to escape cell lysis has always been described as a canonical strategy for many pathogens. However, recent findings have pointed to another cellular strategy to block cell lysis: the removal of MAC pores from parasite's plasma membrane through the Ca^{2+} -dependent mechanism of plasma membrane repair (Ramírez et al., 2019). The plasma membrane repair mechanism of eukaryotic cells has been present in the phylogenetic tree of organisms since ancient times. The ability to repair damages inflicted to the plasma membrane has been derived from echinoderms to mammals (Andrews et al., 2015; Heilbrunn, 1956; Ramírez et al., 2019). When a lytic pore is formed in the plasma membrane of mammalian cells, its removal by endocytosis normally occurs (reviewed by Corrotte and Castro-Gomes, 2019). However, some studies have additionally demonstrated that pores can be also released from the membrane in vesicular buddings similar to exosomes in a process mediated by the membrane fission machinery ESCRT-III (Jimenez et al., 2014; reviewed by Castro-Gomes et al., 2014). Pilot experiments carried out in our laboratory demonstrated that *L. amazonensis* promastigotes can repair the lytic pores formed by MAC. Like mammalian cells, promastigotes incubated with human complement were able to remove MAC pores from their plasma membrane, thus surviving complement killing (unpublished results). Thus, this plasma membrane repair mechanism is conserved in this parasite, and possibly in many others. Future experiments will define whether MAC pores are endocytosed or detached from the plasma membrane by vesicular

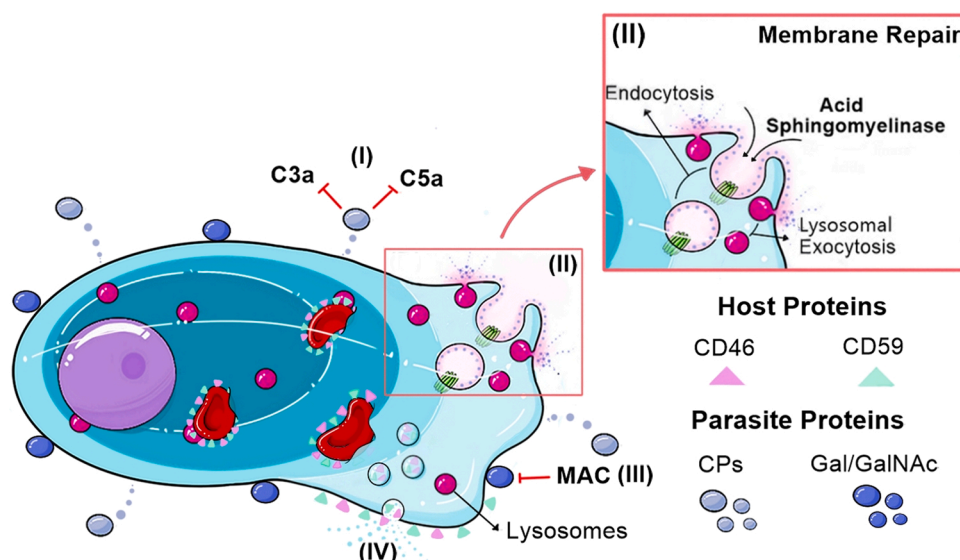


Fig. 7. Mechanisms of Complement System evasion present in *Entamoeba histolytica*. (I) Release of cysteine-proteases that inhibit anaphylotoxins C3a and C5a. (II) MAC-injured membrane repair after calcium-dependent lysosomal exocytosis. The lysosomal enzyme acid sphingomyelinase induces membrane invagination in the area affected by the pore, leading to endocytosis of MAC (III) Gal/GalNAc prevents the binding of C8 and C9 to the C5b-C7 complex, preventing MAC formation. (IV) sequestration of CD46 and CD59 from red blood cells ingested by the parasite and exportation of these regulators to its plasma membrane. CD46 acts as a cofactor for Factor I (FI) and CD59 inhibits MAC formation. Thus, regardless the complement activation pathway involved, the parasite is able to either inhibit MAC formation or, if it is formed, to remove the lytic pore from their membranes.

budding, or both, and which cellular and molecular effectors conserved in these parasites are involved in this complement system escape strategy.

Even though the complement system is mostly known for its action in eliminating microorganisms, its function exceeds that role, accounting for promoting immune surveillance, homeostasis and adaptive responses, and many others (Ricklin et al., 2016, 2010). Interestingly, besides the usual protective functions of the complement system while circulating in serum and interstitial fluids, thus directly interacting with the extracellular leaflets of pathogens, evidence of intracellular activation and intracellular functions of the complement system have recently emerged, the so-called complosome (Arbore et al., 2017, 2016; Liszewski et al., 2013). For example, human CD4⁺ cells contain intracellular stores of C3 interacting in lysosomes with cathepsin L, constantly generating C3a, modulating T cell survival via low level mTOR induction (Liszewski et al., 2013). Hepatitis C virus can also modulate T cells proliferation upon binding of opsonizing C3b to CD19 and CD81, affecting intracellular signaling pathways that block cell activation and the anti-viral responses (Wang et al., 2016). On the other hand, the intracellular activation of the complement system can also act to defeat pathogens, for example, the pathogenic bacteria *Listeria* when opsonized by C3 is intracellularly targeted to autophagosomes which then eliminate the pathogen (Kim et al., 2016). Similarly, C3 may also get internalized together with pathogens and trigger an immunological signaling culminating with NF- κ B activation and several other transcription factors involved in the generation of a strong inflammatory response (Tam et al., 2014). Likewise, the opsonization of the bacteria *Burkholderia pseudomallei*, the causative agent of melioidosis, by C3, increases the death of the intracellular pathogen in a NADPH-oxidase-dependent manner in human neutrophils (Woodman et al., 2012). Thus, even though the most evident and studied effective functions of the complement system are related to its direct action on pathogen's surface, leading to cell lysis or pathogen capture by immune cells, the complement system may also influence important intracellular signaling pathways in the context of host-pathogen interaction.

Importantly, the functions of the complement system in the context of complosome, thus in the intracellular environment, open new roads to increase our understanding of effector immune responses linked to complement activation both in the context of innate and adaptive immune responses. Intracellular parasitic protozoa are very specific regarding the niches they occupy while harboring their host cells. For example, *Leishmania* spp. live within the endocytic pathway in acidic compartments that fuses with lysosomes whilst Apicomplexa parasites, such as *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium* spp., avoid lysosomal fusion to survive in intracellular vacuoles that are modulated to not acidify. *Trypanosoma cruzi*, on its turn, escape from the vacuole in which it is firstly internalized to freely live and multiply in the cytosol of its host cells. The mechanisms that govern these different destinations after parasite internalization are not fully understood. Since these parasites differently interact with molecules of the complement system and taking into consideration the newly discovered actions of the complement system in the intracellular environment, the study of possible roles of the complement system in the final intracellular destination of intracellular parasites is an exciting field to be explored. The definition of all cellular and biochemical bases that govern complement resistance in parasitic protozoa and also the possible roles played by the complement system during host-pathogen interaction may provide crucial information about their basic biology and the weapons they use to trick host defenses, eventually providing important clues that may be used for therapeutic purposes.

Acknowledgments

LVRB and ALSM are Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) fellows. MFH is a CNPq research fellow. This study was financed in part by Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível

Superior (CAPES). Our team is supported by Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG). The members of Laboratório de Biologia Celular e Patógenos Intracelulares would like to thank Professors Egler Chiari (*in memoriam*) and Lucia Maria da Cunha Galvão from Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, for all generosity and support in the establishing of our research group.

References

- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., 2016. A historical overview of the classification. *Evol. Dispers. Leishmania Parasites Sandflies* 1–40. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>.
- Alam, M.N., Das, P., De, T., Chakraborti, T., 2016. Identification and characterization of a *Leishmania donovani* serine protease inhibitor: possible role in regulation of host serine proteases. *Life Sci.* 144, 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.12.004>.
- Albertí, S., Marqués, G., Hernández-Allés, S., Rubires, X., Tomás, J.M., Vivanco, F., Benedí, V.J., 1996. Interaction between complement subcomponent C1q and the *Klebsiella pneumoniae* porin OmpK36. *Infect. Immun.* 64, 4719 LP – 4725.
- Albrecht, J.C., Fleckenstein, B., 1992. New member of the multigene family of complement control proteins in herpesvirus saimiri. *J. Virol.* 66, 3937–3940.
- Andrews, N.W., Corrotte, M., Castro-Gomes, T., 2015. Above the fray: Surface remodeling by secreted lysosomal enzymes leads to endocytosis-mediated plasma membrane repair. *Semin. Cell Dev. Biol.* 45, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.09.022>.
- Arbore, G., West, E.E., Spolski, R., Robertson, A.A.B., Klos, A., Rheinheimer, C., Dutow, P., Woodruff, T.M., Yu, Z.X., O'Neill, L.A., Coll, R.C., Sher, A., Leonard, W.J., Köhl, J., Monk, P., Cooper, M.A., Arno, M., Afzali, B., Lachmann, H.J., Cope, A.P., Mayer-Barber, K.D., Kemper, C., 2016. T helper 1 immunity requires complement-driven NLRP3 inflammasome activity in CD4⁺ T cells. *Sci.* (80) 352. <https://doi.org/10.1126/science.aad1210>.
- Arbore, G., Kemper, C., Kolev, M., 2017. Intracellular complement – the complosome – in immune cell regulation. *Mol. Immunol.* 89, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.05.012>.
- Arlaud, G.J., Reboul, A., Sim, R.B., Colomb, M.G., 1979. Interaction of C1-inhibitor with the C1r and C1s subcomponents in human C1. *Biochim. Biophys. Acta* 576, 151–162. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(79\)90494-x](https://doi.org/10.1016/0005-2795(79)90494-x).
- Arroyo-Olarte, R.D., Gupta, N., 2016. Phosphatidylthreonine: An exclusive phospholipid regulating calcium homeostasis and virulence in a parasitic protist. *Microb. Cell* 3, 189–190. <https://doi.org/10.15698/mic2016.05.496>.
- Arroyo-Olarte, R.D., Martínez, I., Lujan, E., Mendlovic, F., Dinkova, T., Espinoza, B., 2020. Differential gene expression of virulence factors modulates infectivity of Tc1 *Trypanosoma cruzi* strains. *Parasitol. Res.* 119, 3803–3815. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06891-1>.
- Bandyopadhyay, P., Ghosh, D.K., De, A., Ghosh, K.N., Chaudhuri, P.P., Das, P., Bhattacharya, A., 1991. Metacyclogenesis of *leishmania* spp: species-specific in vitro transformation, complement resistance, and cell surface carbohydrate and protein profiles. *J. Parasitol.* 77, 411. <https://doi.org/10.2307/3283129>.
- Bohls, S.S., Garred, P., Kemper, C., Tenner, A.J., 2019. Complement nomenclature—deconvoluted. *Front. Immunol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01308>.
- Boyle, M.J., Wilson, D.W., Richards, J.S., Riglar, D.T., Tetteh, K.K.A., Conway, D.J., Ralph, S.A., Baum, J., Beeson, J.G., 2010. Isolation of viable *Plasmodium falciparum* merozoites to define erythrocyte invasion events and advance vaccine and drug development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 14378–14383. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009198107>.
- Braga, L.L., Ninomiya, H., McCoy, J.J., Eacker, S., Wiedmer, T., Pham, C., Wood, S., Sims, P.J., Petri, W.A., 1992. Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesion of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest.* 90, 1131–1137. <https://doi.org/10.1172/JCI115931>.
- Brittingham, A., Morrison, C.J., McMaster, W.R., McGwire, B.S., Chang, K.P., Mosser, D.M., 1995. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J. Immunol.* 155, 3102 LP – 3111.
- Burton, D.R., Boyd, J., Brampton, A.D., Easterbrook-Smith, S.B., Emanuel, E.J., Novotny, J., Rademacher, T.W., van Schravendijk, M.R., Sternberg, M.J.E., Dwek, R.A., 1980. The C1q receptor site on immunoglobulin G. *Nature* 288, 338–344. <https://doi.org/10.1038/288338a0>.
- Castro-Gomes, T., Koushik, A.B., Andrews, N.W., 2014. ESCRT: nipping the wound in the bud? *Trends Biochem. Sci.* 39, 307–309. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.06.001>.
- CDC, 2019a. Malaria Disease [WWW Document]. *Glob. Heal. Div. Parasit. Dis. Malar.* URL (<https://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html>) (accessed 12.4.21).
- CDC, 2019b. Amebiasis [WWW Document]. *Glob. Heal. Div. Parasit. Dis. Malar.* URL Global Health, Division of Parasitic Diseases and Malaria (accessed 12.5.21).
- CDC, 2018. Toxoplasmosis Disease [WWW Document]. *Glob. Heal. Div. Parasit. Dis. Malar.* URL (<https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/disease.html>) (accessed 12.4.21).
- CDC, 2020. About Parasites [WWW Document]. *Glob. Heal. Div. Parasit. Dis. Malar.* URL (<https://www.cdc.gov/parasites/about.html>) (accessed 12.5.21).
- Cestari, I., Krarup, A., Sim, R.B., Inal, J.M., Ramirez, M.I., 2009. Role of early lectin pathway activation in the complement-mediated killing of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Immunol.* 47, 426–437. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.08.030>.

- Cestari, I., Ansa-Addo, E., Deolindo, P., Inal, J.M., Ramirez, M.I., 2012. Trypanosoma cruzi Immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. *J. Immunol.* 188, 1942–1952. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102053>.
- Chaudhuri, G., Chang, K.-P., 1988. Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from *Leishmania mexicana* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 27, 43–52. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(88\)90023-0](https://doi.org/10.1016/0166-6851(88)90023-0).
- Corrotte, M., Castro-Gomes, T., 2019. Lysosomes and plasma membrane repair, 1st ed, *Current Topics in Membranes*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2019.08.001>.
- Doorduijn, D.J., Bardeol, B.W., Heesterbeek, D.A.C., Ruyken, M., Benn, G., Parsons, E.S., Hoogenboom, B.W., Rooijackers, S.H.M., 2020. Bacterial killing by complement requires direct anchoring of membrane attack complex precursor C5b7. *PLoS Pathog.* 16, e1008606 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008606>.
- Eschenlauer, S.C.P., Faria, M.S., Morrison, L.S., Bland, N., Ribeiro-Gomes, F.L., DosReis, G.A., Coombs, G.H., Lima, A.P.C.A., Mottram, J.C., 2009. Influence of parasite encoded inhibitors of serine peptidases in early infection of macrophages with *Leishmania major*. *Cell. Microbiol.* 11, 106–120. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01243.x>.
- Escudero-Esparza, A., Kalchishkova, N., Kurbasic, E., Jiang, W.G., Blom, A.M., 2013. The novel complement inhibitor human CUB and Sushi multiple domains 1 (CSMD1) protein promotes factor I-mediated degradation of C4b and C3b and inhibits the membrane attack complex assembly. *FASEB J.* 27, 5083–5093. <https://doi.org/10.1096/fj.13-230706>.
- Fernandez, M.M., 2018. *Leishmania donovani* inhibitor of serine Peptidases 2 Mediated inhibition of lectin Pathway and Upregulation of c5ar signaling Promote Parasite Survival inside host 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00063>.
- Ferreira, V., Molina, M.C., Valck, C., Rojas, A., Aguilar, L., Ramirez, G., Schwaeble, W., Ferreira, A., 2004a. Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts. *Mol. Immunol.* 40, 1279–1291. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.11.018>.
- Ferreira, V., Valck, C., Sánchez, G., Gingras, A., Tzima, S., Molina, M.C., Sim, R., Schwaeble, W., Ferreira, A., 2004b. The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from trypanosoma cruzi. *J. Immunol.* 172, 3042–3050. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.3042>.
- Filho, A.A.P., Nascimento, A.A., de, S., Saab, N.A.A., Fugiwara, R.T., D'Ávila Pessoa, G. C., Koerich, L.B., Pereira, M.H., Araújo, R.N., Sant'Anna, M.R.V., Gontijo, N.F., 2021. Evasion of the complement system by *Leishmania* through the uptake of factor H, a complement regulatory protein. *Acta Trop.* 224, 106152 <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106152>.
- Fischer, E., Ouassii, M.A., Velge, P., Cornette, J., Kazatchkine, M.D., 1988. gp 58/68, a parasite component that contributes to the escape of the trypanostigote form of *T. cruzi* from damage by the human alternative complement pathway. *Immunology* 65, 299–303.
- Frederiksen, P.D., Thiel, S., Larsen, C.B., Jensenius, J.C., 2005. M-ficolin, an innate immune defence molecule, binds patterns of acetyl groups and activates complement. *Scand. J. Immunol.* 62, 462–473. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2005.01685.x>.
- Fuhrman, S.A., Joiner, K.A., 1989. *Toxoplasma gondii*: mechanism of resistance to complement-mediated killing. *J. Immunol.* 142, 940–947.
- Garred, P., Genster, N., Pilely, K., Bayarri-Olmos, R., Rosbjerg, A., Ma, Y.J., Skjoed, M.-O., 2016. A journey through the lectin pathway of complement-MBL and beyond. *Immunol. Rev.* 274, 74–97. <https://doi.org/10.1111/immr.12468>.
- Gialelli, C., Gungor, B., Blom, A.M., 2018. Novel potential inhibitors of complement system and their roles in complement regulation and beyond. *Mol. Immunol.* 102, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.05.023>.
- Hadders, M.A., Bubeck, D., Roversi, P., Hakobyan, S., Forneris, F., Morgan, B.P., Pangburn, M.K., Llorca, O., Lea, S.M., Gros, P., 2012. Assembly and Regulation of the Membrane Attack Complex Based on Structures of C5b6 and sC5b9. *Cell Rep.* 1, 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.02.003>.
- Harboe, M., Mollnes, T.E., 2008. The alternative complement pathway revisited. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 1074–1084. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00350.x>.
- Haupt, K., Reuter, M., van den Elsen, J., Burman, J., Hälbig, S., Richter, J., Skerka, C., Zipfel, P.F., 2008. The *Staphylococcus aureus* Protein Sbi Acts as a Complement Inhibitor and Forms a Tripartite Complex with Host Complement Factor H and C3b. *PLoS Pathog.* 4, e1000250 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000250>.
- Heilbrunn, L.V., 1956. *The Dynamics of Living Protoplasm*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-12539-1>.
- Hellwage, J., Meri, T., Heikkilä, T., Alitalo, A., Panelius, J., Lahdenne, P., Ilkka Seppälä, J.T., Meri, S., 2001. The complement regulator factor h binds to the surface protein ospe of borrelia burgdorferi. *J. Biol. Chem.* 276, 8427–8435. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007994200>.
- Henrique, P.M., Marques, T., da Silva, M.V., Nascentes, G.A.N., de Oliveira, C.F., Rodrigues, V., Gómez-Hernández, C., Norris, K.A., Ramirez, L.E., Meira, W.S.F., 2016. Correlation between the virulence of *T. cruzi* strains, complement regulatory protein expression levels, and the ability to elicit lytic antibody production. *Exp. Parasitol.* 170, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.09.001>.
- Holmquist, E., Okroj, M., Nodin, B., Jirström, K., Blom, A.M., 2013. Sushi domain-containing protein 4 (SUSD4) inhibits complement by disrupting the formation of the classical C3 convertase. *FASEB J.* 27, 2355–2366. <https://doi.org/10.1096/fj.12-222042>.
- Huber, M., Fischer, M., Misselwitz, B., Manrique, A., Kuster, H., Niederöst, B., Weber, R., von Wyl, V., Günthard, H.F., Trkola, A., 2006. Complement Lysis Activity in Autologous Plasma Is Associated with Lower Viral Loads during the Acute Phase of HIV-1 Infection. *PLoS Med* 3, e441. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030441>.
- Iida, K., Whitlow, M.B., Nussenzweig, V., 1989. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* escape destruction by the terminal complement components. *J. Exp. Med.* 169, 881–891. <https://doi.org/10.1084/jem.169.3.881>.
- Inal, J.M., Hui, K.-M., Miot, S., Lange, S., Ramirez, M.I., Schneider, B., Krueger, G., Schifferli, J.-A., 2005. Complement C2 receptor inhibitor trispanning: a novel human complement inhibitor receptor. *J. Immunol.* 174, 356–366. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.1.356>.
- Janulczyk, R., Iannelli, F., Sjöholm, A.G., Pozzi, G., Björck Hic, L., 2000. A Novel surface protein of streptococcus pneumoniae that interferes with complement function. *J. Biol. Chem.* 275, 37257–37263. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004572200>.
- Jarva, H., Hellwage, J., Jokiranta, T.S., Lehtinen, M.J., Zipfel, P.F., Meri, S., 2004. The Group B streptococcal β and pneumococcal hic proteins are structurally related immune evasion molecules that bind the complement inhibitor factor H in an analogous fashion. *J. Immunol.* 172, 3111–3118. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.3111>.
- Jayasekera, J.P., Moseman, E.A., Carroll, M.C., 2007. Natural antibody and complement mediate neutralization of influenza virus in the absence of prior immunity. *J. Virol.* 81, 3487–3494. <https://doi.org/10.1128/JVI.02128-06>.
- Ji, X., Olinger, G.G., Aris, S., Chen, Y., Gewurz, H., Spear, G.T., 2005. Mannose-binding lectin binds to Ebola and Marburg envelope glycoproteins, resulting in blocking of virus interaction with DC-SIGN and complement-mediated virus neutralization. *J. Gen. Virol.* 86, 2535–2542. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81199-0>.
- Jimenez, A.J., Maiuri, P., Lafaurie-Janvore, J., Divoux, S., Piel, M., Perez, F., 2014. ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. *Sci. (80-)* 343. <https://doi.org/10.1126/science.1247136>.
- Johnson, J.B., Capraro, G.A., Parks, G.D., 2008. Differential mechanisms of complement-mediated neutralization of the closely related paramyxoviruses simian virus 5 and mumps virus. *Virology* 376, 112–123. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.03.022>.
- Joiner, K.A., DaSilva, W.D., Rimoldi, M.T., Hammer, C.H., Sher, A., Kipnis, T.L., 1988. Biochemical characterization of a factor produced by trypanostigotes of *Trypanosoma cruzi* that accelerates the decay of complement C3 convertases. *J. Biol. Chem.* 263, 11327–11335. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)37962-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)37962-6).
- Kapadia, S.B., Molina, H., van Berkel, V., Speck, S.H., Virgin, H.W., 1999. Murine Gammaherpesvirus 68 Encodes a Functional Regulator of Complement Activation. *J. Virol.* 73, 7658–7670. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.9.7658-7670.1999>.
- Kennedy, A.T., Schmidt, C.Q., Thompson, J.K., Weiss, G.E., Taechalertpaisarn, T., Gilson, P.R., Barlow, P.N., Crabb, B.S., Cowman, A.F., Tham, W.-H., 2016. Recruitment of Factor H as a Novel Complement Evasion Strategy for Blood-Stage Plasmodium falciparum Infection. *J. Immunol.* 196, 1239–1248. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501581>.
- Kennedy, A.T., Wijeyewickrema, L.C., Huglo, A., Lin, C., Pike, R., Cowman, A.F., Tham, W.-H., 2017. Recruitment of Human C1 Esterase Inhibitor Controls Complement Activation on Blood Stage Plasmodium falciparum Merozoites. *J. Immunol.* 198, 4728–4737. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700067>.
- Kim, K.H., Choi, B.K., Kim, Y.H., Han, C., Oh, H.S., Lee, D.G., Kwon, S.B., 2016. Extracellular stimulation of VSIg4/complement receptor Ig suppresses intracellular bacterial infection by inducing autophagy. *Autophagy* 12, 1647–1659. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1196314>.
- Kirjavainen, V., Jarva, H., Biedzka-Sarek, M., Blom, A.M., Skurnik, M., Meri, S., 2008. Yersinia enterocolitica Serum Resistance Proteins YadA and Ail Bind the Complement Regulator C4b-Binding Protein. *PLoS Pathog.* 4, e1000140 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000140>.
- Kishore, U., Reid, K.B., 2000. C1q: Structure, function, and receptors. *Immunopharmacology* 49, 159–170. [https://doi.org/10.1016/S0162-3109\(00\)80301-X](https://doi.org/10.1016/S0162-3109(00)80301-X).
- Kishore, U., Ghai, R., Greenough, T.J., Shrive, A.K., Bonifati, D.M., Gadjeva, M.G., Waters, P., Kojouharova, M.S., Chakraborty, T., Agrawal, A., 2004. Structural and functional anatomy of the globular domain of complement protein C1q. *Immunol. Lett.* 95, 113–128. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2004.06.015>.
- Kraiczky, P., Hellwage, J., Skerka, C., Becker, H., Kirshenfeld, M., Simon, M.M., Brade, V., Zipfel, P.F., Wallich, R., 2004. Complement Resistance of Borrelia burgdorferi Correlates with the Expression of BbCRASP-1, a Novel Linear Plasmid-encoded Surface Protein That Interacts with Human Factor H and FHL-1 and Is Unrelated to Erp Proteins. *J. Biol. Chem.* 279, 2421–2429. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308343200>.
- Lambris, J., Holers, V., 2000. *Therapeutic Interventions in the Complement System*, Humana Pre. ed. Totowa, New Jersey. <https://doi.org/https://doi.org.ez27.periodicos.capes.gov.br/10.1007/978-1-59259-017-9>.
- Lawson, P., Reid, K.B.M., 2000. Mannose-binding lectin, in: *The Complement FactsBook*. Elsevier, pp. 31–35. <https://doi.org/10.1016/B978-012733360-1/50005-1>.
- Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G. F., Loebllich, A.R., Lom, I.J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., Wallace, F.G., 1980. A Newly Revised Classification of the Protozoa. *J. Protozool.* 27, 37–58. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1980.tb04228.x>.
- Ley, V., Andrews, N.W., Robbins, E.S., Nussenzweig, V., 1988. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J. Exp. Med.* 168, 649–659. <https://doi.org/10.1084/jem.168.2.649>.
- Lima, A.P.C.A., Mottram, J.C., 2010. Trypanosomatid-Encoded Inhibitors of Peptidases: Unique Structural Features and Possible Roles as Virulence Factors. *Open Parasitol. J.* 4, 132–138.
- Liszewski, M.K., Kolev, M., Le Fric, G., Leung, M., Bertram, P.G., Fara, A.F., Subias, M., Pickering, M.C., Drouet, C., Meri, S., Arstila, T.P., Pekkarinen, P.T., Ma, M., Cope, A., Reinheckel, T., Rodriguez de Cordoba, S., Afzali, B., Atkinson, J.P., Kemper, C., 2013. Intracellular Complement Activation Sustains T Cell Homeostasis and

- Mediates Effector Differentiation. *Immunity* 39, 1143–1157. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.018>.
- Loos, M., 1985. The Complement System: Activation and Control, in: *Bacteria and Complement*. pp. 7–18. https://doi.org/10.1007/978-3-642-45604-6_2.
- Malhotra, R., Lu, J., Holmskov, U., Sim, R.B., 2008. Collectins, collectin receptors and the lectin pathway of complement activation. *Clin. Exp. Immunol.* 97, 4–9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1994.tb06254.x>.
- Margos, G., Navarette, S., Butcher, G., Davies, A., Willers, C., Sinden, R.E., Lachmann, P. J., 2001. Interaction between Host Complement and Mosquito-Midgut-Stage *Plasmodium* berghiei. *Infect. Immun.* 69, 5064–5071. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.8.5064-5071.2001>.
- Matsushita, M., 2013. Ficolins in complement activation. *Mol. Immunol.* 55, 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.08.017>.
- Matsushita, M., Fujita, T., 2001. Ficolins and the lectin complement pathway. *Immunol. Rev.* 180, 78–85. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2001.1800107.x>.
- Matsushita, M., Thiel, S., Jensenius, J.C., Terai, I., Fujita, T., 2000. Proteolytic Activities of Two Types of Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease. *J. Immunol.* 165, 2637–2642. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.5.2637>.
- McConville, M.J., Turco, S.J., Ferguson, M.A., Sacks, D.L., 1992. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO J.* 11, 3593–3600.
- Medzhitov, R., Janeway, C.A., 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 4–9. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(97\)80152-5](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(97)80152-5).
- Merle, N.S., Church, S.E., Fremeaux-Bacchi, V., Roumenina, L.T., 2015. Complement System Part I: Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front. Immunol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00262>.
- Miller, H., Tam, T., Ralston, K., 2021. Entamoeba histolytica develops resistance to complement deposition and lysis after acquisition of human complement regulatory proteins through trogocytosis. <https://doi.org/10.1101/2021.08.04.455151>.
- Monzote, L., Siddiq, A., 2011. Drug Development to Protozoan Diseases. *Open Med. Chem. J.* 5, 1–3. <https://doi.org/10.2174/1874104501105010001>.
- Morgan, B.P., Dankert, J.R., Esser, A.F., 1987. Recovery of human neutrophils from complement attack: removal of the membrane attack complex by endocytosis and exocytosis. *J. Immunol.* 138, 246–253.
- Müller-Eberhard, H.J., 1984. The membrane attack complex. *Springer Semin. Immunopathol.* 7, 93–141. <https://doi.org/10.1007/BF01893017>.
- Müller-Eberhard, H.J., 1985. The killer molecule of complement. *J. Invest. Dermatol.* 85, S47–S52. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12275445>.
- Müller-Eberhard, H.J., 1986. The membrane attack complex of complement. *Annu. Rev. Immunol.* 4, 503–528.
- Nonaka, M., 2001. Evolution of the complement system. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 69–73. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(00\)00184-9](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(00)00184-9).
- Norris, K.A., Schimpf, J.E., 1994. Biochemical analysis of the membrane and soluble forms of the complement regulatory protein of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 62, 236 LP – 243.
- Norris, K.A., Harth, G., So, M., 1989. Purification of a *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein which elicits lytic antibodies. *Infect. Immun.* 57, 2372–2377. <https://doi.org/10.1128/IAI.57.8.2372-2377.1989>.
- Norris, K.A., Bradt, B., Cooper, N.R., So, M., 1991. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. *J. Immunol.* 147, 2240–2247.
- Nunes, A.C., Ramalho-Pinto, F.J., 1996. Complement resistance of *Leishmania amazonensis* promastigotes is independent of parasite proteases and lysis of sensitive forms is not due to natural antibodies in normal human serum. *Brazilian J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. Med. e Biol.* 29, 1633–1640.
- Nunes, A.C., Almeida-campos, F.R., Horta, M.F., Ramalho-pinto, F.J., 1997. *Leishmania amazonensis* promastigotes evade complement killing by interfering with the late steps of the cascade. *Parasitology* 115, 601–609. <https://doi.org/10.1017/S0031182097001704>.
- Ojha, H., Ghosh, P., Singh Panwar, H., Shende, R., Gondane, A., Mande, S.C., Sahu, A., 2019. Spatially conserved motifs in complement control protein domains determine functionality in regulators of complement activation-family proteins. *Commun. Biol.* 2, 290. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0529-9>.
- Pangburn, M.K., Müller-Eberhard, H.J., 1983. Initiation of the alternative complement pathway due to spontaneous hydrolysis of the thioester of C3. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 421, 291–298. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1983.tb18116.x>.
- Pangburn, M.K., Ferreira, V.P., Cortes, C., 2008. Discrimination between host and pathogens by the complement system. *Vaccine* 26, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.11.023>.
- Petersen, S.V., Thiel, S., Jensen, L., Vorup-Jensen, T., Koch, C., Jensenius, J.C., 2000. Control of the classical and the MBL pathway of complement activation. *Mol. Immunol.* 37, 803–811. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(01\)00004-9](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(01)00004-9).
- Pimenta, P.F.P., Saraiva, E.M.B., Sacks, D.L., 1991. The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. *Exp. Parasitol.* 72, 191–204. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(91\)90137-L](https://doi.org/10.1016/0014-4894(91)90137-L).
- Pizza, M., Donnelly, J., Rappuoli, R., 2008. Factor H-binding protein, a unique meningococcal vaccine antigen. *Vaccine* 26, 146–148. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.11.068>.
- Pouw, R.B., Ricklin, D., 2021. Tipping the balance: intricate roles of the complement system in disease and therapy. *Semin. Immunopathol.* 43, 757–771. <https://doi.org/10.1007/s00281-021-00892-7>.
- Puentes, S.M., Sacks, D.L., da Silva, R.P., Joiner, K.A., 1988. Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* 167, 887–902. <https://doi.org/10.1084/jem.167.3.887>.
- Puentes, S.M., Dwyer, D.M., Bates, P.A., Joiner, K.A., 1989a. Binding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. *J. Immunol.* 143, 3743–3749.
- Puentes, S.M., Dwyer, D.M., Bates, P.A., Joiner, K.A., 1989b. Binding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. *J. Immunol.* 143, 3743–3749.
- Puentes, S.M., Da Silva, R.P., Sacks, D.L., Hammer, C.H., Joiner, K.A., 1990. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J. Immunol.* 145, 4311 LP – 4316.
- Ramírez, F., Mendoza-Macías, C., Andrade-Guillén, S., Rangel-Serrano, A., Páramo-Pérez, I., Rivera-Cuellar, P.E., España-Sánchez, B.L., Luna-Bárceñas, G., Anaya-Velázquez, F., Franco, B., Padilla-Vaca, F., 2019. Plasma membrane damage repair is mediated by an acid sphingomyelinase in *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathog.* <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008016>.
- Ramírez-tolosa, G., Ferreira, A., Sim, R.B., 2017. *Trypanosoma cruzi* Evades the Complement System as an Efficient Strategy to Survive in the Mammalian Host: The Specific Roles of Host / Parasite Molecules and *Trypanosoma cruzi* Calreticulin 8, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01667>.
- Reed, S.L., Ember, J.A., Herdman, D.S., DiScipio, R.G., Hugli, T.E., Gigli, I., 1995. The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylatoxins C3a and C5a. *J. Immunol.* 155, 266–274.
- Reid, K.B.M., 2018. Complement Component C1q: Historical Perspective of a Functionally Versatile, and Structurally Unusual, Serum Protein. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00764>.
- Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., Lambris, J.D., 2010. Complement: A key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* 11, 785–797. <https://doi.org/10.1038/ni.1923>.
- Ricklin, D., Reis, E.S., Lambris, J.D., 2016. Complement in disease: a defence system turning offensive. *Nat. Rev. Nephrol.* 12, 383–401. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.70>.
- Rosado, C.J., Kondos, S., Bull, T.E., Kuiper, M.J., Law, R.H.P., Buckle, A.M., Voskoboinik, I., Bird, P.L., Trapani, J.A., Whistock, J.C., Dunstone, M.A., 2008. The MACPF/CDC family of pore-forming toxins. *Cell. Microbiol.* 10, 1765–1774. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01191.x>.
- Roumenina, L.T., Popov, K.T., Bureeva, S.V., Kojouharova, M., Gadjeva, M., Rabheru, S., Thakrar, R., Kaplun, A., Kishore, U., 2008. Interaction of the globular domain of human C1q with *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteom.* 1784, 1271–1276. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.04.029>.
- Sacks, D.L., Brodin, T.N., Turco, S.J., 1990. Developmental modification of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes during metacyclogenesis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 42, 225–233. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(90\)90165-I](https://doi.org/10.1016/0166-6851(90)90165-I).
- Sahu, A., Kozel, T.R., Pangburn, M.K., 1994. Specificity of the thioester-containing reactive site of human C3 and its significance to complement activation. *Biochem. J.* 302, 429–436. <https://doi.org/10.1042/bj3020429>.
- Saifuddin, M., Parker, C.J., Peeples, M.E., Gorny, M.K., Zolla-Pazner, S., Ghassemi, M., Rooney, I.A., Atkinson, J.P., Spear, G.T., 1995. Role of virion-associated glycosylphosphatidylinositol-linked proteins CD55 and CD59 in complement resistance of cell line-derived and primary isolates of HIV-1. *J. Exp. Med.* 182, 501–509. <https://doi.org/10.1084/jem.182.2.501>.
- Schenkman, S., Jiang, M.-S., Hart, G.W., Nussenzweig, V., 1991. A novel cell surface trans-sialidase of *trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell* 65, 1117–1125. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90008-M](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90008-M).
- Serrato, D., Rappuoli, R., Scarselli, M., Gros, P., van Strijp, J.A.G., 2010. Molecular mechanisms of complement evasion: learning from staphylococci and meningococci. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 393–399. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2366>.
- Sikorski, P.M., Commodaro, A.G., Grigg, M.E., 2020. *Toxoplasma gondii* Recruits Factor H and C4b-Binding Protein to Mediate Resistance to Serum Killing and Promote Parasite Persistence in vivo 10, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03105>.
- Simon, N., Lasonder, E., Scheuermayer, M., Kuehn, A., Tews, S., Fischer, R., Zipfel, P.F., Skerka, C., Pradel, G., 2013. Malaria Parasites Co-opt Human Factor H to Prevent Complement-Mediated Lysis in the Mosquito Midgut. *Cell Host Microbe* 13, 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.11.013>.
- Sologub, L., Kuehn, A., Kern, S., Przyborski, J., Schillig, R., Pradel, G., 2011. Malaria proteases mediate inside-out egress of gametocytes from red blood cells following parasite transmission to the mosquito. *Cell. Microbiol.* 13, 897–912. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01588.x>.
- Spath, G.F., Garraway, L.A., Turco, S.J., Beverley, S.M., 2003a. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 9536–9541. <https://doi.org/10.1073/pnas.1530604100>.
- Spath, G.F., Garraway, L.A., Turco, S.J., Beverley, S.M., 2003b. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 9536–9541. <https://doi.org/10.1073/pnas.1530604100>.
- Stoermer, K.A., Morrison, T.E., 2011. Complement and viral pathogenesis. *Virology* 411, 362–373. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.12.045>.
- Swanson, S.M., Dombink-Kurtzman, M.A., Voss, E.W., 1988. C1q binding by a high affinity anti-fluorescein murine monoclonal IgM antibody and monomeric subunits. *Mol. Immunol.* 25, 545–554. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(88\)90076-4](https://doi.org/10.1016/0161-5890(88)90076-4).

- Tam, J.C.H., Bidgood, S.R., McEwan, W.A., James, L.C., 2014. Intracellular sensing of complement C3 activates cell autonomous immunity. *Sci. (80-.)* 345. <https://doi.org/10.1126/science.1256070>.
- Tambourgi, D.V., Kipnis, T.L., da Silva, W.D., Joiner, K.A., Sher, A., Heath, S., Hall, B.F., Ogden, G.B., 1993. A partial cDNA clone of trypomastigote decay-accelerating factor (T-DAF), a developmentally regulated complement inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, has genetic and functional similarities to the human complement inhibitor DAF. *Infect. Immun.* 61, 3656 LP – 3663.
- Terajima, M., Cruz, J., Co, M.D.T., Lee, J.-H., Kaur, K., Wilson, P.C., Ennis, F.A., 2011. Complement-Dependent Lysis of Influenza A Virus-Infected Cells by Broadly Cross-Reactive Human Monoclonal Antibodies. *J. Virol.* 85, 13463–13467. <https://doi.org/10.1128/JVI.05193-11>.
- Tomlinson, S., Pontes de Carvalho, L.C., Vandekerckhove, F., Nussenzweig, V., 1994. Role of sialic acid in the resistance of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to complement. *J. Immunol.* 153, 3141–3147.
- Torgerson, P.R., Mastroiacovo, P., 2013. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. *Bull. World Health Organ* 91, 501–508. <https://doi.org/10.2471/BLT.12.111732>.
- Touray, M.G., Seeley, D.C., Miller, L.H., 1994. *Plasmodium gallinaceum*: Differential Lysis of Two Developmental Stages of Malaria Sporozoites by the Alternative Pathway of Complement. *Exp. Parasitol.* 78, 294–301. <https://doi.org/10.1006/expr.1994.1031>.
- Velge, P., Ouaisi, M.A., Cornette, J., Afchain, D., Capron, A., 1988. Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote collagen-binding proteins: possible role in cell-parasite interaction. *Parasitology* 97, 255–268 <https://doi.org/DOI:10.1017/S0031182000058467>.
- Volanakis, J.E., Kaplan, M.H., 1974. Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. II. Consumption of guinea pig complement by CRP complexes: requirement for human C1q. *J. Immunol.* 113, 9–17.
- Wang, R.Y., Bare, P., De Giorgi, V., Matsuura, K., Salam, K.A., Grandinetti, T., Schechterly, C., Alter, H.J., 2016. Preferential association of hepatitis C virus with CD19 + B cells is mediated by complement system. *Hepatology* 64, 1900–1910. <https://doi.org/10.1002/hep.28842>.
- Whaley, K., Ruddy, S., 1976. Modulation of the alternative complement pathways by beta 1H globulin. *J. Exp. Med.* 144, 1147–1163. <https://doi.org/10.1084/jem.144.5.1147>.
- WHO, 2022b. Chagas disease (also known as American trypanosomiasis) [WWW Document]. URL ([https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))) (accessed 2.8.21).
- WHO, 2022a. Malaria [WWW Document]. World Heal. Organization. URL (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>) (accessed 5.4.22).
- WHO, 2022c. Leishmaniasis [WWW Document]. URL (https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1) (accessed 5.4.22).
- WHO Expert Committee, 1969. World health organization technical report series - Amoebiasis.
- WHO/PAHO, 2016. Neglected infectious diseases in the Americas: Success stories and innovation to reach the neediest. PAHO, Washington, D.C.
- Woodman, M.E., Worth, R.G., Wooten, R.M., 2012. Capsule Influences the Deposition of Critical Complement C3 Levels Required for the Killing of *Burkholderia pseudomallei* via NADPH-Oxidase Induction by Human Neutrophils. *PLoS One* 7, e52276. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052276>.
- Zipfel, P.F., Skerka, C., 2009. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 729–740. <https://doi.org/10.1038/nri2620>.