

VLADIMIR FAZITO DO VALE

Estudo da atividade inibidora do sistema do complemento humano presente na saliva e conteúdo intestinal de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae)

Belo Horizonte

Novembro, 2011

Vladimir Fazito do Vale

Estudo da atividade inibidora do sistema do complemento humano presente na saliva e conteúdo intestinal de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae)

Orientador: Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo (ICB – UFMG)

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Ciências.

Belo Horizonte
Novembro, 2011

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço aos meus pais, pelo apoio que sempre me deram em todas as minhas escolhas, além do grande exemplo de honestidade.

Às minhas irmãs, Ana e Sara, pelo carinho e por sempre estarem ao meu lado, me aconselhando nos momentos de dúvida.

Agradeço minha família, especialmente meus padrinhos.

À Gina, meu amor, que me incentiva em tudo e é uma fonte de alegria para mim.

Aos meus amigos e amigas do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos, especialmente ao César Nonato que além de colocar o laboratório em ordem é uma pessoa excepcional.

Aos amigos do Departamento de Parasitologia.

Agradeço especialmente meu orientador Nelder Gontijo, pelos ensinamentos durante todos esses anos e por me incentivar em minhas próprias idéias.

Aos professores Marcos Horácio Pereira e Ricardo Nascimento Araújo, que contribuíram muito para essa Tese e também para minha formação.

Às secretárias do Programa de Pós-graduação em Parasitologia, Sumara e Sibebe, que apóiam todos os alunos do Programa e realmente me ajudaram durante todo esse tempo.

Aos demais professores do Departamento de Parasitologia, pelos conhecimentos repassados e pela paciência em ensinar.

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, na pessoa da Professora Érika Martins Braga, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Esta Tese contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*À memória de minha avó,
Ocy Luz Coimbra do Vale, pelo exemplo de vida.*

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 01	Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> .	3
Figura 02	Representação esquemática das vias de ativação do sistema do complemento.	14
Figura 03	Glândula salivar de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .	27
Figura 04	Efeito do EGS de <i>Lutzomyia longipalpis</i> e da proteína salivar recombinante LJM19 sobre a via clássica do complemento humano.	51
Figura 05	Efeito do EGS de <i>Lutzomyia longipalpis</i> e da proteína salivar recombinante LJM19 sobre a via alternativa do complemento humano.	52
Figura 06	Efeito do EGS de <i>Lutzomyia longipalpis</i> sobre a deposição de moléculas pela via clássica.	54
Figura 07	Efeito do EGS de <i>Lutzomyia longipalpis</i> sobre a deposição de moléculas pela via clássica em pH 8,15.	56
Figura 08	Efeito da LJM19 sobre a deposição de moléculas pela via clássica.	56
Figura 09	Efeito do EGS de <i>Lutzomyia longipalpis</i> sobre a deposição de moléculas pela via alternativa.	58
Figura 10	Atuação do EGS de <i>Lutzomyia longipalpis</i> na formação do MAC.	61
Figura 11	Interação do EGS de <i>Lutzomyia longipalpis</i> com as proteínas iniciais da via clássica.	62
Figura 12	Inibição da clivagem de C4 e fator B pelo EGS de <i>Lutzomyia longipalpis</i> presente nos ensaios hemolíticos.	63
Figura 13	Efeito do EGS de <i>Lutzomyia longipalpis</i> sobre as enzimas C1s e fator D.	65
Figura 14	Avaliação da ligação das proteínas iniciais da via clássica ao EGS de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .	66
Figura 15	Determinação do peso molecular da proteína inibidora da via clássica presente na saliva de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .	68
Figura 16	Efeito do conteúdo intestinal (CI) de <i>Lutzomyia longipalpis</i> sobre a deposição de moléculas do complemento humano.	69

RESUMO

O sistema do complemento desempenha um importante papel na imunidade inata e adaptativa, principalmente através da opsonização de organismos invasores, produção de anafilotoxinas e formação de poros na superfície de patógenos. A saliva de *Lutzomyia longipalpis*, o principal vetor de *Leishmania infantum* nas Américas, é capaz de inibir tanto a via clássica como a via alternativa do sistema do complemento humano. Este estudo teve o objetivo de ampliar o conhecimento sobre a inibição do complemento por *L. longipalpis*. Em relação à via clássica, a saliva de *L. longipalpis* não inibiu a deposição do primeiro componente do complemento, o C1q. Porém, uma expressiva inibição dos componentes seguintes C4b, C3b, C5b e C9 ocorreu quando a saliva estava presente. A formação do complexo de ataque à membrana não foi influenciada pela presença da saliva, indicando um ponto de inibição nas etapas iniciais da cascata. O extrato de glândula salivar foi capaz de inibir a clivagem do C4, mas não atuou inibindo a atividade enzimática do C1s. O modo de atuação da saliva de *L. longipalpis* parece estar relacionado com o fato do extrato de glândula salivar ser capaz de se ligar ao C1q humano. A proteína salivar responsável pela inibição da via clássica foi identificada como sendo a LJM19, uma proteína recombinante de aproximadamente 11 kDa que é encontrada na saliva como um dímero de 22,3 kDa. A inibição da via alternativa também foi relacionada às etapas iniciais da cascata do complemento. O extrato de glândula salivar foi capaz de inibir a deposição de C3b, fator Bb, C5b e C9. A inibição da deposição do fator Bb, e provavelmente de todos os outros componentes da via alternativa, foi relacionada à capacidade da saliva em impedir a clivagem do fator B. Porém, a saliva de *L. longipalpis* não foi capaz de inibir diretamente a atividade enzimática do fator D. Além da inibição do complemento pela saliva de *L. longipalpis*, o conteúdo intestinal também foi testado. Nesse caso, os ensaios de deposição não constataram inibição do C5b para a via alternativa. Para a via clássica, o conteúdo intestinal de *L. longipalpis* inibiu a deposição de C3b e C5b, sem inibir a deposição de C4b. A presença de inibidores do complemento na saliva e intestino de flebotomíneos deve estar relacionada com a proteção do epitélio intestinal contra os efeitos líticos presentes no sangue ingerido. Além disso, considerando que a opsonização de moléculas (mesmo moléculas solúveis como as proteínas salivares) por C3b aumenta consideravelmente sua imunogenicidade, a inibição do complemento acabaria por proteger essas moléculas salivares de uma resposta imunológica dirigida contra elas.

ABSTRACT

The complement system plays an important role in both innate and adaptive immunity, mainly by the opsonization of invading organisms, anaphylatoxin production and pore formation in the surface of pathogens. The saliva of *Lutzomyia longipalpis*, the main vector of *Leishmania infantum* in Americas, is able to inhibit both the classical and alternative pathways of the human complement system. This study aimed to increase knowledge concerning complement inhibition by *L. longipalpis*. In relation to the classical pathway, *L. longipalpis*' saliva did not inhibit the deposition of the first complement component, C1q. However, a strong inhibition on C4b, C3b, C5b and C9 deposition occurred in the presence of saliva. Membrane attack complex formation was not directly affected by saliva, indicating inhibition in the early steps of the cascade. Salivary gland extract was able to inhibit C4 cleavage, but not to inhibit the enzymatic activity of C1s. The mechanism of action of the *Lutzomyia longipalpis*' saliva seems to be related to the presence of a salivary protein capable of binding human C1q. This salivary protein responsible for classical pathway inhibition was identified as being LJM19, a 11 kDa protein that is found in sandfly saliva as a 22.3 kDa dimer. Alternative pathway inhibition was also related to the early steps of the complement cascade. Salivary gland extract was able to inhibit C3b, factor Bb, C5b and C9 deposition. Inhibition of the alternative pathway was related to the capacity of saliva to avoid factor B cleavage. Nevertheless, the saliva of *L. longipalpis* was not able to directly inhibit factor D activity. The activity of intestinal contents was also tested in deposition assays. In this case, no inhibition of the alternative pathway was found for C5b. For the classical pathway, the intestinal contents of *L. longipalpis* inhibited the deposition of C3b and C5b, without inhibiting C4b deposition. The presence of complement inhibitors in the saliva and midgut of sandflies should be related to the protection of the intestinal epithelium against the lytic effects of the ingested blood. In addition, complement inhibition might protect the salivary proteins from an immunologic response directed against the salivary antigens. It is well documented that C3b opsonization increases considerably the immunogenicity of antigens, even though the soluble ones such as the salivary proteins.

SUMÁRIO

	Pág.	
1	INTRODUÇÃO	1
1.1	<i>Leishmania</i> e flebotomíneos.	1
1.2	A saliva dos flebotomíneos	4
1.3	O sistema do complemento	10
1.4	Inibição do complemento por parasitos	15
2	JUSTIFICATIVA	22
3	OBJETIVOS	24
3.1	Objetivo geral	24
3.2	Objetivos específicos	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1	Origem e manutenção dos insetos	26
4.2	Obtenção dos extratos de glândula salivar e conteúdo intestinal	27
4.3	Obtenção da proteína LJM19	28
4.4	Soros, anticorpos e proteínas purificadas	29
4.4.1	Coleta e conservação do soro humano	29
4.4.2	Purificação do IgG humano	29
4.4.3	Purificação do C1q humano	30
4.4.4	Anticorpos e outras proteínas do complemento humano	31
4.5	Ensaio hemolíticos	33
4.5.1	Obtenção e preparo das hemácias	33
4.5.2	Ensaio hemolíticos da via clássica	34
4.5.3	Ensaio hemolíticos da via alternativa	35
4.5.4	Ensaio hemolítico para determinar se a saliva de <i>Lutzomyia longipalpis</i> atua sobre a formação do complexo de ataque à membrana	36

4.5.5	Ensaio hemolítico para avaliar a interação do EGS com as proteínas da via clássica do complemento humano: C1, C4, C2 e C3	37
4.6	Ensaio de deposição de componentes do complemento humano em placas de ELISA	39
4.6.1	Preparo das placas de ELISA	39
4.6.2	Ensaio de deposição para via clássica	39
4.6.3	Ensaio de deposição para via alternativa	41
4.6.4	Ensaio para determinar se a saliva de <i>Lutzomyia longipalpis</i> é capaz de desligar componentes previamente depositados sobre superfícies ativadoras	42
4.7	Análise por Western blo da clivagem de componentes do complemento humano	43
4.7.1	Clivagem de C4	43
4.7.2	Clivagem do fator B	44
4.8	Ensaio para determinar se o EGS de <i>Lutzomyia longipalpis</i> é capaz de inibir a atividade enzimática de algumas proteases do complemento	45
4.8.1	Ensaio enzimático de C1s	45
4.8.2	Ensaio enzimático do fator D	45
4.9	Ensaio para determinar se o EGS é capaz de se ligar à alguma proteína da fase inicial da cascata da via clássica	47
4.10	Determinação do peso molecular da proteína inibidora da via clássica do complemento presente no EGS de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	48
4.11	Avaliação do conteúdo intestinal de <i>Lutzomyia longipalpis</i> na deposição de moléculas do complemento em placas de ELISA	49
4.12	Análise estatística	49

5	RESULTADOS	50
5.1	Efeito do EGS de <i>Lutzomyia longipalpis</i> e da LJM19 sobre a atividade hemolítica da via clássica do complemento humano	50
5.2	Efeito do EGS de <i>Lutzomyia longipalpis</i> e da LJM19 sobre a atividade hemolítica da via alternativa do complemento humano	50
5.3	Efeito do EGS de <i>Lutzomyia longipalpis</i> e da LJM19 sobre a deposição de moléculas do sistema do complemento ativado pela via clássica	53
5.4	Efeito do EGS de <i>Lutzomyia longipalpis</i> sobre a deposição de moléculas do complemento humano ativado pela via alternativa	57
5.5	Atuação do EGS sobre a formação do complexo de ataque à membrana	59
5.6	Interação do EGS com as moléculas iniciais da cascata da via clássica	59
5.7	Clivagem dos compostos C4 e fator B em ensaios hemolíticos na presença do EGS de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	62
5.8	Atuação do EGS de <i>Lutzomyia longipalpis</i> na atividade enzimática de C1s e fator D	64
5.9	Ligação do EGS de <i>Lutzomyia longipalpis</i> aos componentes iniciais da via clássica do complemento humano	64
5.10	Peso molecular da proteína inibidora da via clássica do complemento presente na saliva de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	67
5.11	Efeito do conteúdo intestinal de <i>Lutzomyia longipalpis</i> na deposição de moléculas do complemento humano	69
6	DISCUSSÃO	70
7	CONCLUSÕES	84
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – *Leishmania* e flebotomíneos

O gênero *Leishmania* compreende protozoários pertencentes à família Trypanosomatidae e se caracteriza por possuir em seu ciclo de vida duas formas evolutivas básicas: amastigotas e promastigotas. O estágio evolutivo denominado amastigota é encontrado no interior de células dos hospedeiros vertebrados e possui forma arredondada ou oval, sendo o flagelo rudimentar e não exteriorizado. Por outro lado, as promastigotas são encontradas na luz intestinal de insetos vetores e apresentam formato alongado e um flagelo livre.

Os hospedeiros invertebrados de *Leishmania* são insetos pertencentes à família Psychodidae e à subfamília Phlebotominae, sendo dois os gêneros de flebotomíneos importantes como vetores do parasito: *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Young & Duncan 1994).

Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva 1912) é o principal vetor de *L. infantum* nos países americanos e pode ser encontrado desde o México até a Argentina (Young & Duncan 1994, Willians 1999). Os flebotomíneos são insetos de pequeno porte, com o corpo densamente coberto por cerdas e quando pousam, mantêm as asas semi-abertas acima do abdome (Killick-Kendrick 1999). Tanto os machos como as fêmeas necessitam de se alimentar de substâncias açucaradas tais como seiva de plantas, néctar de flores e secreções de afídeos como fonte de energia (Chaniotis 1974, Molyneux et al. 1991, Alexander & Usma 1994). A alimentação sanguínea é exercida apenas pelas fêmeas e esse tipo de dieta proporciona nutrientes para a maturação dos ovócitos e produção de ovos (Soares & Turco 2003). Os flebotomíneos possuem peças bucais curtas e rígidas e por isso não se alimentam de sangue diretamente dos vasos. Ao invés disso, as fêmeas quando picam um hospedeiro dilaceram a sua pele e formam um pequeno poço subcutâneo contendo sangue e restos de tecido, que são então ingeridos pelo inseto. Esse processo, chamado de telmatofagia, possibilita a transmissão da *Leishmania*, uma vez que o parasito raramente é encontrado no sangue e normalmente se aloja nos macrófagos da pele (Bates 2007).

Ao se alimentar em um hospedeiro infectado, a fêmea de flebotomíneo ingere, juntamente com o sangue, macrófagos contendo amastigotas ou amastigotas livres que são liberadas após o rompimento de macrófagos no momento da picada

(Handman & Bullen 2002). O sangue contendo os parasitos é então armazenado no interior do intestino médio abdominal, onde uma camada acelular composta de quitina e proteínas, chamada membrana peritrófica do tipo I, é secretada pelo epitélio intestinal do inseto e envolve todo o bolo alimentar (Hegedus et al. 2009). No interior da membrana peritrófica as amastigotas diferenciam-se rapidamente em promastigotas procíclicas, que possuem o formato ovóide, flagelo curto e pouca motilidade. Essas formas, relativamente resistentes ao ataque das enzimas digestivas do inseto, multiplicam-se intensamente por divisão binária e se diferenciam em promastigotas nectomônadas, que possuem forma mais alongada e flagelo maior (Bates 2007), **Figura 01**.

As nectomônadas têm a capacidade de escapar do confinamento pela membrana peritrófica e para isso secretam quitinases que, com a ajuda de enzimas do próprio flebotomíneo, digerem a membrana peritrófica e permitem a saída do parasito (Shakarian & Dwyer 2000, Ramalho-Ortigão et al. 2005, Bates 2007). Para não serem expulsas juntamente com o alimento digerido e os restos da membrana peritrófica, algumas promastigotas nectomônadas se fixam ao epitélio intestinal do flebotomíneo infectado através de moléculas de lipofosfoglicano (LPG) superficiais que cobrem todo o parasito. Essas moléculas de LPG provavelmente se ligam a lectinas presentes nas microvilosidades do epitélio intestinal do inseto, impedindo que as leishmanias sejam expulsas pelos movimentos peristálticos durante a defecação do sangue digerido (McConville et al. 1992, Pimenta et al. 1994, Sacks et al. 2000). Os parasitos migram para a porção anterior do intestino médio torácico e colonizam a região da válvula do estomodeu, que compreende o limite entre o intestino anterior e o intestino médio (Bates 2007), **Figura 01**.

As promastigotas leptomônadas, uma forma mais curta do parasito, surgem das nectomônadas e sofrem um segundo processo de multiplicação no interior do flebotomíneo (Gossage et al. 2003). No final do ciclo, duas formas são encontradas na região da válvula do estomodeu: promastigotas haptomônadas e principalmente promastigotas metacíclicas. As haptomônadas, cuja forma precursora ainda não está clara (nectomônadas ou leptomônadas), são promastigotas com flagelo pequeno que se aderem à parede da válvula do estomodeu formando um bloqueio no local. As formas metacíclicas, que se originam a partir das leptomônadas, são as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado e possuem o corpo pequeno com um grande flagelo, o que implica em grande motilidade (Bates 2007), **Figura 01**.

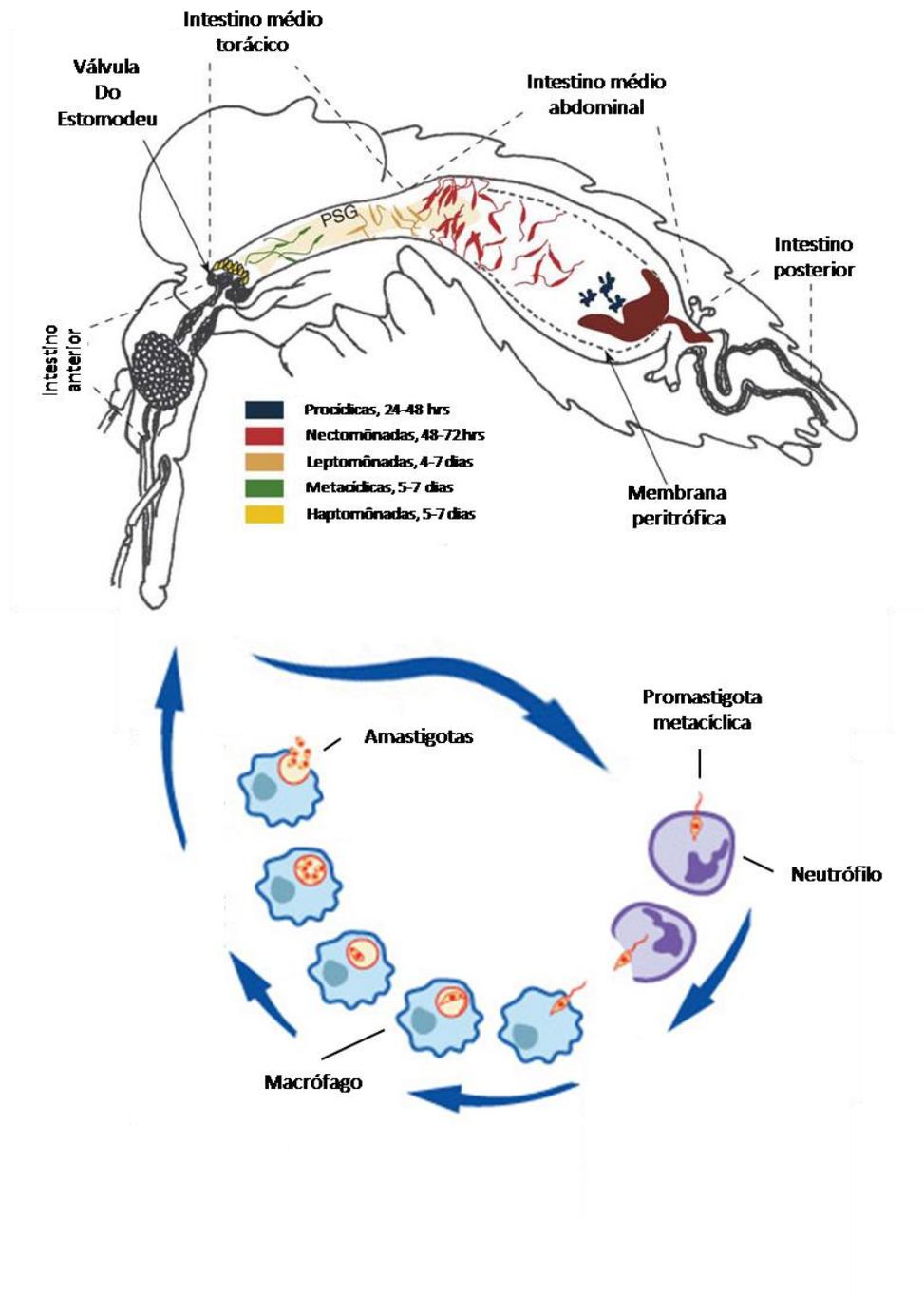


FIGURA 01 Ciclo de vida de *Leishmania*. O flebotomíneo infectado regurgita na pele do hospedeiro formas promastigotas metacíclicas. Após rápida passagem por neutrófilos, as metacíclicas invadem macrófagos, transformam-se em amastigotas e se multiplicam intensamente. Quando um flebotomíneo pica um hospedeiro infectado, adquire as formas amastigotas que irão se desenvolver em promastigotas. Adaptado de Kamhawi (2006).

O mecanismo de transmissão das promastigotas metacíclicas para os hospedeiros vertebrados parece estar envolvido com a colonização das leishmanias na região da válvula do estomodeu do inseto infectado (Volf et al. 2004). A válvula do estomodeu é uma estrutura quitinosa que normalmente se encontra fechada, só se abrindo rapidamente para a passagem de sangue ou das substâncias açucaradas ingeridas pelo inseto, deste modo impede que o alimento retorne até as peças bucais (Tang & Ward 1998). Porém, em infecções maduras por *Leishmania* essa válvula é forçada a se abrir e se torna bloqueada pela presença dos parasitos e de uma substância gelatinosa, composta por proteofosfoglicanos filamentosos, secretada pelas promastigotas (Rogers et al. 2002). Além disso, as quitinases secretadas pelos parasitos ajudam a danificar a estrutura da válvula do estomodeu e o que possibilita o refluxo do material contido no intestino médio (Rogers et al. 2008). Deste modo, os flebotomíneos infectados, que fazem um segundo repasto sanguíneo, acabam por regurgitar o material que bloqueia a passagem do sangue e assim, as promastigotas metacíclicas, juntamente com o PSG (gel secretado pelas promastigotas) e a saliva, são depositadas na pele do hospedeiro (Bates 2007).

1.2 – A saliva dos flebotomíneos

De um modo geral, os artrópodes hematófagos enfrentam dificuldades no momento do repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, pois esses apresentam respostas fisiológicas que podem se contrapor à obtenção de sangue pelo inseto. Assim, o inseto precisa sobrepujar as respostas hemostáticas do hospedeiro vertebrado, controlar a inflamação no local da picada e minimizar uma resposta imunológica do hospedeiro contra as moléculas salivares. A saliva dos artrópodes hematófagos possui um papel importantíssimo na obtenção de sangue, uma vez que é rica em moléculas ativas capazes de interferir com os processos hemostáticos, inflamatórios e imunológicos dos hospedeiros vertebrados (Ribeiro 2003).

No caso específico de *L. longipalpis*, Valenzuela et al. (2004) identificaram as proteínas secretadas mais abundantes nas glândulas salivares desse flebótomo. Através do seqüenciamento do cDNA e análises de proteômica e bioinformática, os autores encontraram 35 transcritos com predição para proteínas secretadas. Dentre esses transcritos, nove cDNAs correspondem a proteínas já descritas para *L. longipalpis* e 18 cDNAs apresentaram homologia variada com seqüências de outros organismos

depositadas em bancos de dados. Os autores encontraram ainda sete cDNAs que não apresentaram correspondência com nenhuma sequência depositada, indicando a presença de proteínas desconhecidas na saliva de *L. longipalpis*.

As glândulas salivares de *L. longipalpis* expressam o mais potente peptídeo vasodilatador conhecido pela ciência: o maxadilan (Ribeiro e al. 1989). Essa molécula foi inicialmente chamada de fator indutor de eritema (EIF) e foi caracterizada por sua sensibilidade a digestão por tripsina e pela habilidade de induzir um eritema localizado na pele sem dor ou coceira. O fator indutor de eritema presente na saliva de *L. longipalpis* se mostrou funcionalmente similar ao peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, apresentando um poder de dilatação de vasos sanguíneos de longa duração e a habilidade de relaxar anéis aórticos em estado de constrição (Ribeiro et al. 1989). Após a purificação dessa molécula por cromatografia líquida de alta performance, Lerner et al. (1991) nomearam o novo vasodilatador de maxadilan e descobriram que esse peptídeo possui atividade ótima entre o pH 7,7 e pH 8,0 e massa molecular de aproximadamente 7 kDa.

Lerner et al. (1991) constataram que a injeção de 0,1 ng de maxadilan desenvolve um eritema equivalente à injeção de 50 ng de peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, indicando que a molécula encontrada na saliva de *L. longipalpis* é 500 vezes mais potente que o mais efetivo vasodilatador conhecido até então. O maxadilan se liga a receptores da superfície celular de tecidos vasculares, o que induz o acúmulo de AMP cíclico no interior das células da musculatura lisa vascular e a consequente redução da concentração dos íons de cálcio. Esse processo proporciona um relaxamento dos vasos sanguíneos através de um mecanismo independente do endotélio (Grevelink et al. 1995, Jackson et al. 1996).

As espécies de *Phlebotomus* não possuem em sua saliva o vasodilatador maxadilan, mas em contrapartida alguns representantes do gênero se utilizam de outras substâncias com atividade semelhante. *Phlebotomus papatasi* e *Phlebotomus argentipes* apresentam altos níveis de adenosina e seu precursor 5'-AMP em sua saliva, com uma concentração de 1nmol por par de glândulas salivares (Ribeiro et al. 1989). Essas duas substâncias possuem atividade vasodilatadora e, além disso, adenosina é um potente inibidor de agregação plaquetária (Collis 1989, Dionisotti et al. 1992).

A saliva dos flebotomíneos apresenta outra molécula com atividade anti-agregação plaquetária denominada apirase. Esta enzima é encontrada na saliva de grande parte dos artrópodes hematófagos (Ribeiro 1995) e entre os flebotomíneos já foi relatada

tanto em *Phlebotomus* como em *Lutzomyia* (Ribeiro et al. 1986, Ribeiro et al. 1989, Hamasaki et al. 2009). A apirase é uma nucleotidase que cliva ATP e ADP em AMP e fosfato inorgânico e desse modo inibe a agregação plaquetária dependente de ADP (Ribeiro 1995). Nos flebotomíneos a apirase é uma enzima que tem pH ótimo próximo do pH 8,0, ponto isoelétrico de 9,3 e dependente de íons de cálcio para seu funcionamento (Hamasaki et al. 2009).

Cerná et al. (2002) descreveram a presença da enzima hialuronidase na saliva de seis espécies de flebotomíneos, sendo que em *L. longipalpis* e *P. papatasi* a enzima possui atividade máxima em pH 5,0, mas é ativa em valores tão altos como pH 8,0. A hialuronidase dos flebotomíneos é capaz de clivar, além do ácido hialurônico, outros componentes da matriz extracelular como o sulfato de condroitina A e C. A presença de uma atividade de hialuronidase na saliva desses insetos pode ter o papel de ajudar a difusão das outras proteínas salivares pelo tecido do hospedeiro picado. Além de moléculas que facilitam a ingestão de sangue, *L. longipalpis* possui em sua saliva uma alfa-amilase ativa de 54 kDa. A presença de amilase na glândula salivar de flebotomíneos talvez indique que esses insetos tenham como fonte alimentar de açúcar, além de dissacarídeos, o amido (Ribeiro et al. 2000).

A saliva dos flebotomíneos, além de possuir atividades relacionadas diretamente com a alimentação sanguínea, também possui a capacidade de interferir e modular o sistema imunológico de seus hospedeiros vertebrados (Kamhawi 2000). Sabe-se que uma fêmea de flebotomíneo albergando uma infecção madura por *Leishmania* regurgita, no momento da picada, de 100 – 1.000 promastigotas metacíclicas sob a pele do hospedeiro (Rogers et al. 2004). Porém, a inoculação através de seringas de uma quantidade equivalente de parasitos em hospedeiros suscetíveis usualmente não causa doença e, ao invés disso, promove a imunidade (Menon & Bretscher 1996). Portanto, pode ser inferido que os componentes salivares presentes no momento da picada de um flebotomíneo podem aumentar consideravelmente a infeciosidade dos parasitos.

Além das formas metacíclicas de *Leishmania* e da saliva, uma picada infectante de flebotomíneo deposita sob a pele do hospedeiro o gel secretado pelas promastigotas (Rogers et al. 2002). O PSG também desempenha um importante papel na imunomodulação do hospedeiro vertebrado (Rogers et al. 2006, Rogers et al. 2009), contudo, o conhecimento adquirido sobre o papel da saliva na exacerbação da infecção por *Leishmania* é muito maior.

O efeito de exacerbação da infecção por *Leishmania* causado pela saliva de um flebotomíneo foi demonstrado pela primeira vez por Titus & Ribeiro (1988). Neste estudo os autores inocularam parasitos da fase estacionária de cultura de *L. major* na pata de camundongos juntamente com extrato de glândula salivar de *L. longipalpis*. Os resultados mostraram que o efeito da saliva no curso da lesão cutânea foi mais pronunciado quando o inóculo continha pequena quantidade de parasitos. As lesões cutâneas em camundongos que receberam dez ou 100 parasitos misturados com o equivalente a 0,5 pares de glândulas salivares apresentaram tamanho de cinco a dez vezes maior que os controles sem saliva. Além disso, a quantidade de parasitos encontrados nas lesões dos camundongos inoculados com parasitos e saliva era 5.000 vezes maior que a quantidade encontrada nas lesões do grupo controle. Resultados semelhantes mostrando que a presença da saliva de *L. longipalpis* leva ao aumento da infeciosidade, elevação no número de parasitos encontrados e exacerbação das lesões foram descritos para outras espécies de *Leishmania* e cepas de camundongos diferentes (Theodos et al. 1991, Lima & Titus 1996, Norsworthy et al. 2004).

Morris et al. (2001) mostraram que a proteína salivar de *L. longipalpis* que está envolvida na exacerbação da infecção por *L. major* é o maxadilan, uma vez que esse peptídeo é capaz de aumentar o tamanho das lesões e o número de parasitos encontrados por lesão com o mesmo grau de eficiência que o extrato de glândula salivar. Além disso, após o desafio com 10^5 parasitos co-inoculados com 0,5 glândulas salivares, camundongos vacinados com maxadilan sintético obtiveram uma alta proteção contra a infecção, apresentando lesões cutâneas até cinco vezes menores que as lesões dos camundongos tratados apenas com o adjuvante. Além da redução drástica no número de parasitos encontrados nas lesões, os camundongos vacinados foram capazes de curar as lesões em 50 dias após a infecção, enquanto os camundongos não vacinados ainda apresentavam lesões no 65º dia (Morris et al. 2001).

A saliva de *P. papatasi*, apesar de não possuir o vasodilatador e imunossupressor maxadilan, é capaz de aumentar a infectividade de *L. major* de uma maneira semelhante à saliva de *L. longipalpis*, uma vez que na presença de saliva as lesões aparecem precocemente, são mais destrutivas e contêm uma quantidade maior de parasitos (Belkaid et al. 1998, Mbow et al. 1998, Ben et al. 2010). Além disso, a exposição a picadas não infectantes de *P. papatasi* e o uso de uma vacina de DNA expressando a proteína salivar SP15 deste mesmo inseto mostraram-se eficazes na

proteção contra infecção por *L. major* em modelo murino (Kamhawi et al. 2000, Valenzuela et al. 2001).

Apesar da saliva de *L. longipalpis* se mostrar muito eficiente na exacerbação da infecção causada por *L. major*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (Andrade et al. 2007), nenhum desses parasitos é naturalmente transmitido pela picada deste inseto (Killick-Kendrick 1990). Utilizando um modelo natural de parasito e vetor, Gomes et al. (2008) inocularam intradermicamente 10^5 metacíclicas de *L. infantum* juntamente com saliva de *L. longipalpis* na orelha de hamsters com o objetivo de mimetizar a transmissão natural por flebotomíneos. Os animais infectados na ausência ou presença de saliva mostraram uma evolução similar da doença. Neste mesmo estudo os autores identificaram uma proteína salivar de *L. longipalpis* que é capaz de conferir imunidade em animais vacinados. Os hamsters imunizados pelo plasmídeo que codifica a proteína de 11 kDa (LJM19) e desafiados com *L. infantum* na presença de saliva apresentaram uma poderosa proteção contra os sintomas graves e a morte causada pela infecção por *L. infantum*.

Tavares et al. (2011) usaram essa mesma proteína (LJM19) para imunizar hamsters e desafiá-los com *L. braziliensis* na presença de saliva de um de seus vetores naturais: *Lutzomyia intermedia*. Os resultados mostraram que a imunização com saliva ou com a proteína LJM19 de *L. longipalpis* é capaz de proteger hamsters contra o desafio contendo *L. braziliensis* e saliva de outra espécie de flebotomíneo.

Outra proteína identificada na saliva de *L. longipalpis* e que confere proteção contra *Leishmania* é a proteína pertencente à família “amarela”: LJM11. Essa proteína induz uma reação de hipersensibilidade tardia que está relacionada com a proteção contra leishmaniose cutânea no modelo murino (Xu et al. 2011).

Os componentes salivares de *L. longipalpis* não aumentam a infecção experimental de *L. infantum* em cães, uma vez que a adição de saliva ao inóculo intradérmico não promove o aparecimento precoce de amastigotas no baço nem aumenta a carga parasitária nos órgãos internos (Paranhos-Silva et al. 2003). No entanto, não se pode descartar a importância da saliva de *L. longipalpis* para o processo de infecção dos principais hospedeiros de *L. infantum*, uma vez que cães vacinados com proteínas salivares deste flebotomíneo apresentaram uma forte imunidade celular protetora (Collin et al. 2009).

Muitos estudos vêm sendo feitos na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos na exacerbação da infecção por *Leishmania* pela saliva dos flebotomíneos.

Sabe-se que tanto a saliva de *L. longipalpis* como a de *P. papatasi* são capazes de atuar sobre macrófagos e reduzir a morte dos parasitos no interior dessas células. Katz et al. (2000) mostraram que a adenosina presente na saliva de *P. papatasi* era responsável pela diminuição da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível e conseqüente diminuição da produção de óxido nítrico em macrófagos de camundongos. Além disso, macrófagos incubados com saliva de *L. longipalpis* ou maxadilan produziram uma maior quantidade de citocinas como IL-10, IL-6 e TGF- β e diminuíram a produção de IL-12p70 e TNF- α , o que possibilitou a diminuição da quantidade de óxido nítrico presente (Brodie 2007). O tratamento de células dendríticas com maxadilan promove a produção de citocinas do tipo 2 e reduz a produção de citocinas do tipo 1 (Wheat et al. 2008). Sabe-se que em modelos murinos de leishmaniose a resposta imunológica do tipo Th2 está associada à susceptibilidade aos parasitos e desenvolvimento de lesões mais graves, enquanto a resposta do tipo Th1, com expressão de IFN- γ e IL-12, está associada com a resistência à infecção (Sacks & Noben-Trauth 2002).

Além da modulação na produção de citocinas, a saliva de *L. longipalpis* também influencia a expressão de moléculas co-estimulatórias presentes na membrana das células apresentadoras de antígenos (Rohousová & Volf 2006). Quando expostas ao maxadilan, as células dendríticas de camundongos não apresentam mudanças nos níveis de expressão do MHC de classe II, porém a expressão das moléculas CD80 e CD86 é diminuída significativamente (Wheat et al. 2008). Em monócitos humanos tratados com lipopolissacarídeo, a saliva de *L. longipalpis* diminui a expressão de CD80 e aumenta a de CD86 e HLA-DR. Já em macrófagos, a saliva leva a um aumento na expressão de CD80 e HLA-DR e a expressão de CD86 não sofre alterações (Costa et al. 2004).

A saliva de *L. longipalpis* é capaz de suprimir completamente a proliferação de células T em resposta a eritrócitos de ovelha *in vivo* e a concanavalina A *in vitro* (Titus 1998). *P. papatasi* e *Phlebotomus duboscqi* também possuem em sua saliva uma atividade inibidora da proliferação de linfócitos T e nesse caso a inibição parece estar relacionada com a liberação de IL-10 e prostaglandina E2 pelas células dendríticas que entraram em contato com a saliva (Carregaro et al. 2008).

Além disso, *L. longipalpis* possui em sua saliva atividade inibidora do sistema do complemento humano (Cavalcante et al. 2003).

1.3 – O sistema do complemento

O sistema do complemento é composto por uma mistura complexa de proteínas plasmáticas e proteínas de membrana que desempenham um importante papel na defesa do hospedeiro contra infecções. Consiste em uma cascata de reações bioquímicas que promove, principalmente, a deposição de proteínas opsonizantes em superfícies celulares, a geração de potentes peptídeos pró-inflamatórios e a morte celular através da formação de poros na membrana plasmática de microorganismos invasores (Morley & Walport 1999). A ativação do sistema do complemento depende do reconhecimento de padrões moleculares na superfície ativadora e pode ocorrer através de três vias: a via clássica, a via das lectinas e a via alternativa (Sim & Dodds 1997).

A via clássica é capaz de ativar o sistema do complemento principalmente através da ligação do componente C1 a imunocomplexos contendo anticorpos do tipo IgM ou IgG, porém a ativação da via clássica na ausência de anticorpos também pode ocorrer em algumas situações (Sim & Dodds 1997). O C1 consiste em um complexo molecular dependente de Ca^{+2} que se forma quando duas moléculas de C1r e duas moléculas de C1s se ligam à proteína C1q. Quando o C1q, que constitui a proteína reconhecadora, se liga a uma substância ativadora da via clássica ocorre uma mudança conformacional nessa molécula e isso permite que o C1r se torne ativo e hidrolise a proenzima C1s, que após ser clivada também irá possuir atividade de serino-protease (Gaboriaud et al. 2004). O C1s ativado hidrolisa então o componente solúvel C4, formando o fragmento C4b que irá se ligar, de um modo inespecífico, próximo ao local de ativação. O componente C2 irá se ligar ao C4b depositado e então também será clivado por C1s, o que ocasionará a formação de C4bC2a, a C3 convertase da via clássica. Essa convertase possui atividade de serino-protease uma vez que o fator C2a presente é capaz de clivar e ativar o C3 solúvel na presença de íons Mg^{+2} . A hidrólise de C3 gera o fragmento C3a que é liberado de forma solúvel e o fragmento C3b que, de um modo semelhante ao C4b, se liga próximo a superfície de ativação. O complexo C4bC2a pode gerar inúmeras moléculas de C3b que irão se depositar na superfície do agente patogênico, opsonizando esse microorganismo e favorecendo a sua ingestão por fagócitos. Quando uma molécula de C3b se liga próximo ao C4b presente no complexo, forma-se então a C5 convertase da via clássica (C4bC2aC3b). O C4b e o C3b desse novo complexo se ligam ao C5 solúvel no plasma e orientam esse componente para ser

clivado por C2a e posterior deposição do C5b e liberação do C5a (Sim & Dodds 1997), **Figura 02.**

A via das lectinas é ativada quando a proteína plasmática MBL (lectina ligante a manose) reconhece resíduos de oligossacarídeos neutros contendo manose, N-acetilglicosamina ou fucose presentes na parede celular de vários tipos de microorganismos. Assim como o C1q da via clássica, a MBL também é dependente de íons Ca^{+2} e possui serino-proteases associadas a sua estrutura. Essas enzimas recebem o nome de MASP-1 e MASP-2 (serino-proteases associadas a MBL) e desempenham função semelhante a C1r e C1s. Após a clivagem de C4 pela MASP-1 ou MASP-2 e C2 pela MASP-1, o resto da cascata do complemento se completa de maneira igual à via clássica (Kawasaki et al. 1983, Sim & Laich 2000, Chen & Wallis 2004), **Figura 02.**

Embora a via alternativa seja também ativada por complexos imunes contendo IgG, IgA e IgE, a rota mais comum de ativação dessa via independe da presença de anticorpos e está relacionada com inúmeras substâncias presentes na superfície de bactérias, fungos, vírus, protozoários e parasitos multicelulares (Sim & Dodds 1997). Algumas moléculas de C3 solúveis no sangue sofrem uma lenta conversão que permite a exposição de um grupo tiol-éster interno com a ligação de uma molécula de H_2O . Essa molécula formada, conhecida como $\text{C3}(\text{H}_2\text{O})$ é capaz de formar, na presença de fator B e fator D, uma C3 convertase solúvel, a $\text{C3}(\text{H}_2\text{O})\text{Bb}$. Esta enzima irá então clivar o C3 solúvel e gerar fragmentos de C3b que, se estiverem perto de uma superfície, irão se ligar tanto em células do próprio hospedeiro como no material exógeno. A ativação da via alternativa por uma superfície e a formação da cascata do complemento vai depender de quanto tempo o primeiro C3b depositado vai permanecer ativo. Quando esse C3b estiver depositado sobre uma superfície não ativadora, moléculas reguladoras irão clivar o composto, formando iC3b (forma inativa do C3b) e impedindo que a cascata do complemento continue. Sobre uma superfície ativadora (por exemplo um microorganismo), o C3b depositado não será logo inativado e irá servir de sítio de ligação para uma molécula de fator B, que será clivado então pelo fator D, uma serino-protease. O complexo formado (C3bBb), é a enzima C3 convertase da via alternativa e, como a C4bC2a da via clássica, é dependente de Mg^{+2} e capaz de clivar outras moléculas de C3 e depositar mais C3b sobre a superfície ativadora. A C5 convertase da via alternativa é subsequentemente formada pela ligação de uma segunda molécula de C3b ao complexo C3bBb , formando então C3bBbC3b . Quando o C5 se liga a C5 convertase da via alternativa, a unidade catalítica da enzima, o Bb, é capaz de

clivar esse composto, gerando C5a e C5b que irá iniciar a formação da via citolítica (Sim & Dodds, 1997), **Figura 02**.

Portanto, as três vias de ativação do complemento convergem para a formação do complexo de ataque a membrana (MAC) na superfície da célula ativadora. O fragmento de C5b que é depositado tanto pela ação da C4bC2aC3b quanto da C3bBbC3b permanece junto à convertase e deste modo é capaz de ligar o C6 presente no sangue. Uma vez ligado ao C6, a molécula de C5b expõe um sítio de ligação a membranas e expõe também um sítio de ligação a C7, que quando é incorporado por esse novo complexo induz a liberação do C5b-7 da C5 convertase. Este novo complexo formado é capaz de se ligar firmemente a membranas biológicas e o fato do sítio de ligação apresentar alta instabilidade, permite que o C5b-7 se ligue apenas a membranas situadas em locais próximos ao da ativação do complemento. Porém, esse complexo está inserido apenas superficialmente e não causa nenhum tipo de dano na integridade da bicamada lipídica. Com a ligação do oitavo componente do complemento (C8), formam-se poros de pequeno diâmetro e a membrana celular se encontra pouco estável. Quando o C9 globular e hidrofílico presente no plasma entra em contato com o C8 depositado, transforma-se em uma proteína alongada e anfipática que atravessa a membrana e aumenta ainda mais a porosidade. Este C9 depositado ainda é capaz de recrutar outras moléculas iguais, aumentando assim o tamanho dos poros e promovendo a lise da célula alvo (Hänsch 1988), conforme pode ser observado na **Figura 02**.

Além da lise da célula alvo, a ativação do sistema do complemento produz, através da clivagem de C3 e C5, os mediadores solúveis C3a e C5a. Essas anafilatoxinas são potentes substâncias pró-inflamatórias que interagem com diversas células do sistema imune. Em macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, a presença de C3a e C5a pode ativar a explosão oxidativa, enquanto basófilos e mastócitos reagem a essas anafilatoxinas liberando histamina para o meio. C5a é um poderoso quimioatraente para células como macrófagos, neutrófilos, basófilos, linfócitos B e T ativados e mastócitos, sendo que este último também migra através de um gradiente de C3a (Klos et al. 2009).

Para evitar que o sistema do complemento atue contra células do próprio hospedeiro e também evitar o desperdício de componentes, a regulação do complemento é feita por várias proteínas e em vários estágios da cascata. A proteína inibidora de C1 (C1INH) é uma serpina que se liga e forma um complexo covalente com o C1r e C1s ativados, dissociando essas duas proteases do complexo C1 e evitando assim a clivagem de C4 e C2 (Agostoni 1989). Outro regulador que atua no primeiro componente do

complemento é a proteína inibidora de C1q (C1qINH). Essa molécula é pouco conhecida e atua se ligando ao C1q e impedindo a formação do complexo C1 (Kirschfink et al. 1997).

As convertases do sistema do complemento podem ser controladas por três diferentes modos: primeiramente, os sub-componentes com atividade catalítica C2a e Bb se dissociam naturalmente do complexo e não se ligam novamente. Existe ainda um grupo de proteínas regulatórias que se ligam a C4bC2a e C3bBb e estimulam a dissociação desses complexos. As proteínas que possuem atividade de aceleração do decaimento das convertases são as solúveis fator H e C4bp e as proteínas de membrana CR1 e DAF. O terceiro modo de regulação das convertases é a clivagem de C4b e C3b pelo fator I, uma serino-protease. A ação do fator I depende da presença de co-fatores protéicos que se ligam ao substrato (C3b e/ou C4b) e possibilitam a clivagem e inativação deste. Os co-fatores para a ação do fator I são: fator H, C4bp, CR1 e MCP. Tanto como fatores de aceleração do decaimento de convertases como co-fatores para o fator I, o fator H atua apenas sobre C3b, enquanto C4bp atua somente em C4b. As outras proteínas interagem tanto com a via clássica como com a via alternativa. C4bp e fator H estão presentes em altas concentrações no soro humano, e são capazes de controlar a ativação de C3 e C5, tanto na fase fluida como associados às superfícies. DAF e MCP estão amplamente distribuídos nas membranas plasmáticas dos tecidos humanos e possuem o importante papel de prevenir a amplificação da deposição de C3b nos tecidos do hospedeiro. CR1 tem uma distribuição tecidual mais restrita (eritrócitos, leucócitos e células renais) e além de atuar como receptor de C3b atua também como uma proteína de membrana reguladora do complemento. A properdina (algumas vezes chamada de fator P) é uma proteína que, ao invés de atuar como um controlador negativo, age ligando-se a C3bBb ou C3bBbC3b e confere maior estabilidade às convertases da via alternativa (Sim & Dodds 1997).

Além do controle sobre as vias de ativação, a via citolítica também é controlada por proteínas reguladoras, tanto solúveis como de membrana. A proteína S (vitromectina) é encontrada no plasma e possui a capacidade de se ligar ao complexo C5b-7 liberado da C5 convertase. A junção da proteína S a esse complexo impede que ele seja incorporado à membrana celular, evitando a formação de poros. Outra proteína solúvel capaz de controlar a formação do complexo de ataque à membrana é a SP-40/40. Essa proteína se liga ao C8 e também impede a inserção do complexo na membrana celular (Hänsch 1988).

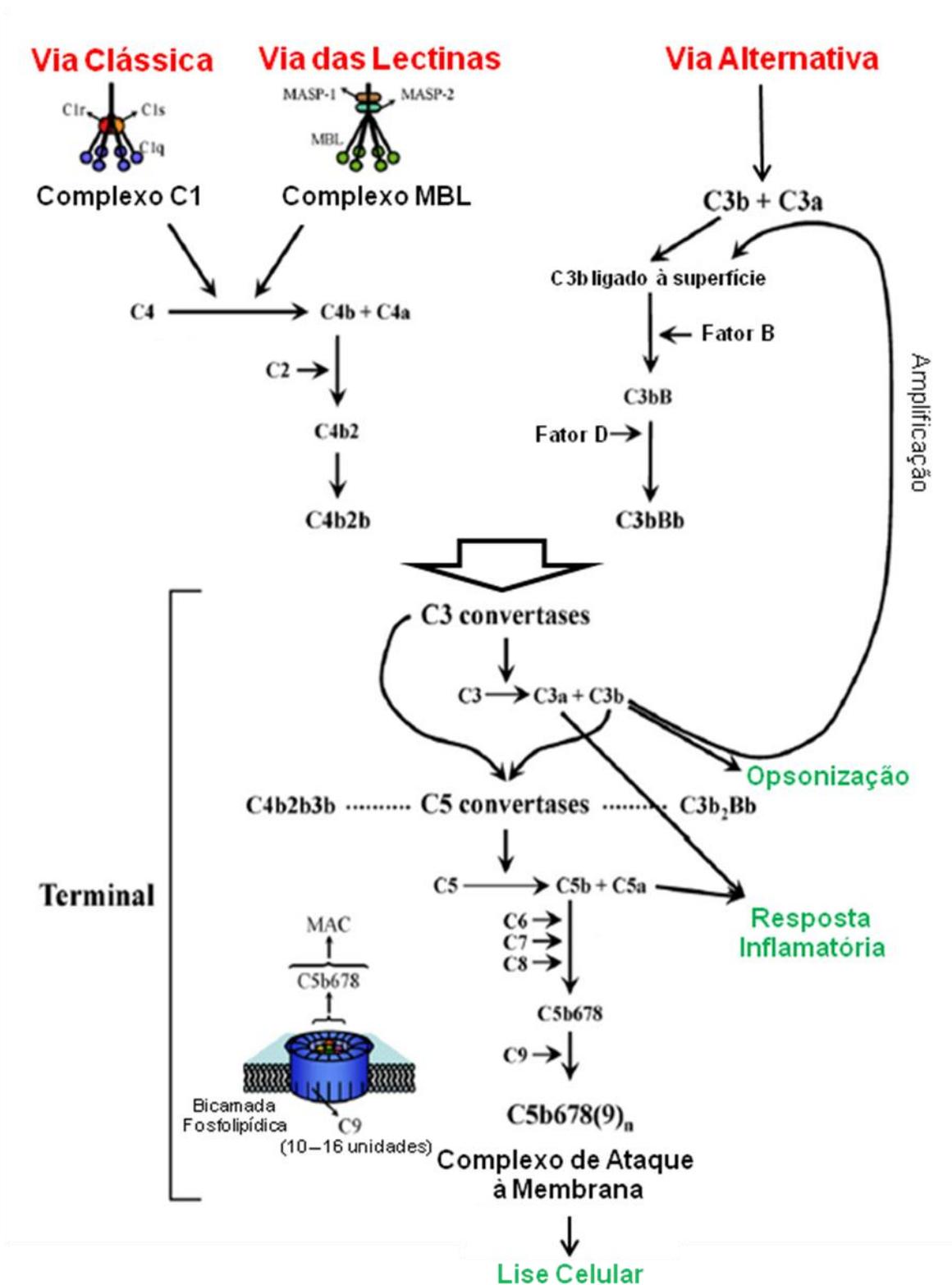


FIGURA 02 Representação esquemática das vias de ativação do sistema do complemento. A ativação através das vias clássica, das lectinas e alternativa leva à formação das enzimas C3 convertases que clivam mais moléculas de C3, amplificando a cascata e gerando opsoninas na superfície do patógeno. Além disso, o complemento atua na geração de anafilatoxinas (C3a e C5a) e formação de poros na membrana da célula alvo. Adaptado de Schroder et al. (2009).

Nas membranas celulares, duas proteínas com ação reguladora sobre a formação do MAC já foram descritas. A HFR (fator de restrição homóloga) é uma proteína ligada à membrana através de uma âncora de glicosil fosfatidil inositol (GPI) e inibe a formação e inserção do MAC, através de uma ação intrínseca. A CD59 também está ligada à membrana através de uma âncora de GPI e é a principal proteína reguladora da formação do MAC na maioria das células. Essa proteína age ligando-se ao C8 no complexo C5b-8 e bloqueando a incorporação do C9, inibindo assim a formação dos poros e a lise celular (Hänsch 1988).

1.3 – Inibição do complemento por parasitos

De um modo geral, os parasitos que infectam os seres humanos e outros vertebrados necessitam lidar com vários aspectos do sistema imune dos seus hospedeiros. Certamente, o sistema do complemento exerce uma grande pressão evolutiva sobre esses parasitos, o que favorece a seleção de mecanismos capazes de proteger esses organismos contra os efeitos potencialmente nocivos do complemento. De fato, a caracterização de como os patógenos conseguem evadir o ataque pelo sistema do complemento tem sido tema de muitos estudos.

Entre os protozoários parasitos, as formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* expressam uma glicoproteína de 160 kDa que se liga tanto ao C3b como ao C4b, inibindo assim a formação e acelerando o decaimento das convertases de C3 e C5 (Norris et al. 1989). Outra molécula da superfície do parasito, uma proteína de cerca de 90 kDa (T-DAF), também se mostrou capaz de atuar sobre C3b e C4b e inibir, tanto a via clássica como a via alternativa do complemento humano (Tambourgi et al. 1993). Além dessas duas proteínas, as tripomastigotas de *T. cruzi* também secretam uma proteína de 58 kDa que é capaz de inibir a formação da C3 convertase através da via alternativa. Porém, essa proteína chamada de gp 58/68 não inibe a via clássica (Fischer et al. 1988). Posteriormente, Ferreira et al. (2004) mostraram que uma calreticulina (TcCRT) encontrada na membrana plasmática de *T. cruzi* é capaz de se ligar ao C1q e a MBL humanos. Como consequência dessa ligação, a atividade lítica da via clássica foi inibida fortemente e a ligação da MBL a polissacarídeos contendo resíduos de manose foi diminuída, indicando que essa proteína poderia também inibir a ativação do complemento humano pela via das lectinas.

As formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* são relativamente resistentes ao ataque do sistema do complemento. Essa resistência parece estar relacionada em parte pela presença de uma espessa camada de lipofosfoglicano (LPG) que recobre toda a superfície celular do parasito. Esse LPG atuaria como uma barreira mecânica, evitando a inserção dos componentes finais da cascata do complemento e a formação de poros na membrana celular da promastigota (Descoteaux & Turco, 1999). Além dessa barreira física, as promastigotas produzem quinases com capacidade de fosforilar C3, C5 e C9, inibindo assim tanto a via clássica como a via alternativa do complemento (Hermoso et al. 1991).

Outra importante molécula presente na superfície celular da *Leishmania* e que possui papel na inativação do complemento é a gp63. Essa metalo-protease de 63 kDa cliva rapidamente o C3b ligado ao parasito e gera então a forma inativa iC3b, que não é capaz de continuar a cascata do complemento (Brittingham et al. 1995). O iC3b ligado à superfície do parasito parece facilitar a entrada da *Leishmania* em macrófagos através do receptor CR3 (Rosenthal et al., 1996). Sendo assim, parece que os parasitos do gênero *Leishmania* não apenas evitam a lise causada pelo complemento, mas utilizam o iC3b depositado para entrarem de um modo “silencioso” nos macrófagos do hospedeiro, uma vez que a fixação de C3 pelo parasito aumenta sua sobrevivência no interior do macrófago (Mosser & Edelson, 1987).

Apesar de *L. amazonensis* possuir em sua superfície a gp63, essa protease parece não estar envolvida na resistência ao complemento por essa espécie, uma vez que o uso de inibidores específicos para metalo-proteases não alterou a sobrevivência do parasito em contato com soro humano (Nunes & Ramalho-Pinto 1996). Além disso, Nunes et al. (1997) mostraram que lisados de promastigotas de *L. amazonensis* não eram capazes de inibir a deposição de C3 sobre placas de ELISA sensibilizadas com IgG humano, mas eram capazes de inibir a deposição do C9, indicando um mecanismo de inibição atuando num ponto final da cascata.

Durante a invasão tecidual, os trofozoítos de *Entamoeba histolytica* encontram-se em contato direto com o sistema do complemento humano. Apesar de esses trofozoítos ativarem a via alternativa do complemento, os parasitos mostram-se resistentes a lise mediada pelo complemento. Com o uso de anticorpos monoclonais contra moléculas da superfície do parasito, Braga et al. (1992) descobriram que uma adesina galactose-específica encontrada na parede celular de *E. histolytica* é a responsável pela inibição do sistema do complemento. Os autores mostraram que essa

proteína, além de possuir alguma similaridade de seqüência com o CD59 humano, possui reatividade cruzada com anticorpos anti-CD59. Assim como a molécula reguladora humana, essa lectina encontrada é capaz de se ligar a C8 e C9 e parece agir impedindo a formação do complexo de ataque à membrana.

Naegleria fowleri, o agente causador da meningoencefalite amebiana primária, também possui mecanismos de evasão do complemento conhecidos. Quando em contato com soro humano, as cepas virulentas de *N. fowleri* formam vesículas da membrana celular para remover os complexos C5b-9 depositados (Toney & Marciano-Cabral 1994) e, assim como *E. histolytica*, também possuem em sua superfície uma molécula similar à CD59 humana (Fritzinger et al. 2006).

Apesar de susceptíveis à lise mediada por complemento heterólogo, os esporozoítos de *Plasmodium* se mostram resistentes ao complemento de seus hospedeiros naturais (Kawamoto et al. 1992), indicando que parasitos desse gênero também possuem mecanismo de modulação do complemento. A proteína circum-esporozoíto (CSP) de *Plasmodium berguei* apresenta motivos de adesão semelhantes à properdina (Goundis & Reid 1988) e de fato, o CSP é capaz de se ligar ao C3d murino (Bergmann-Leitner et al. 2005). Especula-se que os motivos semelhantes à properdina encontrados na CSP inibem a ação do complemento se ligando ao C3b e orientando essa molécula na direção errada (Ramasamy 1998). Além disso, a penetração celular através de CR1 é um evento importante para a sobrevivência e replicação do parasito (Ramasamy 1998).

Entre os vermes trematódeos, as cercárias de *Schistosoma mansoni* ativam a via alternativa de maneira eficiente e, além disso, exibem uma alta susceptibilidade à lise mediada pelo complemento humano (Marikovsky et al. 1986). Porém, os esquistossômulos formados após a penetração da cercaria na pele do hospedeiro vertebrado e os adultos presentes no interior dos vasos sanguíneos se mostram resistentes ao complemento. O primeiro mecanismo envolvido na evasão do complemento por *S. mansoni* é a perda do glicocálice cutâneo presente na cercária, juntamente com a secreção de uma protease capaz de clivar e inativar C3, C3b e C9 (Marikovsky et al. 1988). Além disso, os vermes expressam moléculas em seu tegumento capazes de ligar aos componentes C2 e C3 do complemento humano (Silva et al. 1993, Inal 2006). Outra proteína, de cerca de 94 kDa, possui similaridade antigênica e funcional com o CD59 e é capaz de se ligar aos componentes purificados C8 e C9, inibindo a formação do MAC e a lise de eritrócitos de ovelhas e coelhos pelo

complemento humano. Essa proteína foi identificada como uma paramiosina e sua localização foi confirmada, através de imunofluorescência, no tegumento de esquistossômulos e vermes adultos (Deng et al. 2003). Além das proteínas que o próprio parasito produz para inibir o complemento, *S. mansoni* ainda é capaz de adquirir moléculas dos seus hospedeiros para esse propósito. É sabido que esquistossômulos de *S. mansoni* podem incorporar em seu tegumento a proteína regulatória DAF proveniente de hemácias humanas (Carvalho et al. 1994).

Echinococcus granulosus também é capaz de inibir o complemento humano (Díaz et al. 1999). Díaz et al. (1997) mostraram que a parede do cisto hidático de *E. granulosus* possui a capacidade de seqüestrar o fator H presente no sangue do hospedeiro e usar essa molécula para proteger o parasito do ataque da via alternativa do complemento. Os autores mostraram ainda, que esse fator H seqüestrado de fato funcionava como co-fator para inativação do C3b através da ação do fator I. Procurando um inibidor independente do fator H, Irigoín et al. (2008) testaram o papel do segundo composto mais abundante na parede do cisto hidático, o mio-inositol hexaquisfosfato, na inibição do complemento. Apesar de esse carboidrato ser capaz de inibir a ativação do fator B e impossibilitar a formação da C3 convertase a partir de moléculas purificadas (Irigoín et al. 2002), ele não foi capaz de inativar o complemento na presença das proteínas do soro e nem em condições fisiológicas, mostrando portanto que a ligação do fator H à parede do cisto hidático é o mecanismo responsável pela inibição.

Os parasitos nematódeos *Necator americanus* e *Haemonchus contortus* possuem em seus produtos de excreção/secreção uma proteína semelhante à calreticulina humana capaz de se ligar ao C1q e inativar a lise mediada pela via clássica do complemento (Kasper et al. 2001, Suchitra & Joshi 2005).

Meri et al. (2002) mostraram que as microfilárias de *Onchocerca volvulus* ativam o complemento humano, porém são capazes de inibir a formação do complexo de ataque à membrana. Os autores demonstraram que microfilárias de *O. volvulus* incubadas com soro humano não imune ou com fator H purificado possuem a capacidade de ligar esse regulador da via alternativa. Na presença do fator I, o fator H seqüestrado pela cutícula das microfilárias promove a clivagem do C3b em iC3b, interrompendo assim a cascata do complemento e protegendo as microfilárias.

Loa loa, um outro filarídeo que infecta seres humanos, também evade o complemento através da aquisição de proteínas reguladoras presentes no sangue do hospedeiro vertebrado. As microfilárias coletadas de um paciente infectado

apresentaram níveis normais de deposição de C1q, mas praticamente nenhum C5b-9 foi detectado na superfície dos vermes. Experimentos usando proteínas reguladoras do complemento marcadas com iodo-125 mostraram que microfilárias de *L. loa* adquirem moléculas de fator H e de C4bp do plasma humano e assim impedem a deposição dos componentes finais da cascata do complemento (Haapasalo et al. 2009).

Entre os ectoparasitos, a presença de moléculas inibidoras do complemento foi descrita principalmente na saliva de carrapatos da família Ixodidae. O longo repasto sanguíneo, que pode durar mais de duas semanas em algumas espécies, indica que esses carrapatos são capazes de modular processos fisiológicos de seus hospedeiros como vasoconstrição, inflamação, percepção de dor e imunidade.

Ribeiro (1987) demonstrou pela primeira vez que a saliva de um artrópode hematófago podia impedir a hemólise de hemácias de coelhos pela via alternativa do complemento humano. Além disso, o autor mostrou que a saliva do carrapato *Ixodes dammini* era capaz de inibir a deposição de C3b e também a liberação da anafilatoxina C3a. Em um trabalho posterior, Valenzuela et al. (2000) purificaram, clonaram e expressaram a proteína salivar anticomplemento de *Ixodes scapularis* (Isac) e mostraram que essa molécula era ativa apenas na inibição da via alternativa do complemento, não atuando na via clássica. O mecanismo de ação dessa proteína de 18,5 kDa foi elucidado e mostra que a Isac inibe a deposição de C3b e fator Bb, além de remover o fator Bb ligado anteriormente. A proteína Isac não apresentou nenhuma similaridade significativa com outras moléculas reguladoras do complemento conhecidas até aquele momento.

Em trabalhos mais recentes, proteínas homólogas à Isac foram estudadas no próprio *I. scapularis* e em outras espécies de ixodídeos. A proteína Salp20 de *I. scapularis* apresenta 83% de similaridade de sequência de aminoácidos com a Isac e tem o peso molecular de 48 kDa, devido principalmente a glicosilações. Assim como foi observado para a Isac, Salp20 também inibe a via alternativa do complemento por prevenir a deposição de C3b e fator Bb, além de remover o fator Bb previamente ligado. O mecanismo específico que faz com que a Salp20 iniba a via alternativa do complemento é explicado pelo fato dessa proteína se ligar diretamente à properdina, retirando esse regulador positivo da C3 convertase e acelerando o decaimento dessa enzima (Tyson et al. 2007, Tyson et al. 2008). A saliva de *Ixodes ricinus* também possui a capacidade de inibir a via alternativa do complemento e previne a clivagem do fator B e C3 (Lawrie et al. 2005). Moléculas semelhantes à Isac também foram encontradas na

saliva de *I. ricinus* e atuam de modo parecido, ou seja inibindo a deposição de C3b e fator Bb além de se ligarem a properdina (Daix et al. 2007, Couvreur et al. 2008).

Os carrapatos da família Argasidae também possuem em sua saliva moléculas inibidoras do complemento. Nunn et al. (2005) mostraram que *Ornithodoros moubata*, vetor de algumas borrelíias e reservatório do vírus da peste suína africana, produz uma lipocalina chamada OmCI capaz de inibir tanto a via clássica como a via alternativa do sistema do complemento humano. Essa proteína atua inibindo a clivagem do C5 e parece não ter homologia com as proteínas citadas para os carrapatos da família Ixodidae.

A inibição do complemento por proteínas salivares poderia facilitar o repasto sanguíneo dos carrapatos e determinar a competência vetorial na transmissão de patógenos. Essa hipótese foi testada por Soares et al. (2005) que administraram, por via oral, RNA de dupla fita para o silenciamento da expressão de Isac em ninfas de *I. scapularis*. Os carrapatos silenciados obtiveram um ganho de peso significativamente menor que o grupo controle e, além disso, a carga de espiroquetas de *Borrelia burgdorferi* no grupo tratado foi diminuída. Em outro trabalho, Tyson et al. (2007) mostraram que a presença da proteína Salp20 de *I. scapularis* era capaz de impedir cerca de 70 % da mortalidade de *Borrelia garinii* na presença de soro humano.

Além de moléculas salivares, alguns artrópodes possuem em seus intestinos compostos capazes de interagir com o complemento. As proteínas D1 e II, secretadas pelo intestino de *Sarcoptes scabiei*, são proteases não ativas que inibem as três vias do complemento humano. Essas proteínas impedem a deposição dos componentes C1q, C4b, C3b e C9 (via clássica); MBL, C4b, C3b e C9 (via das lectinas); C3b e C9 (via alternativa). O mecanismo de ação dessas proteínas está relacionado com a ligação de C1q, MBL e properdina (Bergstrom et al. 2009). Em um trabalho recente, Mika et al. (2011) mostraram que uma peritrofina de *S. scabiei* se liga à MBL humana, o que poderia depletar a via das lectinas presentes no alimento ingerido e proteger o epitélio intestinal do ácaro.

A saliva de insetos hematófagos também é capaz de inibir o sistema do complemento humano. Cavalcante et al. (2003), usando como modelos os flebotomíneos *L. longipalpis* e *Lutzomyia migonei* e os triatomíneos *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis* e *Rhodnius prolixus*, mostraram que a saliva de todos esses insetos inibe a via clássica do complemento. A inibição da via alternativa foi testada apenas para os flebotomíneos e a atividade de inibição foi constatada em *L.*

longipalpis. Quando tratada com proteinase K, a saliva de *L. longipalpis* perdia sua atividade inibitória, revelando assim que a molécula responsável por esse fenômeno é de origem protéica. Barros et al. (2009) utilizando ensaios não hemolíticos, constataram que não só a saliva de triatomíneos mas também o conteúdo intestinal desses insetos era capaz de inibir as vias clássica e alternativa do sistema do complemento humano. Os autores mostraram que esses inibidores possuem o papel de proteger o epitélio intestinal desses insetos contra os efeitos nocivos do complemento presentes no sangue ingerido.

2 – JUSTIFICATIVA

A saliva dos flebotomíneos está intimamente relacionada com o processo alimentar desses insetos, tornando o repasto sanguíneo mais rápido e eficiente. Além disso, vários trabalhos publicados nas últimas décadas descreveram a capacidade da saliva de *L. longipalpis* e outros flebotomíneos de modular o sistema imune de seus hospedeiros e, conseqüentemente, beneficiar os patógenos transmitidos por esses insetos (Kamhawi 2000). Quando injetada na pele dos hospedeiros vertebrados, juntamente com formas infectantes de *Leishmania*, a saliva dos flebotomíneos pode aumentar a gravidade das lesões causadas e também aumentar a rapidez com que elas aparecem. Já foi mostrado que a imunização dos hospedeiros com saliva ou proteínas salivares de flebotomíneos pode protegê-los das leishmanioses (Titus et al. 2006, Tavares et al. 2011, Xu et al. 2011). Assim, torna-se relevante o estudo das atividades imunomoduladoras contidas na saliva dos flebotomíneos e a identificação de moléculas salivares envolvidas no estabelecimento da infecção.

Sabe-se que a saliva de *L. longipalpis* é capaz de inibir o sistema do complemento humano, tanto pela via clássica de ativação quanto pela via alternativa (Cavalcante et al. 2003). Porém, não se conhece ainda os mecanismos responsáveis por essa inibição nem tampouco a identidade das proteínas envolvidas.

A possibilidade de incluir antígenos salivares na construção de vacinas para o combate de doenças transmitidas por artrópodes é hoje uma perspectiva real, tendo em vista a importância da saliva na instalação da infecção (Titus et al. 2006). Os inibidores do complemento humano presentes na saliva de *L. longipalpis* poderiam estar diretamente relacionados com a proteção conferida pela saliva aos protozoários do gênero *Leishmania*, tornando-os assim alvos de estudos futuros para a confecção de uma vacina multi-antigênica para a leishmaniose.

O conhecimento do mecanismo de ação e das moléculas envolvidas na inibição do complemento pela saliva de *L. longipalpis* pode também levar a descobertas de compostos com importância farmacológica. Algumas doenças humanas como o lúpus eritomatoso sistêmico e a *miastenia gravis* são causadas pela falha na regulação do sistema imune e ataque do sistema do complemento às células autógenas. De fato, estudos recentes mostraram que uma proteína recombinante inibidora do complemento derivada da glândula salivar de carrapatos é capaz de diminuir drasticamente a

severidade da miastenia grave e a mortalidade causada por essa doença em modelos experimentais (Hepburn et al. 2007, Soltys et al. 2009).

Além disso, a atividade inibidora do sistema do complemento presente na saliva de *L. longipalpis* provavelmente tem um importante papel durante a infecção tanto do hospedeiro invertebrado quanto do vertebrado. Uma vez que a saliva é depositada no local da picada, as formas promastigotas presentes na pele de um hospedeiro, durante uma picada infectante, podem se aproveitar da saliva para proteção contra a lise mediada pelo complemento. Além disso, as formas amastigotas de *Leishmania* podem se aproveitar dessa atividade presente na saliva de *L. longipalpis* no momento em que o flebotômíneo se alimenta em um hospedeiro infectado. Uma vez que no local da picada os macrófagos irão se romper e as amastigotas, muito sensíveis ao complemento (Hoover et al. 1985), irão entrar em contato com o sangue, a proteção conferida pela saliva contra o ataque do complemento seria muito útil para a instalação da infecção no intestino do flebótomo.

Sendo assim, acredita-se que o estudo da inibição do sistema do complemento pela saliva de *L. longipalpis* seja de extrema importância para um melhor entendimento da interação deste importante vetor com o hospedeiro humano.

3 – OBJETIVOS

3.1 – Objetivo geral

Este trabalho teve o objetivo de caracterizar a atividade inibidora do sistema do complemento humano presente na saliva de *L. longipalpis*, bem como analisar a presença de inibidores do complemento no conteúdo intestinal desses insetos.

3.2 – Objetivos específicos

- Confirmar a presença de atividade inibidora da via clássica do complemento humano na saliva de *L. longipalpis*;
- Avaliar se a saliva de *L. longipalpis* é capaz de inibir a deposição dos fatores C1q, C4b, C3b, C5b e C9 do complemento humano ativados pela via clássica;
- Determinar se a saliva de *L. longipalpis* é capaz de desligar os fatores do complemento humano previamente depositados pela via clássica;
- Determinar se a saliva de *L. longipalpis* possui a capacidade de inibir a cascata do complemento agindo na formação do complexo de ataque à membrana;
- Avaliar se a presença de saliva de *L. longipalpis* impede a clivagem de compostos da via clássica como o C4;
- Analisar a capacidade da saliva de *L. longipalpis* de inibir a atividade enzimática de C1s;
- Avaliar a interação da saliva de *L. longipalpis* com as proteínas iniciais da via clássica do complemento humano: C1, C4, C2 e C3;
- Analisar a capacidade da saliva de *L. longipalpis* em se ligar às proteínas iniciais da via clássica do complemento humano: C1q, C4, C2 e C3;

- Determinar o peso molecular da proteína salivar responsável pela inibição da via clássica do complemento humano;
- Confirmar a atividade inibidora da via alternativa do complemento humano presente na saliva de *L. longipalpis*;
- Avaliar se a saliva de *L. longipalpis* é capaz de inibir a deposição dos fatores C3b, fator B, C5b, e C9 do complemento humano ativados pela via alternativa;
- Determinar se a saliva de *L. longipalpis* é capaz de desligar os fatores do complemento humano previamente depositados pela via alternativa;
- Avaliar se a presença de saliva de *L. longipalpis* impede a clivagem de compostos da via alternativa como o fator B;
- Analisar a capacidade da saliva de *L. longipalpis* em inibir a atividade enzimática do fator D;
- Testar a capacidade da proteína recombinante LJM19 da glândula salivar de *L. longipalpis* em inibir a via clássica do sistema do complemento humano;
- Testar a capacidade da proteína recombinante LJM19 da glândula salivar de *L. longipalpis* em inibir a via alternativa do sistema do complemento humano;
- Avaliar se a proteína LJM19 é capaz de inibir a deposição dos fatores C1q e C4b do complemento humano ativados pela via clássica;
- Verificar se o conteúdo intestinal de *L. longipalpis* possui a capacidade de inibir a deposição de moléculas pela via clássica do complemento humano;
- Verificar se o conteúdo intestinal de *L. longipalpis* possui a capacidade de inibir a deposição de moléculas pela via alternativa do complemento humano.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Origem e manutenção dos insetos

Os insetos utilizados nesse trabalho foram provenientes de uma colônia fechada mantida no insetário do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos do Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Esta colônia foi estabelecida em 2006 a partir de espécimes coletados na cidade de Teresina, Estado do Piauí, área endêmica para a leishmaniose visceral.

No insetário, os flebotomíneos foram criados de acordo com a metodologia descrita por Modi & Tesh (1983). Os adultos foram mantidos em gaiolas de náilon envoltas por um saco plástico contendo um pedaço de algodão embebido em água, com o objetivo de manter os insetos em um ambiente de alta umidade relativa. Bolinhas de algodão previamente mergulhadas em uma solução de sacarose 30% foram oferecidas aos adultos no interior da gaiola como fonte de carboidratos para machos e fêmeas. O repasto sanguíneo foi efetuado em hamsters (*Mesocricetus auratus*) previamente anestesiados com 0,3 mL de Thiopental® e com o abdômen tricotomizado para facilitar o acesso das fêmeas à pele do animal. Após três dias do repasto sanguíneo, os adultos foram transferidos para potes de plástico contendo gesso no fundo onde ficaram livres para fazer a postura dos ovos na superfície do gesso. Após a eclosão, as larvas foram mantidas nestes mesmos recipientes e receberam como alimentação uma ração preparada com uma mistura de húmus, fezes de coelho e ração de animais.

A criação dos insetos foi realizada sob condições ambientais controladas, com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar de $70 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro (Modi & Tesh 1983).

Em todos os experimentos foram utilizadas fêmeas de *L. longipalpis* com idade de três a cinco dias após a emergência. Para os experimentos em que a saliva foi usada como amostra, as fêmeas não foram alimentadas com sangue e a alimentação com sacarose foi mantida até o momento da dissecação. Já para os experimentos em que o conteúdo intestinal foi usado como amostra, os flebotomíneos permaneciam em jejum absoluto, para evitar a ingestão de saliva no momento da alimentação com sacarose (Cavalcante et al. 2006).

4.2 – Obtenção dos extratos de glândula salivar e conteúdo intestinal

Utilizando um microscópio estereoscópico e estiletos entomológicos, os flebotomíneos foram dissecados em solução de NaCl 0,9 % para a obtenção das glândulas salivares e conteúdo intestinal.

Para a obtenção dos extratos de glândula salivar, as glândulas retiradas (**Figura 03**) foram lavadas em solução de NaCl 0,9% e transferidas para tubos de microcentrífuga contendo um volume conhecido da solução que seria usada para o ensaio posterior. As glândulas foram então rompidas em um aparelho de ultra-som durante 30 segundos e o material resultante foi centrifugado a 14.000 RCF durante 10 minutos a uma temperatura de 4° C. O sobrenadante foi colhido para os ensaios.

Para a obtenção do conteúdo intestinal, os intestinos dissecados foram lavados em solução salina e transferidos para uma gota de 10 µL de salina 0,9 %. No interior dessa gota o intestino foi rasgado com a ajuda de um estilete entomológico e o conteúdo intestinal se difundia dentro da gota. A parede intestinal foi descartada e o volume de 10 µL recolhido com uma pipeta e transferido para um tubo de microcentrífuga. Esse material foi então centrifugado a 14.000 RCF durante 10 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi recolhido para ser utilizado nos ensaios.

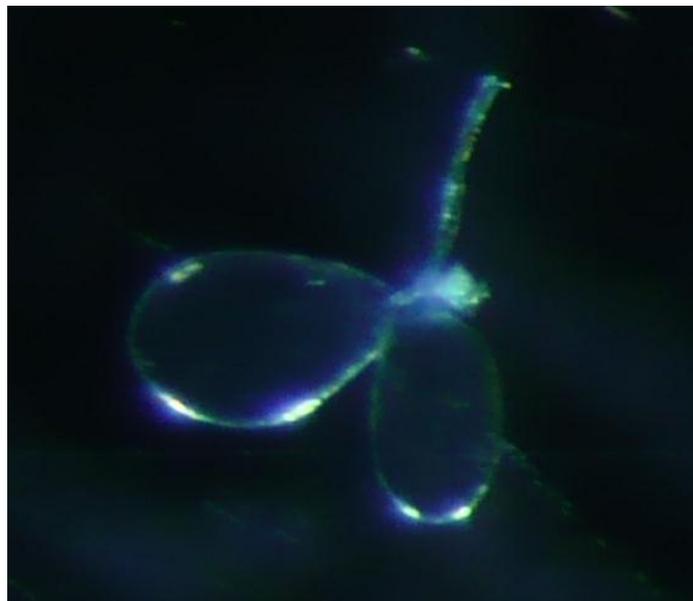


FIGURA 03 Glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis*. Imagem obtida com câmera fotográfica acoplada a um microscópio estereoscópico em aumento de 60 x. Foto do autor.

4.3 – Obtenção da proteína LJM19

A proteína recombinante LJM19, uma das moléculas identificadas na glândula salivar de *L. longipalpis* (Valenzuela et al. 2004), foi cedida pelo Dr. Jesus G. Valenzuela (Laboratory of Malaria and Vector Research – NIAID – NIH/USA) para a realização de alguns ensaios.

O processo utilizado para a clonagem, expressão e purificação dessa proteína pode ser encontrado em Collin et al. (2009) e Teixeira et al. (2010). Basicamente, o cDNA do gene que codifica a LJM19 foi amplificado por PCR utilizando-se um *primer* direto, deduzido à partir da região amino terminal da sequência, e um *primer* reverso codificando um motivo poli-histidina. O produto da PCR foi clonado no vetor VR2001 – TOPO (Oliveira et al. 2006) e, posteriormente, células TOP – 10 (Invitrogen) foram transformadas com esse plasmídeo. As bactérias que receberam o plasmídeo foram cultivadas em meio LB/kanamicina e uma alíquota de cada colônia foi utilizada para sequenciamento. As células que possuíam o plasmídeo com uma correta orientação do inserto e sequência prevista foram selecionadas e cultivadas para obtenção de uma grande quantidade de plasmídeos. Esses plasmídeos foram então purificados utilizando-se o Endofree Plasmid Mega Kit (Qiagen).

As proteínas recombinantes foram produzidas a partir da transfecção de células 293-F (Invitrogen) com os plasmídeos contendo o gene da LJM19. Após 72 horas, o sobrenadante da cultura foi coletado, filtrado, concentrado e aplicado em uma coluna Hi Trap Chelating HP (GE Healthcare). A eluição da proteína foi feita com o aumento da concentração de imidazol e as frações com altas absorvâncias a 280 nm foram coletadas.

Uma última etapa de cromatografia de filtração molecular foi efetuada para a retirada do imidazol presente na amostra e para que essa proteína fosse conservada em PBS.

4.4 – Soros, anticorpos e proteínas purificadas

4.4.1 – Coleta e conservação do soro humano

O sangue de 20 voluntários saudáveis foi coletado para a obtenção de soro. Após a coleta de 10 mL de sangue de cada voluntário, os tubos de ensaio contendo o material foram deixados descansando a temperatura ambiente por um período de três horas. Após esse tempo, o sangue já estava totalmente coagulado e os tubos foram centrifugados a 500 RCF por dez minutos. O soro coletado de cada tubo de ensaio foi misturado com os demais para formar um *pool* de soro humano. Esse material foi aliquotado em frações de 300 µL e congelado a – 80°C em freezer até o momento do uso.

O procedimento citado acima foi realizado várias vezes durante o desenvolvimento do trabalho.

É importante ressaltar que para a coleta do soro humano foram selecionados apenas voluntários que não estavam em contato permanente com flebotomíneos. Para evitar que o soro coletado contivesse anticorpos específicos contra as proteínas salivares de *L. longipalpis*, pessoas que trabalham diariamente na colônia de flebotomíneos, por exemplo, foram descartadas como possíveis doadores.

4.4.2 – Purificação do IgG humano

Para a purificação do IgG total presente no soro humano a metodologia proposta por Catty & Raykundalia (1989) foi utilizada com algumas modificações. Dois mL de soro humano foram misturados a 18 mL de tampão TRIS/HCl 1 M pH 8,0 e a essa mistura foram adicionados 20 mL de uma solução saturada de sulfato de amônio gota a gota. Após a adição de todo o sulfato de amônio, essa mistura foi mantida sob agitação por uma hora para que parte das proteínas precipitassem. Depois de centrifugar a preparação a 10.000 RCF, por 20 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em uma mistura de tampão TRIS/HCl 1M pH 8,0 e de sulfato de amônio saturado na mesma proporção usada anteriormente. Após novo período de agitação, centrifugação e descarte do sobrenadante, as proteínas presentes no sedimento foram dissolvidas em 2mL de tampão fosfato de sódio 0,02M pH 7,0 contendo 1 M de NaCl. Essa solução foi então aplicada no topo de uma coluna de cromatografia contendo

Proteína A Sepharose, resina capaz de se ligar especificamente a moléculas de IgG. Para tanto, a coluna de Proteína A Sepharose foi previamente equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,02M pH 7,0 contendo 1 M de NaCl. Após a ligação dos anticorpos à resina e a lavagem das impurezas não ligadas, as moléculas de IgG foram eluídas com tampão ácido cítrico/NaOH 0,1M pH 3,0 e coletadas em tubos de microcentrífuga contendo um volume de 140µL de TRIS/HCl 1M pH 9,0, até que o volume de cada tubo chegasse a um total de 500µL. Nesta condição, a solução contendo os anticorpos purificados foi corrigida para pH 7,4.

As frações colhidas após a eluição das moléculas de IgG foram levadas ao espectrofotômetro para leitura a 280 nm. As frações contendo os maiores valores de absorvância foram selecionadas e misturadas. Após a determinação da concentração de proteínas nessa solução através do método de Bradford (1976), utilizando BSA como padrão, o material contendo IgG purificado foi aliquoteado e estocado em freezer – 80°C.

4.4.3 – Purificação do C1q humano

O C1q foi purificado utilizando uma coluna de afinidade contendo IgG humano ligado à resina, segundo metodologia proposta por Pohl et al. (1980).

A coluna de IgG-Sepharose foi preparada a partir de CH-Sepharose ativada (Sigma Cod. A9019) segundo as recomendações do fabricante. A quantidade de 0,5 gramas de resina foi suspensa em 100 mL de uma solução 1mM de HCl e após 30 minutos de incubação, a resina foi lavada nessa mesma solução. Cinco mg de IgG purificado foram dissolvidos em 10 mL de uma solução de bicarbonato de sódio 0,1M pH 8, contendo 0,5M de NaCl. Essa solução contendo IgG foi misturada com a resina lavada e incubada a temperatura ambiente por duas horas sob agitação constante para que os anticorpos se ligassem à resina. O bloqueio dos grupos ativos em excesso presentes na resina foi feito com a incubação por uma hora em uma solução de TRIS/HCl 0,1M pH 8. A resina foi então colocada no interior de uma coluna e cinco lavagens com bicarbonato de sódio 0,1M pH 8 foram feitas para remover as moléculas que não se ligaram. A coluna foi então lavada com acetato de sódio 0,05M pH 4 contendo 0,5M de NaCl e uma outra lavagem com fosfato de sódio 0,02M pH 7,0 foi feita. Uma vez pronta, a coluna de IgG-Sepharose foi guardada em tampão fosfato de sódio 0,02M pH 7 contendo 0,2% de azida sódica a 4°C até o momento de uso.

Para a purificação de C1q, a coluna de IgG-Sepharose foi equilibrada com tampão HEPES 5mM pH 7,4 contendo 145mM de NaCl e 10 mM de EDTA. Quatro mL de soro humano foram misturados com quatro mL do tampão usado para equilibrar a coluna. Essa coluna foi então carregada com oito mL de soro diluído 1:1 em tampão. Após a passagem do material pela coluna, essa foi lavada três vezes com o mesmo tampão. Para a retirada do EDTA, a coluna foi então lavada mais três vezes com um tampão HEPES 5mM pH 7,4 contendo 145 mM de NaCl. A eluição do C1q ligado às moléculas de anticorpo foi feita passando-se pela coluna o tampão Hepes 5mM pH 7,4 contendo 1M de NaCl. Frações de 0,5 mL foram coletadas e a absorvância a 280 nm foi medida em espectrofotômetro para cada uma delas. As frações com maiores valores de absorvância foram selecionadas e misturadas em um único estoque.

Uma vez que a alta concentração de sal presente nas amostras de C1q purificado poderia prejudicar os ensaios com essa proteína, ultrafiltros com porosidade de 10 kDa (Amicon Cod. UFC501008) foram usados para dessalinizar as amostras e também para concentrar as proteínas. As proteínas foram concentradas e lavadas em PBS no próprio filtro. Após essa etapa, a quantidade de C1q purificado foi avaliada pelo método de Bradford (1976) e a amostra estocada em freezer – 80°C.

4.4.4 – Anticorpos e outras proteínas do complemento humano

Anticorpos específicos contra proteínas do complemento humano foram adquiridos para utilização nos ensaios. Anticorpos monoclonais produzidos em coelhos contra C3c (Sigma) e C4b (Sigma) e anticorpo policlonal produzido em cabras contra C1q (Sigma) foram comprados na Sigma. Anticorpos policlonais produzidos em cabras contra os componentes C4 (Comp Tech), C2 (Comp Tech), C5 (Comp Tech) e C9(Comp Tech) foram adquiridos na Complement Technology e contra o fator B (Calb) foram adquiridos na Calbiochem.

Para os ensaios de hemólise da via clássica, anticorpos produzidos em coelhos contra eritrócitos de carneiro foram cedidos pela Dr. Marilene S.M Michalick (Laboratório de Sorologia – Departamento de Parasitologia – ICB/UFMG).

Utilizou-se os seguintes anticorpos secundários conjugados com peroxidase: anticorpo monoclonal anti-imunoglobulinas de coelho produzido em

camundongos (Sigma) e anticorpo policlonal anti – IgG de cabra produzido em coelhos (Sigma).

As proteínas purificadas: C1 (Comp Tech), C1s(Comp Tech), C2(Comp Tech), C3(Comp Tech), C4(Comp Tech) e fator D (Comp Tech) foram adquiridas na Complement Technology, assim como o soro depletado de fator B (Comp Tech) e o soro depletado de C6 (Comp Tech).

4.5 – Ensaio Hemolítico

4.5.1 – Obtenção e preparo das hemácias

Para os ensaios hemolíticos da via clássica, hemácias de carneiro sensibilizadas foram usadas de acordo com o protocolo de Whaley & North (1997), com algumas modificações.

Carneiros mantidos na Escola de Veterinária da UFMG foram utilizados para a obtenção das hemácias. A obtenção por punção venosa de 30 mL de sangue foi feita com o uso de uma seringa estéril contendo 30 mL de solução conservadora de sangue autoclavada (glicose 113,8mM, ácido cítrico 30mM, NaCl 72mM, pH 7,4). Esse sangue foi então alíquotado em tubos de ensaio e mantido a 4° C por até quatro meses.

Para a sensibilização das hemácias de carneiro, um mL da alíquota foi retirado e lavado por três vezes consecutivas em tampão GHB-EDTA (HEPES 5 mM, NaCl 145 mM, EDTA 10 mM, gelatina 0,1%, pH 7,4). Essa lavagem consistia em centrifugar as hemácias (470 RCF a 4° C, por 5 minutos) e ressuspender o sedimento com 10 mL de GHB-EDTA. Após a última lavagem, foi adicionado anticorpo anti-hemácias de carneiro na diluição de 1:1000 e essa suspensão de hemácias contendo anticorpos foi incubada a 37°C por 30 minutos para que as hemácias fossem opsonizadas com anticorpos. Após a sensibilização, as hemácias foram lavadas mais duas vezes com GHB-EDTA e uma vez com GHB⁺² (HEPES 5mM, NaCl 145 mM, CaCl₂ 0,15 mM, MgCl₂ 0,5 mM, gelatina 0,1%, pH7,4). Terminada essa lavagem para retirar os anticorpos não ligados, a quantidade de hemácias na suspensão foi dosada em espectrofotômetro e a concentração foi ajustada para 2×10^8 células/mL. Uma vez sensibilizadas, as hemácias de carneiro foram mantidas em geladeira e usadas por um período de até uma semana.

Os ensaios hemolíticos da via alternativa eram feitos com o uso de hemácias de coelho não sensibilizadas (Whaley & North 1997).

O sangue de coelho foi coletado na veia lateral da orelha de animais mantidos no biotério do ICB/UFMG. A coleta de dois mL de sangue era feita com uma seringa contendo dois mL de solução conservadora de sangue. Essa mistura foi transferida para um tubo de ensaio estéril e alíquotas de um mL foram retiradas e lavadas para a utilização das hemácias nos ensaios.

A lavagem das hemácias de coelho foi feita como descrito para as hemácias de carneiro, porém a solução usada foi a Mg-EGTA (HEPES 5mM, NaCl 145mM, MgCl₂ 7mM, EGTA 10 mM, gelatina 0,1 %, pH 7,4) Após três lavagens, as hemácias de coelho foram dosadas em espectrofotômetro como descrito anteriormente e a concentração ajustada para 2×10^8 células/mL com o uso do tampão Mg-EGTA.

4.5.2 – Ensaios hemolíticos da via clássica

Para a confirmação da atividade inibidora da via clássica presente na saliva de *L. longipalpis* e para testar se a proteína recombinante LJM19 foi capaz de inibir especificamente essa via, ensaios hemolíticos foram feitos utilizando-se soro humano depletado de fator B (Whaley & North 1997).

O ensaio com saliva foi feito após a dissecação de dez insetos e obtenção de um extrato de glândula salivar (EGS) que foi diluído em solução de NaCl 0,9%, conforme o item 4.2. Utilizando-se tubos de microcentrífuga de 0,5 mL, o volume de 12,5 µL de EGS (contendo o equivalente a 2; 1; 0,5 e 0,1 lobos salivares) foi misturado a 25 µL de soro depletado de fator B diluído 1:60 em solução GHB⁺². A ausência de fator B assegurava que somente a via clássica estaria atuando. Após a adição de 25 µL da suspensão de hemácias de carneiro sensibilizadas, os tubos foram incubados a 37°C por 30 minutos para que o complemento atuasse na membrana celular dessas células. Após esse tempo, 250 µL de solução salina 0,9% gelada foram adicionados a cada tubo e os conteúdos dos tubos foram centrifugados em temperatura ambiente por um minuto a 1700 RCF. Duzentos µL do sobrenadante foram coletados e com o uso de uma placa de cultura de 96 poços, as amostras foram lidas em um leitor de ELISA a 414 nm.

Em cada experimento foram feitos controles sem a presença de EGS para determinar a capacidade do soro humano em lisar as hemácias sensibilizadas. Além disso, controles sem a adição de soro foram feitos para estimar a taxa de hemólise espontânea dessas células. O controle de hemólise total foi feito adicionando-se 250 µL de água destilada (ao invés de salina) aos tubos. Esse controle foi importante, pois a hemólise provocada pelo soro na ausência de inibidores devia representar cerca de 90% do valor da hemólise total.

Esses experimentos foram feitos em duplicata e três repetições independentes foram conduzidas. A porcentagem de hemólise provocada pelo soro foi

calculada, considerando-se como 100% de hemólise os controles em que o EGS não estava presente. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da hemólise.

Os ensaios para testar se a proteína recombinante LJM19 foi capaz de inibir a via clássica do complemento foram feitos como descrito acima. Nesse caso, as quantidades testadas foram 0,5 µg; 0,25 µg; 0,125 µg e 0,0625 µg.

4.5.3 – Ensaios hemolíticos da via alternativa

Para a confirmação da atividade inibidora da via alternativa presente na saliva de *L. longipalpis* e para testar se a proteína recombinante LJM19 foi capaz de inibir especificamente essa via, ensaios hemolíticos foram feitos utilizando-se soro humano normal na presença de EGTA (Whaley & North 1997). O EGTA quelata os íons cálcio (mas não os Mg^{+2}) e inibe somente a via clássica.

Nos experimentos em que a saliva foi usada como amostra, o EGS foi preparado após a dissecação das glândulas de 40 fêmeas de *L. longipalpis* (**item 4.3**). As diluições com salina 0,9 % foram feitas de modo que a quantidade de lobos salivares nos experimentos foi equivalente a 20, 10, 5 e 1.

O volume de 12,5 µL de EGS foi misturado a 25 µL de soro humano normal diluído 1:10 em solução Mg-EGTA em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL. Logo após a adição de 25 µL de suspensão de hemácias de coelho, os tubos foram incubados por 30 minutos a uma temperatura de 37°C. Terminada a incubação, 250 µL de salina 0,9 % gelada foram adicionados em cada tubo e esses tubos foram centrifugados por um minuto a 1700 RCF e temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram colhidos e a leitura no aparelho de ELISA e análise dos experimentos foram feitas como descrito do **item 4.5.2**.

Os ensaios para testar se a proteína recombinante LJM19 foi capaz de inibir a via alternativa do complemento foram feitos como descrito acima. Porém, apenas a quantidade de 0,5 µg de LJM19 foi testada.

4.5.4 – Ensaio hemolítico para determinar se a saliva de *Lutzomyia longipalpis* atua sobre a formação do complexo de ataque à membrana

Com o objetivo de analisar se o extrato de glândula salivar de *L. longipalpis* é capaz de impedir a formação do complexo de ataque à membrana, um experimento de hemólise utilizando soro depletado de C6 foi desenvolvido.

Para esse experimento, 30 insetos foram dissecados e os EGS obtidos possuíam o equivalente a 10 e 5 lobos salivares.

Trezentos μL da suspensão de hemácias de carneiro sensibilizadas (item 4.5.1) foram coletados e centrifugados a 480 RFC por três minutos a 4°C. Essas hemácias foram então ressuspensas em 300 μL de soro depletado de C6 diluído 1:10 no tampão GHB⁺² e incubadas a 37°C por 15 minutos. Durante essa incubação, a via clássica era ativada e as convertases formadas sobre a superfície das hemácias, contudo não ocorria hemólise pois a falta de C6 impedia a formação do MAC.

Após a primeira incubação, a suspensão de hemácias foi novamente centrifugada a 480 RCF por três minutos a 4°C e as células foram ressuspensas em 300 μL de GHB-EDTA.

Em um tubo de 0,5 mL, 12,5 μL de EGS foram então misturados a 25 μL de soro humano normal diluído 1:10 em solução GHB-EDTA e mais 25 μL da suspensão de hemácias em GHB-EDTA. O EDTA impede a formação de novos complexos de convertase, mas não impede que as convertases já formadas possam atuar. Esse tubo foi incubado a 37°C por 30 minutos.

Para esse experimento, os controles foram feitos incubando as hemácias com soro 1:10 em GHB-EDTA na ausência de EGS e incubando essas hemácias na ausência de EGS e de soro. Um importante controle também foi feito para mostrar que o soro diluído em GHB-EDTA não é capaz de lisar hemácias que não foram previamente incubadas com soro depletado de C6. A avaliação da hemólise foi feita seguindo o mesmo protocolo do item 4.5.2.

Uma variação desse experimento foi feito incubando as hemácias sensibilizadas com soro depletado de C6 na presença de EGS de *L. longipalpis*. Nesse caso, a segunda incubação (soro humano normal diluído em GHB-EDTA) foi feita na ausência de EGS.

4.5.5 – Ensaio hemolítico para avaliar a interação do EGS com as proteínas iniciais da via clássica do complemento humano: C1, C4, C2 e C3

O ensaio foi realizado através da montagem gradual da cascata da via clássica do complemento sobre a superfície de hemácias de carneiro sensibilizadas (item 4.5.1) segundo a metodologia de Krych-Goldberg et al. (1999). Nesse tipo de ensaio, o EGS podia ser acrescentado em cada etapa, de modo que era possível verificar em que ponto o EGS iria inibir a montagem.

Em um tubo de microcentrífuga de 0,5 mL, 100µL de suspensão de hemácias foram centrifugados a 480 RCF durante três minutos e a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as hemácias ressuspendidas em 300 µL de solução GHB⁺² contendo C1 (1,6 µg/mL). Essa preparação foi incubada durante 15 minutos e uma temperatura de 30° C. Após esse período, as hemácias foram centrifugadas e lavadas por uma vez em solução GHB⁺², para que o C1 não ligado às hemácias fosse descartado. As hemácias foram ressuspendidas em 100 µL de solução GHB⁺² contendo a proteína purificada C4 (3 µg/mL) e incubadas por 15 minutos a 30°C na presença e na ausência do EGS. Se o EGS não interferisse nessa etapa, o C4 seria ativado por C1s e acabaria aderindo às hemácias na forma de C4b. Após nova lavagem, as hemácias foram ressuspendidas em 100 µL de solução GHB⁺² contendo C2 purificado (0,75 µg/mL) na presença de 5 mM de iodeto de potássio. Essa preparação foi então incubada por oito minutos a 30°C na presença e na ausência de EGS. Se o EGS não interferisse nessa etapa, C2 poderia se ligar a C4b e também ser ativado em C2a que permaneceria ligado à convertase (C1-C4b-C2a) na superfície das hemácias. Quando oxidado por KI, a ligação de C2a fica mais estável e essa molécula fica mais tempo no complexo. Após nova lavagem, 100 µL de C3 (27 µg/mL) diluído em GHB⁺² foram usados para ressuspender as células e essas foram incubadas durante oito minutos na temperatura de 30°C na presença e ausência de EGS. Se a saliva não interferisse nessa etapa, o C3 seria ativado em C3b e se ligaria covalentemente na superfície das hemácias nas proximidades da convertase. As células foram então lavadas mais uma vez com GHB⁺², centrifugadas por um minuto a 480 RCF e 4°C e ressuspendidas em 100 µL de GHB-EDTA.

Vinte e cinco µL da suspensão de hemácias obtidas como descrito acima foram coletados e misturados a 12,5 µL de solução salina 0,9 % mais 25 µL de soro de cobaia diluído 1:10 em GHB-EDTA. Controles foram feitos para garantir que o soro de

cobaia na presença de EDTA não hemolisaria hemácias que não foram pré – tratadas com proteínas do complemento. A avaliação da hemólise foi feita como no item **4.5.2**.

Como mencionado, o processo descrito acima foi realizado para avaliar a interação do EGS de *L. longipalpis* com as proteínas C1, C4, C2 e C3. Os ensaios foram realizados de modo que a interação do EGS com apenas uma das proteínas era testada por vez. Para cada etapa testada foram utilizadas duas concentrações de EGS equivalentes a 15 e 7,5 lobos salivares.

4.6 – Ensaios de deposição de componentes do complemento humano em placas de ELISA

4.6.1 – Preparo das placas de ELISA

O sistema do complemento humano dispara em contacto com anticorpos (via clássica) ou agarose (via alternativa) aderidos ao plástico de uma placa de ELISA (Barros et al. 2009). Os componentes do sistema que vão sendo ativados em cascata, e que normalmente se aderem às superfícies ativadoras (C1q, C3b, C4b, C5b e etc.), podem então ser quantificados na superfície da placa com o uso de anticorpos específicos para cada um desses componentes. Quando esse tipo de experimento é feito na presença de um inibidor é possível determinar o ponto onde ocorreu a interrupção.

Para a realização dos ensaios de deposição dos componentes ativados pela via clássica, microplacas de ELISA (COSTAR[®]) foram sensibilizadas com 50µL/poço de tampão carbonato/bicarbonato de sódio (Na₂CO₃ 15mM, NaHCO₃ 35mM, pH 9,6) contendo 2µg de IgG humano purificado (**item 4.4.2**). A sensibilização das placas ocorreu durante 12 horas em uma câmara umida mantida à temperatura ambiente (Petersen et al. 2001).

No caso dos ensaios da via alternativa, os poços de microplacas de ELISA (COSTAR[®]) foram recobertos com uma solução de agarose 0,1% dissolvida a quente, em água destilada (100µL/poço). Essas placas foram então deixadas em uma estufa a 37°C por 24 horas, para que ocorresse a evaporação da água e se formasse uma película de agarose no interior do poço (Ribeiro et al. 1987).

4.6.2 – Ensaios de deposição para via clássica

Para a realização dos ensaios da via clássica, foram dissecados dez insetos e as suas glândulas salivares foram transferidas para um tubo de microcentrífuga contendo uma quantidade conhecida de solução do ensaio (HEPES 5mM, NaCl 145 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 7,4). Diluições foram feitas para a obtenção de extratos de glândula salivar (EGS) contendo o equivalente a 2; 1; 0,5 e 0,1 lobos salivares.

As placas sensibilizadas com IgG (**item 4.6.1**) foram tratadas com 200µL/poço de solução de bloqueio 1 (3% de BSA em tampão TRIS/HCl a 10mM e

NaCl 140mM, pH 7,4) durante 30 minutos, a temperatura ambiente, sob agitação. A solução de bloqueio 1 foi descartada e os poços foram novamente bloqueados, nas mesmas condições, com solução de bloqueio 2 (3% BSA em tampão TRIS/HCl 10mM, NaCl 140mM, CaCl₂ 5mM e 0,05% de Tween-20, pH 7,4).

Após o bloqueio, os poços da placa receberam 100 µL de solução do ensaio contendo EGS e o equivalente à 1 µL de soro humano normal. No controle positivo, 100 µL de solução do ensaio contendo soro humano normal foram colocados em cada poço. Além disso, um controle contendo apenas solução do ensaio foi preparado para avaliar a ligação inespecífica dos anticorpos à placa de ELISA. Cada um desses tratamentos foi realizado em triplicata. A placa de ELISA foi então incubada durante 30 minutos a uma temperatura de 37°C, sob agitação constante. Após essa incubação, cada poço foi lavado três vezes com 200 µL de solução de lavagem (0,1% de BSA em tampão TRIS/HCl 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4) por dois minutos sob agitação.

A detecção das moléculas do sistema do complemento depositadas na placa de ELISA foi feita através de anticorpos específicos para cada componente a ser analisado. Para C1q, C5b e C9 foram utilizados anticorpos diluídos 1:2500 em uma solução de HEPES/NaOH 10mM, NaCl 140 mM, pH7,4. Para a detecção de C3b e C4b os anticorpos foram diluídos a 1:1000 na mesma solução citada acima. Cinquenta microlitros da solução de cada anticorpo diluído foram transferidos para os respectivos poços e incubados por 30 minutos, a temperatura ambiente, sob agitação constante. Os anticorpos não aderidos foram lavados com 200µL da solução de lavagem, conforme descrito acima.

Para a detecção dos anticorpos depositados na superfície da placa, 50 µL de uma solução de anticorpos secundários conjugados com peroxidase foram adicionados em cada poço e incubados por 30 minutos, a temperatura ambiente e sob agitação. No caso dos ensaios de deposição de C1q, C5b e C9, foi usado o conjugado anti-cabra diluído 1:5000 na solução HEPES/NaOH 10mM, NaCl 140 mM, pH7,4. Para os ensaios de C4b e C3b, foi usado o conjugado anti-coelho diluído a 1:1500 na mesma solução usada anteriormente.

Após mais um ciclo de lavagem das placas de ELISA, a revelação da peroxidase foi feita com a adição de 200 µL de uma solução tampão 50mM de citrato de sódio/HCl, 0,075% de H₂O₂ e pH 5,5 contendo 1 mg/mL de O-Phenylene-Diamine (OPD). As leituras foram realizadas no modo cinético a 450nm em um leitor de microplacas (Molecular Devices) a cada 30 segundos, durante 10 minutos a 37°C. Os

valores de velocidade máxima do crescimento da absorvância foram calculados pelo Software SoftMax Pro 5.2. Para a criação dos gráficos, os dados foram transformados em porcentagem de deposição da molécula em questão, sendo que 100% de deposição correspondeu à atividade encontrada quando nenhum inibidor estava presente.

Ensaio de deposição de C1q, C4b, C3b, C5b e C9 pela via clássica do complemento humano também foram feitos em pH 8,15, valor de pH encontrado no intestino de *L. longipalpis* logo após repasto sanguíneo (Santos et al. 2008). Para isso, a incubação da placa com EGS e soro humano normal foi feita em HEPES 5mM, NaCl 145mM, CaCl₂ 2mM, MgCl₂ 1mM, pH 8,15.

A capacidade da proteína LJM19 em inibir a deposição de compostos em placas de ELISA sensibilizadas com IgG também foi testada. Nesses experimentos, apenas a deposição de C1q e de C4b foi analisada em pH 7,4. Quantidades de 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625 µg de LJM19 foram testadas.

4.6.3 – Ensaio de deposição para via alternativa

Para a realização dos ensaios da via alternativa, foram dissecados 65 insetos e as suas glândulas salivares foram transferidas para um tubo de microcentrífuga contendo uma quantidade conhecida de solução do ensaio (HEPES 5mM, NaCl 145mM, MgCl₂ 7mM, EGTA 10mM, pH 7,4). Diluições foram feitas para a obtenção de extratos de glândula salivar (EGS) contendo o equivalente a 20, 10, 5 e 1 lobos salivares.

Os poços da placa tratada com agarose receberam 100 µL de solução do ensaio contendo EGS e o equivalente a 7 µL de soro humano normal. No controle positivo, 100 µL de solução do ensaio contendo os 7 µL de soro humano normal foram colocados em cada poço. Além disso, um controle contendo apenas solução do ensaio foi preparado para avaliar a ligação inespecífica dos anticorpos à placa de ELISA. Cada um desses tratamentos foi realizado em triplicata. A placa de ELISA foi então incubada durante 30 minutos a uma temperatura de 37°C, sob agitação constante. Após a incubação, a microplaca foi lavada para a retirada dos componentes do complemento não aderidos. As lavagens foram repetidas 3 vezes, durante 2 minutos, com 200µL da própria solução do ensaio, sob agitação.

A detecção de C3b, fator Bb, C5b e C9 foi realizada com a adição de 50µL de solução contendo anticorpos específicos para cada um desses compostos. A diluição

utilizada para todos esses anticorpos foi de 1:1000. A incubação com os anticorpos foi realizada a temperatura ambiente, por 30 minutos, sob agitação.

Os anticorpos não aderidos foram lavados com a própria solução do ensaio como descrito acima. Para detectar os anticorpos contra os componentes do sistema do complemento aderidos à placa, cada poço era subsequentemente incubado com 50µL de uma solução contendo anticorpos secundários conjugados com peroxidase e diluídos 1:1500 em HEPES/NaOH 10mM; NaCl 140mM; BSA 0,1% e pH 7,4. Essa incubação era realizada durante 30 minutos, sob agitação. O conjugado usado para a detecção do C3b foi um anticorpo anti-coelho, e para os fatores Bb, C5b e C9 foram utilizados conjugados anti-cabra. Após novo ciclo de lavagem, a placa de ELISA foi revelada com o substrato OPD- H₂O₂ como descrito anteriormente para os ensaios da via clássica.

4.6.4 – Ensaio para determinar se a saliva de *Lutzomyia longipalpis* é capaz de desligar componentes previamente depositados sobre superfícies ativadoras

Para avaliar a possibilidade da saliva de *L.longipalpis* desligar fatores previamente depositados pelo sistema do complemento, ensaios de deposição de componentes da via clássica (item 4.6.2) e via alternativa (item 4.6.3) foram feitos segundo Tyson et al. (2008), com modificações.

Neste caso, todos os poços da placa foram incubados por 30 minutos e 37°C com solução de ensaio e soro, sem a adição dos extratos de glândula salivar. Após esse período de incubação, um processo de lavagem era feito como descrito anteriormente para a retirada das moléculas do complemento que não se ligaram à superfície da placa. Nos poços que serviam de controle positivo era adicionada apenas a solução do ensaio. Nos poços “teste” era adicionado o extrato de glândula salivar diluído na solução do ensaio. Para os testes da via clássica foram utilizadas diluições contendo o equivalente a dois lobos salivares e para os testes da via alternativa foram utilizadas diluições contendo o equivalente a 20 lobos salivares. Após nova incubação por 30 minutos a 37°C a placa foi mais uma vez lavada. O processo de detecção dos compostos depositados e a revelação da placa de ELISA foram feitos como descrito nos itens 4.6.2 e 4.6.3.

4.7 – Análise de Western blot da clivagem de componentes do complemento humano

4.7.1 – Clivagem de C4

A clivagem de C4 no soro humano durante os ensaios hemolíticos da via clássica na presença de EGS de *L. longipalpis* foi analisada por Western blot de acordo com Avirutnan et al. (2010).

Ensaio de hemólise da via clássica do complemento humano foram feitos como descrito no item **4.5.2**, exceto que nesse caso foi usado soro humano normal. Os ensaios foram conduzidos na presença de EGS equivalente a 4 lobos salivares ou nenhum inibidor presente (controle). A análise da clivagem de C4 foi feita no início da incubação e 30 minutos depois de iniciada a incubação.

Imediatamente após a adição das hemácias, os tubos que foram analisados no tempo zero foram centrifugados a 1700 RCF por um minuto a temperatura ambiente. Dez µL do sobrenadante de cada um desses tubos foram coletados e misturados com dez µL de tampão de amostra redutor para SDS-PAGE duas vezes concentrado e fervidos por cinco minutos, sendo que os tubos incubados por 30 minutos sofreram o mesmo processo.

As amostras foram aplicadas em um gel de poliacrilamida 10% (Laemmli 1970) e a corrida eletroforética feita a 120 V prosseguiu até que o marcador do tampão da amostra alcançasse a base do gel. As proteínas presentes no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose durante duas horas. Essa membrana foi então bloqueada durante 12 horas com uma solução de PBS contendo 0,1% de Tween 20 e 10% de leite em pó desnatado em agitação constante. Após o bloqueio, a membrana foi lavada por três vezes durante sete minutos com PBS contendo 0,1% de Tween 20. A membrana foi incubada por duas horas em agitação constante com 15 mL de anticorpo policlonal contra C4 diluído 1:2000 em PBS/T. Após um novo ciclo de lavagem, a membrana foi incubada por mais duas horas em 15 mL de anticorpo anti-cabra conjugado com peroxidase numa diluição de 1:4000 em PBS. A membrana foi novamente lavada e a revelação das bandas de C4 foi feita usando o kit Peroxidase Substrate DAB (Vector Laboratories).

4.7.2 – Clivagem do fator B

A clivagem do fator B no soro humano durante os ensaios hemolíticos da via alternativa na presença de EGS de *L. longipalpis* foi analisada por Western blot de acordo com Couvreur et al. (2008).

Ensaio de hemólise da via alternativa do complemento humano foram feitos como descrito no item 4.5.3. Os ensaios foram conduzidos na presença de EGS equivalente a 40 lobos salivares ou nenhum inibidor presente (controle). A análise da clivagem do fator B foi feita no início da incubação (tempo zero) e 30 minutos após o início da incubação.

Imediatamente após a adição das hemácias, os tubos que foram analisados no tempo zero foram centrifugados a 1700 RCF por um minuto à temperatura ambiente. Logo após o início da incubação (tempo zero), cinco μL do sobrenadante de cada um desses tubos foram coletados e misturados com cinco μL de tampão da amostra sem SDS e sem β -mercaptoetanol duas vezes concentrado. Essa amostra não foi fervida. . Após 30 minutos de incubação, o material presente nos tubos foi centrifugado e 5 μL do sobrenadante sofreram o mesmo tratamento.

As amostras preparadas para eletroforese (10 μL) foram aplicadas em um gel de poliacrilamida a 10% em tampão de tris-tricina em que o SDS não estava presente em nenhum dos tampões.

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e o processo de revelação do Western blot foi feito conforme citado no item 4.7.1, com o uso de anti-fator B diluído 1:1000 e uso de conjugado anti-cabra diluído 1:2000.

4.8 – Ensaios para determinar se o extrato de glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis* é capaz de inibir a atividade enzimática de algumas proteases do complemento

4.8.1 – Ensaio enzimático de C1s

Para analisar o efeito da saliva de *L. longipalpis* na atividade enzimática de C1s, ensaios com essa enzima foram realizados utilizando C4 como substrato (Avirutnan et al. 2010).

Em um tubo de microcentrífuga de 0,5 mL, o EGS diluído em PBS (equivalente a 60 lobos salivares) foi misturado com três µg de C4 purificado e 0,3 µg de C1s purificado. O volume final da reação foi de 30 µL e os tubos foram incubados a 37°C por 120 minutos. Tubos contendo apenas C4 purificado foram usados como controle negativo enquanto tubos contendo C4 e C1s na ausência de EGS foram usados como controle positivo. Foi feito ainda um controle incubando apenas C4 purificado e EGS, para avaliar a possibilidade de clivagem do C4 pela saliva.

Após a incubação, 10 µL de cada tubo foram coletados e misturados ao tampão da amostra para SDS-PAGE e a clivagem do C4 foi visualizada através de Western blot pelo mesmo método descrito no item **4.7.1**.

4.8.2 – Ensaio enzimático do fator D

Os ensaios enzimáticos da atividade do fator D na presença de EGS de *L. longipalpis* foram feitos com o uso de um substrato sintético para essa enzima (Kam et al. 1987).

Para a realização desse ensaio, todos os reagentes (inclusive a amostra de glândula salivar) foram preparados ou diluídos em solução HEPES 0,1M, NaCl 0,05M, DMSO 10%, pH 7,4.

Vinte e cinco microlítros de EGS contendo o equivalente a dez lobos salivares foram misturados com 25 µL de fator D purificado (6 µg de proteína/mL) e 50 µL de uma solução de Aldrithiol 0,06 mM (Sigma Cod. D8136) em um tubo de microcentrífuga de 0,5 mL. Após a homogeneização por pipetagem, essa mistura foi colocada em uma cubeta de quartzo de 200 µL. A reação enzimática foi iniciada com a

adição de 100 μL de uma solução 2mM do substrato Z-1-Lys-SBzL (Sigma Cod C3647). Essa cubeta foi então imediatamente levada ao espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu, onde a leitura no modo cinético foi feita durante 30 minutos à 324 nm e temperatura ambiente. O controle positivo foi feito sem a adição de EGS. Outro controle contendo EGS mas sem fator D também foi realizado. Brancos foram feitos sem EGS e sem enzima. Na medida em que o substrato era hidrolisado, o aldritol se combinava com o tiobenzoato formado que absorve a 324 nm.

A atividade do fator D foi calculada como velocidade máxima da reação pelo software UV-Probe e expressa como mili Densidade Óptica por minuto (mDO. min^{-1}).

4.9 – Ensaio para determinar se o extrato de glândula salivar é capaz de se ligar à alguma proteína da fase inicial da cascata da via clássica

Com o objetivo de analisar a capacidade do EGS de *L. longipalpis* de se ligar às proteínas C1q, C4, C2 e C3, ensaios de ELISA foram realizados segundo Kasper et al. (2001).

Quando as glândulas salivares foram usadas como amostra, 80 insetos foram dissecados e o EGS foi obtido através da diluição da amostra em uma solução de Na₂CO₃ 15mM e NaHCO₃ 35mM, pH 9,6.

Microplacas de ELISA foram adsorvidas com 50µL de EGS (equivalente a 100 e 50 lobos salivares/poço) durante 12 horas a 4° C em uma câmara umida. Cada poço foi então bloqueado por duas horas a 37° C com 200 µL de uma solução de PBS contendo 0,1% de Tween 20 e 2% de leite em pó desnatado. Após o bloqueio, os poços foram lavados por três vezes durante três minutos sob agitação com uma solução de PBS/Tween 0,1%. Para analisar a possível ligação de proteínas salivares às proteínas iniciais da cascata da via clássica, os poços foram então incubados por duas horas a 37°C com 50 µL de PBS contendo 0,2 µg da proteína purificada a ser testada (C1q, C4, C2 ou C3). Após essa incubação, nova lavagem foi efetuada e a detecção das proteínas ligadas foi feita usando-se anticorpos específicos (item **4.4.4**) diluídos a 1:1000 em PBS durante 30 minutos e a 37°C. Um novo ciclo de lavagens foi realizado e 50 µL de uma solução contendo os anticorpos conjugados com peroxidase (item **4.4.4**) e diluídos a 1:2000 em PBS foram adicionados em cada poço da placa. Uma nova incubação de 30 minutos a 37°C foi feita. Após mais uma lavagem a placa de ELISA foi revelada com OPD segundo descrito do item **4.6.2**.

Esses experimentos foram repetidos de forma independente pelo menos três vezes e os resultados foram expressos como valores brutos de velocidade máxima de absorvância (mDO. min⁻¹).

4.10 – Determinação do peso molecular da proteína inibidora da via clássica do complemento presente no extrato de glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis*

O peso molecular da proteína inibidora da via clássica foi medido através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), utilizando um aparelho Shimadzu LC-20AT.

Para esse experimento 160 insetos foram dissecados e foi obtido um EGS contendo o equivalente a 300 lobos salivares em 50 μ L de salina 0,7 %. Para diminuir a contaminação da amostra com proteínas intracelulares da glândula salivar, o processo de sonicação não foi feito nesse caso. Ao invés disso, as glândulas salivares foram homogeneizadas através de sucessivas pipetagens até o total rompimento das glândulas e liberação do seu conteúdo. Essa amostra foi então filtrada em membrana de 22 μ m para a retirada de quaisquer fragmento sólido da amostra.

Uma coluna de filtração molecular Discovery BIO GFC 150 (Supelco) foi equilibrada com tampão HEPES 20 mM, 145 mM de NaCl e pH 7,4 em um fluxo de 0,2 mL/minuto. Os 50 μ L de EGS foram aplicados no aparelho e após dez minutos de corrida, frações contendo 50 μ L começaram a ser coletadas de 15 em 15 segundos em tubos de microcentrífuga pelo coletor Pharmacia LKB – Frac – 200.

Após a coleta de 90 frações, cada uma delas foi testada quanto a capacidade de inibição da via clássica. Um μ L de cada fração foi usado nos ensaios de hemólise (item 4.5.2) utilizando soro humano normal como fonte do complemento.

Para a determinação do peso molecular, o kit de padrões para cromatografia de filtração molecular MWGF70 (Sigma) foi utilizado. Cinquenta μ L dos seguintes padrões diluídos em salina 0,7 % foram usados: albumina (5mg/mL – 66 kDa), anidrase carbônica (2mg/mL – 29 kDa) e citocromo C (3mg/mL – 12,4 kDa). Uma curva de tempo de retenção *versus* logaritmo do peso molecular foi construída e a equação da reta obtida pela regressão linear foi usada para o cálculo do peso molecular.

O tempo de retenção da proteína inibidora da via clássica foi definido como a metade do intervalo de tempo que compreendeu a fração com atividade máxima de inibição. Esse tempo de retenção foi então usado na equação gerada pela curva padrão e o antilogaritmo do resultado representou o peso molecular da proteína.

4.11 – Avaliação do conteúdo intestinal de *Lutzomyia longipalpis* na deposição de moléculas do complemento em placas de ELISA

Ensaio de deposição de componentes do sistema do complemento foram feitos também com material do conteúdo intestinal de *L. longipalpis* (item 4.2). Para esses ensaios, a metodologia foi a mesma usada nos ensaios de EGS (item 4.6.2 e 4.6.3) e a quantidade equivalente de 8, 4, 2, 1 e 0,5 intestinos foi usada. No caso da via clássica foram testados os componentes C4b, C3b e C5b e para a via alternativa foi testado apenas o C5b.

4.12 – Análise estatística

Em todos os experimentos pelo menos três repetições independentes foram feitas. Quando três ou mais grupos foram comparados, a significância estatística foi determinada usando a análise de variância simples (one-way ANOVA), seguida do teste de Tukey de comparação múltipla. Para comparações entre dois grupos, o teste *t* de Student foi utilizado. Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados significativos (Software Prism 5).

Para a representação da diferença significativa, os seguintes símbolos foram utilizados nos gráficos: * quando $p < 0,05$; ** quando $p < 0,01$ e *** quando $p < 0,001$.

5 – RESULTADOS

5.1 – Efeito do EGS de *Lutzomyia longipalpis* e da LJM19 sobre a atividade hemolítica da via clássica do complemento humano

Para confirmar a atividade inibidora da via clássica presente na saliva de *L. longipalpis*, ensaios hemolíticos utilizando hemácias de carneiro sensibilizadas foram conduzidos. Com o objetivo de excluir a possibilidade de ativação da via alternativa nesses ensaios, soro humano depletado de fator B foi usado como fonte do complemento.

Como esperado, o EGS foi altamente eficaz na proteção das hemácias contra a lise mediada pela via clássica do complemento humano (**Figura 04A**). Os resultados mostraram que o EGS de *L. longipalpis* contendo o equivalente a dois lobos salivares foi capaz de inibir $99,53 \pm 0,41\%$ da atividade hemolítica presente no soro.

Conforme pode ser observado na **figura 04 B**, quando a proteína recombinante LJM19 foi utilizada nos ensaios, uma clara relação de inibição da hemólise dose-dependente promovida pela via clássica também foi constatada. Nesse caso, valores tão baixos quanto $0,06 \mu\text{g}$ de LJM19 foram capazes de inibir $22,7 \pm 4,6\%$ da hemólise. A medida em que a quantidade de proteína presente no meio aumentou, a inibição da lise de hemácias também cresceu até atingir um platô após $0,25 \mu\text{g}$ de proteína adicionada. Nos ensaios, a quantidade máxima de LJM19 adicionada ($0,5 \mu\text{g}$) foi responsável por uma inibição de $96,4 \pm 1,42\%$ da atividade hemolítica.

5.2 – Efeito do EGS de *Lutzomyia longipalpis* e da LJM19 sobre a atividade hemolítica da via alternativa do complemento humano

Os ensaios hemolíticos para a via alternativa foram feitos com o uso de hemácias de coelho não sensibilizadas e na presença de EGTA. Em contato com o soro humano, as hemácias de coelho ativam a via alternativa, podendo assim sofrer a lise mediada pelo complemento. O EGTA é um quelante capaz de sequestrar os íons Ca^{+2} , mas incapaz de quelar os íons Mg^{+2} , o que impede a ativação da via clássica/lectinas e mantém a via alternativa intacta.

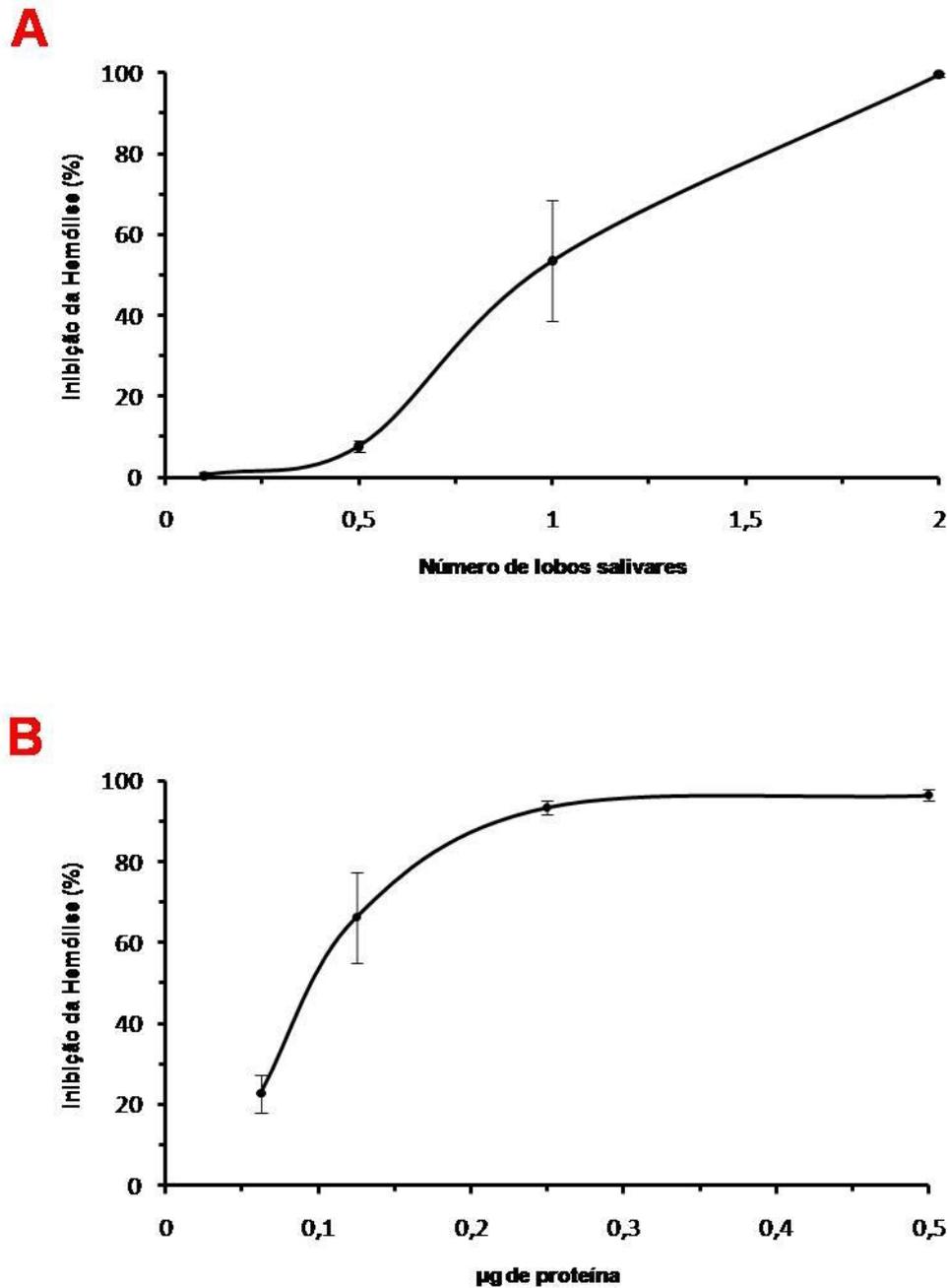


FIGURA 04 Efeito do EGS de *Lutzomyia longipalpis* e da proteína salivar recombinante LJM19 sobre a via clássica do complemento humano. Ensaio utilizando hemácias de carneiro sensibilizadas e soro humano depletado de fator B foram conduzidos na presença do EGS (A) ou de LJM19 (B). Os pontos representam a média de três experimentos independentes feitos em duplicata e as barras verticais indicam o desvio padrão.

Assim como nos ensaios da via clássica, a saliva de *L. longipalpis* inibiu fortemente a atividade hemolítica da via alternativa (**Figura 05 A**). O EGS contendo o equivalente a 20 ácidos salivares foi capaz de inibir a hemólise em $94,3 \pm 2,49\%$, confirmando assim a atividade inibidora da via alternativa presente na saliva de *L. longipalpis*.

A proteína recombinante LJM19, por sua vez, não mostrou atividade inibidora específica para a via alternativa, uma vez que a presença de $0,5 \mu\text{g}$ de LJM19 não foi capaz de reduzir a hemólise causada pelo soro (**Figura 05 B**).

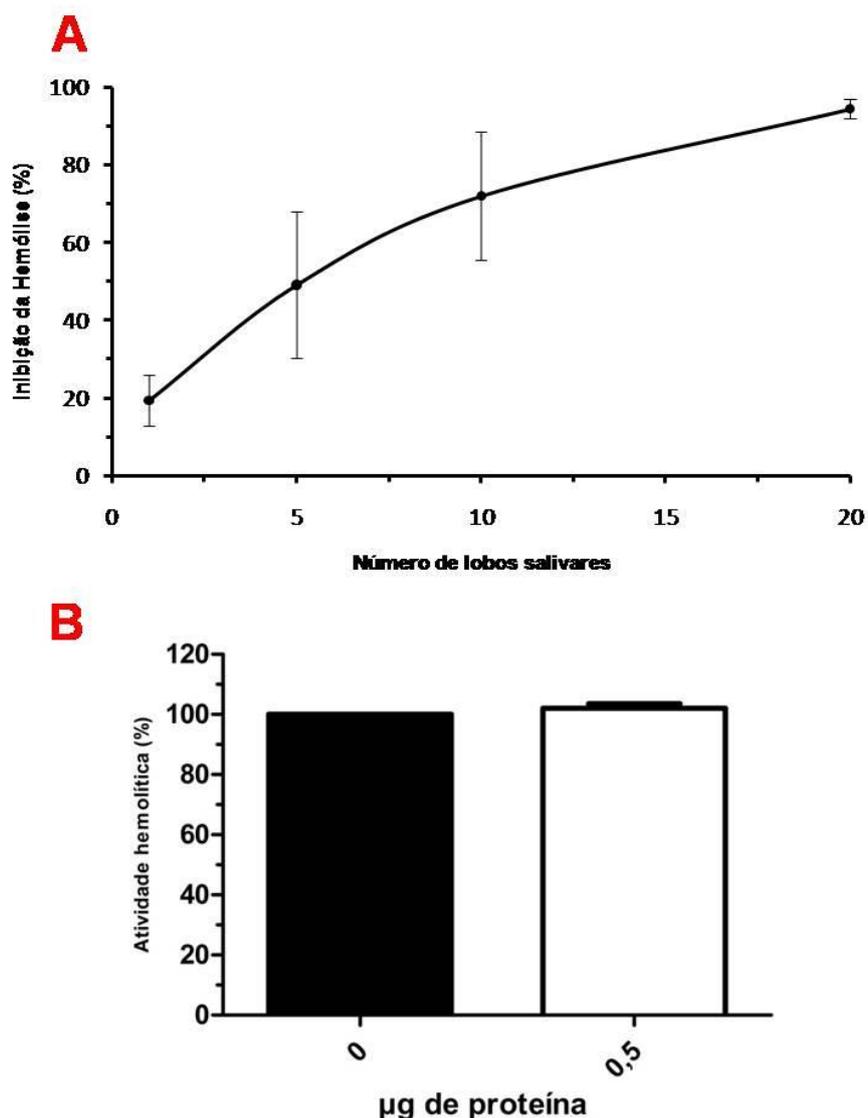


FIGURA 05 Efeito do EGS de *Lutzomyia longipalpis* e da proteína salivar recombinante LJM19 sobre a via alternativa do complemento humano. Ensaios utilizando hemácias de coelho e soro humano com EGTA foram conduzidos na presença do EGS (A) ou de LJM19 (B). Os pontos representam a média de três experimentos independentes feitos em duplicata e as barras verticais indicam o desvio padrão.

5.3 – Efeito do EGS de *Lutzomyia longipalpis* e da LJM19 sobre a deposição de moléculas do sistema do complemento humano ativado pela via clássica

Os ensaios de deposição de moléculas do complemento humano em placas de ELISA mostraram que a saliva de *L. longipalpis* não é capaz de inibir a deposição do componente C1q na superfície da placa em nenhum dos dois valores de pH testados: pH 7,4 (**Figura 06 A**) e pH 8,15 (**Figura 07**). Nos testes, a deposição e ligação do C1q aos anticorpos IgG adsorvidos nos poços da placa de ELISA não foi significativamente menor em nenhuma das diluições de extrato de glândulas salivares usado.

Da mesma maneira, a proteína recombinante da glândula salivar de *L. longipalpis* LJM19 não foi capaz de inibir a deposição de C1q (**Figura 08 A**). Além de não interferir na deposição do C1q, o EGS não foi capaz de desligar o C1q previamente ligado ao complexo antígeno-anticorpo (**Figura 06 B**).

A análise do efeito da saliva de *L. longipalpis* na deposição do próximo componente da via clássica, o C4b, mostrou um resultado diferente daquele obtido para o C1q. Nesse caso, o EGS foi capaz de promover inibição na deposição do C4b sobre a superfície da placa de ELISA. Nos experimentos em que o sistema do complemento atuou no pH normal do sangue humano (pH 7,4), a inibição da deposição de C4b pelo EGS de *L. longipalpis* se mostrou significativamente eficiente para as quantidades equivalentes a dois, um e 0,5 lobos salivares. Com uma quantidade de amostra equivalente a dois lobos salivares, a deposição residual de C4b representou $11,68 \pm 2,16\%$ da deposição dessa molécula na ausência de inibidores (**Figura 06 A**). O EGS também inibiu a deposição de C4b sobre a superfície ativadora em pH 8,15. Neste caso, o EGS contendo o equivalente a dois e um ácidos salivares foi suficiente para promover a inibição. A quantidade relativa de dois lobos salivares foi capaz de diminuir para $3,23 \pm 2,29\%$ a deposição residual de C4b (**Figura 07**).

Assim como a saliva, a proteína LJM19 também foi capaz de inibir a deposição do C4b. As quantidades de 0,5 e 0,25 μg de LJM19 diminuíram de maneira significativa a deposição do C4b sobre a placa de ELISA. Nesse caso, o uso de 0,5 μg de LJM19 inibiu 47,22% da deposição dessa molécula (**Figura 08 B**).

Apesar da eficiência na inibição de deposição das moléculas de C4b quando incubado juntamente com o soro, o EGS não foi capaz de desligar essa proteína previamente depositada na superfície da placa (**Figura 06 B**).

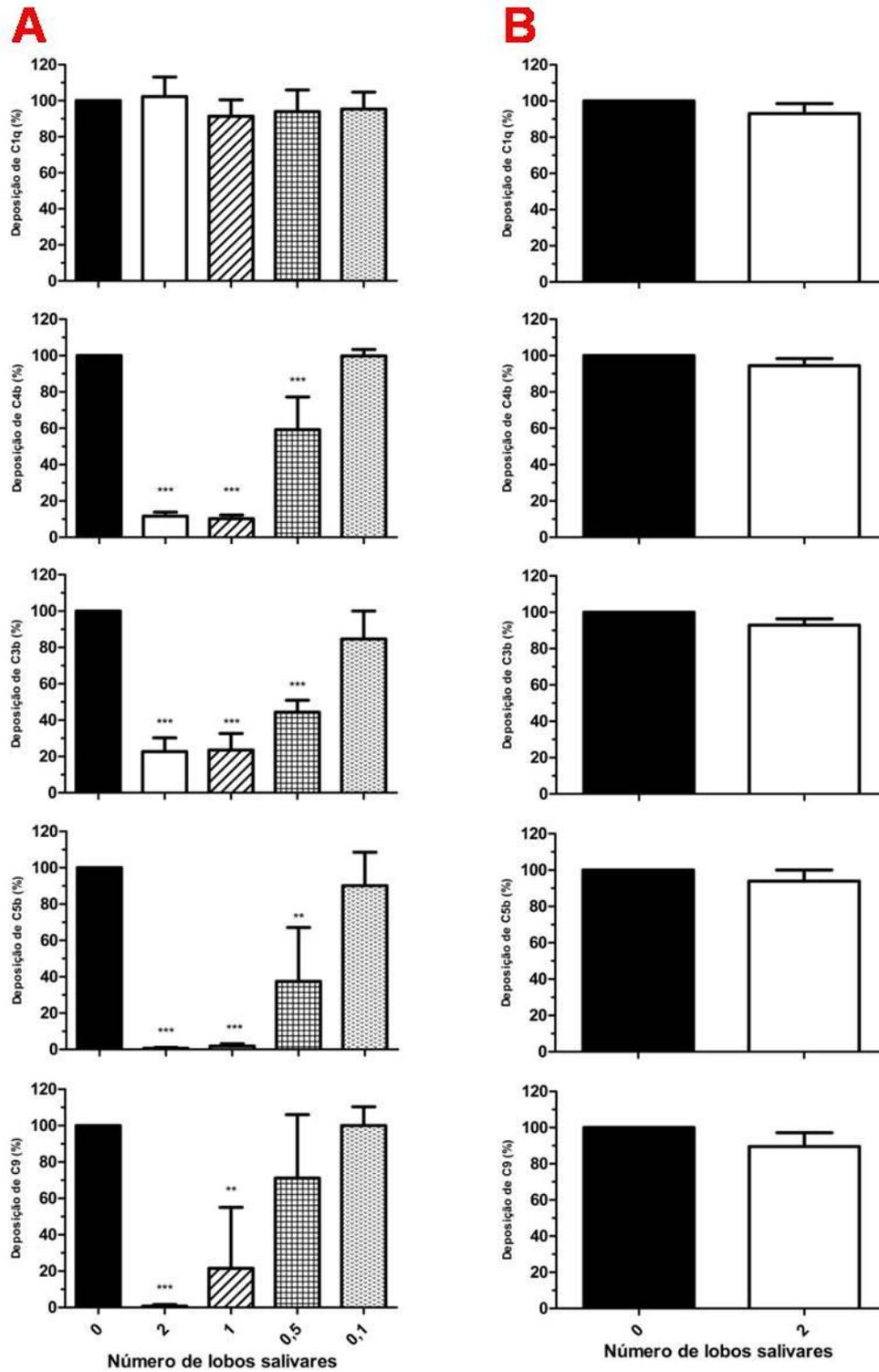


FIGURA 06 Efeito do EGS de *Lutzomyia longipalpis* sobre deposição de moléculas pela via clássica. O EGS foi incubado nas placas juntamente com o SHN (A) ou após a incubação com o SHN (B). A média de três experimentos independentes feitos em triplicata é apresentada, com as barras indicando o desvio padrão.

A deposição do C3b também foi inibida pelo EGS de *L. longipalpis*. No pH 7,4 pode-se observar grande diminuição das moléculas de C3b ligadas à superfície da placa. Neste caso, as quantidades relativas de dois, uma e 0,5 glândulas salivares se mostraram eficientes em inibir de modo significativo a deposição do fator, mostrando um valor de inibição de 77,36% quando dois lobos salivares foram testados (**Figura 06 A**). Em pH 8,15 a inibição da deposição de C3b ocorreu quando EGS contendo o equivalente a dois e um lobos salivares foi testado. Nesse pH, a inibição da deposição de C3b correspondeu a 98,9%, quando 2 lobos salivares foram testados (**Figura 07**). Novamente, não houve desligamento do C3b previamente depositado (**Figura 06 B**).

Quando anticorpos específicos contra C5b foram usados, verificou-se também a inibição da deposição dessa molécula. Em pH 7,4 a inibição ocorreu nos valores de dois, um e 0,5 lobos salivares, sendo que quando o EGS foi usado contendo o equivalente a 2 lobos salivares, a inibição chegou a 99,4% (**Figura 06 A**). Nesse caso também não houve desligamento do C5b previamente ligado (**Figura 06 B**). Em pH 8,15 a inibição da deposição do C5b ocorreu quando quantidades relativas a dois e um ácidos salivares foram usadas. Nesse caso, uma inibição de 97,61% ocorreu quando a quantidade máxima de saliva estava presente e uma inibição de 61,73% ocorreu na presença de um lobo salivar (**Figura 07**).

O EGS de *L. longipalpis* também é capaz de inibir a deposição do último componente do complemento: C9. Para essa molécula, as quantidades relativas de dois e um lobos salivares foram capazes de diminuir a deposição nos ensaios em pH 7,4. Dois lobos salivares foram capazes de inibir quase totalmente (99,3%) a deposição de C9 sobre a placa de ELISA e a quantidade equivalente a um lobo salivar inibiu 78,45% da atividade de deposição do C9 (**Figura 06 A**). Quando os testes foram realizados em pH 8,15, resultados semelhantes foram obtidos. Os experimentos em pH 8,15 foram feitos pois esse é o pH do sangue ingerido dentro do intestino médio dos insetos. Os EGS contendo o equivalente a dois e um lobos salivares foram capazes de inibir a deposição e a quantidade de dois ácidos salivares foi capaz de diminuir para 3,2 % a deposição residual desse composto (**Figura 07**).

Assim como para as outras moléculas do complemento, o EGS de *L. longipalpis* não teve a capacidade de desligar moléculas de C5b e C9 previamente ligadas à superfície ativadora (**Figura 06 B**).

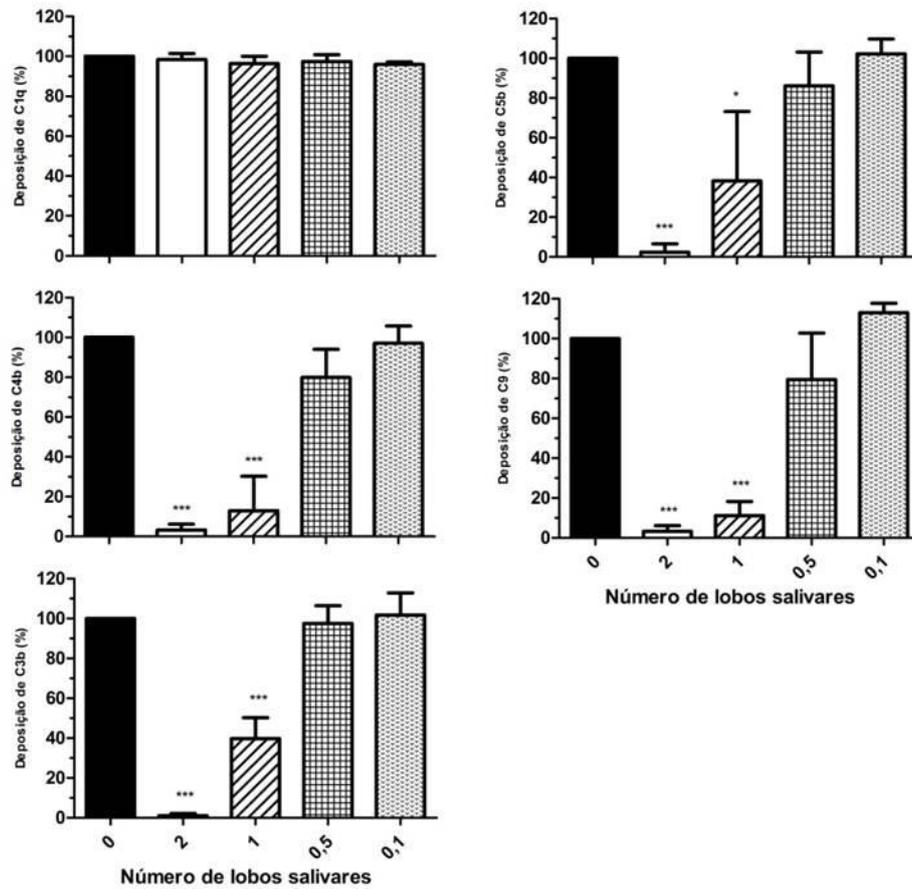


FIGURA 07 Efeito do EGS de *Lutzomyia longipalpis* sobre deposição de moléculas pela via clássica em pH 8,15. O EGS foi incubado nas placas juntamente com o SHN em pH 8,15. A média de três experimentos independentes feitos em triplicata é apresentada, com as barras indicando o desvio padrão.

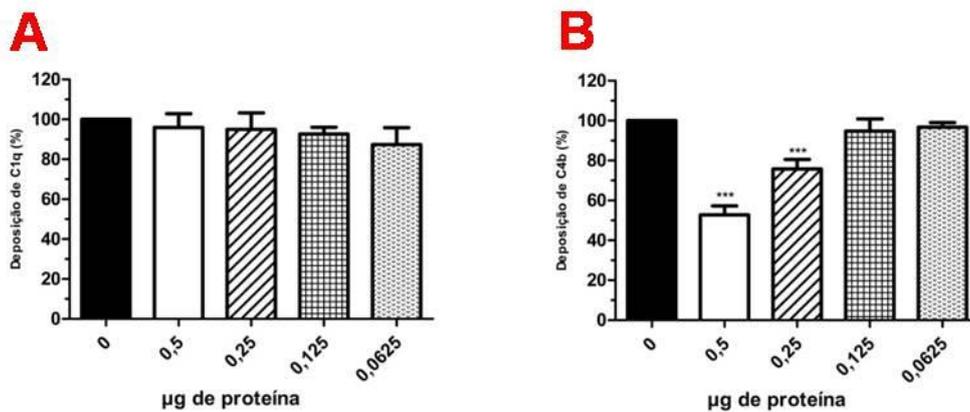


FIGURA 08 Efeito da LJM19 sobre deposição de moléculas pela via clássica. A LJM19 foi incubada nas placas juntamente com o SHN. Efeito na deposição do C1q (A) e na deposição do C4 (B). A média de três experimentos independentes feitos em triplicata é apresentada, com as barras indicando o D.P.

5.4 – Efeito do EGS de *L. longipalpis* sobre a deposição de moléculas do sistema do complemento humano ativado pela via alternativa

Os ensaios para a via alternativa do complemento humano foram feitos em placas recobertas com uma película de agarose. Os resultados mostraram que o EGS de *L. longipalpis* é capaz de inibir a deposição das moléculas do complemento ativadas pela via alternativa no pH 7,4.

A deposição do C3b pela via alternativa do complemento humano na superfície de placas de ELISA é alterada pela presença de compostos salivares de *L. longipalpis*. Utilizando uma quantidade relativa de 20 glândulas salivares, observa-se inibição de 34,36% da deposição de C3b em relação ao controle. Os EGS contendo quantidades menores de saliva também foram capazes de inibir a deposição de C3b, quando 10 e 5 glândulas foram usadas, a inibição correspondeu a 23,57 e 11,55% respectivamente (**Figura 09 A**).

Quando a molécula avaliada foi o fator Bb, a presença de EGS de *L. longipalpis* foi também capaz de inibir a sua deposição. O equivalente a 20 ácidos salivares inibiu a deposição de 64,5% do fator Bb em relação ao controle sem saliva. Uma inibição de 42,8% na deposição de fator Bb foi obtida quando o soro humano foi incubado com o equivalente a 10 lobos salivares (**Figura 09 A**).

A inibição da deposição de moléculas de C5b pelos extratos de glândula salivar também foi constatada. Para o C5b, os valores de inibição foram 67,3% quando 20 lobos salivares foram adicionados e 43,5% na presença de 10 ácidos por ensaio (**Figura 09 A**).

Para os ensaios utilizando anticorpo anti- C9, o EGS também atuou inibindo a deposição desse fator. Observou-se que quantidades equivalentes a 20 lobos salivares foram capazes de inibir 73,39% da deposição dessa molécula, enquanto o equivalente a 10 lobos salivares inibiu 50,22% (**Figura 09 A**).

De uma maneira semelhante ao que ocorreu nos ensaios da via clássica e apesar de haver inibição da deposição de todas as proteínas da via alternativa testadas, o EGS representando a quantidade máxima usada nos ensaios de inibição da deposição não foi capaz de desligar os componentes C3b, fator B, C5b e C9 previamente depositados pela via alternativa. Os gráficos da **Figura 09 B** mostram que não houve diferença significativa entre os grupos comparados.

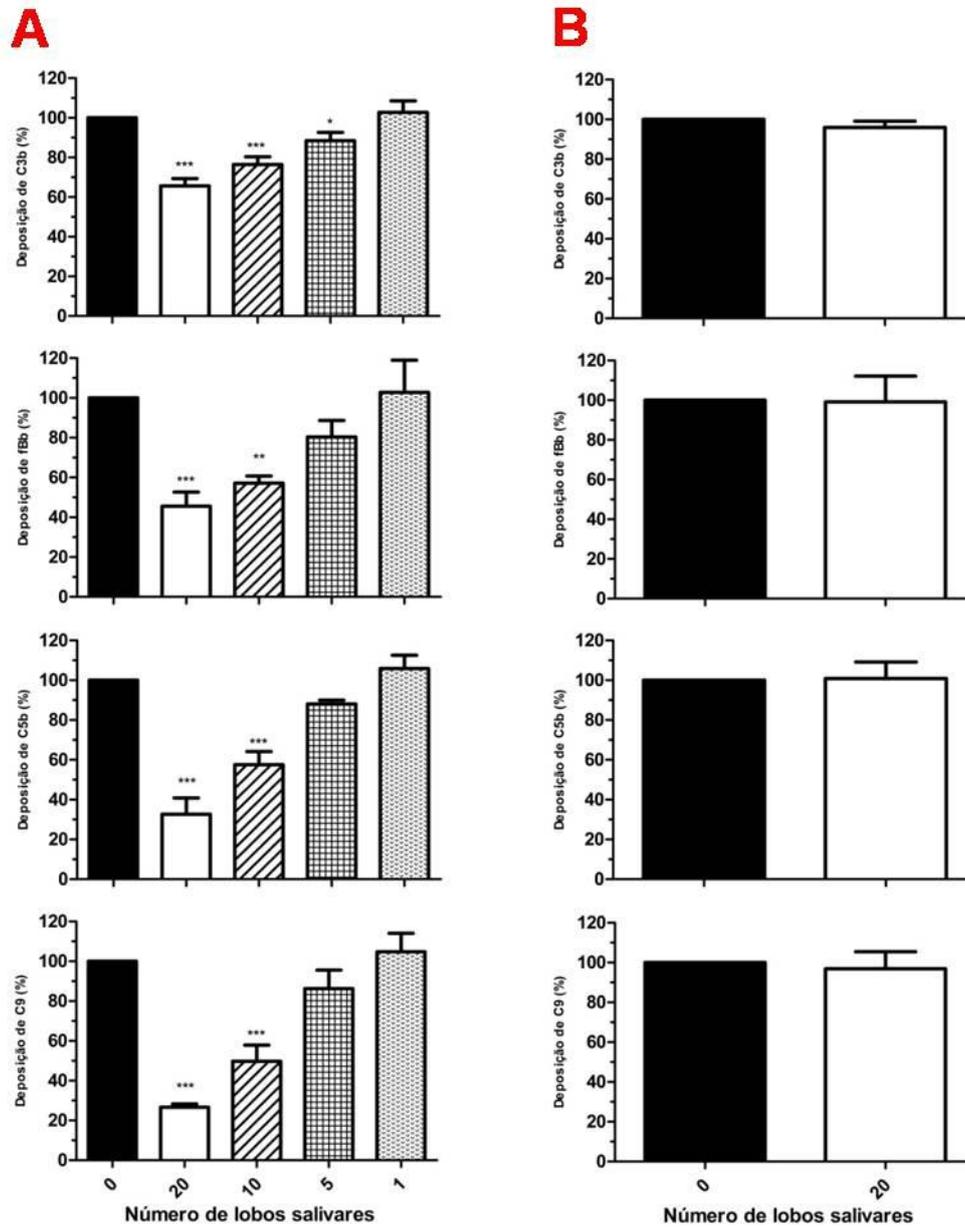


FIGURA 09 Efeito do EGS de *Lutzomyia longipalpis* sobre deposição de moléculas pela via alternativa. O EGS foi incubado nas placas juntamente com o SHN na presença de EGTA (A) ou após a incubação com SHN/EGTA (B). A média de três experimentos independentes feitos em triplicata é apresentada, com as barras indicando o desvio padrão.

5.5 – Atuação do EGS sobre a formação do complexo de ataque à membrana

Com o objetivo de investigar se a saliva de *L. longipalpis* atua diretamente nas etapas finais da cascata do complemento, um ensaio hemolítico em que hemácias pré-incubadas com soro humano depletado de fator C6 foi realizado.

O tratamento com soro depletado de C6 promove a montagem das convertases sobre a superfície das hemácias e assim, não promove hemólise pela falta do componente C6. C6 é o primeiro componente do complexo de ataque à membrana e sua deposição sobre a membrana é pré-requisito para que os demais componentes sejam montados.

Quando soro normal na presença de EDTA é adicionado às hemácias previamente tratadas com soro depletado de C6, a montagem do complexo de ataque às membranas se completa e a hemólise ocorre. O EDTA impede que esse soro normal produza novas convertases sobre a superfície das hemácias, mas permite que as convertases já montadas previamente continuem ativas. Se o EGS tiver alguma molécula capaz de interferir diretamente com a montagem do complexo de ataque às membranas, então quando o soro normal adicionado de EGS fosse adicionado às hemácias ocorreria inibição da hemólise. Uma vez que isso não ocorreu (**Figura 10 A**) pode-se concluir que o EGS não possui nenhuma molécula capaz de inibir diretamente a montagem do complexo de ataque a membrana.

Para confirmar que de fato a saliva inibe o complemento humano em um ponto inicial da cascata, ensaios em que o EGS foi adicionado juntamente com o soro depletado de C6 e omitido na incubação com o soro contendo EDTA foram realizados. Nesse contexto, os EGS contendo o equivalente a dez e cinco ácidos salivares foram capazes de inibir de modo significativo a hemólise, mostrando que realmente a inibição ocorre no início da cascata do complemento (**Figura 10 B**). Isso está plenamente de acordo com os resultados de inibição da deposição de C4b e C3b pela via clássica e de C3b e Bb pela via alternativa (**Figuras 06A e 09A**).

5.6 – Interação do EGS com as moléculas iniciais da cascata da via clássica

Uma vez que os resultados anteriores mostraram que o ponto de inibição do complemento pela saliva de *L. longipalpis* encontra-se nas etapas iniciais da cascata da via clássica, ensaios utilizando as proteínas C1 (complexo), C4, C2 e C3 purificadas

foram feitos. Nesses ensaios, a incubação do EGS com cada proteína era feita separadamente, de modo a reconhecer se a saliva estaria atuando especificamente sobre algum desses compostos.

Os resultados mostrados na **Figura 11** indicam que, de modo curioso, o EGS de *L. longipalpis* não teve a capacidade de inibir a hemólise de hemácias sensibilizadas em nenhum dos grupos testados. Quando os EGS contendo o equivalente a 15 e 7,5 lobos salivares foram incubados com as proteínas purificadas do complemento C1, C4, C2 e C3 separadamente e sequencialmente, não foi possível observar a inibição da atividade hemolítica quando comparada com os grupos controles em que a saliva estava ausente.

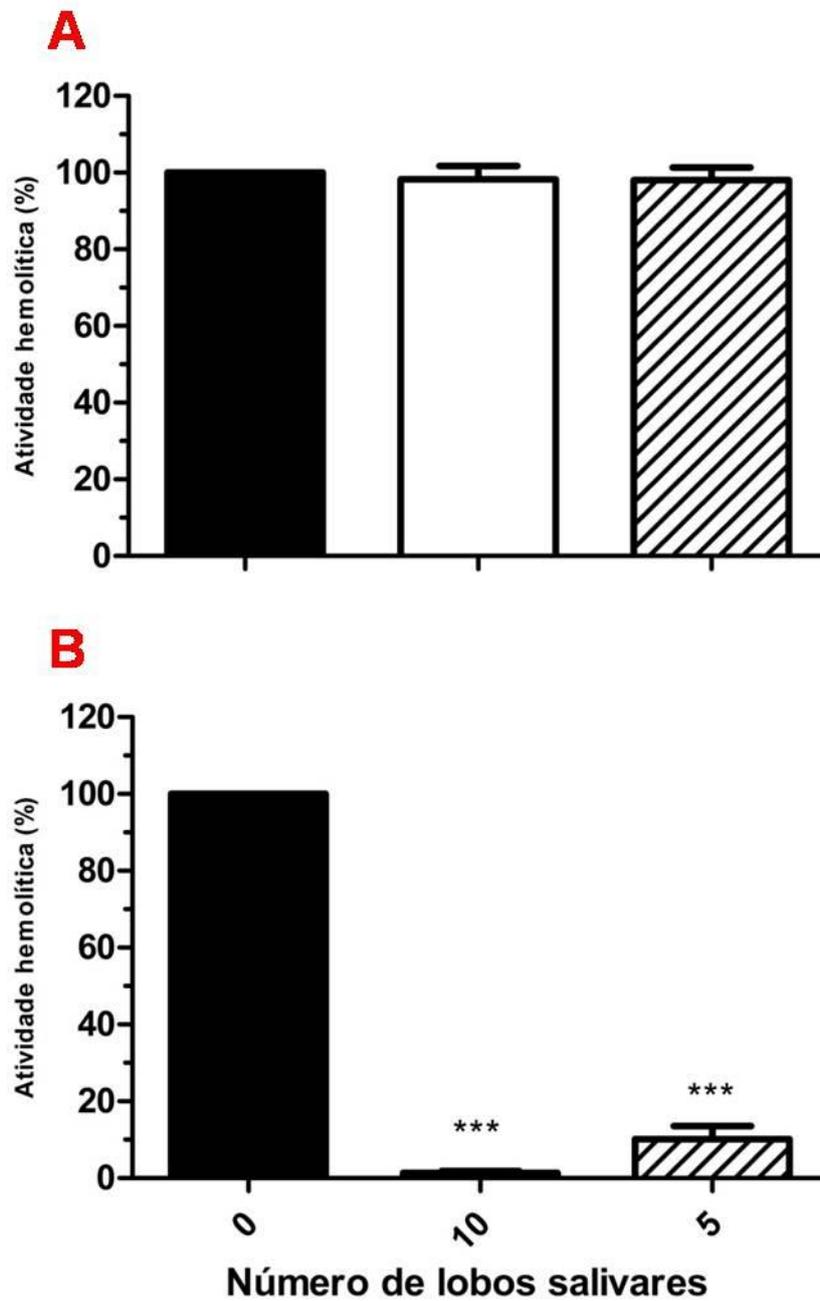


FIGURA 10 Atuação do EGS de *Lutzomyia longipalpis* na formação do MAC. O EGS foi incubado com hemácias de carneiro previamente tratadas com soro depletado de C6 (A) ou incubado juntamente com o soro depletado de C6 (B). A hemólise foi causada por SHN-EDTA. A média de três experimentos independentes feitos em duplicata é apresentada, com as barras indicando o desvio padrão.

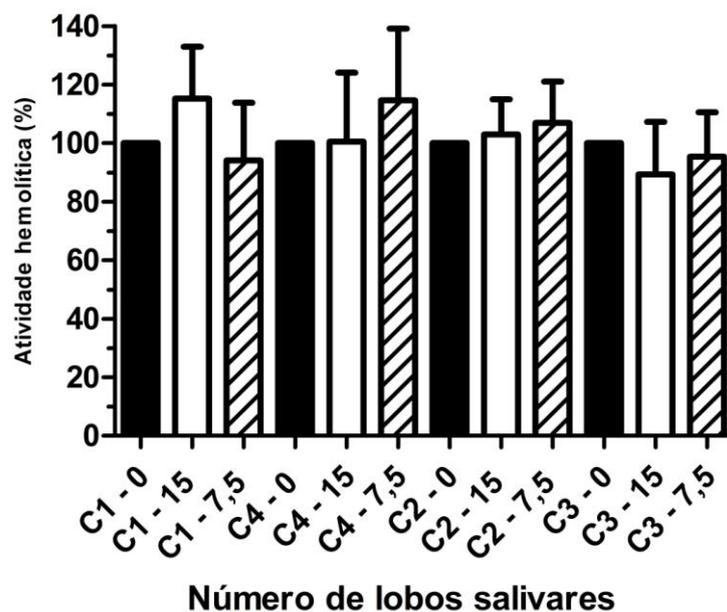


FIGURA 11 Interação do EGS de *Lutzomyia longipalpis* com as proteínas iniciais da via clássica. Ensaio hemolítico em que o EGS foi incubado separadamente com C1, C4, C2 e C3 purificados foram feitos para determinar a atuação da saliva em cada uma dessas proteínas. A média de três experimentos independentes feitos em duplicata é apresentada, com as barras indicando o desvio padrão.

5.7 – Clivagem dos compostos C4 e fator B em ensaios hemolíticos na presença do EGS de *Lutzomyia longipalpis*

A capacidade da saliva de *L. longipalpis* de impedir a ativação (clivagem) do fator C4 (via clássica) e fator B (via alternativa) foi analisada através de Western blot.

Quando a via clássica foi ativada, pôde-se observar que a subunidade α da proteína C4 foi hidrolisada, dando origem a um fragmento menor chamado de α' , presente no C4b. Na presença do EGS de *L. longipalpis* contendo o equivalente a quatro lobos salivares a clivagem do C4 foi totalmente interrompida, uma vez que após 30 minutos de ensaio hemolítico não foi possível observar a banda correspondente à subunidade α' no blot (**Figura 12 A**).

Da mesma forma, a clivagem do fator B dando origem ao fator Bb foi inibida totalmente em ensaios hemolíticos da via alternativa. Após 30 minutos, a presença de fator Bb pode ser observada no controle, mas não quando o EGS equivalente a 40 lobos salivares estava presente (**Figura 12 B**).

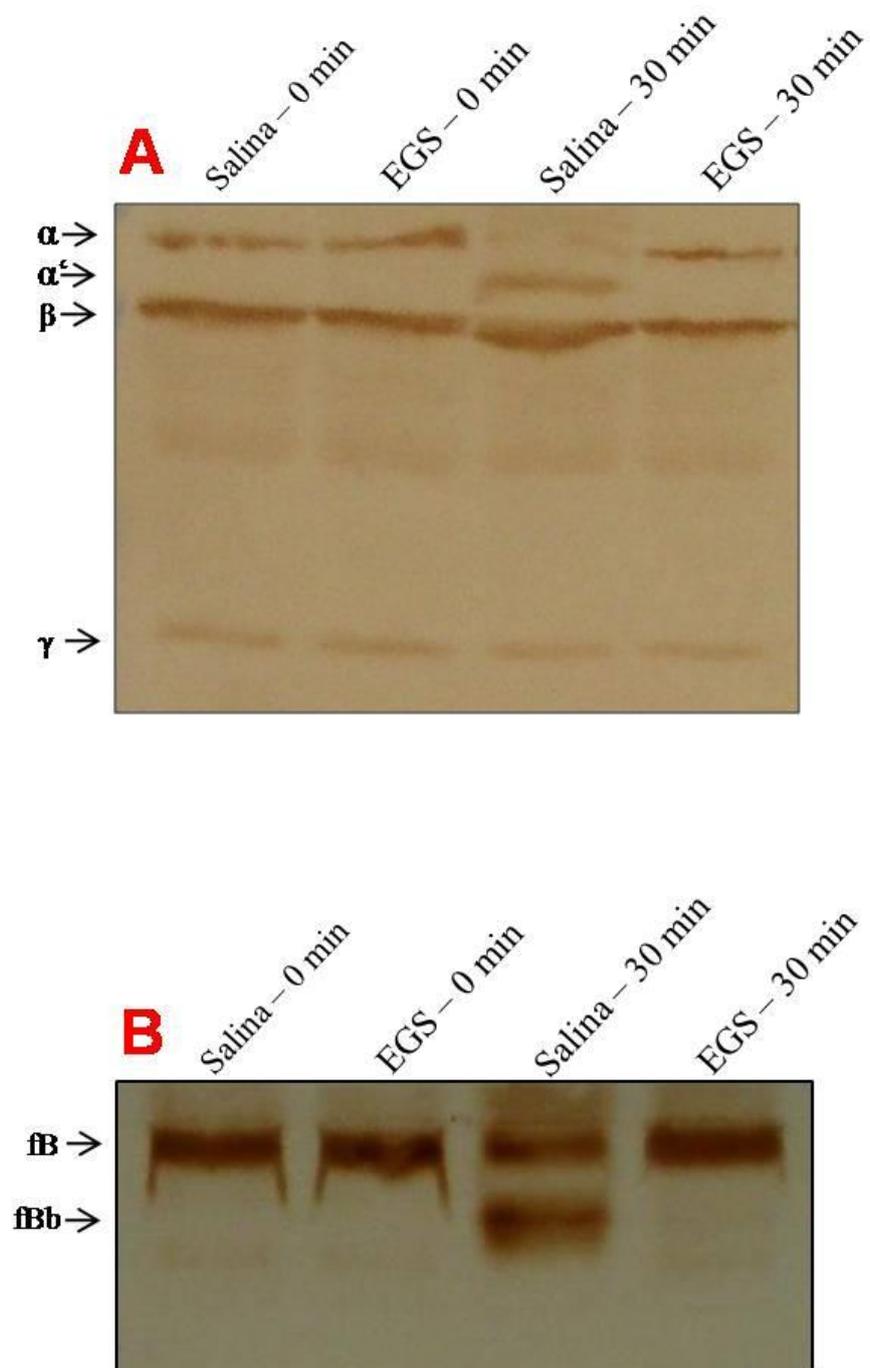


FIGURA 12 Inibição da clivagem de C4 e fator B pelo EGS de *Lutzomyia longipalpis* presente nos ensaios hemolíticos. O sobrenadante dos ensaios hemolíticos para a via clássica e para a via alternativa foi coletado e a eficácia do EGS em impedir a clivagem do C4 (A) e do fator B (B) foi analisado.

5.8 – Atuação do EGS de *Lutzomyia longipalpis* na atividade enzimática de C1s e fator D

Como o EGS de *L. longipalpis* impediu a clivagem tanto do C4 como do fator B nos ensaios de hemólise, a possibilidade da saliva atuar inibindo as enzimas que clivam naturalmente essas moléculas foi levantada. Para testar essa hipótese, ensaios enzimáticos foram realizados com as proteínas purificadas: C1s ativada (enzima responsável pela clivagem do C4) e fator D (enzima responsável pela clivagem do fator B).

Para o ensaio da C1s, o substrato natural da enzima (C4) foi utilizado e a atividade proteolítica foi visualizada através da geração do fragmento α' pela clivagem da subunidade α de C4. Os resultados mostraram que o EGS de *L. longipalpis* não possui a capacidade de inibir a atividade enzimática de C1s, uma vez que a banda referente ao fragmento α' do C4b estava presente no blot tanto do controle positivo quanto quando uma quantidade equivalente a 60 ácidos salivares foi adicionada à reação enzimática (**Figura 13 A**).

Quando o EGS de *L. longipalpis* foi testado para a possível inibição enzimática do fator D, o substrato sintético Z-l-Lys-SBzL foi utilizado. A **Figura 13 B** mostra que o EGS não foi eficaz na inibição do fator D, já que a atividade enzimática permaneceu igual na ausência e na presença de saliva.

5.9 – Ligação do EGS de *Lutzomyia longipalpis* aos componentes iniciais da via clássica do complemento humano

Com o objetivo de determinar se o EGS de *L. longipalpis* ou a proteína recombinante LJM19 são capazes de se ligar a moléculas do complemento humano, ensaios de ELISA foram feitos sensibilizando as placas com 20 e 10 μg de proteínas salivares totais ou um e 0,5 μg de LJM19. Após a sensibilização, as placas foram bloqueadas e tratadas com cada uma das proteínas avaliadas: C1q, C4, C2 e C3.

Quando as placas de ELISA foram sensibilizadas com o EGS, a quantidade relativa de 20 μg de proteínas salivares foi capaz de se ligar de modo significativo, mas não muito intenso ao C4 e ao C2 ($p < 0,05$) (**Figura 14**). Quando a proteína do complemento avaliada foi o C1q, a ligação ao EGS ocorreu nas duas quantidades de

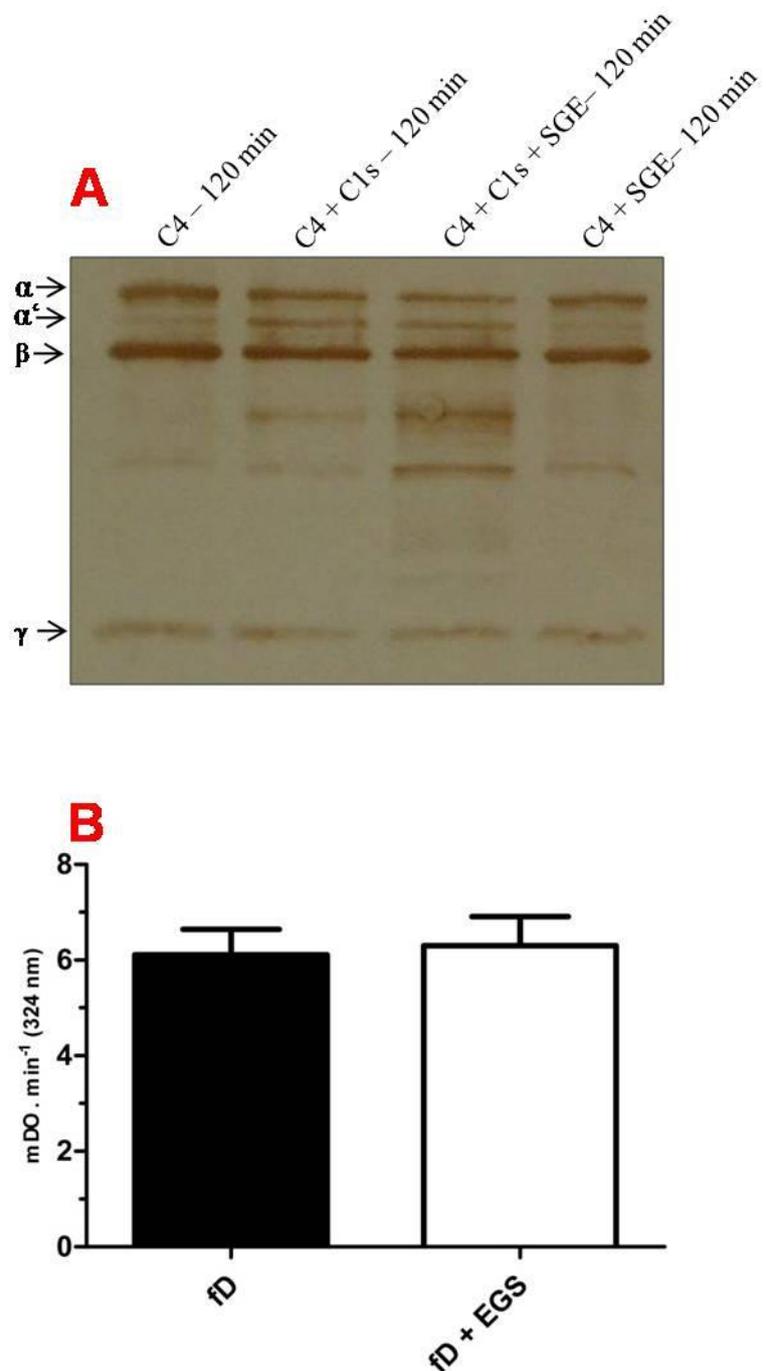


FIGURA 13 Efeito do EGS de *Lutzomyia longipalpis* sobre as enzimas C1s e fator D. Ensaios utilizando as enzimas purificadas foram conduzidos para avaliar a possível inibição direta de C1s e fator D pelo EGS. No caso de C1s (A), C4 foi usado como substrato e a clivagem foi visualizada através de Western blot. Para a atividade de fator D (B), o substrato Z-1-Lys-SBzL foi utilizado. A média de três experimentos independentes feitos em duplicata é apresentada, com as barras indicando o desvio padrão.

saliva que foram testadas e a ligação do EGS ao C1q foi mais contundente ($p < 0,001$) (Figura 14)

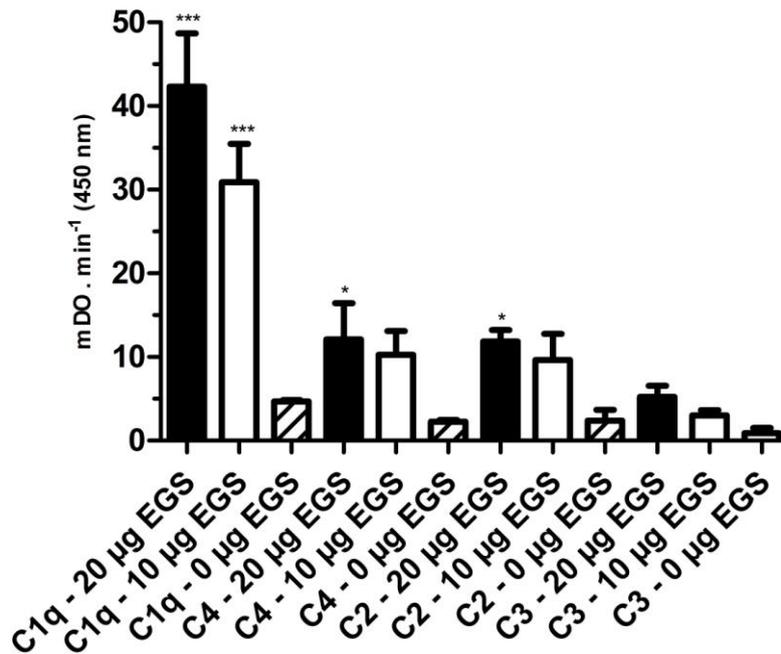


FIGURA 14 Avaliação da ligação das proteínas iniciais da via clássica ao EGS de *Lutzomyia longipalpis*. Placas de ELISA sensibilizadas com EGS de *Lutzomyia longipalpis* foram bloqueadas e incubadas com proteínas purificadas do complemento humano. A ligação das proteínas ao EGS foi estimada através do uso de anticorpos específicos para cada proteína. A média de três experimentos independentes feitos em duplicata é apresentada, com as barras indicando o desvio padrão.

5.10 – Peso molecular da proteína inibidora da via clássica do complemento presente na saliva de *Lutzomyia longipalpis*

A cromatografia de filtração molecular em HPLC do EGS contendo o equivalente a 300 lobos salivares de *L. longipalpis* mostrou um perfil cromatográfico complexo, com proteínas de variados pesos moleculares (**Figura 15 A**).

Cada fração coletada na cromatografia foi usada para o ensaio da via clássica do complemento humano com o objetivo de se obter um pico de atividade máxima e relacionar esse pico com o tempo de eluição. Após os testes com as frações coletadas, o gráfico resultante mostrou que somente um pico de atividade anti-complemento para a via clássica foi encontrado (**Figura 15 B**). O fato da cromatografia ter revelado um pico único de atividade e esse pico ter um formato bem definido e bastante estreito indica que provavelmente apenas uma proteína salivar esteja relacionada com a inibição da via clássica.

Com o uso de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), o peso molecular da proteína inibidora da via clássica do complemento foi calculado. Os padrões de peso molecular conhecido (albumina, anidrase carbônica e citocromo C) foram usados na construção da equação da reta padrão. A fórmula gerada pela regressão linear foi $y = -6,7675x + 26,375$ ($R^2 = 0,994$), sendo que os valores de y representaram o tempo de retenção das moléculas e x o logaritmo do peso molecular.

A atividade inibidora da via clássica presente no EGS teve um tempo de retenção de 17,25 minutos e após os cálculos, o peso molecular da proteína inibidora da via clássica do complemento presente nas glândulas salivares de *L. longipalpis* foi estabelecido como 22,3 kDa.

As frações coletadas na cromatografia foram também testadas para a capacidade de inibição da via alternativa do complemento humano. Porém, em nenhuma das frações coletadas foi encontrada atividade de inibição para essa via.

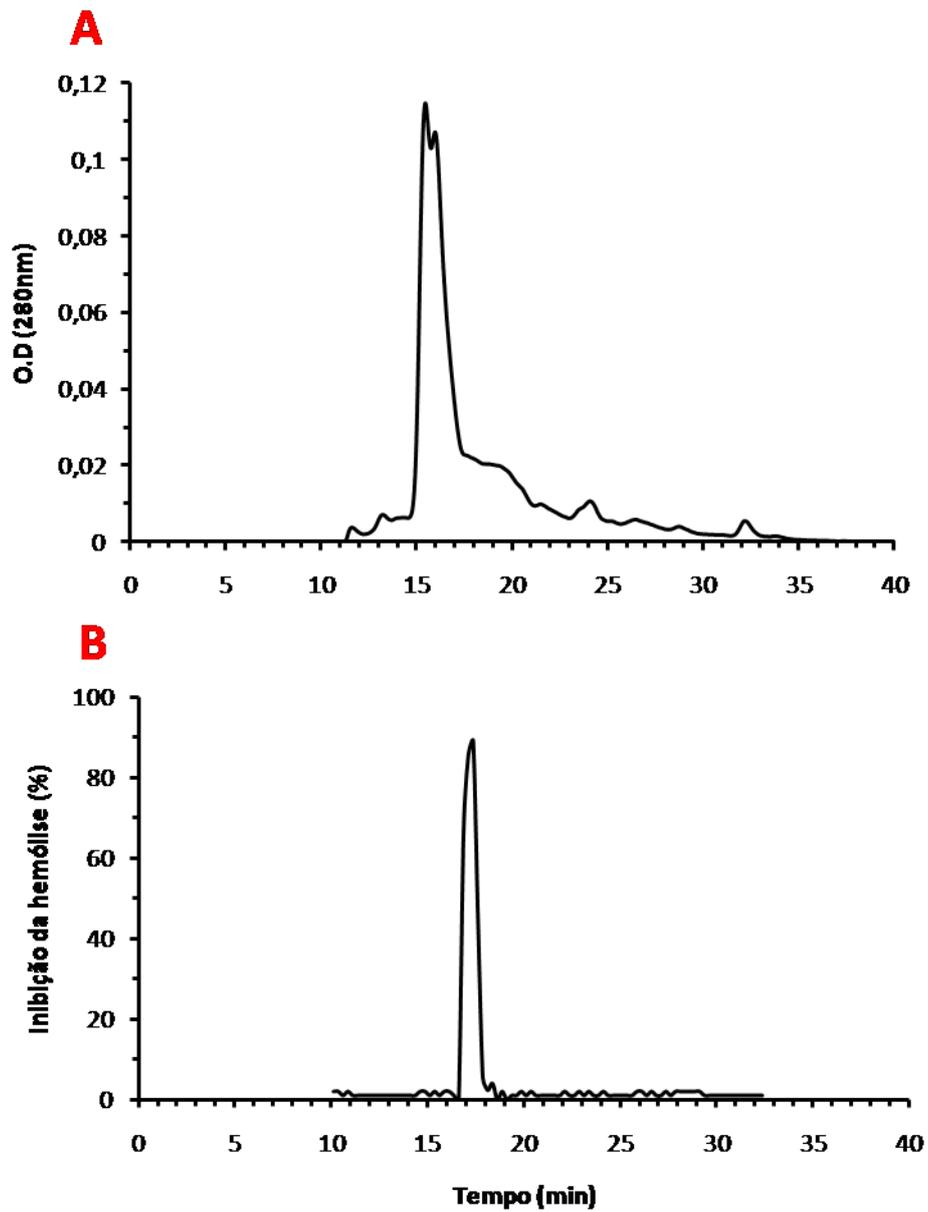


FIGURA 15 Determinação do peso molecular da proteína inibidora da via clássica presente na saliva de *Lutzomyia longipalpis*. O EGS foi submetido a uma coluna de filtração molecular e as frações coletadas foram usadas para ensaios da via clássica. (A) Perfil cromatográfico do EGS de *L. longipalpis* em coluna de gel filtração. (B) Inibição da hemólise pelas frações coletadas.

5.11 – Efeito do conteúdo intestinal de *Lutzomyia longipalpis* na deposição de moléculas do complemento humano

Além da saliva, o conteúdo intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* também foi testado quanto à capacidade de inibir a deposição de moléculas do complemento humano, tanto pela via clássica como pela via alternativa.

Nesse caso, a deposição do C5b pela via alternativa não foi inibida pela presença de nenhuma das quantidades testadas de conteúdo intestinal (**Figura 16 A**).

Para a via clássica, o conteúdo intestinal não impediu a deposição do C4b sobre as placas de ELISA (**Figura 16 B**), mas as quantidades equivalentes a oito e quatro intestinos inibiram significativamente a deposição do C3b e C5b (**Figura 16 C e D**)

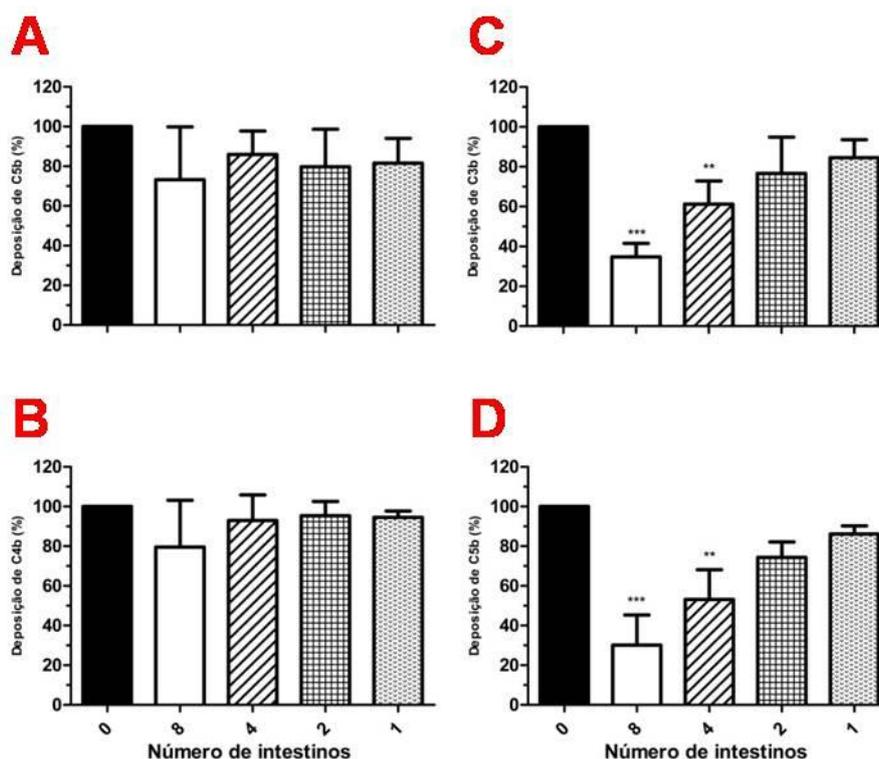


FIGURA 16 Efeito do conteúdo intestinal (CI) de *Lutzomyia longipalpis* sobre deposição de moléculas do complemento humano. (A) Efeito do CI na deposição do C5b pela via alternativa. (B) Efeito do CI na deposição do C4b pela via clássica. (C) Efeito do CI na deposição de C3b pela via clássica. (D) Efeito do CI na deposição de C5b pela via clássica. A média de três experimentos independentes feitos em triplicata é apresentada, com as barras indicando o desvio padrão.

6 – DISCUSSÃO

Além de exercer a função biológica primária de proteger o hospedeiro contra infecções e eliminar microorganismos, sabe-se que o sistema do complemento tem atuação vital em outros processos como na imunidade adaptativa e homeostase (Carroll 2004, Kemper & Atkinson 2007). Assim, o complemento é visto hoje como um complexo sistema de vigilância imune que interage com outros sistemas biológicos e tem o papel de distinguir o tecido saudável do próprio hospedeiro de detritos celulares, células apoptóticas e organismos invasores (Ricklin et al. 2010).

A produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1 β e IL-6) mediante ativação de receptores do tipo Toll é sinergicamente aumentada pela ligação de C3a e C5a aos seus receptores na superfície de células apresentadoras de antígeno. A via de sinalização dos receptores de anafilotoxinas nessas células converge com as vias de Toll 2, 4 e 9, o que explicaria o fato observado (Zhang et al. 2007). Além disso, a interação entre os dois sistemas acontece na medida em que a ativação de receptores do tipo Toll induz a expressão de alguns componentes do complemento (Kaczorowski et al. 2010).

Outro sistema biológico que é influenciado de maneira recíproca pelo complemento é a cascata de coagulação sanguínea. Com o objetivo de aumentar a coagulação local e prevenir a disseminação de microorganismos pela circulação, o sistema do complemento pode atuar amplificando a coagulação e inibindo a fibrinólise. O mecanismo envolvido está relacionado com a indução da expressão do fator tissular e do inibidor do ativador do plasminogênio pelo C5a (Markiewski et al. 2007). A MASP-2, além de ativar a via das lectinas, pode clivar a protrombina e gerar trombina, ativando assim a cascata da coagulação (Krarup et al. 2007). A ativação do complemento por proteínas da coagulação sanguínea também pode ocorrer. Por exemplo, o fator XII ativado pode ativar o complexo C1 e a trombina é capaz de clivar o C5, gerando moléculas ativas de C5a (Ghebrehiwet et al. 1981, Huber-Lang et al. 2006).

O sistema do complemento também é capaz de interagir com linfócitos B na produção de anticorpos. A ligação de antígenos opsonizados com C3d (ou fragmentos relacionados C3dg e C3bi) aos receptores CR2 da superfície de células B juntamente com os co-receptores CD19 e CD81 é capaz de estimular fortemente a produção de anticorpos por essas células. Para os linfócitos B, esse sinal funciona com um potente adjuvante, diminuindo o limiar de ativação da célula e aumentando a produção de anticorpos em até dez mil vezes (Dempsey et al. 1996, Roozendaal & Carroll 2007).

O funcionamento das células T também é influenciado pelo sistema do complemento (Carroll 2004). Nesse sentido, os produtos gerados pela ativação do complemento podem modular a atividade dos linfócitos T indiretamente, através da atuação nas células apresentadoras de antígenos, ou diretamente, através da interação com o próprio linfócito.

A associação de antígenos com fragmentos de C3 é fundamental para seu reconhecimento e processamento pelas células apresentadoras de antígeno. A ausência de C3 reduz a apresentação de antígenos e conseqüentemente diminui a imunidade relacionada às células T (Jacquier-Sarli et al. 1995, Kopf et al. 2002, Suresh et al 2003). Além disso, em camundongos deficientes em C3 a maturação completa das células dendríticas após a internalização de antígenos não acontece (Jacquier-Sarli et al. 1995). Os peptídeos C3a e C5a também são importantes na regulação da produção de citocinas por células apresentadoras de antígeno e as funções dos linfócitos T CD4 e T CD8 são diminuídas em camundongos deficientes para os receptores dessas anafilotoxinas (Drouin et al. 2001, Kohl et al. 2006). O complemento também é capaz de influenciar as células T diretamente, a ativação de receptores para moléculas do complemento e reguladores de membrana presentes na superfície dessas células atua na proliferação, viabilidade e produção de IFN- γ (Heeger et al. 2005, Strainic et al. 2008).

Uma vez que o sistema do complemento possui um papel central na eliminação de infecções e milhões de anos de coevolução ocorreram entre microorganismos e esse componente do sistema imune, não é surpreendente que vários patógenos tenham desenvolvido mecanismos de evasão do complemento. Estratégias de inibição do sistema do complemento podem ser encontradas em vírus, bactérias, fungos, parasitos e até mesmo em artrópodes hematófagos (Lambris et al. 2008, Schroeder et al. 2009).

No caso de *L. longipalpis*, a interação da saliva com o sistema do complemento humano foi demonstrada por Cavalcante et al. (2003). Nesse trabalho, os autores constataram a inibição das vias clássica e alternativa do complemento humano pelo extrato de glândula salivar desse flebotomíneo, mas não identificaram as moléculas responsáveis e nem demonstraram o mecanismo de ação do inibidor salivar.

Nesse contexto, o presente estudo surgiu como uma continuação do trabalho citado acima, com o objetivo de adicionar conhecimento sobre o tema e na tentativa de identificar as proteínas salivares responsáveis pelo fenômeno observado e propor um modelo do mecanismo de inibição.

Com relação à via clássica, ensaios hemolíticos foram feitos para confirmar a inibição pela saliva de *L. longipalpis*. Neste caso, o uso de soro depletado de fator B como fonte do complemento foi importante para excluir a possibilidade de ativação concomitante da via alternativa, uma vez que a C3 convertase da via clássica, ao clivar o C3 solúvel pode iniciar o *loop* de amplificação promovido pela via alternativa (Sim & Dodds 1997). Na ausência de fator B, a C3 convertase da via alternativa não pode ser formada e apenas a via clássica estará atuando na lise das hemácias.

A curva de inibição da via clássica pelo EGS de *L. longipalpis* (**Figura 04 A**) foi semelhante àquela encontrada por Cavalcante et al. (2003) com inibição de valores maiores que 90% quando o equivalente a dois ácidos salivares estavam presentes no ensaio.

O ensaio de hemólise da via clássica utilizado para identificar a atividade inibidora do complemento no EGS de *L. longipalpis*, possui a vantagem de ser extremamente simples e sensível, uma vez que diluições finais de soro tão baixas quanto 1:150 são suficientes para hemolisar cerca de 90 % das hemácias de carneiro opsonizadas com IgG. Porém, o ensaio de inibição da hemólise é capaz apenas de mostrar se existe uma atividade inibidora, não demonstrando em qual ponto da cascata essa inibição ocorreu. Com o objetivo de determinar em quais componentes da cascata do complemento a saliva de *L. longipalpis* é capaz de agir, ensaios em placas de ELISA utilizando anticorpos específicos para algumas proteínas do complemento foram feitos.

Os resultados mostraram que o EGS foi eficiente em inibir a deposição dos componentes C4b, C3b, C5b e C9. Porém, a deposição do primeiro componente da via clássica e molécula reconhecadora dessa via, o C1q, não foi afetado pela saliva (**Figura 06 A**). Resultados semelhantes foram encontrados quando o pH do meio foi aumentado para pH 8,15 (**Figura 07**). Esse é o valor de pH encontrado no interior do intestino das fêmeas de *L. longipalpis* logo após o repasto sanguíneo (Santos et al. 2008) e como uma das hipóteses para a presença de um inibidor do sistema do complemento na saliva desses insetos é a proteção do epitélio intestinal contra o complemento presente no sangue ingerido, essa inibição deveria funcionar também nesse pH.

A saliva de *L. longipalpis* não foi capaz de desligar da placa de ELISA nenhum dos componentes previamente depositados pela ação da via clássica (**Figura 06 B**). Alguns desses componentes se ligam à superfície ativadora através de uma interação covalente, como é o caso da ligação do C3b (Sim & Dodds 1997), e por isso seria altamente improvável que algum inibidor atuasse desfazendo essa ligação. Porém,

outros componentes são passíveis de remoção por inibidores. É o caso das amebas *Entamoeba histolytica* e *Naegleria fowleri*, que possuem inibidores semelhantes ao CD59 humano, capazes de se ligarem a C8 e C9 e impedir a formação do complexo de ataque à membrana (MAC) depositado (Braga et al. 1992, Fritzinger et al. 2006).

O fato da saliva de *L. longipalpis* inibir a deposição do C4b, mas não inibir a deposição do C1q (**Figura 06 A**) indica que um inibidor salivar está atuando em algum ponto da via entre esses dois componentes. Uma vez que o sistema do complemento atua como uma cascata de reações bioquímicas, todo evento que ocorre em um ponto da cascata, acarreta conseqüências nas etapas seguintes. Desse modo, quando se observa a inibição dos componentes C3b, C5b e C9 (**Figura 06 A**) não se pode concluir que a saliva atuou diretamente sobre esses componentes, uma vez que a inibição da deposição do C9, por exemplo, pode ser apenas um reflexo da inibição na deposição do C4b.

Se um segundo inibidor estivesse presente na saliva e atuasse inibindo alguma etapa no final da cascata do complemento, sua presença seria mascarada pelo inibidor que atua no início da via. Sendo assim, os experimentos utilizando o soro depletado de C6 foram conduzidos com o objetivo de avaliar se, além da inibição entre o C1q e C4, o EGS de *L. longipalpis* seria capaz de inibir as etapas finais da cascata do complemento e a formação do complexo de ataque à membrana. Os resultados obtidos mostraram que de fato o EGS não inibe as etapas finais da cascata do complemento, uma vez que a saliva de *L. longipalpis* não impede a hemólise de hemácias contendo os componentes iniciais ativados do complemento (**Figura 10 A**). Quando a saliva foi incubada juntamente com o soro depletado de C6, uma forte inibição da hemólise foi observada (**Figura 10 B**), resultado esse que reforça a tese de que o EGS de *L. longipalpis* atua nas etapas iniciais da via clássica para a inibição do complemento. Uma vez que a formação do complexo de ataque à membrana é uma etapa comum entre todas as vias do complemento (Kondos et al. 2010), podemos afirmar que a saliva de *L. longipalpis* não atua diretamente na formação do MAC, independente da via de ativação do complemento.

Em todos os sistemas biológicos que funcionam em cascata, a regulação e a inibição são mais efetivas quando a atuação ocorre nas etapas iniciais do processo. Basicamente, um número menor de moléculas está envolvido no começo da cascata, o que facilita a ação de moléculas reguladoras. Após a amplificação da resposta, um

número maior de reguladores/inibidores seria necessário para controlar os efeitos da cascata.

Uma vez que os resultados indicaram que o ponto de inibição da via clássica pela saliva de *L. longipalpis* estava nas etapas iniciais da cascata, mais especificamente entre o C1q depositado e a deposição de C4b, os experimentos que se seguiram tiveram como foco essa parte da cascata.

Nos sobrenadantes dos ensaios de hemólise da via clássica, a saliva de *L. longipalpis* impediu totalmente a clivagem do C4 pelo complexo C1 formado na superfície das hemácias (**Figura 12 A**), resultado esse consistente com o fato do EGS inibir a deposição do C4b (**Figura 6 A**). Outros organismos também possuem a capacidade de impedir a deposição do C4b (Barros et al. 2009, Avirutnan et al. 2010) e atuam de alguma forma na clivagem de C4 (Avirutnan et al. 2010). No caso dos flavivírus da dengue, febre amarela e febre do Nilo Ocidental, a deposição do C4b é fortemente inibida pela presença da proteína não estrutural NS1. Nesse estudo, os autores relacionaram a inibição da deposição do C4b com a clivagem do C4 pela própria proteína viral, que produziria fragmentos não ativos e inibiria o complemento (Avirutnan et al. 2010). Esse parece não ser o caso da saliva de *L. longipalpis*, uma vez que o EGS não foi capaz de clivar o C4 purificado (**Figura 13 A**)

Para que ocorra a deposição do C4b pela via clássica sobre uma superfície ativadora, o C4 precisa necessariamente ser clivado pela enzima C1s (Sim & Dodds 1997), o que não ocorre na presença da saliva de *L. longipalpis* (**Figura 12 A**). Desse modo, a inibição direta da atividade enzimática de C1s pelo EGS poderia estar envolvida com o mecanismo de ação usado pelo flebotomíneo para a inibição da via clássica. Essa hipótese foi fortalecida pela identificação na glândula salivar de *L. longipalpis* de um transcrito responsável pela codificação de uma proteína com alta similaridade com a família de inibidores de serino-proteases do tipo serpina (Valenzuela et al. 2004). Após o teste dessa hipótese, não foi possível obter nenhuma evidência que o EGS de *L. longipalpis* atuaria inibindo diretamente o C1s. A **Figura 13 A** mostra que a formação da banda α' correspondente à clivagem do C4 em C4b pelo C1s ocorre mesmo quando uma grande quantidade de saliva estava presente no meio. Quanto à serpina identificada na saliva de *L. longipalpis* (Valenzuela et al. 2004), essa molécula poderia estar envolvida na inibição das proteases presentes na cascata da coagulação, facilitando assim a ingestão de sangue pelo inseto.

Com o objetivo de identificar exatamente com qual molécula da via clássica a saliva de *L. longipalpis* estaria interagindo na inibição do complemento, um ensaio em que as etapas iniciais da cascata da via clássica foram “montadas” passo-a-passo na superfície de hemácias sensibilizadas foi desenvolvido (Krych-Goldberg et al. 1999). Nesses ensaios, as proteínas purificadas do complemento C1, C4, C2 e C3 foram incubadas de forma separada e sequencial, de modo que o EGS de *L. longipalpis* poderia ser testado de forma independente em cada uma dessas proteínas. Para nossa surpresa, os resultados dos ensaios mostraram que dessa forma a saliva de *L. longipalpis* não era capaz de inibir a via clássica, mesmo que em altas concentrações (**Figura 11**). Como a saliva de *L. longipalpis* atua inibindo a ativação do C4 e assim impedindo a deposição do C4b (**Figuras 12A e 09A**), o resultado esperado para o experimento citado acima seria que a saliva inibiria a hemólise somente quando incubada com C1 ou até mesmo com C4.

Apesar do EGS não ter sido capaz de inibir a hemólise quando incubado com as proteínas purificadas, algumas conclusões puderam ser tiradas com o experimento: (1) A saliva de *L. longipalpis* realmente não impede a deposição do C1q, uma vez que se fizesse isso, o C1 não se ligaria às hemácias e seria observada inibição da hemólise. Essa conclusão corrobora o resultado de deposição do C1q mostrado na **Figura 06A**. (2) A saliva de *L. longipalpis* realmente não inibe a atividade enzimática de C1s, pois se isso fosse verdade, seria observada inibição da hemólise quando o C4 foi incubado com EGS, conclusão corroborada pelo resultado da **Figura 13A**. (3) A saliva de *L. longipalpis* não é capaz de deslocar o tetrâmero C1r₂C1s₂ do complexo C1. Se isso ocorresse, a incubação do EGS com o complexo C1 culminaria na inibição da hemólise.

A capacidade das proteínas salivares em se ligar aos componentes iniciais da cascata da via clássica também foi avaliada. Conforme pode ser observado na **Figura 14**, o EGS adsorvido em placas de ELISA é capaz de se ligar ao C1q humano e essa ligação provavelmente é o que ocasiona a inibição da via clássica pela saliva de *L. longipalpis*.

O C1q é uma proteína hexamérica que tem sua estrutura classicamente comparada a um “buquê de tulipas”, compreendendo seis fibras de tripla-hélice semelhantes ao colágeno que se associam para formar o *stalk* (talo do buquê). Em determinado ponto do *stalk*, as fibras de colágeno divergem e formam seis *stems* (hastes do buquê), cada uma delas terminando em uma “cabeça” globular (Gaboriaud et al.

2004). Funcionalmente, as seis cabeças globulares da molécula de C1q compreendem as regiões reconhecedoras, que se ligam aos anticorpos e outros padrões ativadores. Os *stems*, por sua vez, formam um arcabouço onde as moléculas com atividade proteolítica C1r₂C1s₂ se ligam (Gaboriaud et al. 2007).

Em geral, moléculas que se ligam às cabeças globulares do C1q, como os anticorpos e a proteína C-reativa, são ativadoras eficazes da via clássica (Sjoberg et al. 2009). Por outro lado, moléculas que interagem com os *stems* ou com o *stalk* da estrutura do C1q normalmente são capazes de inibir a ativação dessa via do complemento (Groeneveld et al. 2005). Isso ocorre provavelmente por conta da competição por sítios de ligação com o tetrâmero C1r₂C1s₂ ou ainda por conta de mudanças conformacionais no C1q que impediriam que essa molécula ativasse a unidade catalítica C1r.

Quando analisados em conjunto, os resultados discutidos até agora podem indicar um mecanismo de ação da saliva de *L. longipalpis* na inibição da via clássica do complemento humano. A proteína salivar responsável pela inibição se liga à molécula de C1q (**Figura 14**), o que provavelmente impede a ativação de C1r₂C1s₂ (ou sua ligação ao C1q). Uma vez que a unidade catalítica do complexo C1 não foi ativada, o C4 não será clivado (**Figura 12A**). Como consequência, a deposição do C4b é inibida (**Figura 06A**) e isso impede a formação da C3 convertase e deposição dos componentes seguintes (**Figura 06A**). Assim, todo esse processo culmina na inibição da hemólise observada (**Figura 04A**). Interessantemente, a saliva não foi capaz de inibir a hemólise quando incubada com o complexo C1 purificado (**Figura 11**). Uma possível explicação seria o fato de que a purificação do C1 é um processo que geralmente ativa a molécula (Berg 2000), e talvez a saliva de *L. longipalpis* só seja capaz de atuar no complexo C1 inativado (antes de C1r ativar C1s por meio de proteólise ou antes de C1r e C1s se associarem a C1q).

O mecanismo de inibição da via clássica baseado em ligação à molécula de C1q parece ser bem difundido entre os organismos que lidam com o sangue de hospedeiros. A proteína de revestimento do astrovírus humano do tipo 1 é capaz de inibir a ativação da via clássica do complemento humano através da ligação de C1q (Bonaparte et al. 2008). Mais precisamente, essa proteína interage com o C1q e desloca as enzimas C1r e C1s associadas a ela (Hair et al. 2010). Calreticulinas encontradas nos produtos de excreção/secreção de *Necator americanus* e *Haemonchus contortus* também se ligam ao C1q e inibem a ativação da via clássica (Kasper et al. 2001,

Suchitra et al. 2005). Nos ácaros causadores da sarna humana, as moléculas D1 e I1 se ligam apenas à região do *stalk* do C1q, inibindo a atividade hemolítica da via clássica e também a deposição de moléculas como C4b, C3b e C9 (Bergstrom et al. 2009). Possivelmente, a molécula inibidora da via clássica presente na saliva de *L. longipalpis* também se liga apenas à região do *stalk* de C1q, uma vez que a saliva não impede a ligação do C1q aos complexos antígeno-anticorpo (**Figura 06A**).

A molécula envolvida na inibição da via clássica pela saliva de *L. longipalpis* parece mesmo ser a proteína LJM19. Entre todas as proteínas recombinantes da saliva de *L. longipalpis*, essa foi a única com atividade consistente na inibição do complemento humano (Valenzuela JG - comunicação pessoal). De fato, nossos experimentos com essa proteína mostraram claramente uma inibição dose-dependente da via clássica, com valores maiores que 90% quando 0,25 µg de LJM19 estavam presentes no meio (**Figura04B**). Além disso, assim como o EGS de *L. longipalpis*, a LJM19 não foi capaz de inibir a deposição de C1q (**Figura 08A**), mas foi capaz de inibir a deposição do C4b (**Figura 08B**).

A cromatografia de filtração molecular do EGS de *L. longipalpis* revelou apenas um pico de atividade anti-complemento para a via clássica (**Figura 15A e B**). O formato simétrico do pico indica que apenas uma proteína na saliva de *L. longipalpis* seria responsável pela inibição da via clássica, resultado que está de acordo com o fato da LJM19 ser a única proteína recombinante que se mostrou realmente ativa na inibição da via clássica.

Nossos resultados mostraram ainda um peso molecular de 22,3 kDa para a proteína inibidora da via clássica do complemento humano (**Figura 15A e B**). A LJM19, por sua vez, é uma proteína de 11 kDa (Valenzuela et al. 2004). Provavelmente, em condições fisiológicas as moléculas de LJM19 se ligam, formando um dímero de aproximadamente 22 kDa.

A LJM19 é uma proteína descoberta através de estudos de sequenciamento do cDNA das glândulas salivares de *L. longipalpis* (Valenzuela et al. 2004). A sequência contendo 115 aminoácidos não possui similaridades com sequências de outras proteínas depositadas nos bancos de dados.

Até o momento, três trabalhos foram publicados relatando a imunização de modelos experimentais com essa proteína e descrevendo o aparecimento de certa proteção contra *Leishmania*.

No primeiro trabalho, Gomes et al. (2008) avaliaram a resposta imune celular e humoral de hamsters imunizados com os plasmídeos que codificam as proteínas salivares mais abundantes de *L. longipalpis*. Dos 16 plasmídeos testados, quatro foram selecionados por induzir ou a produção de anticorpos, ou uma resposta de hipersensibilidade tardia ou ambas. Os autores imunizaram hamsters, separadamente, com esses quatro plasmídeos e após o desafio com *L. infantum chagasi* e EGS de *L. longipalpis*, a avaliação da infecção foi conduzida. Cinco meses após a infecção, apenas o grupo imunizado com LJM19 possuía um número de parasitos significativamente mais baixo, no fígado e no baço, que o grupo controle. Além disso, esse grupo foi o único que não apresentou os sinais clínicos da leishmaniose visceral, sendo que os animais imunizados com LJM19 sobreviveram até oito meses após a infecção. No grupo controle, todos os animais morreram em até seis meses. A proteção conferida pela imunização com LJM19 foi atribuída às maiores razões IFN- γ /TGF- β no fígado e baço dos animais do grupo teste e ainda a uma expressão elevada de iNOS nesses órgãos. Hamsters imunizados com LJM19 e expostos a *L. longipalpis* apresentaram, no local da picada, um ambiente associado à resposta imunológica do tipo 1, com elevada expressão de IFN- γ e IL-10. A proteção conferida pela imunização com LJM19 também estaria relacionada à formação desse ambiente hostil para a *Leishmania* no local da picada (Gomes et al. 2008). Uma vez que a LJM19 é a molécula responsável pela inibição da via clássica do complemento (**Figura 04B**), parte da proteção contra *Leishmania* causada pela imunização com essa molécula poderia estar relacionada com a inativação da atividade inibidora do complemento no momento da picada.

O segundo estudo publicado com essa proteína mostrou que a imunização de hamsters com o plasmídeo correspondente a LJM19 induziu uma reação de hipersensibilidade tardia contra a saliva de *L. longipalpis* e também de *L. intermedia*. Além disso, os animais imunizados com LJM19 e desafiados com *L. braziliensis* na presença de EGS dos dois flebotomíneos apresentaram lesões menores e uma redução na carga parasitária. Nesse caso, houve um aumento significativo na produção de IFN- γ pelos linfonodos dos animais imunizados, o que sugere que a imunização com essa proteína induz uma resposta imune protetora através da expressão aumentada de citocinas pró-inflamatórias (Tavares et al. 2011).

A publicação mais recente com a LJM19 trata-se da imunização de hamsters com plasmídeos dessa proteína salivar em conjunto com uma vacina de DNA contendo o plasmídeo que codifica a proteína 11 da membrana do cinetoplasto de *L. donovani* –

KMP 11 (Silva et al. 2011). Hamsters imunizados intradermicamente com LJM19, KMP11 ou LJM19 mais KMP11 foram desafiados com promastigotas da fase estacionária de cultura de *L. infantum chagasi* mais o EGS de *L. longipalpis*. Os resultados mostraram que todos os três grupos experimentais foram de certa forma protegidos contra a infecção. Porém, não houve aumento na proteção quando as duas vacinas foram inoculadas conjuntamente. Esse trabalho mostrou ainda que a imunização de hamsters com o plasmídeo da LJM19 foi capaz de impedir o surgimento de alterações hematológicas decorrente da leishmaniose visceral no modelo utilizado.

Apesar de três artigos publicados demonstrando a capacidade da LJM19 em conferir proteção em hamsters imunizados, só agora uma função foi relacionada a essa molécula. Infelizmente, poucos experimentos foram feitos com a proteína purificada até o momento, uma vez que só muito recentemente tivemos acesso à LJM19. Sendo assim, os testes de função dessa proteína devem continuar em nosso laboratório.

A inibição da via alternativa pela saliva de *L. longipalpis* também foi confirmada (**Figura 05A**). Assim como Cavalcante et al. (2003), uma quantidade maior de lobos salivares do que aquela usada nos ensaios da via clássica foi necessária para inibir fortemente a via alternativa. Isso não indica necessariamente que o EGS de *L. longipalpis* é menos ativo na inibição da via alternativa, uma vez que a quantidade de soro nos ensaios nesse caso foi seis vezes maior. Quando a proteína recombinante LJM19 foi testada para a capacidade de interferir na via alternativa, não houve inibição da hemólise (**Figura 05B**), e por isso os experimentos foram feitos apenas com o EGS.

Nos ensaios de deposição da via alternativa, a saliva de *L. longipalpis* foi capaz de inibir a deposição de todos os componentes testados (**Figura 09A**). O fato do EGS de *L. longipalpis* não impedir a formação do complexo de ataque à membrana (**Figura 10A**) e inibir a deposição dos componentes iniciais da via alternativa, como o C3b e o fator B, indica que, nesse caso, a inibição também ocorre nas etapas iniciais da ativação da cascata.

Os carrapatos do gênero *Ixodes* possuem a capacidade de inibir a via alternativa do complemento humano, mas não inibem a via clássica (Schroeder et al. 2009). A saliva desses carrapatos inibe a deposição de C3b e fator Bb, fato esse que impede a formação da C3/C5 convertase e portanto impede também a inserção do complexo de ataque à membrana e a lise celular (Valenzuela et al. 2001, Tyson et al. 2007, Couvreur et al. 2008). O mecanismo usado pelas proteínas Irac de *Ixodes ricinus* e Salp20 de *Ixodes scapularis* é a ligação à properdina (Tyson et al. 2007, Couvreur et

al. 2008). A properdina é um regulador positivo da via alternativa que se liga à C3 convertase dessa via e estabiliza o complexo enzimático, aumentando assim sua meia vida (Kemper et al. 2010). As proteínas salivares desses carrapatos, ao se ligarem à properdina, retiram esse regulador positivo da C3 convertase e acabam por acelerar o decaimento dessa enzima. Como consequência dessa ligação à properdina, a saliva dos *Ixodes* e as proteínas responsáveis pela inibição do complemento nesses carrapatos são capazes de impedir a clivagem do fator B e desligar o fator Bb previamente depositado em uma superfície ativadora (Tyson et al. 2007, Couvreur et al. 2008).

Assim como a saliva dos carrapatos do gênero *Ixodes*, o EGS de *L. longipalpis* inibiu a deposição do C3b e fator Bb (**Figura 09A**), além de impedir completamente a clivagem do fator B (**Figura 12B**). Porém, a saliva de *L. longipalpis* não foi capaz de desligar o fator Bb previamente depositado na superfície das placas de ELISA (**Figura 09B**). Esse resultado talvez indique que o mecanismo de ação da inibição da via alternativa pela saliva de *L. longipalpis* seja diferente daquele usado pelos carrapatos. Por outro lado a possibilidade do mecanismo de inibição da via alternativa ser devido à ligação da properdina não pode ser excluída, uma vez que as proteínas D1 e I1 de *Sarcoptes scabiei* inibem a via alternativa através da ligação de properdina, mas não são capazes de acelerar o decaimento da C3 convertase (Bergstrom et al. 2009).

O modo pelo qual a saliva de *L. longipalpis* impede a clivagem do fator B (**Figura 12 B**) ainda não está bem esclarecido. Assim como o caso do bloqueio da clivagem do C4 nos ensaios da via clássica (**Figura 12 A**), a enzima responsável pela clivagem do fB, o fator D, não parece sofrer inibição pela saliva de *L. longipalpis* (**Figura 13B**).

Curiosamente, em nenhuma das frações coletadas da cromatografia de filtração molecular (**Figura 15A**) a atividade inibidora da via alternativa foi encontrada. Uma explicação para esse fato talvez seja a perda de atividade da molécula responsável durante o processo de cromatografia. Outra explicação seria que a inibição da via alternativa pela saliva de *L. longipalpis* depende da ação em conjunto de duas proteínas e quando essas moléculas são separadas pela cromatografia, a atividade é perdida.

A inibição da via alternativa pela saliva de *L. longipalpis* ainda necessita de ser mais bem investigada. A compreensão de qual molécula (ou quais moléculas) é a responsável pelo fenômeno e como a saliva atua é importante para o melhor conhecimento da interação vetor-hospedeiro.

Além da saliva, as fêmeas de *L. longipalpis* possuem em seu conteúdo intestinal uma atividade capaz de inibir a deposição de componentes da via clássica do complemento humano sobre uma superfície ativadora (**Figura 16B, C e D**). Esse mesmo conteúdo intestinal não foi capaz de inibir a deposição do C5b pela via alternativa (**Figura 16A**). Aparentemente, a inibição da via clássica pelo conteúdo intestinal de *L. longipalpis* é feita de modo distinto daquele feito pela LJM19 ou pela saliva. Enquanto o EGS é capaz de inibir a deposição de C4b e todos os outros componentes seguintes (**Figura 06A**), o conteúdo intestinal dos flebotômíneos não foi capaz de inibir a deposição de C4b (**Figura 16B**), mas foi capaz de inibir a deposição de C3b e C5b (**Figura 16C e D**).

A presença de inibidores intestinais do sistema do complemento em triatomíneos e mosquitos foi demonstrada por Barros et al. (2009). Nesse estudo, os autores mostraram que não só a saliva dos triatomíneos, mas também o conteúdo intestinal desses insetos era capaz de inibir o complemento. O conteúdo intestinal de *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* e *Rhodnius prolixus* foi efetivo na inibição da deposição do C4b e C3b pela via clássica e na deposição do C3b pela via alternativa. O mosquito *Aedes aegypti*, que não conta com um inibidor salivar do complemento (Cavalcante et al. 2003), possui também em seu intestino componentes capazes de inibir a deposição de C3b tanto pela via clássica como pela via alternativa (Barros et al. 2009).

Sarcoptes scabiei também possui em seu intestino moléculas capazes de interagir com o complemento (Mika et al. 2011). Esses ácaros possuem peritrofinas que se ligam ao MBL, possivelmente para inibir a via das lectinas e a formação do complexo de ataque à membrana no epitélio intestinal.

A proteção das células intestinais contra a ação lítica do sistema do complemento presente no sangue ingerido é de fato a explicação mais óbvia para a presença de inibidores do complemento na saliva/intestino de artrópodes hematófagos. Triatomíneos que se alimentaram normalmente de sangue humano, não apresentaram deposição do complexo de ataque à membrana no epitélio intestinal, fato esse que foi atribuído à presença de inibidores intestinais e salivares. Quando esses insetos foram forçados a se alimentar na ausência de saliva e com soro humano duas vezes concentrado, os inibidores intestinais não foram capazes de sozinhos, inibirem o complemento de modo satisfatório. Foi então constatada, por imunofluorescência, a deposição do MAC nas células intestinais e a morte celular através do corante iodeto de propídeo (Barros et al. 2009).

A proteção do intestino pode não ser a única função atribuída aos inibidores do complemento presentes na saliva e intestino de *L. longipalpis* e outros artrópodes hematófagos.

Devido à interação entre as cascatas do complemento e da coagulação sanguínea (Markiewski et al. 2007), a inibição do complemento pela saliva de *L. longipalpis* poderia ajudar o flebotomíneo na obtenção de sangue no momento da picada. Além disso, a diminuição da produção de C5a no local da picada devido à inibição do complemento pela saliva poderia prevenir a degranulação de mastócitos e liberação de histamina no local, diminuindo assim a percepção do hospedeiro à picada do inseto (Erdei et al. 1997).

Uma vez que antígenos opsonizados com fragmentos de C3d se mostram muito mais imunogênicos e estimulam as células B a produzirem uma quantidade até 10.000 vezes maior de anticorpos (Roosendaal & Carroll 2007), a função de inibidores do complemento poderia estar relacionada à modulação da produção de anticorpos contra as proteínas salivares.

Os inibidores de complemento salivares e intestinais podem ter importância durante a transmissão de patógenos por artrópodes hematófagos. Kyckova & Kopecky (2006) mostraram que a saliva de *Ixodes ricinus* protege a espiroqueta de *Borrelia afzelii* contra a lise mediada pelo complemento *in vitro*. A proteína anti-complemento S20NS de *I. scapularis* foi capaz de impedir a lise de *Borrelia garinni*, uma espécie causadora da doença de Lyme na Europa, em 70% quando essa bactéria foi incubada com soro humano normal diluído 1:5 (Tyson et al. 2007). Isolados de *Borrelia burgdorferi* sensíveis ao complemento foram protegidas da ação lítica do soro humano pela adição da proteína salivar de carrapatos Salp15. As espiroquetas de *B. burgdorferi* foram capazes de se ligar a Salp15 e assim impedir a inserção do complexo de ataque à membrana (Schuijt et al. 2008).

Possivelmente, os parasitos do gênero *Leishmania* também se beneficiam da atividade inibidora do complemento presente na saliva dos flebotomíneos. Apesar de serem relativamente resistentes à ação lítica do soro humano (Bogdan & Rollinghoff 1997), as promastigotas metacíclicas poderiam usar os inibidores salivares de *L. longipalpis* como uma complementação na resistência à lise mediada pelo complemento. Recentemente nosso grupo de pesquisa demonstrou que a lise causada pelo soro humano em promastigotas de *L. infantum* foi significativamente diminuída com a adição do EGS de *L. longipalpis* (Alves 2011).

Por outro lado, as amastigotas de *Leishmania* são altamente suscetíveis à lise pelo soro humano (Hoover et al. 1985a, Hoover et al. 1985b). E assim, os inibidores do complemento presentes na saliva e no intestino de *L. longipalpis* poderiam ser extremamente importantes para o parasito no momento em que um flebotomíneo se alimenta em um hospedeiro infectado. No local da picada ou dentro do intestino do inseto, as amastigotas (agora fora do espaço intracelular após a ruptura dos macrófagos infectados) estariam em contato direto com os componentes do sistema do complemento. Se o complemento não fosse inativado pela saliva/conteúdo intestinal, ele poderia provocar a morte das amastigotas. Talvez esse seja o momento em que as leishmanias se beneficiam dos inibidores do complemento de *L. longipalpis*.

7 – CONCLUSÕES

- A saliva de *Lutzomyia longipalpis* é capaz de inibir a via clássica e alternativa do complemento humano;
- A proteína recombinante LJM19 é capaz de inibir a via clássica do complemento humano, mas não é capaz de inibir a via alternativa;
- A saliva de *L. longipalpis*, assim como a LJM19, não inibe a deposição do C1q, mas inibe a deposição dos componentes seguintes nos ensaios da via clássica;
- A saliva de *L. longipalpis* inibe a via clássica do complemento em pH 8,15;
- A saliva de *L. longipalpis* inibe a deposição de C3b, fator Bb, C5b e C9 nos ensaios da via alternativa;
- A saliva de *L. longipalpis* não é capaz de desligar componentes previamente depositados em superfícies ativadoras;
- A saliva de *L. longipalpis* impede a clivagem dos componentes C4 e fator B, mas não inibe as enzimas responsáveis por essa clivagem;
- A saliva de *L. longipalpis* se liga ao componente C1q da via clássica;
- O peso molecular da proteína inibidora da via clássica em condições fisiológicas é 22,3 kDa;
- O conteúdo intestinal de *L. longipalpis* não inibe a deposição do C5b pela via alternativa nem do C4b pela via clássica, porém é capaz de inibir a deposição do C3b e C5b pela via clássica.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agostoni A 1989. Inherited C1 inhibitor deficiency. *Complement and Inflammation* 6: 112-118.
- Ahmed SBH, Chelbi I, Kaabi B, Cherni S, Derbali M, Zhioua E 2010. Differences in the salivary effects of wild-caught versus colonized *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) on the development of zoonotic cutaneous leishmaniasis in BALB/C mice. *Journal of Medical Entomology* 47: 74-79.
- Alexander B, Usma MC 1994. Potential sources of sugar for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia youngi* (Diptera, Psychodidae) in a colombian coffee plantation. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 88: 543-549.
- Alves AN 2011. Atividade lítica pelo sistema de complemento em promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* frente a componentes salivares de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Dissertação - UFMG
- Andrade BB, Oliveira CI, Brodskyn CI, Barral A, Barral-Netto M 2007. Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: Current insights. *Scandinavian Journal of Immunology* 66: 122-127.
- Avirutnan P, Fuchs A, Hauhart RE, Somnuk P, Youn S, Diamond MS, Atkinson JP 2010. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *Journal of Experimental Medicine* 207: 793-806.
- Barros VC, Assumpcao JG, Cadete AM, Santos VC, Cavalcante RR, Araujo RN, Pereira MH, Gontijo Nf 2009. The role of salivary and intestinal complement system inhibitors in the midgut protection of triatomines and mosquitoes. *Plos One* 4.
- Bates PA 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology* 37: 1097-1106.

- Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, Ribeiro J, Sacks DL 1998. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: Powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *Journal of Experimental Medicine* 188: 1941-1953.
- Bergmann-Leitner ES, Scheiblhofer S, Duncan EH, Leitner WW, Chen D, Angov E, Khan F, Williams JL, Winter DB, Thalhamer J, Lyon JA, Tsokos GC 2005. C3d binding to the circumsporozoite protein carboxy-terminus deviates immunity against malaria. *International Immunology* 17: 245-255.
- Bergstrom FC, Reynolds S, Johnstone M, Pike RN, Buckle AM, Kemp DJ, Fischer K, Blom AM 2009. Scabies mite inactivated serine protease paralogs inhibit the human complement system. *Journal of Immunology* 182: 7809-7817.
- Bogdan C, Rollinghoff M 1998. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *International Journal for Parasitology* 28: 121-134.
- Bonaparte RS, Hair PS, Banthia D, Marshall DA, Cunnion KA, Krishna NK 2008. Human astrovirus coat protein inhibits serum complement activation via C1, the first component of the classical pathway. *Journal of Virology* 82: 817-827.
- Bradford MM 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Braga LL, Ninomiya H, McCoy JJ, Eacker S, Wiedmer T, Pham C, Wood S, Sims PJ, Petri WA 1992. Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesin of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Investigation* 90: 1131-1137.

- Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM 1995. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement-fixation, cell-adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *Journal of Immunology* 155: 3102-3111.
- Brodie TM, Smith MC, Morris RV, Titus RG 2007. Immunomodulatory effects of the *Lutzomyia longipalpis* salivary gland protein maxadilan on mouse macrophages. *Infection and Immunity* 75: 2359-2365.
- Carregaro V, Valenzuela JG, Cunha TM, Verri WA, Grespan R, Matsumura G, Ribeiro JMC, Elnaiem DE, Silva JS, Cunha FQ 2008. Phlebotomine saliva inhibit immune inflammation-induced neutrophil migration via an autocrine DC-derived PGE(2)/IL-10 sequential pathway. *Journal of Leukocyte Biology* 84: 104-114.
- Carroll MC 2004. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nature Immunology* 5: 981-986.
- Carvalho E, Metz CN, Davitz MA, Ramalho-Pinto FJ 1994. Binding of gpi-pld-treated daf to the surface of *Schistosom mansoni* schistosomula. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 27: 457-462.
- Catty D, Raykundalia C 1989. Production and quality control of polyclonal antibodies. In: Catty D. *Antibodies: a practical approach*. Washington. Press Oxford.vol 1 19-80
- Cavalcante RR, Pereira MH, Freitas JM, Gontijo NF 2006. Ingestion of saliva during carbohydrate feeding by *Lutzomyia longipalpis* (Diptera; Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101: 85-87.
- Cavalcante RR, Pereira MH, Gontijo NF 2003. Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitology* 127: 87-93.

- Cerna P, Mikes L, Volf P 2002. Salivary gland hyaluronidase in various species of phlebotomine sand flies (Diptera : Psychodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 1691-1697.
- Chanioti 1974. Sugar-feeding behavior of *Lutzomyia trapidoi* (Diptera : Psychodidae) under experimental conditions. *Journal of Medical Entomology* 11: 73-79.
- Chen CB, Wallis R 2004. Two mechanisms for mannose-binding protein modulation of the activity of its associated serine proteases. *Journal of Biological Chemistry* 279: 26058-26065.
- Collin N, Gomes R, Teixeira C, Cheng L, Laughinghouse A, Ward JM, Elnaiem DE, Fischer L, Valenzuela JG, Kamhawi S 2009. Sand fly salivary proteins induce strong cellular immunity in a natural reservoir of visceral leishmaniasis with adverse consequences for *Leishmania*. *Plos Pathogens* 5.
- Collis MG 1989. The vasodilator role of adenosine. *Pharmacology & Therapeutics* 41: 143-162.
- Costa DJ, Favali C, Clarencio J, Afonso L, Conceicao V, Miranda JC, Titus RG, Valenzuela J, Barral-Netto M, Barral A, Brodskyn C. I 2004. *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. *Infection and Immunity* 72: 1298-1305.
- Couvreur B, Beaufays J, Charon C, Lahaye K, Gensale F, Denis V, Charlotieux B, Decrem Y, Prevot PP, Brossard M, Vanhamme L, Godfroid E 2008. Variability and action mechanism of a family of anticomplement proteins in *Ixodes ricinus*. *Plos One* 3.

- Daix V, Schroeder H, Praet N, Georgin JP, Chiappino I, Gillet L, Fays K, Decrem Y, Leboulle G, Godfroid E, Bollen A, Pastoret PP, Gern L, Sharp PM, Vanderplasschen A 2007. *Ixodes* ticks belonging to the *Ixodes ricinus* complex encode a family of anticomplement proteins. *Insect Molecular Biology* 16: 155-166.
- Dempsey PW, Allison MED, Akkaraju S, Goodnow CC, Fearon DT 1996. C3d of complement as a molecular adjuvant: Bridging innate and acquired immunity. *Science* 271: 348-350.
- Deng JS, Gold D, LoVerde PT, Fishelson Z 2003. Inhibition of the complement membrane attack complex by *Schistosoma mansoni* paramyosin. *Infection and Immunity* 71: 6402-6410.
- Descoteaux A, Turco SJ 1999. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 1455: 341-352.
- Diaz A, Ferreira A, Sim RB 1997. Complement evasion by *Echinococcus granulosus* - Sequestration of host factor H in the hydatid cyst wall. *Journal of Immunology* 158: 3779-3786.
- Diaz A, Irigoien F, Ferreira F, Sim RB 1999. Control of host complement activation by the *Echinococcus granulosus* hydatid cyst. *Immunopharmacology* 42: 91-98.
- Dionisotti S, Zocchi C, Varani K, Borea PA, Ongini E 1992. Effects of adenosine derivatives on human and rabbit platelet-aggregation - correlation of adenosine receptor affinities and antiaggregatory activity. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 346: 673-676.
- Drouin SM, Corry DB, Kildsgaard J, Wetsel RA 2001. Cutting edge: The absence of C3 demonstrates a role for complement in Th2 effector functions in a murine model of pulmonary allergy. *Journal of Immunology* 167: 4141-4145.

- Erdei A, Kerekes K, Pecht I 1997. Role of C3a and C5a in the activation of mast cells. *Experimental and Clinical Immunogenetics* 14: 16-18.
- Ferreira V, Valck C, Sanchez G, Gingras A, Tzima S, Molina MC, Sim R, Schwaeble W, Ferreira A 2004. The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Immunology* 172: 3042-3050.
- Fischer E, Ouaisi MA, 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: 299-303.
- Fritzinger AE, Toney DM, MacLean RC, Marciano-Cabral F 2006. Identification of a *Naegleria fowleri* membrane protein reactive with anti-human CD59 antibody. *Infection and Immunity* 74: 1189-1195.
- Gaboriaud C, Thielens NM, Gregory LA, Rossi V, Fontecilla-Camps JC, Arlaud GJ 2004. Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle. *Trends in Immunology* 25: 368-373.
- Gaboriaud C, Teillet F, Gregory LA, Thielens NM, Arlaud GJ 2007. Assembly of C1 and the MBL- and ficolin-MASP complexes: Structural insights. *Immunobiology* 212: 279-288.
- Ghebrehiwet B, Silverberg M, Kaplan AP 1981. Activation of the classical pathway of complement by Hageman-factor fragment. *Journal of Experimental Medicine* 153: 665-676.
- Gillet L, Schroeder H, Mast J, Thirion M, Renauld JC, Dewals B, Vanderplasschen A 2009. Anchoring tick salivary anti-complement proteins IRAC I and IRAC II to membrane increases their immunogenicity. *Veterinary Research* 40.

- Gomes R, Teixeira C, Jania Teixeira M, Oliveira F, Jose Menezes M, Silva C, de Oliveira C. I, Miranda JC, Elnaiem DE, Kamhawi S, Valenzuela JG, Brodskyn CI 2008. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 7845-7850.
- Gossage SA, Rogers ME, Bates PA 2003. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *International Journal for Parasitology* 33: 1027-1034.
- Goundis D, Reid KBM 1988. Properdin, the terminal complement components, thrombospondin and the circumsporozoite protein of malaria parasites contain similar sequence motifs. *Nature* 335: 82-85.
- Grevelink SA, Osborne J, Loscalzo J, Lerner EA 1995. Vasorelaxant and second-messenger effects of maxadilan. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 272: 33-37.
- Groeneveld TWL, Oroszlan M, Owens RT, Faber-Krol MC, Bakker AC, Arlaud GJ, McQuillan DJ, Kishore U, Daha MR, Roos A 2005. Interactions of the extracellular matrix proteoglycans decorin and biglycan with C1q and collectins. *Journal of Immunology* 175: 4715-4723.
- Haapasalo K, Meri T, Jokiranta TS 2009. *Loa loa* microfilariae evade complement attack in vivo by acquiring regulatory proteins from host plasma. *Infection and Immunity* 77: 3886-3893.
- Hair PS, Gronemus JQ, Crawford KB, Salvi VP, Cunnion KM, Thielens NM, Arlaud GJ, Rawal N, Krishna NK 2010. Human astrovirus coat protein binds C1q and MBL and inhibits the classical and lectin pathways of complement activation. *Molecular Immunology* 47: 792-798.

- Hamasaki R, Kato H, Terayama Y, Iwata H, Valenzuela JG 2009. Functional characterization of a salivary apyrase from the sand fly, *Phlebotomus duboscqi*, a vector of *Leishmania major*. *Journal of Insect Physiology* 55: 1044-1049.
- Hansch GM 1988. The complement attack phase. In: Rother K, Till GO. *The complement system*. Berlin: Springer-Verlag. Cap 1 202-230
- Handman E, Bullen DVR 2002. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology* 18: 332-334.
- Heeger PS, Lalli PN, Lin F, Valujskikh A, Liu JB, Muqim N, Xu YY, Medof ME 2005. Decay-accelerating factor modulates induction of T cell immunity. *Journal of Experimental Medicine* 201: 1523-1530.
- Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, Toprak U 2009. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annual Review of Entomology* 54: 285-302.
- Hepburn NJ, Williams AS, Nunn MA, Chamberlain-Banoub JC, Hamer J, Morgan BP, Harris CL 2007. In vivo characterization and therapeutic efficacy of a C5-specific inhibitor from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Journal of Biological Chemistry* 282: 8292-8299.
- Hermoso T, Fishelson Z, Becker SI, Hirschberg K, Jaffe CL 1991. Leishmanial protein-kinases phosphorylate components of the complement-system. *Embo Journal* 10: 4061-4067.
- Hoover DL, Berger M, Hammer CH, Meltzer MS 1985. Complement-mediated serum cyto-toxicity for *Leishmania major* amastigotes - killing by serum deficient in early components of the membrane attack complex. *Journal of Immunology* 135: 570-574.

- Hoover DL, Berger M, Oppenheim MH, Hockmeyer WT, Meltzer MS 1985. Cytotoxicity of human-serum for *Leishmania donovani* amastigotes - antibody facilitation of alternate complement pathway-mediated killing. *Infection and Immunity* 47: 247-252.
- Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, Rittirsch D, Neff TA, McGuire SR, Lambris JD, Warner RL, Flierl MA, Hoesel LM, Gebhard F, Younger JG, Drouin SM, Wetsel RA, Ward PA 2006. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nature Medicine* 12: 682-687.
- Inal JM 2006. Complement C2 receptor inhibitor trispanning: from man to schistosome (vol 27, pg 320, 2005). *Springer Seminars in Immunopathology* 27: 509-510.
- Irigoin F, Ferreira F, Fernandez C, Sim RB, Diaz A 2002. Myo-inositol hexakisphosphate is a major component of an extracellular structure in the parasitic cestode *Echinococcus granulosus*. *Biochemical Journal* 362: 297-304.
- Irigoin F, Laich A, Ferreira AM, Fernandez C, Sim R. B, Diaz A 2008. Resistance of the *Echinococcus granulosus* cyst wall to complement activation: analysis of the role of InsP(6) deposits. *Parasite Immunology* 30: 354-364.
- Jackson TS, Lerner E, Weisbrod RM, Tajima M, Loscalzo J, Keaney J. F 1996. Vasodilatory properties of recombinant maxadilan. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 40: H924-H930.
- Jacquiersarlin MR, Gabert FM, Villiers MB, Colomb MG 1995. Modulation of antigen-processing and presentation by covalently-linked complement c3b fragment. *Immunology* 84: 164-170.
- Kaczorowski DJ, Afrazi A, Scott MJ, Kwak JH, Gill R, Edmonds RD, Liu Y, Fan J, Billiar TR 2010. Pivotal Advance: The pattern recognition receptor ligands lipopolysaccharide and polyinosine-polycytidylic acid stimulate factor B synthesis by the macrophage through distinct but overlapping mechanisms. *Journal of Leukocyte Biology* 88: 609-618.

- Kam CM, McRae BJ, Harper JW, Niemann M. A, Volanakis J. E, Powers JC 1987. Human-complement protein D, protein C2, and protein B: active-site mapping with peptide thioester substrates. *Journal of Biological Chemistry* 262: 3444-3451.
- Kamhawi S 2000. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes and Infection* 2: 1765-1773.
- Kamhawi S, Belkaid Y, Modi G, Rowton E, Sacks D 2000. Protection against cutaneous Leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290: 1351-1354.
- Kamhawi S 2006. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology* 22: 439-445.
- Kasper G, Brown A, Eberl M, Vallar L, Kieffer N, Berry C, Girdwood K, Eggleton P, Quinnell R, Pritchard DI 2001. A calreticulin-like molecule from the human hookworm *Necator americanus* interacts with C1q and the cytoplasmic signalling domains of some integrins. *Parasite Immunology* 23: 141-152.
- Katz O, Waitumbi JN, Warburg A 2000. Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62: 145-150.
- Kawamoto Y, Winger LA, Hong K, Matsuoka H, Chinzei Y, Kawamoto F, Kamimura K, Arakawa R, Sinden RE, Miyama A 1992. *Plasmodium berghei* sporozoites are sensitive to human serum but not susceptible host serum. *Experimental Parasitology* 75: 361-368.
- Kawasaki N, Kawasaki T, Yamashina I 1983. Isolation and characterization of a mannan-binding protein from human-serum. *Journal of Biochemistry* 94: 937-947.

- Kemper C, Atkinson JP 2007. T-cell regulation: with complements from innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 7: 9-18.
- Kemper C, Atkinson JP, Hourcade DE 2010. Properdin: Emerging Roles of a Pattern-Recognition Molecule. *Annual Review of Immunology*, Vol 28 28: 131-155.
- Killick-Kendrick R 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology* 17: 279-289.
- Kirschfink M, Blase L, Engelmann S, SchwartzAlbiez R 1997. Secreted chondroitin sulfate proteoglycan of human B cell lines binds to the complement protein C1q and inhibits complex formation of C1. *Journal of Immunology* 158: 1324-1331.
- Klos A, Tenner AJ, Johswich KO, Ager RR, Reis ES, Koehl J 2009. The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Molecular Immunology* 46: 2753-2766.
- Kohl J, Baelder R, Lewkowich IP, Pandey MK, Hawlisch H, Wang LH, Best J, Herman NS, Sproles AA, Zwirner J, Whitsett JA, Gerard C, Sfyroera G, Lambris JD, Wills-Karp M 2006. A regulatory role for the C5a anaphylatoxin in, type 2 immunity in asthma. *Journal of Clinical Investigation* 116: 783-796.
- Kondos SC, Hatfaludi T, Voskoboinik I, Trapani JA, Law R.H.P, Whisstock JC, Dunstone MA 2010. The structure and function of mammalian membrane-attack complex/perforin-like proteins. *Tissue Antigens* 76: 341-351.
- Kopf M, Abel B, Gallimore A, Carroll M, Bachmann MF 2002. Complement component C3 promotes T-cell priming and lung migration to control acute influenza virus infection. *Nature Medicine* 8: 373-378.
- Krarpup A, Hajela K, Wallis R, Presanis JS, Gal P, Sim RB 2007. Mannan-binding lectin associated serine protease 2 (MASP-2) activates prothrombin directly and initiates low-level clotting. *Molecular Immunology* 44: 198-198.
- Krych-Goldberg M, Hauhart RE, Subramanian VB, Yurcisin BM, Crimmins DL, Hourcade DE, Atkinson JP 1999. Decay accelerating activity of complement

- receptor type 1 (CD35) - Two active sites are required for dissociating C5 convertases. *Journal of Biological Chemistry* 274: 31160-31168.
- Kyckova K, Kopecky J 2006. Effect of tick saliva on mechanisms of innate immune response against *Borrelia afzelii*. *Journal of Medical Entomology* 43: 1208-1214.
- Lambris JD, Ricklin D, Geisbrecht BV 2008. Complement evasion by human pathogens. *Nature Reviews Microbiology* 6: 132-142.
- Lawrie CH, Sim RB, Nuttall PA 2005. Investigation of the mechanisms of anti-complement activity in *Ixodes ricinus* ticks. *Molecular Immunology* 42: 31-38.
- Lerner EA, Ribeiro JMC, Nelson RJ, Lerner MR 1991. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary-glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Journal of Biological Chemistry* 266: 11234-11236.
- Lima HC, Titus RG 1996. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infection and Immunity* 64: 5442-5445.
- Marikovsky M, Arnon R, Fishelson Z 1988. Proteases secreted by transforming schistosomula of *Schistosoma mansoni* promote resistance to killing by complement. *Journal of Immunology* 141: 273-278.
- Marikovsky M, Levischaffer F, Arnon R, Fishelson Z 1986. *Schistosoma mansoni*: killing of transformed schistosomula by the alternative pathway of human-complement. *Experimental Parasitology* 61: 86-94.
- Markiewski MM, Nilsson B, Ekdahl KN, Mollnes TE, Lambris JD 2007. Complement and coagulation: strangers or partners in crime? *Trends in Immunology* 28: 184-192.
- Mbow ML, Bleyenbergh JA, Hall LR, Titus RG 1998. *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. *Journal of Immunology* 161: 5571-5577.

- McConville MJ, Turco SJ, Ferguson MAJ, Sacks DL 1992. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *Embo Journal* 11: 3593-3600.
- Menon JN, Bretscher PA 1996. Characterization of the immunological memory state generated in mice susceptible to *Leishmania major* following exposure to low doses of *L. major* and resulting in resistance to a normally pathogenic challenge. *European Journal of Immunology* 26: 243-249.
- Meri T, Jokiranta TS, Hellwage J, Bialonski A, Zipfel PF, Meri S 2002. *Onchocerca volvulus* microfilariae avoid complement attack by direct binding of factor H. *Journal of Infectious Diseases* 185: 1786-1793.
- Modi GB, Tesh RB 1983. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus-papatasi* (Diptera : Psychodidae) in the laboratory. *Journal of Medical Entomology* 20: 568-569.
- Morley BJ, Walport MJ 1999. Complement. London: *Factsbook Academic Press*.
- Morris RV, Shoemaker CB, David JR, Lanzaro GC, Titus RG 2001. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *Journal of Immunology* 167: 5226-5230.
- Mosser DM, Edelson PJ 1987. The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. *Nature* 327: 329-331.
- Norris KA, Harth G, So M 1989. Purification of a *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein which elicits lytic antibodies. *Infection and Immunity* 57: 2372-2377.
- Norsworthy NB, Sun JR, Elnaiem D, Lanzaro G, Soong L 2004. Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulation interleukin-10 production. *Infection and Immunity* 72: 1240-1247.

- Nunes AC, Almeida-Campos FR, Horta MF, Ramalho-Pinto FJ 1997. *Leishmania amazonensis* promastigotes evade complement killing by interfering with the late steps of the cascade. *Parasitology* 115: 601-609.
- Nunes AC, Ramalho-Pinto RJ 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 Journal of Medical and Biological Research* 29: 1633-1640.
- Nunn MA, Sharma A, Paesen GC, Adamson S, Lissina O, Willis AC, Nuttall PA 2005. Complement inhibitor of C5 activation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Journal of Immunology* 174: 2084-2091.
- Oliveira F, Kamhawi S, Seitz AE, Pham VM, Guigal PM, Fischer L, Ward J, Valenzuela JG 2006. From transcriptome to immunome: Identification of DTH inducing proteins from a *Phlebotomus ariasi* salivary gland cDNA library. *Vaccine* 24: 374-390.
- Paranhos-Silva M, Oliviera GGS, Reis EA, Menezes RMC, Fernandes O, Sherlock I, Gomes RBB, Pontes-de-Carvalho LC, Dos-Santos WLC 2003. A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with *Leishmania chagasi* in the presence or absence of sand fly saliva. *Veterinary Parasitology* 114: 97-111.
- Pimenta PFP, Saraiva EMB, Rowton E, Modi GB, Garraway LA, Beverley SM, Turco SJ, Sacks DL 1994. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 9155-9159.
- Pohl DA, Gibbons JJ, Tsai CC, Roodman ST 1980. Isolation and purification of C1q from plasma. *Journal of Immunological Methods* 36: 13-27
- Ramalho-Ortigao JM, Kamhawi S, Joshi MB, Reynoso D, Lawyer PG, Dwyer DM, Sacks DL, Valenzuela JG 2005. Characterization of a blood activated chitinolytic

system in the midgut of the sand fly vectors *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. *Insect Molecular Biology* 14: 703-712.

Ramasamy R 1998. Molecular basis for evasion of host immunity and pathogenesis in malaria. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 1406: 10-27.

Ribeiro JMC 1987. *Ixodes dammini*: salivary anti-complement activity. *Experimental Parasitology* 64: 347-353.

Ribeiro JMC 1995. Blood-feeding arthropods - live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infectious Agents and Disease-Reviews Issues and Commentary* 4: 143-152.

Ribeiro JMC, Francischetti IMB 2003. Role of arthropod saliva in blood feeding: Sialome and post-sialome perspectives. *Annual Review of Entomology* 48: 73-88.

Ribeiro JMC, Modi GB, Tesh RB 1989. Salivary apyrase activity of some old-world phlebotomine sand flies. *Insect Biochemistry* 19: 409-412.

Ribeiro JMC, Rossignol PA, Spielman a 1986. Blood-finding strategy of a capillary-feeding sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology* 83: 683-686.

Ribeiro JMC, Rowton ED, Charlab R 2000. Salivary amylase activity of the phlebotomine sand fly, *Lutzomyia longipalpis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30: 271-277.

Ribeiro JMC, Vachereau A, Modi GB, Tesh RB 1989. A novel vasodilatory peptide from the salivary-glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Science* 243: 212-214.

Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD 2010. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature Immunology* 11: 785-797.

- Rogers ME, Chance ML, Bates PA 2002. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology* 124: 495-507.
- Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MAJ, Bates PA 2004. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 430: 463-467.
- Rogers ME, Hajmova M, Joshi MB, Sadlova J, Dwyer DM, Volf P, Bates PA 2008. *Leishmania* chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. *Cellular Microbiology* 10: 1363-1372.
- Rogers ME, Sizova OV, Ferguson MAJ, Nikolaev AV, Bates PA 2006. Synthetic glycovaccine protects against the bite of *Leishmania*-infected sand flies. *Journal of Infectious Diseases* 194: 512-518.
- Rogers M, Kropf P, Choi BS, Dillon R, Podinovskaia M, Bates PA, Mueller I 2009. Proteophosphoglycans regurgitated by *Leishmania*-infected sand flies target the l-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival. *Plos Pathogens* 5.
- Rohousova I, Volf P 2006. Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. *Folia Parasitologica* 53: 161-171.
- Roosendaal R, Carroll MC 2007. Complement receptors CD21 and CD35 in humoral immunity. *Immunological Reviews* 219: 157-166.
- Sacks DL, Modi G, Rowton E, Spath G, Epstein L, Turco SJ, Beverley SM 2000. The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 406-411.
- Sacks D, Noben-Trauth N 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews Immunology* 2: 845-858.

- Santos VC, Araujo RN, Machado LAD, Pereira MH, Gontijo NF 2008. The physiology of the midgut of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva 1912): pH in different physiological conditions and mechanisms involved in its control. *Journal of Experimental Biology* 211: 2792-2798.
- Schroeder H, Daix V, Gillet L, Vanderplasschen A, Renauld JC 2007. The paralogous salivary anti-complement proteins IRAC I and IRAC II encoded by *Ixodes ricinus* ticks have broad and complementary complement of inhibitory activities against the different host species. *Microbes and Infection* 9: 247-250.
- Schroeder H, Skelly PJ, Zipfel PF, Losson B, Vanderplasschen A 2009. Subversion of complement by hematophagous parasites. *Developmental and Comparative Immunology* 33: 5-13.
- Schuijt TJ, Hovius JWR, van Burgel ND, Ramamoorthi N, Fikrig E, van Dam AP 2008. The tick salivary protein Salp15 inhibits the killing of serum-sensitive *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates. *Infection and Immunity* 76: 2888-2894.
- Shakarian AM, Dwyer DM 2000. Pathogenic *Leishmania* secrete antigenically related chitinases which are encoded by a highly conserved gene locus. *Experimental Parasitology* 94: 238-242.
- Silva EE, Clarke MW, Podesta RB 1993. Characterization of a C3 receptor on the envelope of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology* 151: 7057-7066.
- Sim RB, Dodds AW 1997. The complement system: an introduction. In: Dodds AW, Sim RB (ed.) *Complement: a practical approach*. Oxford University Press., Cap 1, p.1-18.
- Sim RB, Laich A 2000. Serine proteases of the complement system. *Biochemical Society Transactions* 28: 545-550.
- Sjoberg AP, Trouw LA, Blom AM 2009. Complement activation and inhibition: a delicate balance. *Trends in Immunology* 30: 83-90.

- Soares CAG, Lima CMR, Dolan MC, Piesman J, Beard CB, Zeidner NS 2005. Capillary feeding of specific dsRNA induces silencing of the Isac gene in nymphal *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Molecular Biology* 14: 443-452.
- Soares RPP, Turco SJ 2003. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera : Psychodidae : phlebotominae): a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 75: 301-330.
- Soltys J, Kusner LL, Young A, Richmonds C, Hatala D, Gong B, Shanmugavel V, Kaminski HJ 2009. Novel complement inhibitor limits severity of experimentally myasthenia gravis. *Annals of Neurology* 65: 67-75.
- Strainic MG, Liu J, Huang D, An F, Lalli PN, Muqim N, Shapiro VS, Dubyak GR, Heeger PS, Medof ME 2008. Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4(+) T cells. *Immunity* 28: 425-435.
- Suchitra S, Joshi P 2005. Characterization of *Haemonchus contortus* calreticulin suggests its role in feeding and immune evasion by the parasite. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1722: 293-303.
- Suresh M, Molina H, Salvato MS, Mastellos D, Lambris JD, Sandor M 2003. Complement component 3 is required for optimal expansion of CD8 T cells during a systemic viral infection. *Journal of Immunology* 170: 788-794.
- Sutterwala FS, Rosenthal LA, Mosser DM 1996. Cooperation between CR1 (CD35) and CR3 (CD11b/CD18) in the binding of complement-opsonized particles. *Journal of Leukocyte Biology* 59: 883-890.

- Tambourgi DV, Kipnis TL, Dasilva WD, Joiner KA, Sher A, Heath S, Hall BF, 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: 3656-3663.
- Tang YS, Ward R. D 1998. Stomodaeal valve ultrastructure in the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera : Psychodidae). *Medical and Veterinary Entomology* 12: 132-135.
- Tavares NM, Silva RA, Costa DJ, Pitombo MA, Fukutani KF, Miranda JC, Valenzuela JG, Barral A, de Oliveira CI, Barral-Netto M, Brodskyn C 2011. *Lutzomyia longipalpis* saliva or salivary protein LJM19 protects against *Leishmania braziliensis* and the saliva of its vector, *Lutzomyia intermedia*. *Plos Neglected Tropical Diseases* 5.
- Teixeira C, Gomes R, Collin N, Reynoso D, Jochim R, Oliveira F, Seitz A, Elnaiem DE, Caldas A, de Souza AP, Brodskyn CI, de Oliveira CI, Mendonca I, Costa C.H, Volf P, Barral A, Kamhawi S, Valenzuela JG 2010. Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum chagasi* in Latin America. *Plos Neglected Tropical Diseases* 4.
- Theodos CM, Ribeiro JMC, Titus RG 1991. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. *Infection and Immunity* 59: 1592-1598.
- Titus RG 1998. Salivary gland lysate from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* suppresses the immune response of mice to sheep red blood cells in vivo and concanavalin A in vitro. *Experimental Parasitology* 89: 133-136.
- Titus RG, Bishop JV, Mejia JS 2006. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunology* 28: 131-141.

- Titus RG, Ribeiro JMC 1988. Salivary-gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 239: 1306-1308.
- Toney DM, Marcianocabral F 1994. Membrane vesiculation of *Naegleria fowleri* amebas as a mechanism for resisting complement damage. *Journal of Immunology* 152: 2952-2959.
- Tyson K, Elkins C, Patterson H, Fikrig E, de Silva A 2007. Biochemical and functional characterization of Salp20, an *Ixodes scapularis* tick salivary protein that inhibits the complement pathway. *Insect Molecular Biology* 16: 469-479.
- Tyson KR, Elkins C, de Silva AM 2008. A novel mechanism of complement inhibition unmasked by a tick salivary protein that binds to properdin. *Journal of Immunology* 180: 3964-3968.
- Valenzuela JG, Belkaid Y, Garfield MK, Mendez S, Kamhawi S, Rowton ED, Sacks DL, Ribeiro JMC 2001. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: Characterization of a protective salivary protein. *Journal of Experimental Medicine* 194: 331-342.
- Valenzuela JG, Charlab R, Mather TN, Ribeiro JMC 2000. Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *Journal of Biological Chemistry* 275: 18717-18723.
- Valenzuela JG, Garfield M, Rowton ED, Pham VM 2004. Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*. *Journal of Experimental Biology* 207: 3717-3729.
- Volf P, Hajmova M, Sadlova J, Votypka J. 2004. Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. *International Journal for Parasitology* 34: 1221-1227.

- Wallbanks KR, Moore JS, Bennett LR, Soren R, Molyneux DH, Carlin JM, Perez JE 1991. Aphid derived sugars in the neotropical sandfly: *Lutzomyia peruensis*. *Tropical Medicine and Parasitology* 42: 60-62.
- Whaley K, North J 1997 Haemolytic assays for whole complement activity and individual components, In: Dodds A, Sim RB (Ed). *Complement a Pratical Approach*. Oxford University Press. cap 2, p. 19-47.
- Wheat WH, Pauken KE, Morris RV, Titus RG 2008. *Lutzomyia longipalpis* salivary peptide maxadilan alters murine dendritic cell expression of CD80/86, CCR7, and cytokine secretion and reprograms dendritic cell-mediated cytokine release from cultures containing allogeneic T cells. *Journal of Immunology* 180: 8286-8298.
- Willians P 1989. Patterns in the geographical distrubution of members of the genus *Lutzomyia*. *Contributions to the Knoledge of Diptera*. 1: 455-502.
- Young DG, Duncan MA 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera, Psychodidae). *Mem Am Entomol Inst* 54: 871-881.
- Xu X, Oliveira F, Chang BW, Collin N, Gomes R, Teixeira C, Reynoso D, Pham VM, Elnaiem DE, Kamhawi S, Ribeiro JMC, Valenzuela JG, Andersen JF 2011. Structure and function of a "yellow" protein from saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* that confers protective immunity against *Leishmania major* infection. *Journal of Biological Chemistry* 286: 32383-32393.
- Zhang X, Kimura Y, Fang C, Zhou L, Sfyroera G, Lambris JD, Wetsel RA, Miwa T, Song WC 2007. Regulation of Toll-like receptor-mediated inflammatory response by complement in vivo. *Blood* 110: 228-236.