

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

**Atividade lítica pelo sistema complemento em promastigotas de  
*Leishmania (Leishmania) infantum* frente a componentes salivares  
de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae)**

ALEXANDRE ALVES DE SOUSA NASCIMENTO

BELO HORIZONTE  
FEVEREIRO / 2011

ALEXANDRE ALVES DE SOUSA NASCIMENTO

**Atividade lítica pelo sistema complemento em promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* frente a componentes salivares de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Departamento de Parasitologia – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Parasitologia.

**Área de concentração:** Entomologia

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

**Co-orientador:** Dr. Ricardo Toshio Fujiwara (ICB/UFMG)

BELO HORIZONTE  
FEVEREIRO / 2011

043

Nascimento, Alexandre Alves de Sousa.

Atividade lítica pelo sistema complemento em promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* frente a componentes salivares de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera : Psychodidae)

[manuscrito] / Alexandre Alves de Sousa Nascimento. – 2011.

61 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Nelder de Figueiredo Gontijo. Co-orientador: Ricardo Toshio Fujiwara.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. *Leishmania infantum*. 2. *Lutzomyia longipalpis*. 3. Ativação do complemento. 4. Saliva - Teses. I. Gontijo, Nelder de Figueiredo. II. Fujiwara, Ricardo Toshio. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU:576.88/.89

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, e por ter sempre abençoado o meu caminho, assim como todos os meus sonhos.

À minha mãe, pelo amor, pelo exemplo e por nunca ter hesitado em apoiar os meus planos, os meus desejos e até as minhas idéias “loucas”.

Ao meu pai, que agradecerei eternamente por, em vida, ter me mostrado com o seu exemplo, o valor da honestidade, da humildade e do amor à família.

Aos meus irmãos, Sandra e Alex, pelo apoio, confiança e sempre terem acreditado no meu potencial.

Aos meus padrinhos, Mauro e Valdelice, pela ajuda, carinho e por me darem a certeza de que as minhas conquistas são, para eles, um motivo de grande orgulho e felicidade.

À tia Dorinha, pelo amor doado desde o início da minha vida.

A todos da minha família que me apoiaram, torceram e ajudaram nessa conquista.

Ao meu orientador, professor Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo, por sua orientação, confiança, sabedoria, paciência e pelo seu exemplo de dedicação à Ciência.

Ao meu co-orientador, professor Dr. Ricardo Toshio Fujiwara, por sua valiosa contribuição, pela oportunidade e confiança.

Ao professor Dr. Marcos Horácio Pereira, por sua colaboração, ajuda e (até mesmo) por suas manifestações “sinceras” de carinho ao meu querido Piauí.

A todos do laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos do Departamento de Parasitologia – ICB – UFMG, pela paciência, pelo aprendizado e pela oportunidade, em especial aos alunos Pedro Henrique Gazzinelli Guimarães e Jacqueline Araújo Fiúza, pela ajuda dispensada na preparo e realização de alguns experimentos.

Ao laboratório de Entomologia Médica do Instituto de Pesquisa René Rachou – Fiocruz/MG, em especial ao professor Dr. Rodrigo Soares e a aluna Junara Miranda Coelho, pela ajuda.

Ao laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia – ICB – UFMG, em especial à professora Dra. Maria Norma Melo e a Soraia de Oliveira Silva, pela valiosa contribuição e dicas com os parasitos utilizados na realização deste trabalho.

Ao laboratório de Sorologia do Departamento de Parasitologia – ICB – UFMG, em especial ao aluno Sidney Magno da Silva pela ajuda com o soro de animais infectados.

Ao programa de Pós-Graduação em Parasitologia do ICB – UFMG e a todos os seus funcionários, pela grande oportunidade de realização deste trabalho, e em especial à Sumara Aparecida, pelos auxílios e pelo carinho.

Aos professores do Departamento de Parasitologia – ICB – UFMG, pela importante contribuição para a minha formação.

Aos amigos que fazem (ou fizeram) parte do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH): Adriana Coelho, André, Annalice, Antonio, Bruno, Camila, Cássio, Ceres Luciana, Dimitri, Fernanda, Iancor, Kleber, Kolyvan, Luciana, Rafaela, Rafaello, Ricardo, “Rivaldão”, Vânia e Vladimir, pela agradabilíssima companhia, o que me deixa bastante feliz nessa nossa “segunda casa”.

Ao amigo e técnico, César Nonato, pela sua ajuda fundamental na realização deste e de todos os demais trabalhos realizados no LFIH.

Aos amigos do Departamento de Parasitologia – ICB – UFMG, pela torcida e amizade, em especial ao amigo Dr. Andrey José de Andrade, pelo inegável apoio, cumplicidade e por ter dividido comigo grandes momentos de alegria em BH (essa “roça grande!”).

À eterna turma 9.8: Angeliquinha, Emilia, Fernando, Laila, Lanuze, Letícia, Luíza, Pedro e Rafa, pela maravilhosa convivência e me ensinarem que sempre é possível se tirar algo de divertido dos momentos de estresse.

Aos amigos de BH, pela companhia, por compartilharem comigo os momentos de alegria e pelo apoio nos momentos difíceis.

A todos os amigos de Teresina, em especial a Deyse, Juliana e Maurício, por terem compartilhado comigo os sonhos e as expectativas de uma vida nova, num lugar novo.

Ao CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro e concessão da bolsa, possibilitando a execução deste trabalho.

À minha mãe, Francisca das Chagas A. de  
S. Nascimento, pois da sua força faço a  
minha força, para poder ser feliz e realizar  
os sonhos que almejo na minha vida.

*“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho que se tem, ou que seus planos nunca vão dar certo, ou que você nunca vai ser alguém. Quem acredita sempre alcança!”*

(Renato Russo)

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição geográfica da leishmaniose visceral no Velho e Novo mundo\_\_\_\_\_ **01**
- Figura 2.** Ciclo biológico de *Leishmania* no inseto vetor e no hospedeiro vertebrado\_\_\_\_\_ **05**
- Figura 3.** Representação esquemática das vias de ativação do sistema complemento e seus mecanismos efetores \_\_\_\_\_ **09**
- Figura 4.** Interação macrófago, complemento e promastigotas de *Leishmania* \_\_\_\_ **13**
- Figura 5.** Efeitos da saliva do *Lutzomyia longipalpis* no hospedeiro vertebrado \_\_\_\_ **21**
- Figura 6.** Curva de crescimento de *Leishmania infantum* (BH-46) em Grace's Insect Medium\_\_\_\_\_ **27**
- Figura 7.** Representação esquemática do ensaio de lise de promastigotas de *L. infantum* pelo complemento na presença (ou não) de extrato de glândula salivar de *L. longipalpis* \_\_\_\_\_ **30**
- Figura 8.** Cinética de lise pelo complemento humano em promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária de desenvolvimento, empregando-se soro humano em diferentes concentrações, na ausência de extrato de glândula salivar de *L. longipalpis* \_\_\_\_\_ **34**
- Figura 9.** Cinética de lise pelo complemento humano em promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária de desenvolvimento, utilizando soro à 10%, empregando-se quantidades diferentes de extrato de glândula salivar de *L. longipalpis* \_\_\_\_\_ **35**

**Figura 10.** Cinética de lise pelo complemento humano em promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária de desenvolvimento, utilizando soro à 5%, empregando-se quantidades diferentes de extrato de glândula salivar de *L. longipalpis* \_\_\_\_\_ **36**

**Figura 11.** Comparação da atividade lítica pelo complemento humano em formas promastigotas de *L. infantum* em função da concentração do soro e da quantidade de extrato de glândula salivar de *L. longipalpis* considerando o tempo final de 6 minutos \_\_\_\_\_ **36**

**Figura 12.** Cinética de lise em promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária de desenvolvimento pelo complemento de cães não infectados utilizando soro à 10% \_\_\_\_\_ **37**

**Figura 13.** Cinética de lise em promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária de desenvolvimento pelo complemento de cães infectados por *L. infantum* utilizando soro à 10% \_\_\_\_\_ **37**

**Figura 14.** Avaliação da ligação do componente C3b do soro humano normal a 5% na membrana plasmática de *L. infantum* na presença, na ausência de saliva e utilizando soro inativado \_\_\_\_\_ **38**

**Figura 15.** Avaliação da ligação do componente C3b do soro de cães infectados na membrana plasmática de *L. infantum* utilizando soro a 5% e soro inativado \_\_\_\_\_ **39**

**Figura 16.** Avaliação da ligação do componente C3b do soro de cães não infectados na membrana plasmática de *L. infantum* utilizando soro a 5% e soro inativado \_\_\_\_\_ **39**

**Figura 17.** Concentração de proteínas em extrato de glândula salivar de *L. longipalpis* de acordo com a idade \_\_\_\_\_ **40**

**Figura 18.** Concentração de proteínas em extrato de glândula salivar de *L. longipalpis* de acordo com a idade e dieta das fêmeas \_\_\_\_\_ **41**

**Figura 19.** Valor médio da concentração de proteínas em extrato de glândula salivar de *L. longipalpis* em fêmeas de 3 a 5 dias de emergência com e sem repasto sanguíneo \_\_\_\_\_ **41**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ADP:** Adenosina difosfato

**AMP:** Adenosina monofosfato

**ATP:** Adenosina trifosfato

**BSA:** Soro de albumina bovina

**cDNA:** DNA complementar

**CR1:** Receptor do complemento tipo 1

**CR3:** Receptor do complemento tipo 3

**CR4:** Receptor do complemento tipo 4

**gp63:** Metaloproteinase de 63kD

**IFN- $\gamma$ :** Interferon-gama

**IgE:** Imunoglobulina tipo E

**IgG:** Imunoglobulina tipo G

**IgM:** Imunoglobulina tipo M

**IL-4:** Interleucina-4

**IL-12:** Interleucina-12

**iNOS:** Óxido nítrico sintetase induzível

**IRF-1:** Fator de regulação de interferon-1

**LPG:** Lipofosfoglicano

**LTA:** Leishmaniose tegumentar americana

**LV:** Leishmaniose visceral

**LVC:** Leishmaniose visceral canina

**MAC:** Complexo de ataque a membrana

**MASPs:** Serino proteases associadas à MBL

**MBL:** Lectina ligante da manose

**NK:** célula "*natural killer*"

**NO:** Óxido nítrico

**OMS:** Organização Mundial de Saúde

**PAMPs:** Padrões moleculares de reconhecimento de patógenos

**PBMC:** Células mononucleares do sangue periférico

**pH:** Potencial hidrogenionico

**PPG:** Proteofosfoglicano

**PRRs:** Receptores de reconhecimento padrão

**PSA:** Antígeno de superfície de promastigota

**RIFI:** Reação de imunofluorescência indireta

**SFB:** Soro fetal bovino

**SFM:** Sistema mononuclear fagocitário

**SHN:** Soro humano normal

**Th1:** Linfócito T helper do tipo 1

**Th2:** Linfócito T helper do tipo 2

**TNF- $\alpha$ :** Fator de necrose tumoral-alfa

## ABSTRACT

Since the first reports about visceral leishmaniasis in Brazil, the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has been incriminated as the main vector of *Leishmania infantum*, the causative agent of visceral leishmaniasis in the Americas. The saliva of the vector modulates the host immune response at different levels, including inhibition of the complement activation, making it a critically important component in the process of disease transmission. This study aimed to show the importance of salivary inhibitors of the complement of *L. longipalpis* for the survival of *L. infantum* promastigotes when exposed to both, human and dog serum. The amount of saliva released by females in the bite site during blood feeding was also estimated. Considering that opsonization with C3b seems important for *Leishmania* phagocytosis in a manner that avoid macrophages activation, we investigated the deposition of C3b on the parasite surface in the presence or absence of saliva by indirect immunofluorescence. Stationary phase promastigotes were partially sensitive to the normal human serum (5% of serum killed almost 50% of the promastigotes). We observed a significant reduction of cell death when promastigotes were exposed to the normal human serum in the presence of saliva. This effect was dependent of saliva concentration. Despite showing partial sensitivity to human complement, promastigotes presented great resistance to lysis by complement of infected dogs and uninfected ones. For all hosts, C3b deposition was efficient in the presence and absence of saliva, showing that, while diminishing the lytic action by normal human serum, saliva does not prevent the promastigote opsonization by complement. Since saliva favors the survival of *L. infantum* promastigotes when exposed to the human serum, it could be critical in the process of transmitting the parasite to the man. Altogether, our results could explain why dogs are more susceptible to be infected by *L. infantum* than humans.

Key words: *Leishmania infantum*; *Lutzomyia longipalpis*; complement; saliva

## RESUMO

Desde os primeiros relatos de leishmaniose visceral no Brasil, o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* tem sido incriminado como o principal vetor de *Leishmania infantum*, agente causador da leishmaniose visceral nas Américas. A saliva do vetor modula a resposta imune do hospedeiro em diferentes níveis, incluindo a inibição da ativação do complemento, tornando-se um componente de grande importância no processo de transmissão desta parasitose. O presente trabalho teve como objetivo mostrar a importância dos inibidores do complemento salivares de *L. longipalpis* para a sobrevivência de promastigotas de *L. infantum* quando expostas ao soro humano ou de cães. A quantidade de saliva liberada pelas fêmeas durante o repasto sanguíneo também foi estimada. Considerando que a opsonização com C3b parece ser importante para a fagocitose de *Leishmania* de uma maneira que evite a ativação de macrófagos, investigamos a deposição de C3b na superfície do parasita na presença ou ausência de saliva por imunofluorescência indireta. Promastigotas em fase estacionária foram parcialmente sensíveis ao soro humano normal (5% de soro matou quase 50% das promastigotas). Observamos uma redução significativa na morte celular quando as promastigotas foram expostas ao soro humano normal na presença de saliva. Este efeito foi dependente da concentração de saliva. Embora apresentem relativa sensibilidade ao complemento humano, as promastigotas apresentaram grande resistência à lise pelo complemento de cães infectados e não infectados. Para todos os hospedeiros, a deposição de C3b foi eficiente na presença e ausência de saliva, mostrando que, embora diminuindo a ação lítica pelo soro humano normal, a saliva não impede a opsonização das promastigotas pelo complemento. Como a saliva favorece a sobrevivência das promastigotas de *L. infantum* quando expostas ao soro humano, ela poderia ser fundamental no processo de transmissão do parasita ao homem. De modo geral, nossos resultados poderiam explicar por que os cães são mais suscetíveis a serem infectados por *L. infantum* que os humanos.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*; *Lutzomyia longipalpis*; complemento; saliva

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
1.1. As Leishmanioses	01
1.2. O Ciclo Biológico de <i>Leishmania</i>	04
1.3. O sistema complemento	06
1.3.1. A via clássica do complemento	07
1.3.2. A via das lectinas	07
1.3.3. A via alternativa do complemento	08
1.3.4. Mecanismos efetores e de regulação do sistema complemento	08
1.4. Interação <i>Leishmania</i> – hospedeiro vertebrado	10
1.4.1. Imunologia na infecção por <i>Leishmania</i>	10
1.4.2. A interação <i>Leishmania</i> – macrófago nas leishmanioses	11
1.4.3. <i>Leishmania</i> , complemento e mecanismos de evasão do parasito	14
1.5. A saliva de flebotomíneos e seu envolvimento na transmissão de <i>Leishmania</i>	17
1.5.1. O processo hematofágico	17
1.5.2. A saliva e alguns de seus componentes	18
1.5.3. Saliva e o sistema imune do hospedeiro	19
1.5.4. A saliva de flebotomíneos na proteção do hospedeiro vertebrado	22
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>25</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
3.5. Objetivo geral	26
3.6. Objetivos específicos	26
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>27</b>
4.1. Parasitos	27
4.2. Flebotomíneos <i>Lutzomyia longipalpis</i>	28
4.3. Extração de saliva	28
4.4. Colheita e estocagem do soro	28

4.5.	Avaliação da lise pelo complemento em <i>Leishmania infantum</i> por citometria de fluxo _____	29
4.5.1.	Preparo dos parasitos _____	29
4.5.2.	Cinética de lise das formas promastigotas em contato com o soro do hospedeiro _____	30
4.6.	Avaliação qualitativa da fixação do componente C3b do complemento à membrana plasmática de <i>Leishmania infantum</i> por reação de imunofluorescência _____	31
4.7.	Quantificação de proteínas salivares em extrato de glândulas salivares de <i>L. longipalpis</i> _____	32
4.8.	Análises estatísticas _____	33
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> _____	<b>34</b>
5.1.	Cinética de lise em promastigotas de <i>L. infantum</i> por fatores do soro humano normal _____	34
5.2.	Cinética de lise em promastigotas de <i>L. infantum</i> por fatores do soro cães infectados e não infectados _____	37
5.3.	Avaliação qualitativa da ligação do componente C3b na membrana plasmática de <i>L. infantum</i> _____	38
5.4.	Quantificação de proteínas salivares totais _____	40
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> _____	<b>42</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> _____	<b>49</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> _____	<b>50</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. As Leishmanioses

As leishmanioses correspondem a um conjunto de doenças causadas por uma variedade de espécies de protozoários parasitos pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania* (Ross, 1903), constituindo um sério problema de saúde pública em várias regiões do mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que aproximadamente 350 milhões de pessoas encontram-se expostas ao risco de contrair a doença (WHO, 2010).

As leishmanioses estão distribuídas em 88 países, dos quais 72 são considerados países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (Fig. 1). São endêmicas nas regiões tropicais da África e Américas, na Índia e em regiões do Mediterrâneo e Sudoeste Asiático. Como a notificação é compulsória em apenas 32 dos países afetados, um substancial número de casos nunca é relatado. De fato, 2 milhões de novos casos, sendo 1,5 milhão para Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e 500.000 para Leishmaniose Visceral (LV), ocorrem anualmente, com um número estimado em 12 milhões de pessoas atualmente infectadas no mundo (WHO, 2010).

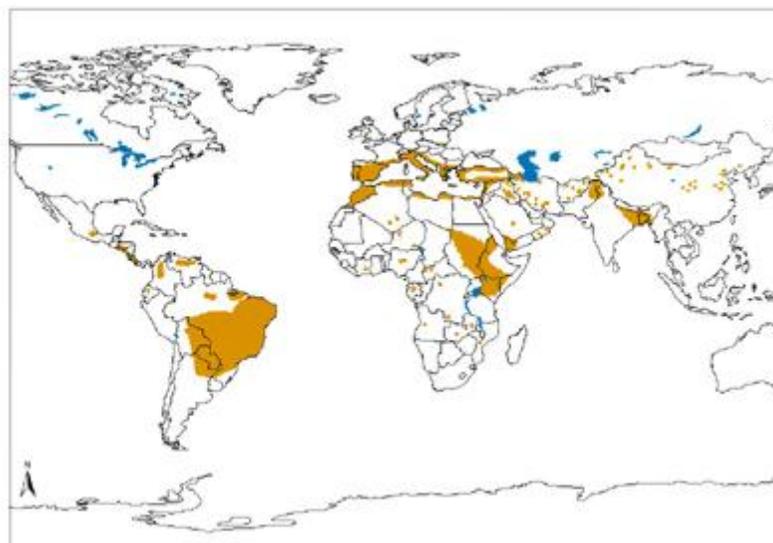


Figura 1. Distribuição geográfica da leishmaniose visceral no Velho e Novo mundo (WHO, 2010)

As leishmanioses manifestam-se sob diferentes formas clínicas devido, sobretudo, à variedade de parasitos que afetam a população humana. A LV, causada pela *Leishmania donovani* (Laveran & Mesnil, 1903) no Velho Mundo e *Leishmania infantum* (Nicolle, 1908) tanto no Velho como no Novo Mundo, é a forma mais grave que, se não tratada, pode levar a morte. Um variado número de espécies de *Leishmania* causam as leishmanioses cutânea ou cutâneomucosa, sendo responsáveis por uma considerável morbidade em focos endêmicos da doença (Gramiccia & Gradoni 2005).

Na natureza, todas as espécies de *Leishmania* são transmitidas aos seus hospedeiros vertebrados por fêmeas de insetos dípteros, pertencentes à família Psychodidae (Subfamília: Phlebotominae), conhecidos como flebotomíneos. Estes, por sua vez, estão distribuídos por quase todas as regiões do mundo, sendo encontrados sob as mais diversas condições climáticas e de altitude, em ambientes silvestres, rurais e urbanos. São representados por mais de 800 espécies, das quais muitas são importantes vetoras de patógenos humanos. A subfamília Phlebotominae inclui seis gêneros: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius* no Velho Mundo e *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya* no Novo Mundo (Young & Duncan 1994).

Existem mais de 400 espécies de *Lutzomyia* descritas, porém a maioria delas sem importância na epidemiologia das leishmanioses. Das espécies descritas, apenas 44 são vetores conhecidos ou suspeitos de transmitir *Leishmania* para o homem (Young & Duncan 1994; Williams & Dias 2005).

Desde os primeiros relatos de LV no Brasil na década de 30, o flebotomíneo *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) tem sido incriminado como o principal vetor de *L. infantum* em nosso país e nas Américas (Chagas 1936; Lainson et al. 1977). Esta espécie de flebotomíneo possui uma ampla, embora descontínua distribuição geográfica, podendo ser encontrada desde o sul do México até o norte da Argentina (Young & Duncan 1994). No Brasil, até pouco tempo atrás, havia o registro da sua presença nas regiões Norte, Nordeste, Centro-oeste e Sudeste. Recentemente, Souza e colaboradores (2009) relataram o primeiro registro do aparecimento de *L. longipalpis* na região Sul, no estado do Rio Grande do Sul.

Cerca de 22 espécies de *Leishmania* são encontradas infectando o homem e destas, 15 ocorrem nas Américas (Shaw 1994; Silveira et al. 2002). *Leishmania infantum* é a espécie responsável pela LV (calazar), uma zoonose que tem como reservatório primário algumas espécies de canídeos Sul-Americanos, pode atingir cães, bem como provocar a forma visceral generalizada em humanos (Chagas et al. 1938).

O Brasil está enfrentando atualmente um processo de expansão e urbanização das leishmanioses, com um aumento no número de casos humanos e cães soropositivos em cidades de médio e grande porte (Carvalho et al. 2010). Tanto a LV como a leishmaniose visceral canina (LVC) apresentam grande impacto na saúde pública do Brasil, pois tem o cão doméstico (*Canis familiaris*) como o principal reservatório de *L. infantum* nos focos urbanos e peri-urbanos da doença (Reis et al. 2009).

A principal fonte de infecção por *L. Infantum* em humanos são os cães naturalmente infectados. Presume-se que a maioria dos cães em áreas altamente endêmicas estejam expostos à infecção por *Leishmania* (Baneth e Aroch, 2008). A proporção de cães infectados é muito alta podendo chegar a 80% (Berrahal et al., 1996), porém o espectro da infecção é bastante variável. Enquanto os cães mostrando doença progressiva representam um terço dos cães soropositivos (Fisa et al. 1999), um alto percentual de animais infectados permanecem assintomáticos ou desenvolvem alguns sinais clínicos leves, com resolução ao longo do tempo (Carrillo & Moreno 2009).

A associação entre o estatus clínico de cães naturalmente infectados e o seu papel na infecção de flobotomíneos *L. longipalpis* tem sido avaliado, demonstrando uma alta capacidade de transmissão por cães sintomáticos, embora esta transmissão seja possível também por animais assintomáticos (Travi et al. 2001; Costa-Val et al. 2007). Da mesma forma, o estatus clínico de cães naturalmente infectados mostrou correlacionar-se com a carga parasitária encontrada na pele, medula óssea e baço desses animais (Reis et al. 2006).

Tem sido estimado que pelo menos 2,5 milhões de cães estejam infectados apenas no sudoeste europeu. O número de animais infectados na América do Sul

também é estimado em milhões, existindo altos níveis de infecção em algumas áreas da Venezuela e Brasil, onde a alta prevalência de infecção canina é associada com o elevado risco de doença humana (Baneth et al. 2008).

No Brasil, a LV apresenta comportamento epidemiológico cíclico, com elevação de casos em períodos médios a cada cinco anos, podendo ser observadas diferenças nesse comportamento entre estados e municípios. Em 2007, 20 unidades federadas registraram casos autóctones e, até a década de 90, a região Nordeste correspondeu a 90% dos casos no país. Porém, a doença encontra-se em expansão para outras regiões, de modo que do total de casos do período de 2000 a 2007, 62% ocorreram na região Nordeste, havendo uma expansão gradativa para as regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste, que passaram de 17,1% do total de casos em 2000 para 52% do total de casos em 2007 (MS, 2009).

## **1.2. O Ciclo Biológico de *Leishmania***

Durante seu ciclo de vida, os parasitos alternam entre dois estágios distintos de desenvolvimento: as amastigotas e as promastigotas. No hospedeiro vertebrado, as formas amastigotas de *Leishmania* caracterizam-se pelo seu formato ovóide, com aproximadamente 2,5 a 5µm de diâmetro, flagelo não exteriorizado e habitam as células do sistema mononuclear fagocitário (SMF), principalmente os macrófagos, multiplicando-se no interior do fagolisossomo. As formas promastigotas por sua vez, caracterizam-se por apresentar corpo alongado, medindo entre 14 e 20µm e flagelo livre na sua porção anterior, localizando-se no trato digestivo do inseto vetor (Descoteaux & Turco 1999; Cunningham 2002).

As formas promastigotas são transmitidas aos hospedeiros vertebrados através da picada de fêmeas de flebotomíneos, ou do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) ou do gênero *Lutzomyia* (Novo Mundo). A infecção é iniciada quando os flebotomíneos fazem um repasto sanguíneo em animais doentes (telmatofagia) e ingerem macrófagos infectados com amastigotas. O sangue ingerido passa para o intestino posterior e, em seguida, as leishmânias diferenciam-se em diversos

estágios de desenvolvimento à medida que migram do intestino médio abdominal para a válvula do estomodeu, localizada na região anterior do trato digestivo do vetor e a qual faz uma junção com o intestino anterior (Fig. 2). Cada uma dessas fases (promastigotas procíclicas, nectomonadas, leptomonadas, metacíclicas e haptomonadas) é caracterizada por uma morfologia e alterações funcionais que visam garantir a sua sobrevivência no vetor (Kamhawi 2006).

A virulência é expressa durante a metaciclogênese, um processo no qual formas promastigotas não-infectantes e em divisão transformam-se em formas infectantes e sem capacidade de multiplicação (promastigotas metacíclicas). Estas são encontradas principalmente nas regiões mais anteriores do tubo digestivo e são altamente adaptadas para sobreviver nos hospedeiros mamíferos (Kamhawi 2006).

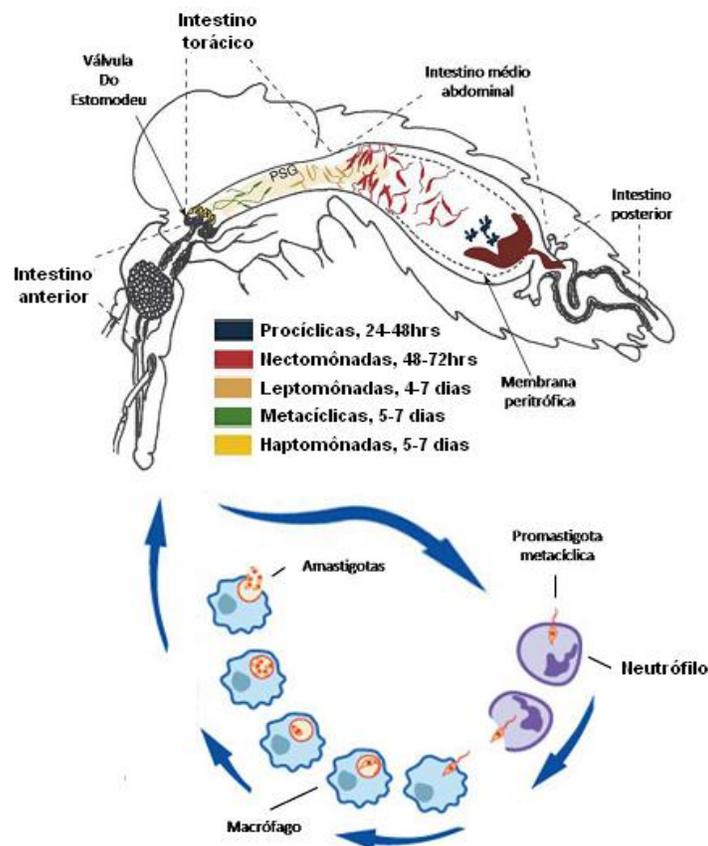


Figura 2. Ciclo biológico de *Leishmania* no inseto vetor e no hospedeiro vertebrado (Modificado de Kamhawi 2006)

Uma vez no hospedeiro vertebrado, os neutrófilos desempenham um importante papel nos momentos iniciais da infecção por *Leishmania*. As promastigotas metacíclicas são fagocitadas por estas células, desencadeando a apoptose desses neutrófilos. Residindo no interior das vesículas apoptóticas, as leishmanias são então fagocitadas por macrófagos (Peters & Sacks 2009). No interior do vacúolo parasitóforo ou fagolisossomo, a fim de evitar a sua degradação, estabelecem condições favoráveis para a sua proliferação. O aumento da temperatura e a diminuição do pH no interior do fagolisossomo fornecem os sinais necessários para a diferenciação das promastigotas em amastigotas. As amastigotas multiplicam-se intensamente, por divisão binária, rompendo os macrófagos infectados e sendo liberadas para infectar macrófagos vizinhos, reiniciando o ciclo (Descoteaux & Turco 1999; Cunningham 2002).

### **1.3. O sistema complemento**

O sistema imunológico dos mamíferos é um notável complexo de processos bioquímicos que permitem, dentre outras funções, a detecção eficaz e repressão de patógenos que ameaçam a saúde do hospedeiro. Dentre os componentes deste sistema, destaca-se o sistema complemento, que liga covalentemente proteínas específicas à superfície de diferentes organismos invasores objetivando promover a fagocitose e/ou a lise desses organismos, sendo então considerado um sistema multicompetente. Esse sistema envolve uma complexa rede de proteínas presentes no soro, livres ou associadas à membrana de células. Podem provocar uma eficiente e regulada resposta imune citolítica e inflamatória contra microrganismos (bactérias, vírus, parasitos), tecidos danificados por processos físicos, químicos ou injúrias neoplásicas, e outras superfícies identificadas como não próprias. O sistema do complemento pode ser ativado através de três principais vias: a via clássica, a via das lectinas e a via alternativa (Fig. 3)(Dunkelberger & Song 2010).

### 1.3.1. A via clássica do complemento

A via clássica do complemento envolve as glicoproteínas C1q, C1r, C1s, e C2-C9. Uma molécula de C1q, duas de C1r, e duas de C1s associam-se na presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  para formar um grande complexo protéico denominado C1 (Sim & Dodds 1997). A via clássica ocorre quando C1q, no complexo com as serino proteases C1r e C1s (o complexo C1), liga-se à região Fc de anticorpos (geralmente IgG1 e IgM) ligados a agentes patogênicos. A ativação autocatalítica de C1r ativa C1s e esta cliva C4 e C2 em fragmentos maiores (C4b, C2a) e menores (C4a, C2b). Os fragmentos maiores associam-se para formar o complexo C4b2a na superfície do patógeno e ganham a capacidade de clivar C3, sendo denominado de C3 convertase. A geração da C3 convertase, que cliva C3 na anafilatoxina C3a e na opsonina C3b, é o ponto para o qual converge toda a ativação do complemento (Janeway et al. 2005; Dunkelberger & Song 2010).

### 1.3.2. A via das Lectinas

A via das lectinas é uma via independente de imunoglobulinas. Diferentemente do reconhecimento de complexos antígeno-anticorpo que ocorre na via clássica, a via das lectinas utiliza receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como as lectinas ligantes de manose (MBL) e ficolinas, para realizar o reconhecimento de estruturas “*nonself*” (Janeway et al. 2005; Dunkelberger & Song 2010). Os PRRs agem sobre poucas estruturas altamente conservadas presentes em um grande número de grupos de microrganismos, referidos como padrões moleculares de reconhecimento de patógenos (PAMPs) (Medzhitov & Janeway 2000). Exemplos de PAMPs incluem endotoxina ou lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas, ácido lipoteicóico de bactérias gram-positivas, e  $\beta$ -glicanos de fungos (Dunkelberger & Song 2010). MBL pode se ligar a carboidratos na parede de bactérias gram-positivas e gram-negativas e fungos, bem como em alguns vírus e parasitos. Semelhante ao complexo C1 da via clássica, MBL forma um complexo com serino proteases denominadas de MASP-1, -2, e -3, que são funcional e estruturalmente

semelhantes (embora não idênticas) ao C1s e C1r, tal que a ligação da MBL à superfícies patogênicas leva a uma ativação das MASP's, à clivagem de C2 e C4, e finalmente, a geração da C3 convertase: C4bC2a (Dunkelberger & Song 2010).

### 1.3.3. A via alternativa do complemento

As proteínas da via alternativa são o fator D, fator B, C3 e C5 – C9 (Sim & Dodds 1997). Esta via é distinta das vias clássica e das lectinas, sendo iniciada pela hidrólise espontânea do C3 (que é muito abundante no plasma) para um análogo de C3b, C3(H<sub>2</sub>O), que por sua vez se liga ao fator B, permitindo a sua clivagem em Bb e Ba através do Fator D e formação inicial da C3 convertase da via alternativa, C3(H<sub>2</sub>O)Bb (Janeway et al. 2005). Esta C3 convertase constitui a base de um circuito de amplificação em que C3(H<sub>2</sub>O)Bb começa a converter C3 em C3b e C3a, de uma forma análoga à C3 convertase (C4bC2a) das vias clássica e das lectinas. O C3b gerado pode ligar-se a superfícies nas proximidades e associar-se com o fator B, que por sua vez pode ser ativado pelo Fator D para formar C3bBb, a C3 convertase predominante da via alternativa (Walport 2001; Dunkelberger & Song 2010). O complexo pode ser ainda estabilizado pela properdina (Fator P), que ajuda a estabilizar a C3 convertase da via alternativa (Hourcade 2008).

### 1.3.4. Mecanismos efetores e de regulação do sistema complemento

A fase final efetora da cascata do complemento será sempre a mesma independente da via inicial de ativação, e culminará com a formação do complexo de ataque à membrana C5b-9 ou MAC. A primeira etapa desta via é a clivagem de C5, com conseqüente formação de C5a e C5b. Uma seqüência de interações não enzimáticas entre C5b, C6, C7, C8 e C9 resulta na formação do MAC. O peptídeo C5b é estabilizado ao formar um complexo com C6 (C5b6). Quando C7 liga-se a esse complexo induz a uma transição do mesmo ao estado hidrofóbico, que permite ao complexo C5b67 inserir-se, firmemente, na camada bilipídica e ligar-se à

molécula de C8, que também se insere na membrana da célula alvo (Ambrósio 2005).

O complexo C5b-8 possui capacidade lítica limitada, mas atua como agente polimerizante de C9. A ligação subsequente de até 12 ou 15 moléculas de C9, seguida da polimerização dessas, forma uma estrutura tubular não homogênea (poliC9), inserida na superfície celular, à qual C5b-8 mantém-se ligado. O potencial lítico do MAC depende de C9 produzir poros grandes suficientes para levar à lise da célula nucleada (Ambrósio 2005).

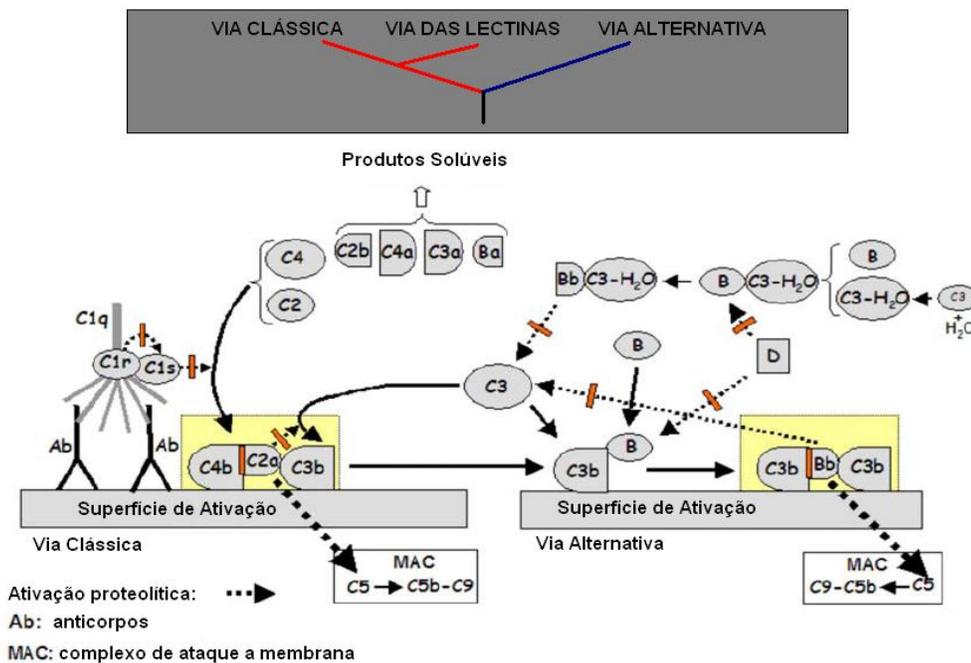


Figura 3. Representação esquemática das vias de ativação do sistema complemento e seus mecanismos efetores (Modificado de Barros et al. 2009)

A regulação do complemento ocorre predominantemente em duas etapas no interior das cascatas: no nível das convertases, tanto em sua formação quanto na sua atividade enzimática, e durante a montagem do MAC (Liszewski et al. 1996). Caso C4b ou C3b se liguem indevidamente à superfície de uma célula do próprio organismo (uma ligação indevida), um sistema de proteção pode ser ativado. A inativação das moléculas que se ligarem indevidamente pode ser feita através da serino protease Fator I, que identifica essas ligações espúrias e destrói essas

moléculas. Além do Fator I existem outros inibidores que evitam a formação desregulada de C3 convertases. O principal exemplo desta categoria de inibidores do complemento é o Fator de decaimento (DAF ou CD55), que serve para inibir a montagem de novas C3 convertases e encurtar a meia-vida das convertases pré-formadas, limitando assim a sua capacidade de continuar a participar na ativação do complemento (Turnberg & Botto 2003; Dunkelberger & Song 2010). Outro controle desempenhado pelo complemento é a inibição da montagem do MAC através de inibidores ligados à membrana (CD59) ou solúveis (vitronectina, proteína S), ajudando a limitar as atividades destrutivas do complemento a alvos apropriados e minimizar a ocorrência de danos teciduais (Turnberg & Botto 2003).

#### **1.4. Interação *Leishmania* – Hospedeiro Vertebrado**

##### 1.4.1. Imunologia na infecção por *Leishmania*

A resposta imune protetora contra *Leishmania* é mediada por células. Os parasitas escapam da resposta imune humoral do hospedeiro residindo em fagolisossomos de células fagocitárias (neutrófilos, macrófagos, etc.). Portanto, os anticorpos parecem ter pouco efeito sobre a infecção e podem estar associados à suscetibilidade/morbidade na infecção por *Leishmania*. Os macrófagos empregam um número variado de estratégias de defesa contra o parasito, indo desde a fagocitose, resultando em uma explosão oxidativa, até a acidificação do vacúolo parasitóforo, formado pela fusão do fagossomo com lisossomos. O ambiente ácido pode promover a desnaturação de proteínas, deixando o parasito suscetível à degradação por hidrolases ácidas (Cunningham 2002).

A infecção por *Leishmania* é caracterizada pelo surgimento de altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* no soro, entretanto o papel desses anticorpos na proteção de pacientes com LV ainda é incerto. Em humanos, uma análise crítica de isotipos de imunoglobulinas específicas anti-*Leishmania* revelou elevados níveis de IgG, IgM, IgE e subclasses de IgG durante a doença (Anam et al. 1999; Atta et al.

2004). IgG não apenas falha no fornecimento de proteção contra este patógeno intracelular, como também contribui para a progressão da doença. A administração passiva de IgG anti-*Leishmania* resultou no aparecimento de grandes lesões em camundongos BALB/c com intensa produção de IL-10 (Miles et al. 2005). Este resultado pode estar correlacionado com o título elevado de anticorpos anti-*Leishmania* durante a fase ativa da doença e a consecutiva queda após o tratamento e cura (Sharma & Singh 2009).

Macrófagos, células dendríticas, citocinas como interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), a interleucina-12 (IL-12) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), e fatores de transcrição tais como o fator de regulação de interferon-1 (IRF-1), são cruciais para a resolução de infecções com todas as espécies de parasitas do gênero *Leishmania* e para uma imunidade protetora de longa duração (Bogdan & Röllinghoff 1998). Células T helper também desempenham um importante papel na resposta imune contra *Leishmania*. A expansão de clones de linfócitos Th1 tem um papel protetor, enquanto a expansão de células Th2 pode causar o agravamento da doença. A produção de IL-12 por células dendríticas e macrófagos faz com que linfócitos T indiferenciados se diferenciem em células do tipo Th1, induzindo a produção de IFN- $\gamma$  pelas células T e *natural killer* (NK). O IFN- $\gamma$  em conjunto com o TNF- $\alpha$ , produzidos pelos macrófagos infectados, ativam o gene da óxido nítrico sintetase (iNOS), resultando na produção de óxido nítrico (NO), que é tóxico para o parasita. Enquanto a expansão de células do tipo Th1 está ocorrendo, a expansão de células Th2 deve ser mantida sob controle. IL-4 regula a diferenciação de células Th2. Este tipo de resposta não é eficaz contra *Leishmania*, pois interfere na produção de IL-12 e IFN- $\gamma$ , inibindo a produção de óxido nítrico (Cunningham 2002).

#### 1.4.2. A interação *Leishmania* - macrófago nas leishmanioses

A fagocitose é uma importante arma no arsenal do sistema imune inato. No entanto, as leishmânias desenvolveram mecanismos bastante eficientes para subverter a atividade microbicida dos macrófagos. A fagocitose é composta por dois

eventos interligados: a interação por meio de uma ligação de baixa afinidade, seguida de uma interação cinética rápida e a internalização seguindo uma ligação de alta afinidade (Handman & Bullen 2002).

As duas grandes famílias de moléculas de superfície de promastigotas, gp63 e lipofosfoglicanos, são consideradas as ligantes principais para fixação aos macrófagos. A gp63 é uma metaloproteinase, a qual é distribuída de forma abundante na superfície de promastigotas e em menor intensidade nas amastigotas. A família de fosfoglicanos compreende os glicolipídios, como o lipofosfoglicano (LPG), e as proteínas fosfoglicosiladas, tais como as fosfatases ácidas e os proteofosfoglicanos (PPG). O lipofosfoglicano é um complexo de glicolipídios, formando uma camada densa sobre toda a superfície das promastigotas (Handman & Bullen 2002).

A *Leishmania* entra nos fagócitos mononucleares por fagocitose mediada por receptores. Os receptores do complemento, CR1 e CR3, desempenham papéis importantes em ambos os processos e podem agir em conjunto para facilitar a ligação e o englobamento do parasito (Handman & Bullen 2002). A interação do parasito com os receptores do complemento ocorre de três formas: (1) na presença de soro, através da ativação do componente C3 e ligação do fragmento C3bi do complemento ao receptor CR3; (2) por uma via independente do soro, através da ligação da protease de superfície gp63 ao receptor CR3, e (3), através da ligação do LPG ao CR3 ou CR1 na superfície do macrófago (Handman 1999).

As promastigotas metacíclicas usam da sua opsonização pelo complemento para ganhar a entrada em macrófagos. O processo de opsonização com C3b e C3bi, que se ligam aos receptores CR1 e CR3, é a forma predominante pela qual promastigotas metacíclicas entram no macrófago (Alexander et al. 1999). Objetivando verificar a importância do receptor CR3 na ligação de espécies de *Leishmania* a macrófagos humanos, alguns experimentos foram realizados e o resultado obtido mostrou que formas promastigotas de *Leishmania* necessitam da ativação do complemento ou mais especificamente da deposição de C3bi na sua superfície para que possam ser fagocitadas pelos macrófagos via receptor CR3 (Mosser et al. 1992). Este método pode proporcionar uma vantagem de

sobrevivência, uma vez que CR1 e CR3 promovem a fagocitose sem disparar a explosão oxidativa. Outra vantagem de usar o receptor CR3 é que ele inibe a produção de IL-12, que é produzida quando a imunidade mediada por células é ativada, protegendo assim as formas promastigotas (Cunningham 2002).

Os receptores CR1 e CR3 e outros, incluindo CR4, o receptor para produtos finais de glicosilação avançada, e o receptor da proteína C-reativa, facilitam a captação das promastigotas pelos macrófagos. A habilidade de usar uma variedade de diferentes receptores torna mais fácil a entrada destas formas no macrófago. Estes receptores também permitem a entrada das promastigotas nas células de Langerhans na epiderme, onde podem transformar-se em amastigotas. Embora os parasitos não possam replicar nessas células, elas podem oferecer um ambiente mais seguro para a transformação em amastigotas, pois não produzem iNOS (iNOS, NOS2), que poderiam matar o parasita (Cunningham 2002).

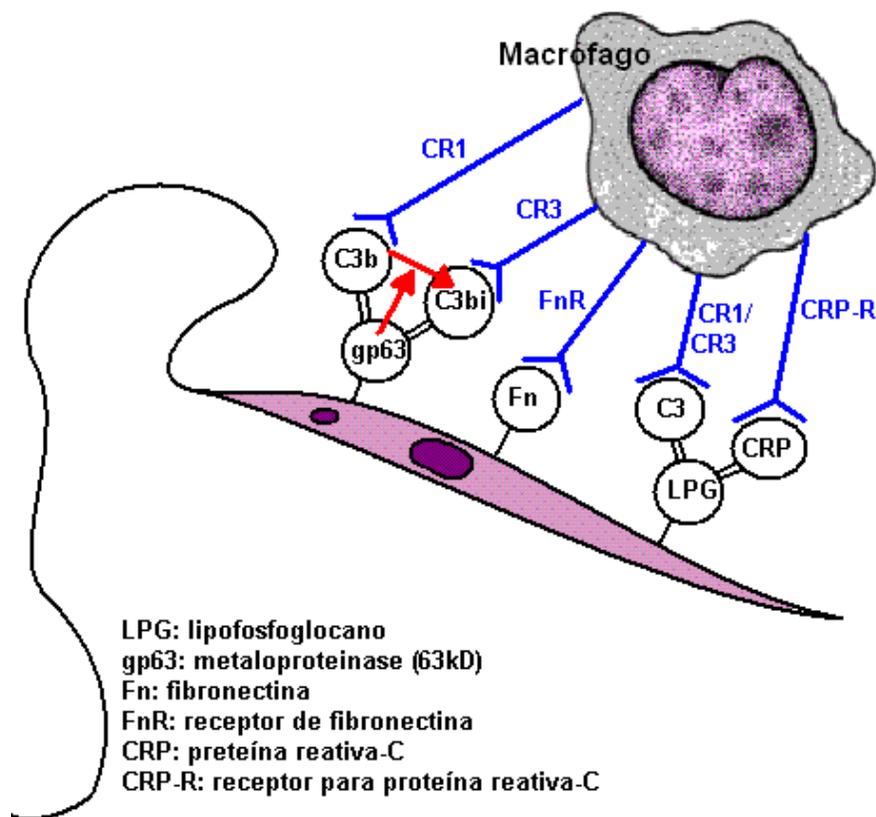


Figura 4. Interação macrófago, complemento e promastigotas de *Leishmania* (Adaptado de Bogdan & Röllinghoff 1998)

Após a sua ligação à superfície de macrófagos, promastigotas são englobadas em um fagossomo conhecido como vacúolo parasitóforo, que sofre uma série de eventos de fusão para formar o fagolisossomo. Moléculas do complexo lipofosfoglicano (LPG) protegem as formas promastigotas das duras condições encontradas no vacúolo parasitóforo. A diferenciação das promastigotas em formas amastigotas e sua conseqüente proliferação ocorrem no ambiente ácido e rico em hidrolases do fagolisossomo. No entanto, o nível de expressão de LPG na superfície de amastigotas é baixo, então outros glicoconjugados também podem proteger as formas amastigotas. Uma vez dentro dos macrófagos, as leishmânias empregam uma variedade de mecanismos adaptativos para sobreviver às condições adversas encontradas neste novo ambiente (Descoteaux & Turco 1999; Cunningham 2002). Elas manipulam o ambiente hostil através da inibição de enzimas hidrolíticas, produtos metabólicos tóxicos como o NO, vias de sinalização celular, produção de citocinas, e outros eventos. Estas estratégias determinam o sucesso do parasito em evadir da resposta imune do hospedeiro e promover a sua sobrevivência (Bogdan & Röllinghoff 1998).

#### 1.4.3. *Leishmania*, complemento e mecanismos de evasão do parasito

Em contato com o soro humano normal, as promastigotas ativam o complemento pela via clássica e via alternativa simultaneamente. Domínguez e colaboradores (2002) utilizaram como modelo parasitos tripanossomatídeos, dentre eles, quatro espécies diferentes de *Leishmania* (*L. amazonensis*, *L. donovani*, *L. infantum* e *L. major*), objetivando avaliar a ação das vias clássica e alternativa na opsonização por C3 e lise pelo complemento nas formas promastigotas. O resultado mostrou uma ação bastante acelerada pelas duas vias, principalmente na via clássica, sugerindo que a infecção humana por *Leishmania* é um processo extremamente rápido, e as promastigotas devem mostrar estratégias de evasão imediatamente após a inoculação a fim de evitar a lise pelo complemento (Domínguez et al. 2002).

Os primeiros estudos sobre a interação de promastigotas com o sistema imune do hospedeiro demonstraram que esses parasitos eram bastante sensíveis à lise mediada pelo complemento. A observação de que as formas metacíclicas provenientes de cultura em fase estacionária de crescimento foram mais infectantes que as promastigotas procíclicas da fase logarítmica, levou a uma avaliação de parasitos provenientes de diferentes fases de crescimento, levando em consideração a sua suscetibilidade à lise mediada pelo complemento. Franke e colaboradores (1985) demonstraram que promastigotas em fase estacionária de *L. panamensis* e *L. donovani* foram mais resistentes à lise mediada pelo complemento do que eram os organismos provenientes da fase log de crescimento. Usando *L. major*, Puentes e colaboradores (1988) obtiveram resultados semelhantes e relacionaram o aumento da resistência a modificações estruturais do LPG. O alongamento na cadeia de LPG na superfície de promastigotas metacíclicas pode proteger o parasito da lise mediada pelo complemento, agindo como uma barreira física, impedindo a inserção do complexo de ataque a membrana (MAC) à membrana plasmática das promastigotas. (Franke et al. 1985; Puentes et al. 1988; Mosser & Brittingham 1997).

O alongamento e modificação estrutural do LPG não é a única mudança fenotípica observada durante o desenvolvimento de resistência ao complemento pelas promastigotas. Vários grupos relataram o aumento da expressão de gp63 em promastigotas metacíclicas em relação às formas procíclicas, e buscaram definir o papel desta metaloprotease na resistência das formas promastigotas à lise mediada pelo complemento. Usando mutantes de *L. amazonensis*, Brittingham e colaboradores (1995) demonstraram uma associação entre a expressão de gp63 e a resistência à lise mediada pelo complemento. Organismos expressando tipo selvagem de gp63 expressaram níveis reduzidos de componentes terminais do complemento e foram muito mais resistentes à lise que organismos que não apresentavam gp63 (Brittingham et al. 1995).

Estes dados demonstram que a metaloproteinase gp63 pode fornecer às promastigotas alguma resistência à lise mediada pelo complemento, e que o mecanismo desta resistência é dependente da atividade proteolítica de gp63, que cliva C3b a uma forma inativa (C3bi) impedindo assim a continuidade da cascata do

complemento até a formação do MAC (Mosser & Brittingham 1997). Porém, mesmo inibindo o complemento, a formação de iC3b ajuda na ligação do parasito aos receptores CR1 e CR3 dos macrófagos facilitando sua fagocitose por estas células.

Uma vantagem adicional da ativação do complemento pelos parasitos é a geração de peptídeos quimiotáticos C3a e C5a, atraindo monócitos para a área (Brittingham & Mosser 1996). Monócitos recém-chegados à área de infecção possuem pouca expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal da classe II (MHC-II), não podendo apresentar antígenos e sendo quiescentes aos parasitas durante a fase inicial de infecção por *Leishmania* (Handman 1999).

Promastigotas de *L. infantum* provenientes de culturas com poucas passagens são mais resistentes à lise pelo complemento em 25 a 50% de soro humano normal (SHN); em contrapartida, promastigotas em fase estacionária, provenientes de culturas com muitas passagens (>16 a 100) são sensíveis. Este comportamento pode estar correlacionado com a perda de expressão de gp63, assim como de glicoproteínas de superfície de promastigotas (PSA, também conhecida como gp46) durante a cultura em série (Lincoln et al. 2004). A transfecção de promastigotas de *L. chagasi* com muitas passagens em cultura com plasmídios de expressão de PSA restaura a resistência ao complemento em células na fase estacionária, sugerindo a participação do PSA na proteção das formas promastigotas frente ao complemento (Lincoln et al. 2004; Moreno et al. 2007).

O efeito do soro fresco em amastigotas de *Leishmania* também tem sido estudado. Hoover e colaboradores (1984) observaram que o soro humano normal é bastante eficiente na lise de formas amastigotas de *L. major*, mas nem tanto para *L. donovani*. Posteriormente, Mosser e demais pesquisadores (1985) relataram que amastigotas de espécies resistentes também ativam o complemento através da via alternativa, fixando o componente C3, e que não há correlação entre o valor absoluto de C3 fixado nas amastigotas das diferentes espécies e sua suscetibilidade à inativação pelo complemento, sugerindo que a lise pode não ser um indicador adequado da ativação do complemento. Além disso, a fixação do componente C3

pode representar um mecanismo do parasita para facilitar a re-entrada nos fagócitos do hospedeiro (Hoover et al. 1984; Mosser et al. 1985).

## **1.5. A saliva de flebotomíneos e o seu envolvimento na transmissão de *Leishmania***

### 1.5.1. O processo hematofágico

Como explicado anteriormente, as diferentes espécies de *Leishmania* são transmitidas ao hospedeiro vertebrado por fêmeas de flebotomíneos durante o repasto sanguíneo, necessário para a maturação dos ovos do inseto vetor. Os flebotomíneos localizam o sangue pela introdução de suas peças bucais na pele do hospedeiro, rasgando tecidos, lacerando capilares e criando poços hemorrágicos sobre a pele, onde se alimentam. É o que chamamos de telmatofagia (Ribeiro 1995). De maneira geral, durante o repasto sanguíneo, os insetos hematófagos injetam saliva nos tecidos dos hospedeiros. Neste processo, em flebotomíneos, o conteúdo da glândula salivar é injetado ao mesmo tempo em que as formas promastigotas metacíclicas são regurgitadas na pele do hospedeiro (Titus & Ribeiro 1988).

O conteúdo salivar auxilia na busca por um ambiente ideal para a hematofagia. Para exercer com sucesso esta tarefa, os insetos hematófagos precisam superar os obstáculos inflamatórios e hemostáticos do hospedeiro, compostos pela cascata de coagulação sanguínea, vasoconstrição e agregação plaquetária. Durante o processo hematofágico, a resposta imune do hospedeiro acabaria inativando as atividades antihemostáticas das proteínas salivares na medida em que estas serviriam de antígenos. Assim, flebotomíneos da mesma espécie teriam dificuldade de se alimentar num hospedeiro já picado anteriormente, pois seus anticorpos anti-saliva poderiam inativar as atividades anti-hemostáticas das proteínas salivares (Andrade et al. 2007).

Para superar tais barreiras, os flebotomíneos evoluíram de modo a apresentarem dentro de sua secreção salivar uma variedade de potentes agentes

imunomoduladores e moléculas anti-inflamatórias, assessorando no combate e na neutralização das respostas do hospedeiro vertebrado contra a saliva (Ribeiro 1995). Desta forma, o conteúdo da glândula salivar destes insetos apresenta grande relevância parasitológica em razão da capacidade de regular o sistema imune, podendo, através do poder inibitório das células de defesa do hospedeiro, criar um ambiente adequado à sobrevivência e multiplicação dos microrganismos transmitidos durante a hematofagia (Andrade et al. 2005; Rohousová & Volf 2006).

#### 1.5.2. A saliva e alguns de seus componentes

No estudo da modulação da resposta imune do hospedeiro pela saliva de flebotomíneos e da forma pela qual esta modulação afeta a transmissão e o estabelecimento da *Leishmania*, é pertinente que se faça uma análise das moléculas salivares identificadas até o momento, assim como a sua atividade farmacológica.

A análise dos componentes salivares revelou uma significativa diversidade farmacológica e bioquímica, contendo uma complexa variedade de moléculas biologicamente ativas (Ribeiro et al. 1986; Ribeiro et al. 1999). Apirase e maxadilan são as mais investigadas. Apirase é uma enzima antiagregante plaquetária que hidrolisa ATP e ADP a AMP e fosfato inorgânico (Ribeiro 1995). Sua presença já foi demonstrada nas glândulas salivares de espécies pertencentes tanto ao gênero *Phlebotomus* como no gênero *Lutzomyia*, assim como na maioria dos insetos hematófagos investigados (Ribeiro et al. 1986; Ribeiro et al. 1989). O maxadilan é um polipeptídeo vasodilatador, sendo considerado o mais potente dos vasodilatadores conhecidos até hoje. Ao contrário da apirase, foi identificado apenas no conteúdo salivar da espécie *L. longipalpis* (Ribeiro et al. 1986).

Nos últimos 10 anos, o isolamento de moléculas específicas através de técnicas experimentais tem contribuído para uma melhor compreensão da interação entre patógeno, vetor e hospedeiro. Uma variação no conteúdo salivar tem sido descrita em flebotomíneos de uma mesma espécie em diferentes regiões geográficas. O estudo do conteúdo salivar de espécies provenientes de diferentes

partes do mundo certamente aumentaria as chances de encontrar moléculas que poderiam funcionar como marcadores ou como candidatos a vacinas (Andrade et al. 2007).

### 1.5.3. Saliva e o sistema imune do hospedeiro

As propriedades imunomodulatórias da saliva de flebotomíneos foram estudadas quase que exclusivamente em duas espécies: *Lutzomyia longipalpis* e *Phlebotomus papatasi*. A saliva destas duas espécies modula a resposta imune do hospedeiro em diferentes níveis, incluindo tanto a resposta imune inata como a adquirida. Alguns destes efeitos são comuns às duas espécies, e outros são específicos (Rohousová & Volf 2006).

A saliva de *L. longipalpis* também aumenta a infecciosidade de outras espécies de *Leishmania* do Novo Mundo. Em camundongos, quando injetados com a saliva de *L. longipalpis*, a infecção por *L. braziliensis* foi significativamente maior. Esta observação foi realizada através da medida do tamanho da lesão, da carga parasitária e do curso da infecção. Em camundongos tratados com a saliva, as lesões progrediram para uma acumulação extensiva de macrófagos parasitados, persistindo por toda a vida dos camundongos (Samuelson et al. 1991, Lima & Titus 1996, Donnelly et al. 1998). Em *L. amazonensis*, este efeito é evidente tanto em camundongos BALB/C quanto em CBA. Em animais tratados com a saliva, as lesões são maiores e contêm uma maior quantidade de parasitas, no entanto, não há nenhuma mudança na taxa de infecção ou no desenvolvimento intracelular do parasito em macrófagos do hospedeiro (Theodos et al. 1991, Norsworthy et al. 2004). Células de linfonodos de camundongos tratados com saliva produziram mais IL-4 e IL-10, mas não houveram diferenças na produção de outras citocinas como a IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Norsworthy et al. 2004).

Embora os trabalhos citados acima demonstrem o significativo papel da saliva de flebotomíneos na transmissão e no curso da parasitose em várias espécies de *Leishmania*, todos os resultados acima mencionados não refletem as condições

naturais, uma vez que *L. longipalpis* não é um vetor natural de *L. major*, *L. braziliensis*, nem de *L. amazonensis*, mas sim de *L. infantum*. A inoculação simultânea de *L. infantum* com extrato de glândula salivar de *L. longipalpis* também aumenta a infectividade do parasito em camundongos (Warburg et al. 1994). Por outro lado, a saliva de *L. longipalpis* não melhora a infecção experimental de *L. infantum* em cães (Paranhos et al. 1993, Paranhos-Silva et al. 2003). Além disso, a adição de extrato de glândula salivar do vetor não leva à detecção precoce de amastigotas no baço ou a um aumento da carga parasitária em órgãos internos (Paranhos-Silva et al. 2003).

A saliva de *L. longipalpis* afeta a ativação do complemento, a proliferação de células T, e várias funções de células apresentadoras de antígenos (por exemplo: monócitos, macrófagos e células dendríticas) (Fig. 5). As células do sistema imunológico mais estudadas em termos de imunomodulação pela saliva de flebotomíneos são as células apresentadoras de antígenos. Nessas células, a saliva/maxadilana modula a secreção de várias citocinas e altera a expressão de moléculas co-estimulatórias (Rohousová & Volf 2006). Em monócitos humanos tratados com lipopolissacarídeos (LPS), a saliva diminui a expressão de CD80 e aumenta a expressão de CD86 e HLA-DR. Em macrófagos, há um aumento na expressão de CD80 e HLA-DR, mas sem alteração na expressão de CD86. A adição de saliva durante a geração de células dendríticas leva a uma diminuição na expressão de CD80, CD86, HLA-DR e CD1a. No entanto, a intensidade de efeitos estimulatórios e inibitórios varia dependendo do indivíduo (Costa et al. 2004). Essas mudanças na expressão de moléculas co-estimulatórias podem alterar a ativação e resposta de células T (Rohousová & Volf 2006).

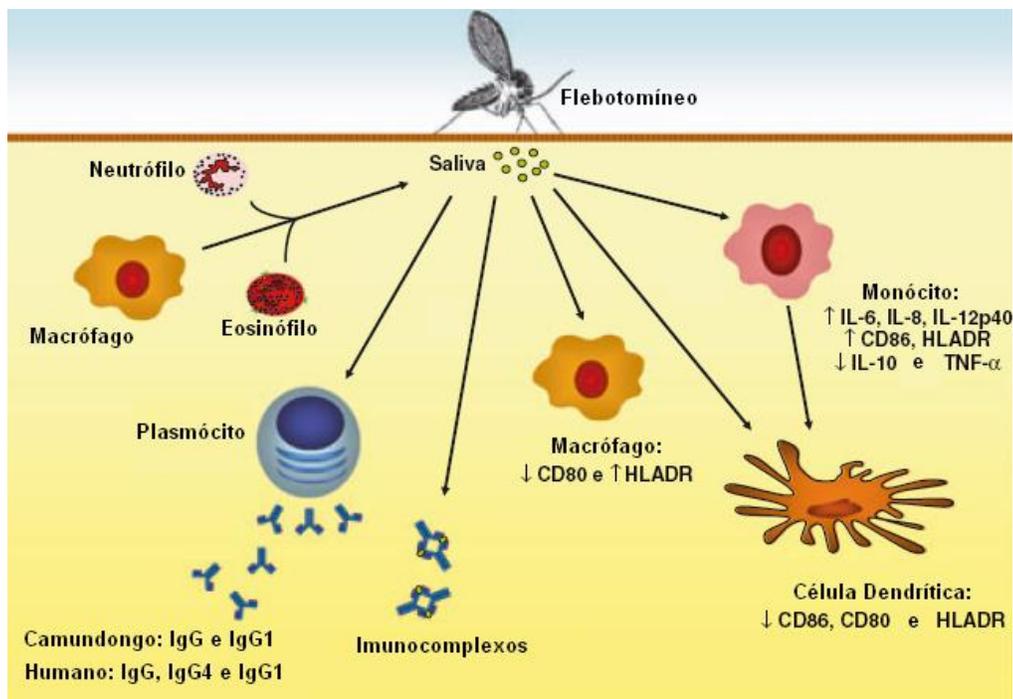


Figura 5. Efeitos da saliva do *Lutzomyia longipalpis* no hospedeiro vertebrado (Modificado de Andrade et al. 2007)

Outro efeito da saliva de *L. longipalpis* bem como para o maxadilão sozinho é a modulação na proliferação de células T. A saliva é capaz de suprimir completamente a resposta proliferativa de células T. O mecanismo do efeito inibitório ainda não está bem definido, no entanto, os resultados sugerem que a saliva/maxadilão afeta tanto as células apresentadoras de antígeno quanto as células T. O peptídeo pode inibir a ativação de células T ao nível de sinais co-estimulatórios ou por supressão prévia de IL-2 (Qureshi et al. 1996; Titus 1998; Costa et al. 2004).

No que diz respeito à ativação do complemento, Cavalcante e colaboradores (2003) demonstraram que tanto a saliva de *L. longipalpis* quanto de *L. migonei* inibem a via clássica de ativação do complemento, porém, apenas a saliva de *L. longipalpis* inibe a via alternativa também. A molécula inibidora da via clássica presente na saliva de *L. longipalpis* é uma proteína termo-estável de 10-30 kDa (Cavalcante et al. 2003). Alguns componentes do sistema complemento são serino proteases, portanto, uma das moléculas com atividade anti-complemento poderia ser

um inibidor de serino proteases, encontrado na biblioteca de cDNA de saliva de *L. longipalpis* (Valenzuela et al. 2004; Rohousová & Volf 2006).

Supondo que os inibidores do complemento podem proteger alguns patógenos, é razoável inferir que os anticorpos do hospedeiro dirigidos contra esses inibidores, inativando-os, poderiam comprometer o desenvolvimento desses patógenos. No entanto, a atividade inibitória do complemento encontrada na saliva de vários insetos hematófagos e vetores de diferentes agentes etiológicos, poderia estar diretamente envolvida na modulação da resposta imune humoral.

É conhecido que mesmo antígenos solúveis, quando opsonizados com C3b, são de 10 a 100 vezes mais eficientes na indução da resposta humoral que quando não opsonizados (Colomb et al. 1996). A presença de inibidores salivares capazes de atuar na ativação do sistema do complemento pode reduzir consideravelmente a quantidade de antígenos salivares opsonizados com C3b e, conseqüentemente, afetar a apresentação desses antígenos ao sistema imune do hospedeiro. Conseqüentemente, esses hospedeiros seriam menos eficientes para realizar uma resposta imune contra proteínas salivares, preservando as atividades que são necessárias para um repasto sanguíneo normal (Barros et al. 2009).

#### 1.5.4. A saliva de flebotomíneos na proteção do hospedeiro vertebrado

Titus e Ribeiro (1988) foram os primeiros a demonstrar o efeito da saliva de flebotomíneos na exacerbação da infecção por *Leishmania*. Usando como modelo *L. major* e saliva de *L. longipalpis*, inocularam de 10 a 100 parasitos em fase estacionária de crescimento com 10% do extrato de uma glândula salivar na pata de camundongos, observando um aumento no tamanho das lesões cutâneas resultantes de 5 a 10 vezes maiores que nos controles. Além disso, essas lesões continham cerca de 5 000 vezes mais parasitos que nos controles.

A interação saliva, sistema imune e *Leishmania* comporta-se de forma contraditória. Embora a saliva de flebotomíneos tenha demonstrado um importante papel no processo de transmissão do parasito, favorecendo a infecção, a saliva

também pode desempenhar um papel na proteção contra a infecção em hospedeiros vertebrados previamente imunizados contra a saliva do vetor. As proteínas salivares do flebotomíneo são inoculadas no local de deposição do parasito durante a transmissão pela picada. Assim, as proteínas salivares que influenciam na imunidade do hospedeiro podem potencialmente ter conseqüências sobre o curso da infecção.

Esta hipótese tem sido confirmada através do estudo em roedores. Nestes animais, a imunização com a saliva de flebotomíneos conferiu proteção tanto para a forma visceral quanto para a forma tegumentar da leishmaniose. Esta proteção foi associada com o desenvolvimento da imunidade celular na forma de uma resposta de hipersensibilidade tardia e presença de IFN- $\gamma$  no local da picada dos flebotomíneos (Kamhawi et al. 2000, Oliveira et al. 2008).

Até o momento, existem poucos dados disponíveis sobre a resposta imune celular contra a saliva de flebotomíneos em cães e seu papel na proteção contra a LVC. Collin e colaboradores (2009), utilizando um número variado de proteínas salivares de *L. longipalpis*, observaram a indução de forte imunidade celular em cães. A imunização com essas moléculas induziu a produção de altos níveis de anticorpos IgG2 e de IFN- $\gamma$ . Após o desafio com insetos infectados ou não infectados, cães imunizados desenvolveram uma resposta celular no local da picada caracterizada por infiltração linfocítica e elevada expressão de IFN- $\gamma$  e IL-12. Além disso, a estimulação in vitro de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) com o extrato de glândulas salivares resultou na redução da infecção em macrófagos. Dessa forma, em indivíduos previamente sensibilizados com antígenos salivares, certas proteínas da saliva podem funcionar como potentes imunógenos obrigatoriamente co-depositados com parasitos durante a transmissão. Portanto, a inclusão dessas proteínas em uma vacina anti-*Leishmania* poderia estimular o desenvolvimento de uma imunidade protetora após a picada de flebotomíneos infectados (Collin et al. 2009).

Giunchetti e colaboradores (2008), na busca de uma vacina contra a LVC, avaliaram a ação de um candidato a vacina composto por proteínas de promastigotas de *Leishmania* e extrato de glândula salivar de *L. longipalpis* contendo o adjuvante saponina. O candidato a vacina induziu forte resposta do sistema imune

humoral de cães em relação à saliva e às proteínas do parasito. A análise imunofenotípica mostrou um aumento de células B CD21 e células T CD5 circulantes, refletida pela maior contagem de células TCD4 e CD8. A interação observada entre as células apresentadoras de antígenos e o grau de ativação dos linfócitos indicaram uma possível relação entre as respostas imunes do tipo inata e adaptativa. A elevação na frequência de linfócitos T CD8+ específicos para *L. chagasi* associada a intensa proliferação celular, além da elevação progressiva dos níveis de óxido nítrico no soro, apresentaram um perfil compatível para o seu uso como uma potencial vacina anti-LVC.

## 2. JUSTIFICATIVA

Na infecção por *Leishmania*, a saliva do vetor tem um importante papel na transmissão do parasito, modulando a resposta imune do hospedeiro em diferentes níveis. Embora a inibição do complemento pela saliva não seja completa, a presença de inibidores do complemento na saliva de *L. longipalpis* possivelmente é de grande relevância na transmissão das promastigotas para o hospedeiro vertebrado, assim como das formas amastigotas aos flebotomíneos no momento do repasto sanguíneo.

A exposição dos parasitos aos fatores líticos do complemento presentes no sangue, se não fosse a existência de componentes inibidores presentes na saliva, poderia impossibilitar o sucesso da transmissão desses parasitos tanto ao vetor como ao hospedeiro vertebrado. No momento do repasto, o vetor coloca as amastigotas em contato com componentes do complemento presentes no sangue. Na ausência de inibidores salivares, a ação lítica do complemento mataria essas amastigotas no intestino dos insetos, e assim estes não se infectariam. Embora mais resistentes ao complemento, as metacíclicas poderiam também se beneficiar dos inibidores no local da picada, pois estariam expostas ao sangue até que fossem fagocitadas. Por sua vez, a opsonização dos parasitos pelo componente C3b do complemento, embora não seja suficiente para disparar a montagem do MAC, causando a lise do parasito, é de grande relevância por facilitar a sua fagocitose pelos macrófagos, favorecendo a manutenção do parasito no hospedeiro vertebrado.

Embora existam muitos trabalhos na literatura envolvendo a interação da *Leishmania* com o complemento humano, pouco se sabe sobre a interação entre o parasito e a resposta imune no cão, e como a *Leishmania* se comporta frente aos fatores líticos do soro do hospedeiro na presença ou não de componentes salivares do inseto vetor.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

- Avaliar a ação do complemento humano e canino sobre formas promastigotas de *Leishmania infantum* e a ação protetora da saliva de *Lutzomyia longipalpis* sobre o parasito.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Estudar a cinética de lise das formas promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária de desenvolvimento em contato com o soro humano normal, em várias diluições diferentes, na presença ou não de saliva de *L. longipalpis*.
- Estudar a cinética de lise das formas promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária de desenvolvimento em contato com o soro de cães normais e infectados, na presença ou não de saliva de *L. longipalpis*.
- Investigar comparativamente a deposição de C3b na membrana plasmática de formas promastigotas de *L. infantum* na presença ou não de saliva de *L. longipalpis* por meio de imunofluorescência indireta
- Estimar a quantidade de proteína salivar liberada durante uma picada e relacionar esta quantidade com a quantidade de complemento presente no sangue ingerido.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Parasitos

Os parasitos utilizados neste estudo foram *L. infantum* (MHOM/BR/1972/BH46). Esta cepa foi isolada de paciente humano infectado e é mantida no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos – Departamento de Parasitologia – UFMG. As formas promastigotas foram cultivadas em meio de cultura Grace's Insect Medium (Sigma: G9771) pH 6,5. O meio de cultura foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Os parasitos eram acondicionados em garrafas acrílicas estéreis e descartáveis, e mantidos a uma temperatura de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  em estufa B.O.D. Os parasitos utilizados nos experimentos eram provenientes de cultura no final da fase estacionária de desenvolvimento. Com o objetivo de se usar parasitos com maior poder de infecção, exibindo um maior nível de expressão de fatores de auto-proteção, foi padronizado o uso de parasitos até a sexta passagem em meio de cultura. Sendo assim, ultrapassado o número limite de passagens no meio, as leishmânias foram inoculadas em hamsters para posterior isolamento e utilização nos experimentos.

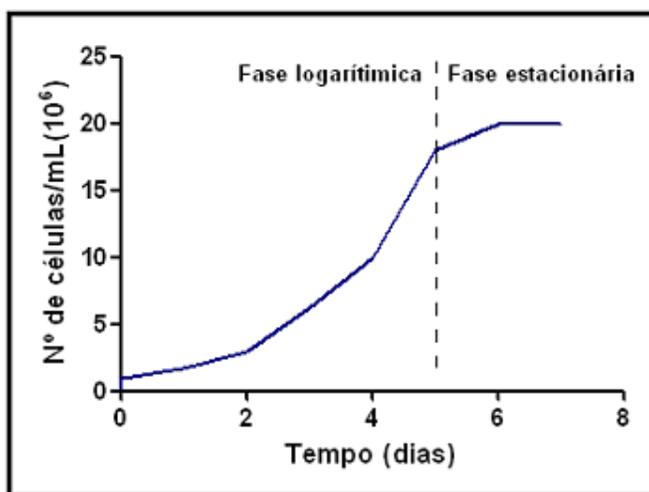


Figura 6. Curva de crescimento de *L. infantum* (MHOM/BR/1972/BH46) em Grace's Insect Medium

#### **4.2. Flebotomíneos *Lutzomyia longipalpis***

Os flebotomíneos *L. longipalpis* utilizados para a realização dos experimentos são oriundos da cidade de Teresina, Piauí, Brasil. Os insetos foram mantidos em colônia fechada no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos - Departamento de Parasitologia – UFMG sob as seguintes condições:  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  de temperatura e 60-80% de umidade relativa como descrito por Modi & Tesh (1983), com algumas modificações.

#### **4.3. Extração de saliva**

Baseando-se na metodologia empregada por Cavalcante e colaboradores (2003), para a extração das glândulas salivares foram utilizadas fêmeas de flebotomíneos *L. longipalpis* de três a cinco dias de fase adulta e alimentadas apenas com solução de sacarose a 30%. Com o auxílio de alfinetes entomológicos e sob uma lupa, as glândulas foram dissecadas em solução tampão HEPES/NaOH 40mM em NaCl 0,7% pH 7,4 e em seguida foram transferidas para um microtubo contendo o mesmo tampão, sendo mantidas em recipiente com gelo. Foi mantida a proporção de 5 $\mu\text{L}$  do tampão para cada ácino de glândula salivar. As glândulas foram lisadas por sonicação durante 10 segundos e depois centrifugadas a 10.000 RPM a 4°C por 5 minutos, coletando-se o sobrenadante.

#### **4.4. Colheita e estocagem do soro**

Um “pool” de soro humano foi obtido através da colheita de sangue de 10 doadores voluntários e saudáveis, com idade entre 20 e 30 anos e residentes no município de Belo Horizonte, Minas Gerais. O sangue total destes doadores foi coletado em tubos sem anticoagulante e após a coagulação foi centrifugado durante 10 minutos a 1500g a temperatura ambiente. Após a obtenção do soro de cada

doador, eles foram misturados, aliquotados e mantidos em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

Um “pool” do soro de cinco cães sintomáticos, naturalmente infectados por *L. infantum* e outro “pool” de cinco cães saudáveis foram preparados seguindo a metodologia descrita para o soro humano. A infecção nos cães foi confirmada por Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), com positividade numa titulação de 1:40, ELISA e exame parasitológico de punção de medula.

#### **4.5. Avaliação da lise pelo complemento em *Leishmania infantum* por citometria de fluxo**

##### 4.5.1. Preparo dos parasitos

Em microtubos, foram adicionados 1000 $\mu\text{L}$  de cultura de *L. infantum* em fase final da curva de crescimento (a partir de 5 dias após o último repique). As promastigotas foram lavadas duas vezes por centrifugação e ressuspendidas em solução tampão HEPES/NaOH 40mM em NaCl 0,7% pH 7,4. Após a última lavagem as células foram ressuspendidas em 1000  $\mu\text{L}$  do mesmo tampão. Em seguida, foi retirada uma alíquota de 100 $\mu\text{L}$  da suspensão de células para realizar a contagem na Câmara de Neubauer. Após a contagem, a concentração da suspensão de células foi ajustada adicionando solução tampão HEPES/NaOH 40mM em NaCl 0,7% pH 7,4 até as concentrações de  $4 \times 10^6$  células/mL, nos experimentos com saliva, e  $2 \times 10^6$  células/mL, nos experimentos sem saliva.

##### 4.5.2. Cinética de lise das formas promastigotas em contato com o soro do hospedeiro

A avaliação da lise pelo complemento foi realizada com três tipos de soro (humano normal, cão normal e cão doente) em triplicata. Nos experimentos com ausência de saliva de *L. longipapilis*, microtubos contendo 10 $\mu\text{L}$  de solução de iodeto

de propídeo (0,01mg/mL) e volumes variáveis de solução salina 0,9% e de soro do hospedeiro foram pré-incubados a uma temperatura de 37°C por 5 minutos. O iodeto de propídeo penetra nas células e não é eliminado pela membrana em células mortas. Uma vez dentro das células mortas, o corante se intercala ao DNA, tornando-o fluorescente. O volume de soro adicionado aos microtubos foi variável para cada um deles. Este soro foi diluído nas proporções de 2, 5 e 10% do volume total em cada microtubo, que foi de 200µl, após a adição de 100µl da suspensão de células na concentração de  $2 \times 10^6$  células/ml (tempo zero). A partir daí, alíquotas de 20µl foram retiradas nos tempos: 30 seg, 1,5 min, 3 min, 4,5 min e 6 min e foram transferidas para tubos específicos (tubos FACS) contendo 180µl de solução salina 0,9% e levados ao citômetro de fluxo para avaliação da ocorrência da morte celular.

Nos experimentos com presença de saliva de *L. longipalpis*, a metodologia empregada foi semelhante à descrita anteriormente, porém a concentração da suspensão de células foi de  $4 \times 10^6$  promastigotas/ml e o seu volume a ser adicionado foi reduzido para 50µl. Além disso, os microtubos foram preparados em triplicatas, pois para cada diluição específica do soro (2, 5 e 10%), foi adicionado 50µl do extrato de glândula salivar contendo o equivalente a 2, 4 e 8 ácidos, respectivamente. A análise dos dados foi feita utilizando o *software* BD CellQuest Pro.

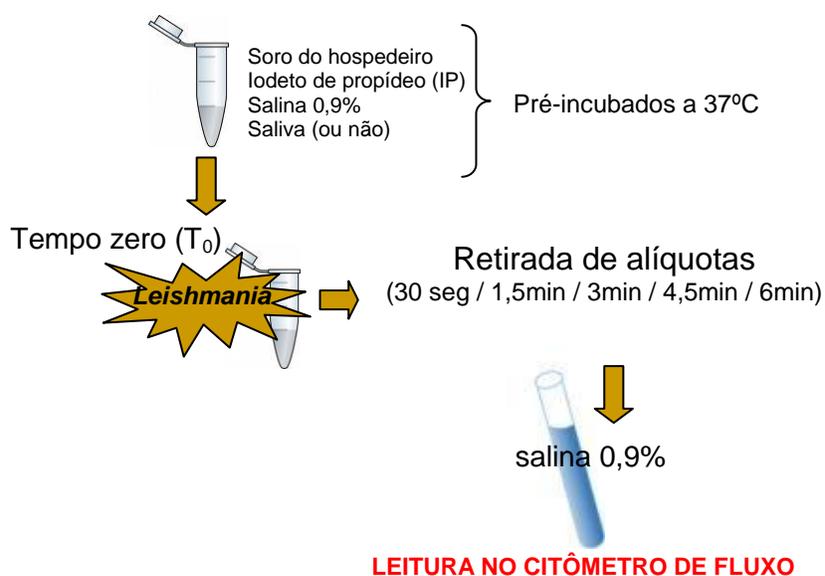


Figura 7. Representação esquemática do ensaio de lise de promastigotas de *L. infantum* pelo complemento na presença (ou não) de extrato de glândula salivar de *L. longipalpis*

#### **4.6. Avaliação da fixação do componente C3b do complemento à membrana plasmática de *Leishmania infantum* por reação de imunofluorescência**

Com base na metodologia proposta por Mosser e Edelson (1984), a técnica de microscopia de imunofluorescência foi realizada para avaliar a ligação do componente C3b à superfície dos parasitos sensibilizados com o soro do hospedeiro. Este estudo foi realizado na presença ou não de extrato de glândulas salivares de *L. longipalpis*. Foi utilizado como controle o soro inativado de cada hospedeiro, e esta inativação foi feita por meio do aquecimento do mesmo em banho de água a 56°C durante 30 minutos.

O preparo dos parasitos utilizados na realização destes experimentos foi realizado de forma semelhante à descrita no item 4.5.1. Para cada amostra separadamente,  $5 \times 10^6$  parasitos, suspensos em 100µl de solução tampão HEPES/NaOH 40mM em NaCl 0,7%, foram incubados durante 30 minutos a 37°C com o soro do hospedeiro, na presença ou não de saliva de *L. longipalpis*. A diluição do soro foi de 5% e a quantidade de ácidos utilizados foi de 8 ácidos. Após a incubação, os parasitos sensibilizados foram lavados duas vezes por centrifugação e ressuspensão em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,2. Foram então ressuspensos em 100µl de PBS contendo 1% de albumina bovina (BSA). Uma diluição de 1/100 de anticorpo anti-C3 humano produzido em coelho ou de anticorpo anti-C3 canino produzido em cabra foi adicionado e incubado por 30 minutos a 37°C sob agitação. Em seguida, os parasitos foram novamente lavados 2 vezes em PBS e ressuspensos em 100µl de solução de Azul de Evans em PBS (0,2 mg/ml) contendo anticorpo anti-IgG de coelho produzido em cabra e conjugado com fluoresceína (para soro humano), ou anticorpo monoclonal anti-IgG de cabra produzido em rato e conjugado com fluoresceína (para soro de cão), ambos numa diluição de 1/4000. Após uma nova incubação de 30 minutos a temperatura ambiente, sob agitação e protegidos da luz, foram novamente lavados 2 vezes em PBS e ressuspensos em 50µl de PBS contendo 20% de glicerina. Os parasitos foram então transferidos para lâminas e levados para leitura em microscópio de imunofluorescência (comprimento de onda de 520nm), onde foram fotografados e avaliados quanto à intensidade de marcação de

C3b na membrana plasmática. Esses experimentos foram realizados em triplicata e repetidos 3 vezes.

#### **4.7. Quantificação de proteínas salivares em extrato de glândulas salivares de *L. longipalpis***

Um grupo de insetos adultos foi transferido para gaiolas de tecido logo após a emergência dos mesmos. Nessas gaiolas, desde o início, machos e fêmeas receberam alimento a base de carboidratos, como descrito no item 4.3. Todos os dias, a partir do primeiro e até o quinto dia após a emergência dos adultos, foi retirado um grupo de 10 fêmeas, as quais foram dissecadas para a extração de suas glândulas salivares, sendo que no terceiro, quarto e quinto dias, também foi retirado um grupo de mais 10 fêmeas, as quais realizaram repasto sanguíneo em hamster anestesiados (Tiopental sódico: 60mg/Kg). Logo após o término do repasto, essas fêmeas também foram dissecadas para a extração de suas glândulas salivares. Seguindo a metodologia descrita no item 4.3, as glândulas foram dissecadas em 40µl de solução tampão HEPES/NaOH 40mM em NaCl 0,7%, mantidas em microtubo e congeladas a -80°C até o momento do uso. Para promover o total rompimento dos ácidos das glândulas salivares, momentos antes do uso, cada microtubo sofreu uma seqüência de pipetagens por aproximadamente 15 segundos e em seguida foram centrifugados a uma velocidade de 10.000 RPM a 4°C durante 5 minutos.

A quantificação de proteínas salivares totais para cada grupo de 10 fêmeas (20 ácidos) foi determinada seguindo uma curva padrão de concentração de albumina bovina, como descrito por Bradford (1976). Para a leitura das amostras, foi utilizada uma placa de cultura de 96 poços e as amostras de cada tratamento foram distribuídas em duplicata. Esta leitura foi realizada em leitor de micro-placas sob temperatura ambiente e utilizando-se um comprimento de onda de 595 nm. Três dosagens independentes foram realizadas.

#### 4.8. Análises estatísticas

Para a análise estatística dos dados gerados neste estudo foi utilizado o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Inc, EUA). Para verificar se houve distribuição Gaussiana dos dados, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Na comparação entre dois grupos, foi utilizado o teste T student para os dados paramétricos e o teste de Mann-Whitney para os dados não paramétricos. Na análise entre 3 ou mais grupos, foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni para os dados paramétricos e Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn's para os dados não paramétricos. Além destes, o teste de Grubbs foi utilizado para detectar a presença de possíveis “*outliers*” nas amostras. Todos os testes foram considerados significativos quando apresentaram um valor de  $P \leq 0.05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Cinética de lise em promastigotas de *L. infantum* por fatores do soro humano normal

Na avaliação da atividade lítica pelo complemento utilizando o SHN, a suscetibilidade das formas promastigotas mostrou-se dependente da concentração do soro do hospedeiro. Sob nossas condições experimentais, a atividade lítica nas células mostrou-se presente apenas após o tempo de 1 minuto e meio de incubação, permanecendo crescente até os 6 minutos (Figura 8). Para todas as concentrações do soro utilizadas, a partir dos 6 minutos a porcentagem de morte celular manteve-se constante até os 12 minutos de incubação das células (dados não mostrados).

O uso de SHN a 2% não demonstrou nenhum efeito lítico significativo sobre as formas promastigotas de *Leishmania*, tendo a porcentagem de morte celular permanecido praticamente constante (3-8%) até os 6 minutos de incubação com o soro do hospedeiro (Fig. 8).

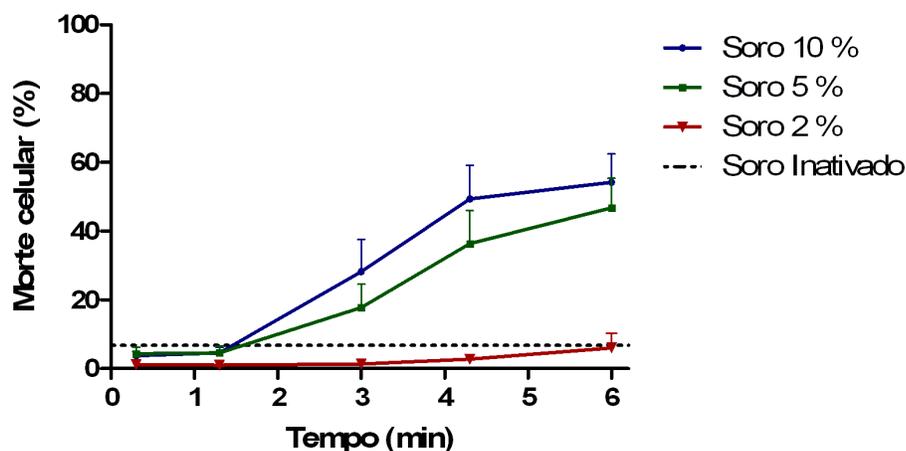


Figura 8. Cinética de lise pelo complemento humano em promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária de desenvolvimento, empregando-se soro humano em diferentes concentrações, na ausência de extrato de glândula salivar de *L. longipalpis*

Nos ensaios onde foi envolvida a participação de EGS de *L. longipalpis*, foram observados diferentes níveis de inibição da lise das promastigotas na presença de saliva. Esta inibição mostrou-se dependente tanto da concentração do soro como da concentração de EGS utilizada em cada tratamento.

Quando foi utilizado SHN a 10%, a atividade lítica do complemento humano foi observada a partir de 1 minuto e meio de incubação, e quase 60% das promastigotas apresentaram-se mortas após os 6 minutos de incubação com o soro (Fig. 9). Nesta concentração de soro (10%), a adição de EGS não mostrou-se eficiente na proteção das células contra a ação do complemento, não interferindo nem na velocidade do processo lítico e nem na porcentagem final de morte após os 6 minutos (ANOVA, ns).

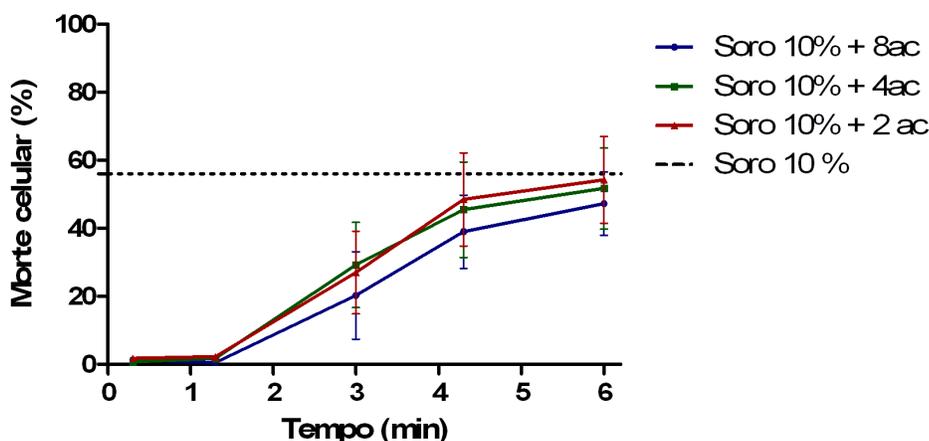


Figura 9. Cinética de lise pelo complemento humano em promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária de desenvolvimento, utilizando soro à 10%, empregando-se quantidades diferentes de extrato de glândula salivar de *L. longipalpis*

No uso de SHN a 5%, a ação do complemento sobre a lise das células também ficou evidente a partir de 1 minuto e meio de incubação com o soro, e com valores crescentes de morte celular até o tempo de 6 minutos. Nessa concentração de soro, a adição de EGS mostrou-se bastante eficiente na proteção das promastigotas, apresentando uma resposta dose dependente (Fig. 10).

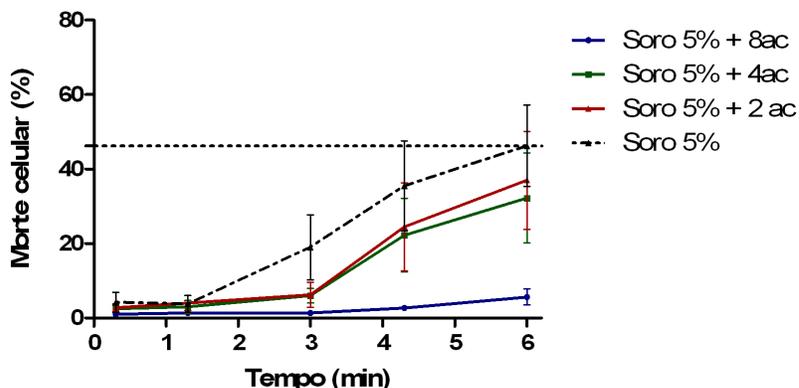


Figura 10. Cinética de lise pelo complemento humano em promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária de desenvolvimento, utilizando soro à 5%, empregando-se quantidades diferentes de extrato de glândula salivar de *L. longipalpis*

A análise realizada apenas do tempo final de incubação das amostras (6 minutos) mostrou que, comparado ao tratamento sem saliva, foi observado uma significativa redução da morte celular utilizando o soro a 5% com EGS referente a 8 ácidos salivares (Kruskal-Wallis.  $p=0.04$ ). Por outro lado, tal redução não foi observada utilizando menores concentrações de saliva e nem com soro a 10%, mesmo utilizando o valor mais alto de EGS (Fig. 11).

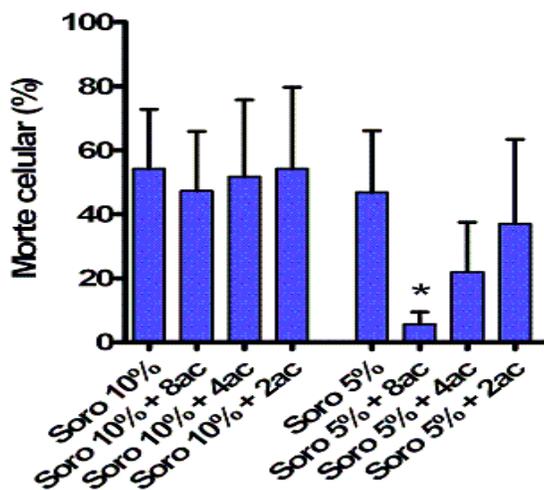


Figura 11. Comparação da atividade lítica de formas promastigotas de *L. infantum* pelo complemento humano em função da concentração do soro e da quantidade de extrato de glândula salivar de *L. longipalpis* considerando o tempo final de 6 minutos (\* representa diferença estatística entre as porcentagens de morte celular na presença e ausência de extrato de glândula salivar de *L. longipalpis*. Kruskal-Wallis.  $p \leq 0,05$ )

## 5.2. Cinética de lise em promastigotas de *L. infantum* por fatores do soro de cães infectados e não infectados

A avaliação da morte celular de *Leishmania infantum* por fatores do complemento de cães infectados e não infectados mostrou grande resistência das formas promastigotas ao soro destes animais. Em ambos os grupos, o soro a 10% não foi capaz de causar uma morte significativa dos parasitos numa incubação de até 6 minutos. Nessa condição não foi observada diferença significativa comparando-se os tratamentos com soro a 10% aos grupos controle contendo soro inativado a 10% (Fig. 12 e 13).

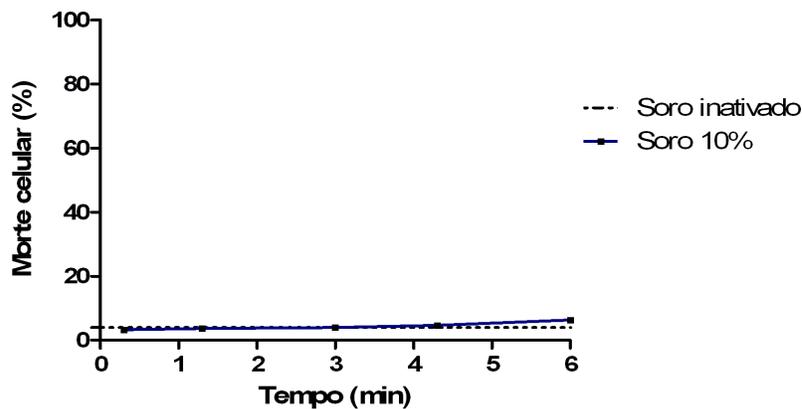


Figura 12. Cinética de lise em promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária de desenvolvimento pelo complemento de cães não infectados utilizando soro à 10%

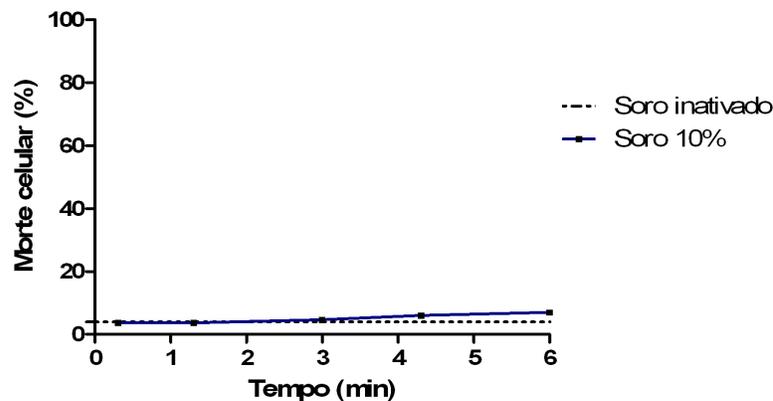


Figura 13. Cinética de lise em promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária de desenvolvimento pelo complemento de cães infectados por *L. infantum* utilizando soro à 10%

### 5.3. Avaliação qualitativa da ligação do componente C3b na membrana plasmática de *L. infantum*

Na avaliação com o soro humano normal, a ligação do componente C3b na membrana plasmática das células foi positiva quando estas eram incubadas com o soro a 5% tanto na presença como na ausência de extrato de glândulas salivares de *L. longipalpis*. Esta ligação foi confirmada pela positividade na fluorescência das células quando submetidas aos tratamentos. Não foi observada fluorescência nas células do grupo controle, o qual consistiu de parasitos incubados com o soro humano normal inativado (Fig. 14C). O protocolo utilizado também não permitiu a observação de variações na intensidade de fluorescência entre os tratamentos.

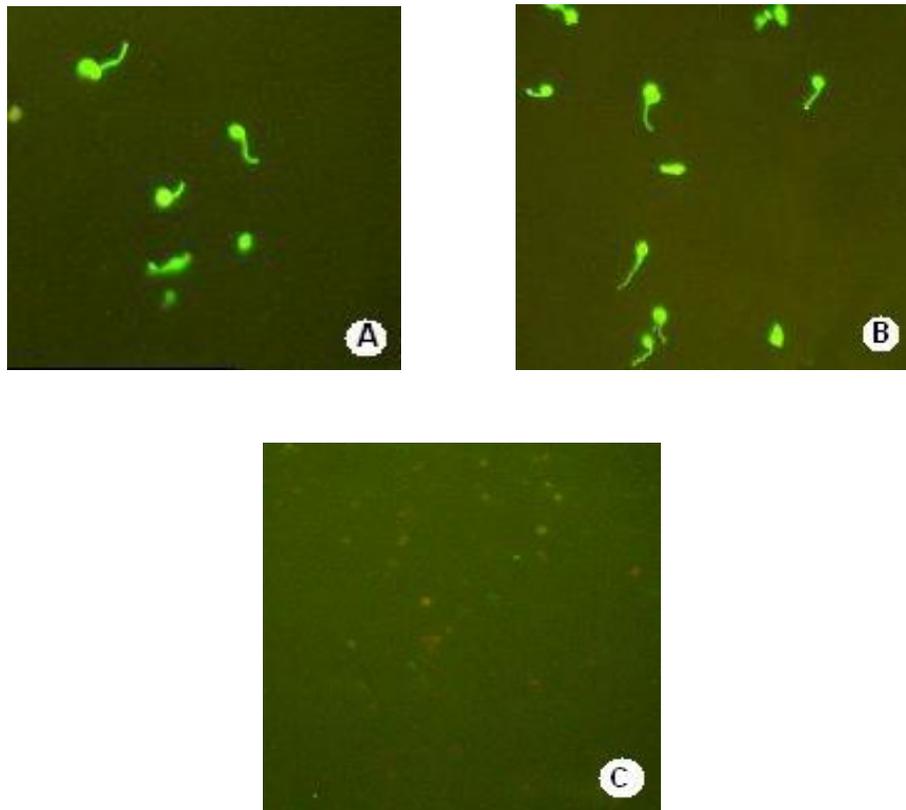


Figura 14. Avaliação da ligação do componente C3b do soro humano normal a 5% na membrana plasmática de *L. infantum* na presença (A), na ausência de saliva (B) e utilizando soro inativado (C). Aumento de 40X.

Como descrito no item 5.2, embora não tenha sido observada suscetibilidade dos parasitos frente ao soro de cães infectados e não infectados, a avaliação da ligação do componente C3b do soro desses animais foi positiva. A fluorescência foi positiva nas células sensibilizadas tanto com o soro de animais infectados (Fig. 15A) quanto com o de não infectados (Fig.16A). Assim como no soro humano normal, esta fluorescência não foi observada nas células incubadas com os soros inativados desses animais (Fig. 15B e 16B).

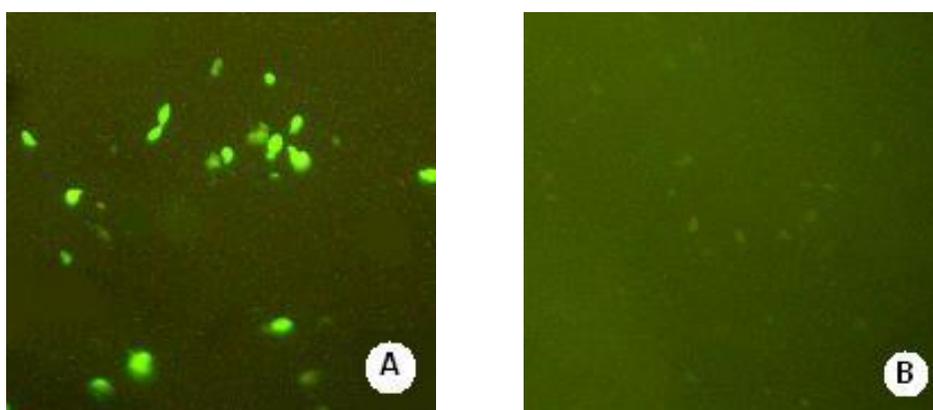


Figura 15. Avaliação da ligação do componente C3b do soro de cães infectados na membrana plasmática de *L. infantum* utilizando soro a 5% (A) e soro inativado a 5%(B). Aumento de 40x.

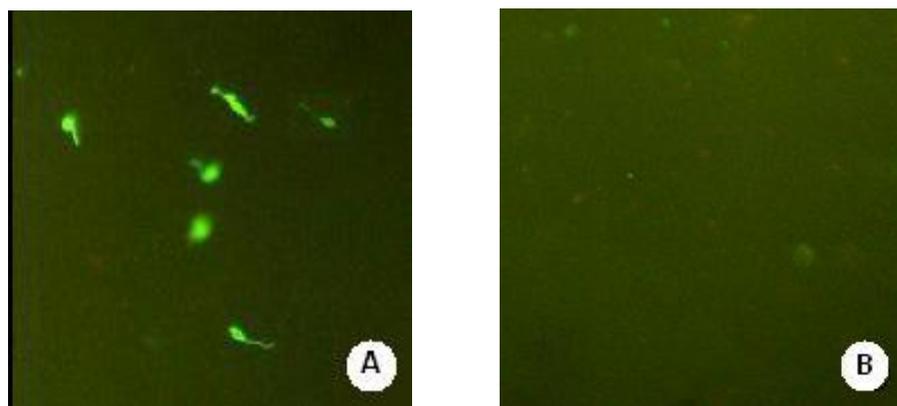


Figura 16. Avaliação da ligação do componente C3b do soro de cães não infectados na membrana plasmática de *L. infantum* utilizando soro a 5% (A) e soro inativado a 5%(B). Aumento de 40X.

#### 5.4. Quantificação de proteínas salivares totais

O valor referente à quantidade de proteínas salivares totais nos grupos de fêmeas de flebotomíneos alimentadas apenas com carboidratos (n=10) sofreu um aumento significativo do primeiro ao terceiro dia de fase adulta, não tendo sido observadas diferenças significativas entre os valores referentes ao terceiro, quarto e quinto dias (Fig. 17). O valor médio observado foi de aproximadamente 0,8 µg de proteína para um grupo de 5 pares de glândulas, ou seja, 10 ácidos (0,16 µg/ fêmea) no primeiro dia após a emergência dos adultos, passando para aproximadamente 2,2 µg (0,44 µg/ fêmea) no terceiro dia.

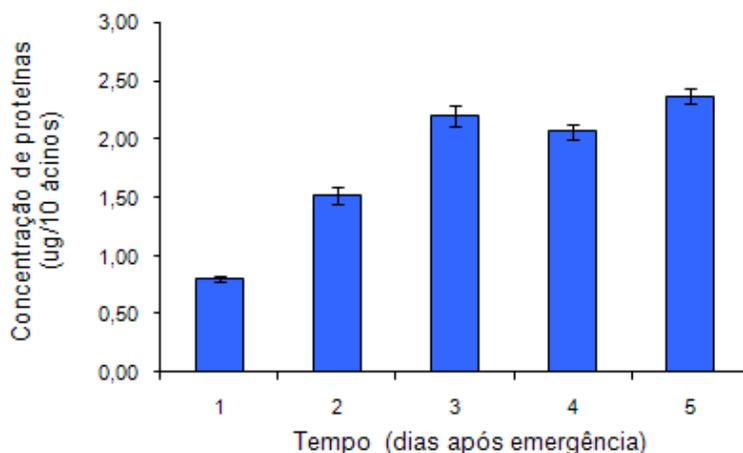


Figura 17. Concentração de proteínas em extrato de glândula salivar de *L. longipalpis* de acordo com a idade

Comparando-se insetos da mesma idade, os grupos de fêmeas que receberam o repasto sanguíneo em hamster anestesiado (n=10) apresentaram significativa redução (~ 44 - 60%) na quantidade de proteínas totais após o repasto. Não houve diferença significativa entre os valores encontrados do terceiro ao quinto dia após a emergência, tanto no grupo de fêmeas sem repasto quanto no grupo que realizaram repasto sanguíneo (ANOVA, ns) (Fig. 18). Traçando-se uma média entre os valores encontrados do terceiro ao quinto dia após a emergência, foi

observada uma redução média de aproximadamente 52% na quantidade de proteínas salivares totais após o repasto sanguíneo (Fig.19).

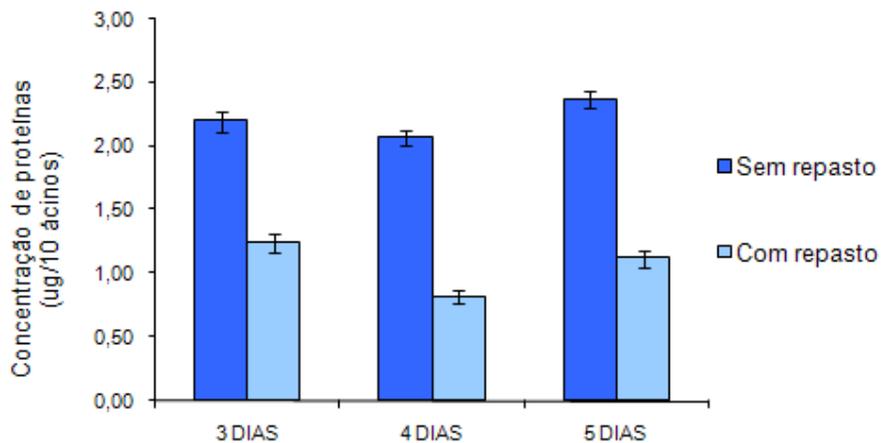


Figura 18. Concentração de proteínas em extrato de glândula salivar de *L. longipalpis* de acordo com a idade e dieta das fêmeas

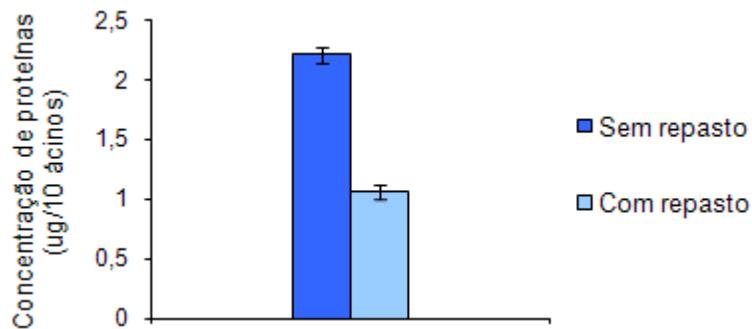


Figura 19. Valor médio da concentração de proteínas em extrato de glândula salivar de *L. longipalpis* em fêmeas de 3 a 5 dias de emergência com e sem repasto sanguíneo

## 6. DISCUSSÃO

A transmissão de *Leishmania* aos seus hospedeiros vertebrados ocorre no momento em que fêmeas infectadas com o parasito realizam o repasto sanguíneo. Durante este processo, o conteúdo das glândulas salivares é injetado junto com as promastigotas de *Leishmania* na pele do hospedeiro (Titus & Ribeiro 1988). Os mecanismos envolvidos nessa transmissão, os quais incluem fatores intrínsecos dos parasitos assim como as variadas combinações específicas entre estes e o vetor, continuam a ser alvos de uma série de debates.

Em contato com o soro humano normal (SHN), as promastigotas de *Leishmania* disparam a ativação do sistema complemento e a opsonização por C3b (Mosser & Brittingham 1997). Para que ocorra o sucesso na infecção de seus hospedeiros, o parasito deve escapar dos efeitos citolíticos do complemento. Portanto, a identificação dos mecanismos que determinam a opsonização das promastigotas poderia contribuir para o entendimento do processo de evasão do parasito às estratégias de defesa do hospedeiro vertebrado.

No SHN, a ativação do complemento e o mecanismo de opsonização das promastigotas são alvos de controvérsias. Alguns estudos indicam que as promastigotas ativam a via clássica do complemento (Domínguez & Toraño 1999; Navin et al. 1989), embora a maioria afirme que a ativação do complemento pela *Leishmania* é independente de anticorpo, ou seja, é mediada pelas vias alternativa ou das lectinas (Mosser & Edelson 1984; Mosser et al. 1986). Com o objetivo de esclarecer este mecanismo de ativação, Domínguez e colaboradores (2002) estudaram aspectos variados envolvendo a interação de quatro diferentes espécies de *Leishmania* com os fatores do complemento presentes no soro humano, e observaram que no SHN as promastigotas ativam as vias clássica e alternativa simultaneamente.

A capacidade da saliva em interferir com o sistema complemento tem sido observada em diversos grupos de artrópodes hematófagos, incluindo carrapatos (Valenzuela et al. 2000) e insetos como triatomíneos e mosquitos (Barros et al.

2009). Em flebotomíneos, Cavalcante e colaboradores (2003) utilizando como modelo extrato de glândulas salivares de fêmeas de *L. longipalpis* provenientes dos municípios de Teresina e Abaetetuba, nos estados brasileiros do Piauí e Pará, respectivamente, e fêmeas de *L. migonei* provenientes da Venezuela, observaram que a saliva de *L. longipalpis* das duas localidades foi capaz de inibir tanto a via clássica como a via alternativa do complemento humano, na mesma intensidade. Por outro lado, a saliva de *L. migonei* inibiu apenas a via clássica do complemento, não tendo nenhum efeito significativo sobre a via alternativa.

O efeito lítico do soro sobre promastigotas e amastigotas de várias espécies de *Leishmania* também tem sido avaliado (Hoover et al. 1984; Domínguez et al. 2002; Moreno et al. 2007), porém nenhum dos trabalhos anteriores avaliou a suscetibilidade desses parasitos aos fatores do complemento do hospedeiro na presença da saliva do vetor, a qual já foi demonstrado possuir relevante importância no processo de transmissão do parasito.

A suscetibilidade das formas promastigotas de *Leishmania* mostrou ser dependente da concentração do soro e o processo de lise celular apresentou-se de forma bastante acelerada, visto que na maior concentração de soro (10%), aproximadamente 50% dos parasitos já haviam sido mortos no tempo de 4 minutos e meio. Estes resultados confirmam mais uma vez que, embora possam apresentar uma certa resistência ao complemento do hospedeiro, as formas promastigotas de *Leishmania* devem utilizar mecanismos bastante eficientes e mostrar uma resposta bastante rápida no processo de evasão do ataque do sistema imunológico.

Domínguez e colaboradores (2002) avaliaram a ação lítica do complemento humano em 4 diferentes espécies de *Leishmania*: *L. donovani* Khartoum 1246 (MHOM/SD/43/124), *L. amazonensis* Maria (MHOM/Br/79/Maria), *L. infantum* PB75 (MHOM/Fr/LEM75) e *L. major* NIH 173 (MHOM/IR/-/173). Foram usadas promastigotas provenientes de culturas axênicas em fase estacionária de desenvolvimento e a morte celular foi avaliada por citometria de fluxo utilizando SHN a 50%. A cinética de lise em SHN mostrou uma grande variabilidade interespecífica na porcentagem de morte celular, além de uma elevada suscetibilidade aos fatores do complemento humano para as 4 espécies de *Leishmania*. Ao final de 3 minutos,

apenas 15 e 10 % das promastigotas de *L. major* e *L. amazonensis*, respectivamente, sobreviveram.

Moreno e colaboradores (2007), objetivando avaliar a resistência de formas promastigotas de *L. infantum* provenientes do trato digestivo de fêmeas de *Phlebotomus perniciosus*, compararam a suscetibilidade ao complemento humano desses parasitos com a de promastigotas provenientes de cultura axênica em fase estacionária de crescimento. Como resultado, observaram uma elevada morte celular, com aproximadamente 90% dos parasitos mortos aos 3 minutos quando incubados com o SHN a 50%, sem diferença significativa na sensibilidade entre as formas provenientes de cultura e àquelas isoladas do trato digestivo de flebotomíneos.

Grimm e Jenni (1993), também utilizando como modelo promastigotas de *L. infantum* isoladas de *P. perniciosus* aos 14 dias pós-infecção e SHN a 12%, observaram que aproximadamente 50% dos parasitos permaneceram viáveis após 1 hora de incubação a 37°C. Esse resultado está de acordo com os valores encontrados no nosso estudo utilizando o SHN a 10%, que foi de aproximadamente 50% de morte aos 6 minutos, permanecendo constante até os 12 minutos (dados não mostrados). Em *Leishmania*, a suscetibilidade *in vitro* ao complemento humano parece estar em função da concentração do soro, pois apenas metade das promastigotas foram mortas em 1 hora de incubação com soro a 12% (Grimm & Jenni 1993), e quase todas foram mortas aos 3 minutos de incubação com o soro a 50% (Moreno et al. 2007).

A adição de extrato de glândula salivar de *L. longipalpis* embora não tenha influenciado consideravelmente na proteção das formas promastigotas de *Leishmania* nos grupos de maior concentração do soro (10%), teve uma grande contribuição na redução da morte celular no tratamento o qual se utilizou o soro a 5% na presença de extrato de glândula salivar referente a 8 ácidos. Neste tratamento foi observada uma redução de aproximadamente 85% na morte celular comparado ao tratamento sem saliva, utilizando-se a mesma concentração de soro.

A concentração de proteínas salivares totais, em fêmeas sem alimentação sanguínea, aumenta a partir do primeiro dia após a emergência dos adultos. Este

valor apresentou um crescente aumento (aproximadamente 2,5 vezes) até o terceiro dia, mantendo-se praticamente constante até o quinto dia. Na avaliação da quantidade de saliva liberada durante o repasto sanguíneo foi observada uma redução de aproximadamente 50% na quantidade de proteínas totais após o repasto.

Prates e colaboradores (2008), realizando um estudo quantitativo das proteínas salivares em fêmeas de *L. longipalpis* de acordo com a idade e dieta, observaram valores consideravelmente mais elevados que aqueles observados no nosso estudo, embora esta quantificação tenha seguido um padrão de crescimento semelhante. Esse valor consideravelmente mais alto encontrado por Prates e colaboradores pode ser justificado pela maneira pela qual eles promoveram o rompimento dos ácinos das glândulas salivares, que consistiu no uso de um sonicador. Desta forma, pode ter havido interferência de proteínas intracelulares, as quais possivelmente ficaram suspensas após o rompimento das membranas celulares no processo de sonicação.

A estimativa da quantidade de saliva liberada pelas fêmeas no momento do repasto sanguíneo é um ponto de grande importância para se avaliar quais seriam as reais proporções de saliva e soro do hospedeiro nas condições naturais, isto é durante a picada num hospedeiro. Nos ensaios de lise pelo complemento humano, embora a redução mais expressiva tenha sido na proporção de 5% de soro com 8 ácinos, essa proporção não reproduz de forma fiel o que acontece naturalmente no momento do repasto sanguíneo num hospedeiro, sendo a quantidade de saliva subestimada no nosso modelo experimental, pois a proporção de saliva utilizada foi menor do que a lançada no local da picada em condições naturais. Rogers e colaboradores (2001) estimaram o volume de sangue ingerido por fêmeas de *L. longipalpis* durante o repasto em 1,6µl. Levando-se em consideração o hematócrito humano (~45%), o volume correspondente ao soro presente no repasto é de aproximadamente 0,9µl. Nós determinamos que uma fêmea lança no local da picada durante o repasto o equivalente a mais ou menos a saliva presente em um ácino salivar (50% do conteúdo dos dois ácinos). Portanto, a proporção natural de saliva/soro é de 1 ácino para cada 0,9 µl de soro. Assim, para os experimentos com soro a 5% (10µl de soro em 200 µl) seria necessário o uso de pelo menos 11 ácinos

para mantermos a mesma proporção. De acordo com nossos resultados mostrados na Figura 8, mesmo utilizando uma quantidade relativa menor de saliva ainda obtivemos uma significativa inibição de morte celular. Seguindo este raciocínio, nos experimentos com soro a 10% deveríamos usar o equivalente a 22 ácidos salivares para obter o mesmo efeito. Isto explicaria porque não obtivemos inibição do complemento nestas condições (Figura 9).

A busca por modelos experimentais mais fiéis ao modelo natural de transmissão de *Leishmania* é de grande relevância para o entendimento da interação entre o parasito, o vetor e o hospedeiro vertebrado. Desta forma, é fundamental que além da proporção entre saliva e soro (complemento) se leve em consideração a quantidade de parasitos envolvidos na interação com o hospedeiro vertebrado. O número de formas promastigotas expostas a uma determinada concentração de soro e saliva deve influenciar na eficiência com que o sistema do complemento vai atacar os parasitos levando-os a morte. Em nossos experimentos utilizamos apenas uma concentração de parasitos para cada concentração de soro e saliva. Porém o número de parasitos normalmente regurgitados no local da picada (até 1000 promastigotas)(Rogers et al. 2004) deve ser levado em conta nos próximos experimentos.

Diversos trabalhos vêm demonstrando a participação de fatores presentes no soro de pacientes naturalmente infectados no aumento da citotoxicidade pelo complemento em parasitos do gênero *Leishmania*. Hoover e colaboradores (1985) avaliaram a participação de anticorpos na eficiência de ativação da via clássica. Observaram um aumento considerável da citotoxicidade em amastigotas de *L. donovani* quando incubadas com o soro de pacientes naturalmente infectados e de humanos saudáveis, comparados ao grupo controle incubado apenas com o soro de humanos saudáveis.

A atividade lítica em *Leishmania* é desencadeada principalmente pela ativação da via alternativa do complemento, porém a participação de anticorpos específicos anti-*Leishmania*, os quais apresentam-se em títulos elevados em infecções naturais tanto em humanos como em cães, podem atuar diretamente na ativação da via clássica, exacerbando o efeito lítico do complemento nessas células.

Os cães domésticos são os reservatórios de maior importância na epidemiologia da LV, sendo considerados a principal fonte de infecção para o vetor nas regiões urbanas e peri-urbanas (Costa-Val et al. 2007). No entanto, embora exista uma variedade de trabalhos relacionados à suscetibilidade de promastigotas ao complemento humano, não existem na literatura trabalhos relacionados à cinética de lise e à sensibilidade desses parasitos aos fatores do complemento presentes no soro de cães infectados e não infectados por *Leishmania*.

Nesta primeira avaliação da sensibilidade de formas promastigotas de *L. infantum* aos fatores líticos do complemento presentes no soro de cães infectados e não infectados, diferentemente do que ocorre com o soro humano, observamos uma elevada resistência dessas células numa concentração de 10% de soro, tanto para animais saudáveis quanto para animais infectados. A forte resistência desses parasitos à lise mediada pelo complemento canino, dessa forma, poderia explicar, pelo menos em parte, a relativa vulnerabilidade dos cães à LVC.

Embora praticamente todas as células tenham permanecido viáveis após a incubação com o soro canino por até 6 minutos, as formas promastigotas de *L. infantum* são capazes de ativar o sistema complemento em cães e opsonizar as células do parasito com C3b. Nos ensaios de avaliação da opsonização por C3b em promastigotas, não observamos nenhuma diferença aparente entre os resultados com soro humano, de cães doentes e de cães não infectados. Em nossas condições experimentais, a adição de extrato de glândula salivar não impediu a opsonização das células pelo componente C3b do soro. Isto é curioso, pois nosso grupo de pesquisa possui diversas evidências experimentais de que a saliva de *L. longipalpis* inibe a deposição de C3b, embora esta deposição nunca seja inibida completamente. É possível que nas nossas condições experimentais (concentrações de anticorpo e etc) a diferença de deposição de C3b sobre as formas promastigotas na presença e ausência de saliva não seja perceptível.

Mosser e colaboradores (1985), usando como modelo amastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*, avaliaram a ativação do complemento humano e relacionaram esta ativação aos diferentes níveis de suscetibilidade ao complemento apresentado por cada espécie do parasito. A ativação do complemento também foi

determinada pela identificação de C3b ligado à superfície das células por RIFI. Foi observado que todas as espécies, independentemente do seu grau de suscetibilidade, foram capazes de ativar o sistema de complemento.

Desta forma, esses dados sugerem que a lise pode não ser um indicador adequado da ativação do complemento. Isto pode ser particularmente relevante para parasitos intracelulares obrigatórios como a *Leishmania*, a qual pode usar da sua opsonização por C3b como uma vantagem adicional para facilitar a sua entrada nos fagócitos, favorecendo a manutenção do parasito no hospedeiro vertebrado.

Nosso trabalho foi pioneiro na avaliação da participação da saliva de flebotomíneos no processo de resistência à lise pelo complemento de hospedeiros de importância na epidemiologia da LV. Além disso, não existiam dados na literatura referente à suscetibilidade de *Leishmania* ao complemento de cães, portanto, nossos resultados abrem portas para um estudo mais amplo e detalhado desta interação, assim como da participação da saliva na proteção do parasito, buscando entender melhor a modulação do sistema imunológico pela saliva e seu possível uso na formulação de uma vacina eficiente contra a LV ou LVC.

## 7. CONCLUSÕES

A atividade lítica pelo complemento em *L. infantum* utilizando SHN é dependente da concentração de soro. As promastigotas em fase estacionária de desenvolvimento, embora mais resistentes à lise pelo complemento, podem ser atacadas e mortas pelo complemento humano, que atua de forma bastante rápida no processo de lise destas células. Por outro lado, as formas promastigotas de *L. infantum* podem apresentar grande resistência ao complemento presente no soro de cães infectados e não infectados, mesmo na presença de títulos elevados de anticorpos específicos anti-*Leishmania* nos cães infectados.

A saliva de *L. longipalpis* pode influenciar consideravelmente na sobrevivência das promastigotas de *L. infantum* frente ao complemento humano, favorecendo na sobrevivência do parasito durante o processo de transmissão ao hospedeiro vertebrado. No entanto, a presença de EGS de *L. longipalpis*, não impede completamente a ativação do complemento tanto pelo soro humano quanto de cães infectados e não infectados por *Leishmania*, embora outros trabalhos tenham demonstrado uma inibição desta ativação na presença de saliva do vetor.

A quantidade de proteínas salivares em *L. longipalpis* está diretamente relacionada à idade, tendo considerável aumento na sua quantidade após o terceiro dia de emergência. Durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, estas fêmeas liberam aproximadamente 50% da quantidade de proteínas salivares totais, o que corresponde ao valor encontrado em um ácido de glândula salivar.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander J, Satoskar AR, Russell DG 1999. *Leishmania* species: Models of intracellular parasitism. *J Cell Sci.* 112: 2993-3002.

Anam K, Afrin F, Banerjee D, Pramanik N, Guha SK, Goswami RP, Gupta PN, Saha SK, Ali N 1999. Immunoglobulin subclass distribution and diagnostic value of *Leishmania donovani* antigen-specific immunoglobulin G3 in Indian kala-azar patients. *Clin Diagn Lab Immunol.* 6: 231-235.

Ambrósio AR 2005. *Leishmania (Viannia) braziliensis: Ativação do sistema complemento e interação com a Lectina Ligante da Manose (MBL)*, Master Thesis, Universidade federal do Paraná, Curitiba, 81pp.

Andrade BB, Oliveira CI, Brodskyn CI, Barral A, Barral-Neto M 2007. Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: Current insights. *Scand J Immunol.* 66: 122-127.

Atta AM, Colossi R, Sousa-Atta ML, Jeronimo SM, Nascimento MD, Bezerra GF, Orge G, Carvalho EM 2004. Antileishmanial IgG and IgE antibodies recognize predominantly carbohydrate epitopes of glycosylated antigens in visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 99(5):525-30.

Baneth G, Aroch I 2008. Canine leishmaniasis - a diagnostic and clinical challenge. *Vet. J.* 175, 14–15.

Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L 2008. Canine Leishmanioses – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitol.* 24: 324-330.

Berrahal F, Mary C, Roze M, Berenger A, Escoffier K, Lamouroux D, Dunan S 1996. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55, 273–277.

Barros VC, Assumpção JG, Cadete AM, Santos VC, Cavalcante RR, Araújo RN, Pereira MH, Gontijo NF 2009. The role of salivary and intestinal complement system inhibitors in the midgut protection of triatomines and mosquitoes. *Plos One.* 4: e6047.

Bogdan C, Röllinghoff M 1998. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *International Journal for Parasitology.* 28: 121-134.

Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Brittingham A, Morrison CJ, McMarter 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. *J Immunol.* 155: 3102-3111.

Brittingham A, Mosser DM 1996. Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitol Today.* 12: 444-447.

Carrillo E, Moreno J 2009. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol and Immunopathol.* 128: 67-70.

Carvalho GM, Gontijo CM, Falcão AL, Andrade Filho JD 2010. Study of phlebotomine sand flies (Diptera: Phlebotomidae) collected in a *Leishmania*-endemic area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Brazil. *J Med Entomol.* 47: 972-976.

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.

Chagas E 1936. Primeira verificação em indivíduo vivo da leishmaniose visceral no Brasil. *Bras-Méd*. 50:221-222.

Chagas E, Cunha AM, Ferreira LC, Deane L, Geane G, Guimarães FN, Paumgarten MJ, Sá B 1938. Leishmaniose Visceral Americana (Relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da leishmaniose visceral americana em 1937). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 33: 189-229.

Collin N, Gomes R, Teixeira C, Cheng L, Laughinghouse A, Ward JM, Elnaiem D, 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(5): e1000441.

Colomb MG, Villiers CL, Villiers M-B, Gabert FM, Santoro L 1996. The role of antigen-bound C3b in antigen processing. *Res Immunol*. 147: 75–82.

Costa DJ, Favali C, Clarencio J, Afonso L, Conceição V, Miranda JC, Titus RG, Valenzuela J, Barral-Neto M, Barral A, Brodskyn CI 2004. *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. *Infect Immun*. 72: 1298-1305.

Costa-Val AP, Cavalcanti RR, Gontijo NF, Michalick MSM, Alexander B, Williams P, Melo MN 2007. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *The Vet Journal*. 174: 636-643

Cunningham AC 2002. Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol*. 72: 132-141.

Descoteaux A, Turco SJ 1999. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta*. 1455: 341-352

Domínguez M, Toraño A 1999. Immue Adherence-mediated Opsonophagocytosis: The Mechanism of *Leishmania* Infection. *J Exp Med*. 189(1): 25 – 35.

Dominguez M, Moreno I, López-Trascasa M, Toraño A 2002. Complement Interaction with Trypanosomatid Promastigotes in Normal Human Serum. *J Exp Méd*. 195: 451-459.

Donnelly KB, Lima HC, Titus RG 1998. Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania braziliensis* in the presence or absence of sand fly vector salivary gland lysate. *J. Parasitol*. 84: 97–103.

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

Fisa R, Gallego M, Castillejo S, Aisa MJ, Serra T, Riera C, Carrio J, Gallego J, Portus M 1999. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. *Vet. Parasitol*. 83, 87–97.

Franke ED, McGreevy PB, Katz SP, Sacks DL 1985. Growth cycle dependent generation of complement-resistant *Leishmania* promastigotes. *J Immunol*. 134: 2713-2718.

Giunchetti RC, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Roatt BM, de Oliveira Aguiar-Soares RD, Coura-Vital W, de Abreu RT, Malaquias LC, Gontijo NF, Brodskyn C, de Oliveira CI, Costa DJ, de Lana M, Reis AB 2008. A killed

*Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. *Vaccine*. 26: 623-638.

Gramiccia M, Gradoni L 2005. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *Int J Parasitol*. 35: 1169-1180.

Grimm F, Jenni L 1993. Human serum resistant promastigotes of *Leishmania infantum* in the midgut of *Phlebotomus perniciosus*. *Acta Trop*. 52: 267-273.

Handman E 1999. Cell biology of *Leishmania*. *Adv Parasitol*. 44: 01-39.

Handman E, Bullen DV 2002. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends parasitol*. 18(8): 332-334.

Hoover DL, Berger M, Nacy CD, Hockmeyer WT, Meltzer MS 1984. Killing of *Leishmania tropica* amastigotes by factors in human serum. *J Immunol*. 43: 1630

Hoover DL, Berger M, Hammer CH, Meltzer MS 1985. Complement-mediated serum cytotoxicity for *Leishmania major* amastigotes: killing by serum deficient in early components of the membrane attack complex. *J Immunol*. 135(1): 570-574.

Hourcade DE 2008. Properdin and complement activation: a fresh perspective. *Curr Drug Targets*. 9:158-164.

Janeway CA Jr, Travers P, Walport MJ, Shlomchik M 2005. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, Vol. VI, Garland Publishing, New York, 547pp.

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 Parasitol.* 22: 439-445.

Lainson R, Ward RD, Shaw JJ 1977. Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Nature.* 266: 628-630.

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. *Infect. Immun.* 64: 5442–5445

Lincoln LM, Ozaki M, Donelson JE, Beetham JK 2004. Genetic complementation of *Leishmania* deficient in PSA (GP46) restores their resistance to lysis by complement. *Mol Biochem Parasitol.* 137: 185-189.

Liszewski MK, Farries TC, Lublin DM, Rooney IA, Atkinson JP 1996. Control of the complement system. *Adv Immunol.* 61:201-283.

Medzhitov R, Janeway C Jr 2000. Innate immunity. *N Engl J Med.* 343:338-344.

Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SM, Mosser DM 2005. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med.* 201: 747-753.

Modi GB, Tesh RB 1983. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *J Med Entomol.* 20: 568-569.

Moreno I, Molina R, Toraño A, Laurin E, García E, Dominguez M 2007. Comparative real-time kinetic analysis of human complement killing of *Leishmania infantum* promastigotes derived from axenic culture or from *Phlebotomus perniciosus*. *Microbes Infect.* 9: 1574-1580.

Mosser DM, Edelson PJ 1984. Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania promastigotes*: parasite lysis and attachment to macrophages. *J Immunol.* 132(3): 1501-5.

Mosser DM, Wedgwood JF, Edelson PJ 1985. *Leishmania* amastigotes: resistance to complement-mediated lysis is not due to a failure to fix C3. *J Immunol.* 134: 4128-4131.

Mosser DM, Springer TA, Diamond MS 1992. *Leishmania* promastigotes require opsonic complement to bind to the human leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol.* 116(2): 511-20.

Mosser DM, Brittingham A 1997. *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology.* 115: 09-23.

MS - Ministério da Saúde 2009. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Eletrônico Epidemiológico, Zoonoses. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br>  
Acessado em: 10 de fevereiro de 2010.

Norsworthy NB, Sun JR, Elnaiem D, Lanzaro G, Soong L 2004. Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulation interleukin-10 production. *Infect. Immun.* 72: 1240–1247.

Navin TR, Krug EC, Pearson RD 1989. Effect of immunoglobulin M from normal human serum on *Leishmania donovani* promastigote agglutination, complement-mediated killing, and phagocytosis by human monocytes. *Infect Immun.* 57(4):1343-6.

Oliveira F, Lawyer PG, Kamhawi S, Valenzuela JG 2008. Immunity to Distinct Sand Fly Salivary Proteins Primes the Anti-*Leishmania* Immune Response towards Protection or Exacerbation of Disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2: e226.

Paranhos M, Dos Santos WC, Sherlock I, Oliveira GGS, Pontes De Carvalho LC 1993. Development of eosinophilia in dogs intradermally inoculated with sand fly saliva and *Leishmania (Leishmania) chagasi* stationary phase. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 88: 249–251.

Paranhos-Silva M, Oliveira GGS, Reis EA, De 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. *Vet. Parasitol.* 114: 97–111.

Peters NC, Sacks DL 2009. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiology.* 11(9): 1290-1296.

Prates DB, Santos LD, Miranda JC, Souza AP, Palma MS, Barral-Netto M, Barral A 2008. Changes in amounts of total salivary gland proteins of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) according to age and diet. *J Med Entomol.* 45(3):409-13.

Puentes SM, Sacks DL, Da Silva RP, Joiner KA 1988. Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. *J Exp Med.* 167: 887-902.

Qureshi AA, Asahina A, Ohnuma M, Tajima M, Granstein RD, Lerner EA 1996. Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilator peptide from sand fly salivary gland extracts. *Am J Trop Med Hyg.* 54: 665-671.

Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Vale AM, Maques MJ, Giunchetti RC, Mayrink W, Guerra LL, Andrade RA, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA 2006. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112: 102-116.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, Tafuri WL, Corrêa-Oliveira R 2009. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 128: 87-95.

Ribeiro JM, Rossignol PA, Spielman A 1986. Blood-finding strategy of a capillary-feeding sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 83: 683–686.

Ribeiro JM, Modi GB, Tesh RB 1989. Salivary apyrase activity of some Old World phlebotomine sand flies. *Insect Biochem.* 19: 409–412.

Ribeiro JM 1995. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis.* 4: 143-152

Ribeiro JM, Katz O, Pannell LK, Waitumbi J, Warburg A 1999. Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP. *J. Exp. Biol.* 202: 1551–1559.

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 sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology.* 124: 495-507.

Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MA, Bates PA 2004. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature.* 22: 463-467.

Rohousová I, Volf P 2006. Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. *Folia Parasitol.* 53: 161-171.

Samuelson J, Lerner E, Tesh R, Titus R 1991. A mouse model of *Leishmania braziliensis braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. *J. Exp. Med.* 173: 49–54.

Shaw JJ 1994. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 471-478.

Sharma U, Singh S 2009. Immunobiology of leishmaniasis. *Indian J Exp Biol.* 47(6): 412-423.

Silveira FT, Ishikawa EA, De Souza AA, Lainson R 2002. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasite.* 9(1): 43-50.

Sim RB, Dodds AW 1997. The complement system: an introduction. In: Dodds AW, Sim RB, *Complement: a practical approach*, Oxford University Press, p. 01-18.

Souza GD, Santos E, Andrade Filho JD 2009. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104(8) 1181-2.

Theodos CM, Ribeiro JM, Titus RG 1991. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. *Infect. Immun.* 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 concavalin A in vitro. *Exp Parasitol.* 89: 133-136.

Titus RG, Ribeiro JM 1988. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science.* 239: 1306-1308.

Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C, Osorio Y 2001. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am J Trop Med Hyg.* 64: 119-124.

Turnberg D, Botto M 2003. The regulation of the complement system: insights from genetically-engineered mice. *Mol Immunol.* 40:145-153.

Valenzuela JG, Charlab R, Mather TN, Ribeiro JM 2000. Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *J Biol Chem.* 275(25):18717-23.

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*. *J Exp Biol.* 207: 3717-3729.

Warburg A, Saraiva E, Lanzaro GC, Titus RG, Neva F 1994. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser B.* 345:223–230.

Walport MJ 2001. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med.* 344:1140-1144.

WHO - World Health Organization 2010. [homepage on the internet]. Geneva: leishmaniasis/burden of disease. [updated 2010 Jan 16; cited 2010 Feb 08]. Available from:[http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden\\_magnitude/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html)

Williams P, Dias ES Psychodidae, In: Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA. Parasitologia Humana, 11ª Edição. São Paulo: Atheneu, 2005. cap. 42, p. 345-353.

Young DG, Duncan MA 1994. Guide to the identification in geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Am Entomol Inst.* 54: 871-881.