

Antonio Ferreira Mendes de Sousa

**Ação da saliva de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera,
Psychodidae) sobre o sistema complemento de cães
(*Canis familiaris*), galinhas (*Gallus gallus*) e cobaias
(*Cavia porcellus*)**

**Belo Horizonte
Minas Gerais – Brasil
2012**

Antonio Ferreira Mendes de Sousa

**Ação da saliva de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera,
Psychodidae) sobre o sistema complemento de cães
(*Canis familiaris*), galinhas (*Gallus gallus*) e cobaias
(*Cavia porcellus*)**

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

Área de concentração: Entomologia

Orientador: Prof. Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo

Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos - LFIH

Departamento de Parasitologia – ICB/UFMG

Belo Horizonte – 2012

Sousa, Antonio Ferreira Mendes de.

Ação da saliva de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) sobre o sistema complemento de cães (*Canis familiaris*), galinhas (*Gallus gallus*) e cobaias (*Cavia porcellus*). [manuscrito] / Antonio Ferreira Mendes de Sousa. – 2012.

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

Orientador: Nelder de Figueiredo Gontijo.

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

1. Psychodidae – Teses. 2. Saliva -Teses. 3. Complemento (Imunologia) – Teses. 4. Parasitologia – Teses. 5. Entomologia - Teses. I. Gontijo, Nelder de Figueiredo. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 595.7

Aos meus pais,

**Antonio Ferreira de Sousa Sobrinho
e Francisca Mendes de Sousa**

Os nossos pais amam-nos porque somos seus filhos, é um fato inalterável. Nos momentos de sucesso, isso pode parecer irrelevante, mas nas ocasiões de fracasso, oferecem um consolo e uma segurança que não se encontram em qualquer outro lugar.

Bertrand Russel

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.

José de Alencar

Agradecimentos

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

Ao meu orientador, **Seu Nelder**, pela confiança, paciência e ensinamentos.

Ao professor **Dr. Rodolfo C. Giunchetti**, da Universidade Federal de Ouro Preto, pela permissão para coleta de sangue de cães mantidos em canis desta universidade.

Ao **Dr. Jesus G. Valenzuela**, da Unidade de Biologia Molecular de Vetores do *National Institute of Health* – NIH (USA), pela gentileza em nos ceder amostras da proteína recombinante LJM19.

Ao **César Nonato**, técnico do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos, pela criação dos insetos utilizados neste trabalho e por toda ajuda a mim dispensada dentro e fora do laboratório. Deixo aqui registrada minha admiração à sua pessoa: um profissional competente e responsável, pai preocupado e um grande ser humano. César, você é O CARA !

Aos amigos e colegas do LFIH, pelo clima tranquilo no laboratório, as brincadeiras que distraem e amenizam os dias de trabalho exaustivo, e as trocas de idéias científicas que nos ajudam a crescer como profissionais. Agradeço especialmente ao **Vladimir Fazito do Vale**, por me ajudar diretamente na realização deste trabalho desde o primeiro momento fornecendo importantes dicas e sugestões.

Às amigas da turma de mestrado, **Cynthia de Paula** e **Flaviane Matosinhos**, pela excelente companhia, simpatia e pelos trabalhos bem-sucedidos realizados juntos. À Cynthia, meu carinho especial pela afinidade e atenção desde o primeiro contato, ainda na seleção para o mestrado.

Ao **Gregório Almeida**, que se tornou muito mais que um colega de mestrado, mais que uma companhia de saídas, tornou-se um grande AMIGO. Sou-lhe profundamente grato por toda ajuda prestada, pela confiança, os incontáveis momentos de descontração e também pelas críticas. Expresso

aqui minha admiração à sua coragem e inteligência e confesso que esses dois anos em Belo Horizonte não seriam tão bons sem a sua Amizade !

À amiga **Kel Aguiar**, pela companhia, carinho e amizade de longa data que cresce a cada dia que passa.

Ao amigo **Andrey Andrade**, pelas inúmeras conversas inspiradoras, dicas de estatística e sugestões visando a qualidade deste trabalho. Conviver e contar com a ajuda de pessoas como você será sempre um privilégio.

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

Aos professores do curso de Pós-graduação em Parasitologia da UFMG, nas pessoas dos seus coordenadores, **Profª Érika Martins Braga** e **Prof. Marcos Horácio Pereira**, pelos ensinamentos de qualidade, essenciais à minha formação como Parasitologista.

Às instituições de fomento que contribuíram para a realização deste trabalho: **CAPES, CNPq** e **FAPEMIG**.

A todos os amigos e colegas que direta ou indiretamente me ajudaram a concluir mais esta etapa acadêmica.

MUITO OBRIGADO !!!

Sumário

	Página
Lista de abreviaturas e siglas	IX
Lista de figuras	X
Lista de tabelas	XII
Resumo	XIII
Abstract	XIV
1. Introdução	15
1.1 Importância dos Flebotomíneos	15
1.2 Leishmaniose Visceral Americana	17
1.3 Importância da Saliva do Vetor no Processo de Hematofagia e Transmissão do Parasito	19
1.4 O Sistema Complemento	22
1.5 Importância da Inibição do Sistema Complemento para Artrópodes Hematófagos	25
2. Justificativa	28
3. Objetivos	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos	29
4. Metodologia	30
4.1 Aprovação em Comitê de Ética	30
4.2 Criação dos Insetos	30
4.3 Obtenção do Extrato de Glândulas Salivares (EGS) e da Proteína Recombinante LJM19	31
4.4 Obtenção dos Soros	32

4.5	Determinação da Influência do pH e da Temperatura na Atividade do Sistema Complemento de Cães, Galinhas e Cobaias	33
4.6	Estudo da Ação do EGS sobre a Hemólise provocada pelo Sistema Complemento de Cães, Galinhas e Cobaias	33
4.7	Estudo da Ação do EGS sobre a Deposição de C3b de Cães e Cobaias	35
4.8	Estudo da Ação da Proteína Recombinante LJM19 sobre a Via Clássica do Sistema Complemento de Cães	37
4.9	Análise Estatística	37
5.	Resultados	38
5.1	Determinação da Influência do pH e da Temperatura na Ativação do Complemento de Cães, Galinhas e Cobaias	38
5.1.1	Influência do pH na Ativação da Via Clássica	38
5.1.2	Influência do pH na Ativação da Via Alternativa	38
5.1.3	Influência da Temperatura na Ativação do Sistema Complemento das Aves	39
5.2	Ação do EGS sobre a Atividade Hemolítica da Via Clássica das Três Espécies Estudadas	40
5.3	Ação do EGS sobre a Atividade Hemolítica da Via Alternativa das Três Espécies Estudadas	42
5.4	Ação do EGS sobre a Deposição de C3b da Via Clássica de Cães e Cobaias	44
5.5	Ação do EGS sobre a Deposição de C3b da Via Alternativa de Cães e Cobaias	46
5.6	Ação da Proteína LJM19 sobre a Via Clássica de Cães	50
6.	Discussão	52
7.	Conclusões	61
8.	Referências Bibliográficas	62

Lista de Abreviaturas e Siglas

CAM: Complexo de ataque à membrana

DALY: anos de vida perdidos devido à morte prematura e anos de produção perdidos devido à morbidade

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra acético

EGS: Extrato de glândula salivar

EGTA: Ácido etileno-glicol tetra acético

GHB²⁺: HEPES 5mM, NaCl 145mM, CaCl₂ 0,15mM, MgCl₂ 0,5mM e gelatina 0,1%

GHB-EDTA: HEPES 5mM, NaCl 145mM, EDTA 10Mm e gelatina 0,1%

HMEBN: HEPES 5mM; MgCl₂ 7mM; EGTA 10mM; Albumina de soro bovino 5mg/ml; NaCl 140mM

HN: HEPES 10mM e NaCl 140Mm

HNB :HEPES 10mM, NaCl 140mM e Albumina de soro bovino 1mg/ml

HNCM: HEPES 4mM; NaCl 145mM; CaCl₂ 2mM; MgCl₂ 1mM

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

IFN- γ : Interferon gama

IL: Interleucina

kDa: Quilodalton

LPG: Lipofosfoglicano

LVA: Leishmaniose Visceral Americana

MASP: Serino-protease associada à MBL

MBL: Lectina ligante de manose

Mg-EGTA: HEPES 5mM, NaCl 145mM, EGTA 10mM, MgCl₂ 7Mm e gelatina 0,1%

OPD: Orto-fenileno-diamina

PAMP: Padrão molecular associado a patógenos

TNB: Tris 10mM, NaCl 140mM e Albumina de soro bovino 3%

TNBTC: Tris 10mM, NaCl 140mM, Albumina de soro bovino 3%, Tween 20 0,05% e CaCl₂ 5mM

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa

Lista de Figuras

	Página
Figura 1: Ciclo biológico de flebotomíneo representando seu desenvolvimento holometábolo	15
Figura 2: Esquema representativo do ciclo biológico de <i>Leishmania</i> sp. em hospedeiro humano e no vetor	17
Figura 3: Flebotomíneo realizando telmatofagia	20
Figura 4: Esquema representativo do sistema complemento	23
Figura 5: Manutenção dos flebotomíneos em colônia	31
Figura 6: Dissecção de glândulas salivares de <i>L. longipalpis</i>	31
Figura 7: Atividade hemolítica da via clássica de cães, galinhas e cobaias em diferentes pHs	38
Figura 8: Atividade hemolítica da via alternativa de cães, galinhas e cobaias em diferentes pHs	39
Figura 9: Deposição de C3b proveniente da via alternativa de cães e cobaias em pH 7,4 e pH 8,15	39
Figura 10: Ativação das vias clássica e alternativa do complemento de galinhas em diferentes temperaturas	40
Figura 11: Porcentagem de hemólise pela via clássica de cães na presença de diferentes concentrações de EGS em pH 7,4 e pH 8,15	40
Figura 12: Porcentagem de hemólise pela via clássica de galinhas na presença de diferentes concentrações de EGS em pH 7,4 e pH 8,15	41
Figura 13: Porcentagem de hemólise pela via clássica de cobaias na presença de diferentes concentrações de EGS em pH 7,4 e pH 8,15	42
Figura 14: Porcentagem de hemólise pela via alternativa de cães na presença de diferentes concentrações de EGS em pH 7,4 e pH 8,15	43
Figura 15: Porcentagem de hemólise pela via alternativa de galinhas na presença de diferentes concentrações de EGS	

em pH 7,4 e pH 8,15	43
Figura 16: Porcentagem de hemólise pela via alternativa de cobaias na presença de diferentes concentrações de EGS em pH 7,4	44
Figura 17: Porcentagem de deposição de C3b da via clássica de cães na presença de diferentes concentrações de EGS em pH 7,4 e pH 8,15	45
Figura 18: Porcentagem de deposição de C3b da via clássica de cobaias na presença de diferentes concentrações de EGS em pH 7,4 e pH 8,15	45
Figura 19: Porcentagem de deposição de C3b da via alternativa de cães na presença de diferentes concentrações de EGS em pH 7,4 e pH 8,15	46
Figura 20: Porcentagem de deposição de C3b da via alternativa de cobaias na presença de diferentes concentrações de EGS em pH 7,4	47
Figura 21: Porcentagem de hemólise pela via clássica de cães na presença de diferentes concentrações da proteína LJM19 em pH 7,4	50
Figura 22: Porcentagem de deposição de C3b da via clássica de cães na presença de diferentes concentrações da proteína LJM19 em pH 7,4	50

Lista de tabelas

	Página
Tabela 1: Porcentagem de inibição da via clássica do sistema complemento de cães, cobaias e galinhas pela saliva de <i>L. longipalpis</i>	48
Tabela 2: Porcentagem de inibição da via alternativa do sistema complemento de cães, cobaias e galinhas pela saliva de <i>L. longipalpis</i>	49

Resumo

A inibição do sistema complemento humano é uma das atividades presentes na saliva e/ou conteúdo intestinal de artrópodes hematófagos e está envolvida na proteção do epitélio do tubo digestivo desses vetores contra a ação deletéria do complemento presente no sangue ingerido. O objetivo deste trabalho foi investigar a ação da saliva de *Lutzomyia longipalpis*, o principal vetor de *Leishmania infantum* nas Américas, sobre as vias clássica e alternativa do sistema complemento de cães, galinhas e cobaias. Para isso, foram realizados para as três espécies ensaios hemolíticos e ensaios do tipo ELISA para detecção de C3b na presença de diferentes concentrações de extrato de glândula salivar. Ambos os testes foram realizados em pH 7,4 e em pH 8,15 (pH do lúmen intestinal do inseto logo após a ingestão de sangue). Com soro de cães, foram realizados os experimentos supracitados apenas em pH 7,4 na presença da proteína salivar recombinante LJM19, descrita como inibidora da via clássica humana. Os resultados mostram que a saliva é capaz de inibir fortemente a hemólise pela via clássica de cães e cobaias em ambos os pHs, mas com fraca intensidade a das aves. Em pH 7,4, a saliva não inibiu a atividade hemolítica da via alternativa de nenhuma das espécies estudadas, mas observou-se forte inibição nos testes com soros de cães, ao aumentarmos o pH para 8,15. Os resultados dos testes de deposição de C3b corroboram aqueles encontrados nos ensaios de hemólise. A proteína LJM19 inibiu significativamente tanto a hemólise quanto a deposição de C3b da via clássica de cães. Pode-se concluir que os inibidores salivares de *L. longipalpis* atuam de maneira espécie-específica, atuando sobre o sistema complemento de mamíferos, mas não sobre o das aves.

Abstract

Inhibitors of the complement system (CS) are commonly present in the saliva of haematophagous insects. Experimental evidence suggests that these inhibitors are involved in the protection of the midgut against injury by CS present in the ingested blood. Previous studies have shown that the saliva of the Phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* (the main vector of American Visceral Leishmaniasis) inhibited the human CS. Our aim was to investigate whether *L. longipalpis*' saliva inhibit the classical and alternative pathways of the complement system from other animals such as dogs, chickens and Guinea pigs. Erythrocyte lysis assays and ELISA for C3b detection assays were performed with dogs, chickens and Guinea pigs sera in the presence of different concentrations of salivary gland extract at pH 7,4 and 8,15 (the vector's intestinal pH right after the blood meal). Only with dog sera, these assays were also done in the presence of the recombinant protein LJM19, a salivary inhibitor of the human classical pathway. Our results show that sandfly saliva is capable of strongly inhibiting the haemolysis by the dogs and Guinea pigs classical pathway. This was seen at both pHs. The chickens classical pathway was inhibited very weakly. At pH 7,4 saliva was unable to downregulate haemolytic activity of the alternative pathway for all three species studied, but when the pH was increased to 8,15, the dogs alternative pathway was strongly inhibited. The ELISA tests results matched those seen in the erythrocyte lysis assays. The LJM19 protein significantly inhibited the dogs' hemolysis activity and C3b deposition from classical pathway. In conclusion, *L. longipalpis*' salivary inhibitors protect the intestinal epithelium against the mammalian complement system. They appear to be species-specific, acting on mammals CS, but not on avian CS.

1. Introdução

1.1 Importância dos Flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, sub-família Phlebotominae. Caracterizam-se por apresentar tamanho reduzido (em torno de 2 a 3 mm), corpo densamente recoberto por cerdas, asas lanceoladas constantemente semi-eretas e cabeça formando ângulo de noventa graus com o tórax, dando-lhes um aspecto corcunda. Como todos os dípteros, possuem ciclo holometábolo (Fig. 1), passando pelas fases de ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto (Sherlock, 2003).

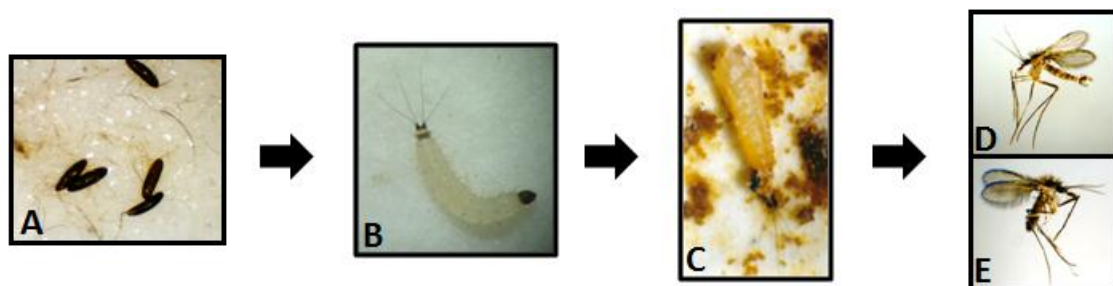


Figura 1: Ciclo biológico de flebotomíneo representando seu desenvolvimento holometábolo: (A) Ovos; (B) larva de quarto estágio; (C) pupa; (D) macho e (E) fêmea. (Fotos: Gontijo, NF)

As larvas vivem em solo e se alimentam de matéria orgânica em decomposição. Os adultos se alimentam de seiva de plantas e secreções de afídeos. Apenas as fêmeas são hematófagas, com hábitos predominantemente crepusculares e noturnos, necessitando do sangue ingerido para iniciar a maturação dos ovos (Soares e Turco, 2003).

Além de realizarem picadas dolorosas e causadoras de reações alérgicas, os flebotomíneos são importantes em saúde pública por serem transmissores naturais de diversos agentes patogênicos para seres humanos e animais, como a bactéria *Bartonella*, numerosos arbovírus e, com maior importância, protozoários do gênero *Leishmania*, os agentes etiológicos das leishmanioses (Sherlock, 2003).

As leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias de caráter predominantemente zoonótico que apresentam sintomatologia variável de acordo com fatores relacionados ao hospedeiro (ex. idade, estado nutricional, estado imunológico) e ao parasito (ex. espécie, cepa). Podem apresentar-se sob as formas clínicas cutânea, mucocutânea, cutânea difusa e a forma visceral mais grave, comumente fatal em seres humanos quando não tratada (Dantas-Torres, 2007).

A doença é endêmica em mais de oitenta países e constitui um sério problema de saúde pública em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, com *DALY* (anos de vida perdidos devido à morte prematura e anos de produção perdidos devido à morbidade) de 2.357.000 anos. A estimativa é de dois milhões de novos casos por ano, sendo um milhão e quinhentos mil casos das formas tegumentares e quinhentos mil novos casos da forma visceral. Além disso, cerca de 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco, incluindo a doença entre as seis endemias prioritárias da Organização Mundial de Saúde (Desjeux, 2004).

Flebotomíneos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* constituem, respectivamente, os vetores das leishmanioses no Velho e Novo Mundo. Ao realizar o repasto sanguíneo em um hospedeiro reservatório, o inseto ingere juntamente com sangue, células do sistema mononuclear fagocitário contendo formas amastigotas de *Leishmania*. Em seu trato digestivo, os protozoários diferenciam-se em formas flageladas denominadas promastigotas, cujo desenvolvimento culmina com o aparecimento de formas promastigotas metacíclicas. Esta transformação é denominada metaciclogênese, iniciando-se após o término da digestão sanguínea. As formas metacíclicas são infectantes para mamíferos e localizam-se principalmente na porção anterior do trato digestivo do vetor. Na ocasião de outro repasto sanguíneo, os parasitos são regurgitados no hospedeiro, havendo assim sua transmissão e início de um novo ciclo biológico (Kamhawi, 2006) (Fig. 2).

Normalmente, o pH intestinal de um flebotomíneo é mantido rigorosamente em torno de 6,0. Entretanto, após o repasto sanguíneo, o pH do lúmen do intestino médio abdominal, onde o sangue é armazenado, é rapidamente alcalinizado chegando a uma média de 8,15. Esta alcalinização é

necessária para a digestão do sangue pelas enzimas tripsina e quimotripsina, que possuem pH ótimo alcalino (Santos *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2011).

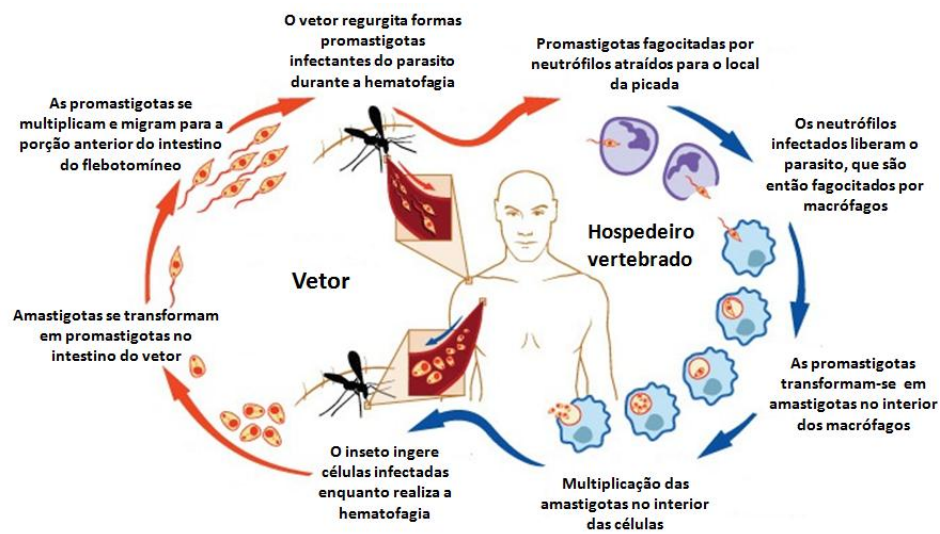


Figura 2: Esquema representativo do ciclo biológico de *Leishmania* sp em hospedeiro humano e no vetor (Adaptado de www.niaid.nih.gov/topics/leishmaniasis).

1.2 Leishmaniose Visceral Americana

A Leishmaniose Visceral Americana (LVA) é amplamente distribuída no Novo Mundo, sendo descrita desde o México até a Argentina, com 90% dos casos ocorrendo no Brasil, onde a doença já foi registrada em 20 dos 26 estados nacionais, com incidência anual de 3.500 casos (Lainson e Rangel, 2005; Dantas-Torres e Brandão-Filho, 2006). A LVA é uma zoonose que acomete predominantemente canídeos e humanos, com prevalência maior entre crianças mal-nutridas (Cerf *et al.*, 1987).

Leishmania (Leishmania) infantum (sinonímia *L. (L.) chagasi*) é o agente etiológico da LVA, tendo como principal vetor fêmeas infectadas de *Lutzomyia longipalpis*, espécie considerada primariamente silvestre, mas que tem demonstrado uma grande capacidade de adaptar-se a vários ambientes, aumentando sua densidade dentro e ao redor de habitações humanas e

animais no meio urbano, facilitando a transmissão da doença (Barata *et al.*, 2005). Além disso, esta espécie é considerada oportunista em relação à fonte de sangue para sua alimentação, realizando hematofagia em grande variedade de hospedeiros. Isso favorece a transmissão de *L. infantum* entre os animais e destes para o homem (Quinnel *et al.*, 1992; Dias *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2008).

Os canídeos domésticos são considerados os principais reservatórios do parasito, possibilitando facilmente a infecção do vetor devido a um intenso parasitismo cutâneo, além de apresentarem maior índice de infecção natural quando comparado com humanos e viverem mais próximos do homem que reservatórios silvestres (Evans *et al.*, 1992; Dantas-Torres, 2007; Gomes *et al.*, 2007). Além disso, Quinnel e Dye (1994), em um estudo realizado na Ilha de Marajó (PA), correlacionaram positivamente a presença de cães em habitações humanas com a abundância de *L. longipalpis* no peridomicílio, o que pode aumentar a taxa de infecção no vetor, caso haja cães infectados ou outros reservatórios na região (Gouvêa *et al.*, 2007). Devido a estes fatores, a eutanásia de cães soro-reativos para *Leishmania* sp é uma das medidas adotadas pelo Programa Nacional de Controle da Leishmaniose Visceral (MS, 2006).

Marsupiais (ex. *Didelphis albiventris* e *D. marsupialis*) e raposas (ex. *Cerdocyon thous*) são comumente incriminados como reservatórios secundários e/ou silvestres de *L. infantum*, sendo importantes na manutenção do ciclo enzoótico do parasito (Travi *et al.*, 1994; Dantas-Torres e Brandão-Filho, 2006). Evidências de infecção natural em roedores domésticos (ex. *Rattus rattus* e *R. norvegicus*) e selvagens (ex. *Nectomys squamipes*) têm sido relatadas (Marcelino *et al.*, 2011; Quaresma *et al.*, 2011). Embora a relevância destes animais como reservatórios de *L. infantum* seja ainda discutida, o fato dos mesmos possuírem comportamento sinantrópico poderia favorecer à transmissão intradomiciliar do parasito.

As galinhas domésticas apresentam um papel ainda não muito bem definido na epidemiologia da LVA. A criação destas aves no peridomicílio é frequentemente citada como um fator de risco para aquisição da doença em áreas endêmicas, pois sua presença aumenta o número de insetos no local (Caldas *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2003). Entretanto, quando um flebotomíneo

infectado se alimenta em uma galinha, ele deixa de picar pessoas ou cães, e assim a presença destas aves poderia prevenir a transmissão de *Leishmania*. Além disso, as aves são refratárias a este parasito, eliminando-o em seu organismo.

Em áreas urbanas e rurais, as galinhas atuam como uma fonte de sangue comum para os flebotomíneos, sendo importantes na manutenção de populações do vetor. Alexander *et al.* (2002) citam alguns fatores favoráveis à hematofagia em galinhas. Entre eles, está o fato de serem inativas à noite, horário em que o inseto realiza o repasto sanguíneo; de apresentarem áreas de pele exposta, como a crista e a barbela, que são altamente vascularizadas; e possuírem a pele mais fina que a de mamíferos, o que facilita a perfuração pela probóscide dos flebotomíneos. Outro importante fator favorável é o fato de que trombócitos de aves são menos eficientes no controle da hemorragia quando comparados com plaquetas de mamíferos, atrasando assim a hemostasia e facilitando a hematofagia (Alexander *et al.*, 2002).

1.3 Importância da Saliva do Vetor no Processo de Hematofagia e Transmissão do Parasito

Por possuírem peças bucais curtas e rígidas, os flebotomíneos são incapazes de canular vasos sanguíneos e, portanto, realizam hematofagia do tipo telmatofágica, na qual penetram sua probóscide na pele do hospedeiro, atingindo as camadas superficiais da derme, onde cortam tecidos e laceram capilares, formando assim coleções de sangue de onde se alimentarão (Fig. 3). Neste processo, a saliva do vetor é inoculada no local da picada (Andrade *et al.*, 2007).

Esta forma de alimentação expõe o inseto às respostas hemostática, inflamatória e imune do hospedeiro, as quais dificultam o sucesso do repasto sanguíneo (Ribeiro e Francischetti, 2003). Entretanto, *L. longipalpis*, assim como outros artrópodes hematófagos, possuem componentes salivares farmacologicamente ativos capazes de driblar tais respostas do hospedeiro. Estudos têm mostrado que estes componentes favorecem a ingestão de

sangue pelo vetor, bem como o sucesso da infecção pelo parasito por ele transmitido (Kamhawi, 2000).

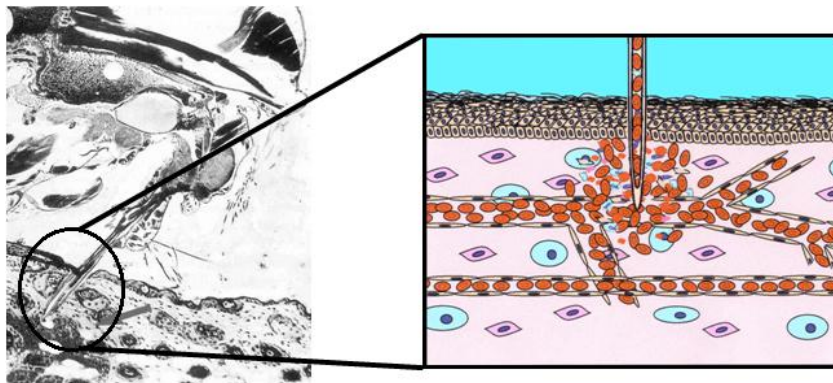


Figura 3: Flebotomíneo realizando telmatofagia (Foto: Colonel H.E. Shortt). Em destaque, representação da laceração de capilares com formação de coleção de sangue da qual o inseto se alimenta.

A hemostasia é o conjunto de respostas do hospedeiro responsável pelo controle da perda de sangue devido à injúria de um vaso sanguíneo, e envolve a agregação plaquetária, coagulação e vasoconstrição. Os flebotomíneos possuem componentes em sua saliva para combater de forma redundante e sinérgica cada um desses fatores, como a enzima apirase, que é um importante inibidor de agregação plaquetária (Kamhawi, 2000); uma proteína com ação anticoagulante (Charlab *et al.*, 1999); e o mais potente vasodilatador já descrito, o peptídeo Maxadilan (Lerner *et al.*, 2007).

Titus e Ribeiro (1988) demonstraram que extrato de glândula salivar de *L. longipalpis*, quando inoculado juntamente com formas promastigotas de *L. major* nas patas de camundongos, provocava exacerbação da infecção, com lesão cinco a dez vezes maior e carga parasitária cinco mil vezes maior que nos animais inoculados apenas com o parasito. Este fenômeno é possível devido a diferentes mecanismos imunomoduladores mediados pela saliva do vetor.

Em modelos murinos para estudos de leishmaniose causada por *L. major*, a resistência ao parasito está associada à expressão de citocinas como interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-12

(IL-12), caracterizando resposta imune do tipo Th1. Esta resposta promove a estimulação de macrófagos para produção de óxido nítrico e radicais de oxigênio, lesivos ao parasito. Já a susceptibilidade está ligada à expressão predominante de IL-4 e IL-10, características de resposta do tipo Th2 (Kane e Mosser, 2001; Sacks e Noben-Trauth, 2002). Utilizando este modelo experimental, tem-se mostrado que saliva de *L. longipalpis* direciona a resposta imune para o tipo Th2, favorecendo o sucesso da infecção pelo parasito (Andrade *et al.*, 2007). Esta modulação é causada principalmente pela estimulação de expressão de IL-4 e diminuição na expressão de IFN- γ , TNF- α e IL-2 pela saliva do vetor (Lima e Titus, 1996; Mbow *et al.*, 1998).

Alguns componentes específicos da saliva de *L. longipalpis* possuem propriedades imunomodulatórias. Morris *et al.* (2001) mostraram que o vasodilatador Maxadilan é capaz de exacerbar a infecção por *L. major* em camundongos com a mesma intensidade que a saliva total. Esta exacerbação ocorre devido a ação do vasodilatador sobre os macrófagos, estimulando a produção de citocinas do tipo Th2, ao mesmo tempo que provoca uma diminuição na produção de citocinas do tipo Th1 (Brodie *et al.*, 2007). Adicionalmente, a imunização de camundongos com Maxadilan sintético propiciou a proteção dos animais contra a infecção por *L. major* (Morris *et al.*, 2001).

Outra propriedade salivar relacionada ao sistema imune é a inibição do sistema complemento. Cavalcante *et al.* (2003) demonstraram que saliva de *L. longipalpis* é capaz de inibir a ação lítica do sistema complemento humano tanto pela via clássica como pela via alternativa. Caracterizando o inibidor salivar, os autores descobriram tratar-se de uma proteína resistente ao calor com peso molecular entre 10 e 30 kDa.

1.4 O Sistema Complemento

O sistema complemento é um dos principais mediadores da resposta imune inata dos vertebrados, formado por cerca de 30 proteínas sintetizadas principalmente em hepatócitos e macrófagos e que apresentam-se solúveis no plasma ou associadas à superfície celular. Este sistema atua em esquema de

cascata proteolítica, sendo sua principal função o reconhecimento, opsonização e lise de microorganismos invasores e células alteradas do hospedeiro (Sim e Laich, 2000). Além disso, possui também importante papel na resposta imune adaptativa, auxiliando a apresentação de antígenos, tornando a resposta humoral mais eficiente (Morgan *et al.*, 2004). Evolutivamente, o sistema complemento representa um antigo componente da defesa do hospedeiro e sua sobrevivência ao longo da evolução denota sua importância como fator protetor contra patógenos invasores (Dunkelberger e Song, 2010).

Sua ativação se dá através de três vias: a clássica, a das lectinas e a alternativa (Fig. 4). A via clássica é ativada quando o componente C1q, juntamente com as serino-proteases C1r e C1s (complexo C1), se ligam a anticorpos IgM e IgG aderidos à superfície de patógenos invasores. Uma vez ativado, o complexo C1 é capaz de clivar os componentes C4 e C2, e seus fragmentos maiores, C4b e C2a, formam o complexo C4b2a sobre a superfície ativadora. Este complexo possui a capacidade de clivar o componente C3, o mais importante e abundante componente do sistema complemento, em C3a e C3b (Dunkelberger e Song, 2010).

O fragmento C3a é uma anafilotoxina, responsável pela quimiotaxia de leucócitos, como neutrófilos, eosinófilos e basófilos, e pelo recrutamento e degranulação de mastócitos, causando aumento da permeabilidade vascular e facilitando a infiltração celular em locais de inflamação alérgica (DiScipio e Schraufstatter, 2007). Já C3b é uma opsonina que apresenta um grupo tioéster exposto, permitindo sua ligação covalente à superfície ativadora. Esta opsonização marca o patógeno como '*non-self*', sinalizando para que células de defesa o fagocitem. Além disso, C3b se liga próximo ao complexo C4b2a, formando o complexo C4b2a3b, conhecido como C5 convertase, pois cliva o componente C5 em C5a e C5b. Este dá início à montagem do complexo de ataque à membrana (CAM). C6 se liga ao C5b recém ativado e logo forma um grande complexo composto por C5b, C6, C7, C8 e C9. Durante a montagem do CAM, estes componentes inserem-se na bicamada lipídica do patógeno, formando poros que levam à lise celular (Speth *et al.*, 2008).

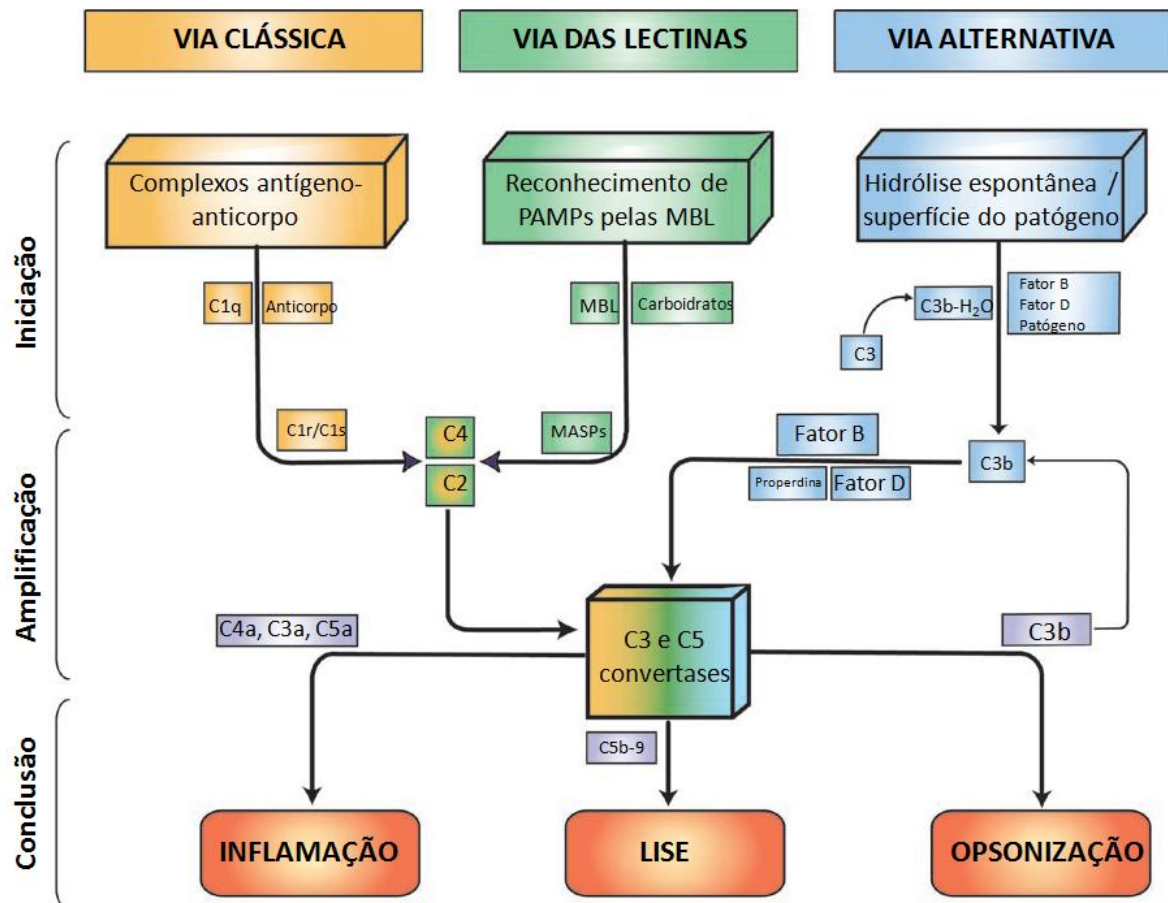


Figura 4: O sistema complemento pode ser ativado por três vias: clássica, das lectinas e alternativa. A via clássica é ativada quando C1q se liga a anticorpos aderidos ao antígeno, ativando C1r e C1s, que clivam C4 e C2. A via das lectinas é ativada quando a lectina ligante de manose (MBL) encontra moléculas específicas associadas a patógenos, ativando as serino-proteases associadas a MBL (MASPs), clivando então C4 e C2. Os produtos da clivagem destes componentes formam a C3 convertase das vias clássica e das lectinas, C4b2a, que cliva C3 em C3a e C3b. Uma segunda molécula de C3b pode associar-se a C4b2a para formar a C5 convertase das vias clássicas e das lectinas, C4b2a3b. A via alternativa é ativada quando C3 sofre hidrólise espontânea e forma a C3 convertase inicial desta via, C3-H₂O-Bb, na presença dos fatores B e D, levando à clivagem adicional de C3 e formação das C3 e C5 convertases da via alternativa (C3bBb e C3bBb3b, respectivamente). A properdina facilita a ativação desta via pois estabiliza suas convertases. As três vias convergem para a formação das convertases, que geram os maiores efetores do sistema complemento: anafilotoxinas (ex.: C3a), opsoninas (ex.: C3b) e o complexo de ataque a membrana (CAM). O CAM é a montagem final dos componentes C5b, C6, C7, C8 e C9, que pode lisar diretamente superfícies opsonizadas (Adaptado de Dunkelberger e Song, 2010).

A via das lectinas é a mais recentemente descrita. Ela é ativada de forma similar à via clássica, entretanto é independente de anticorpos. A molécula de ativação desta via é a lectina ligante de manose (MBL), que reconhece motivos específicos (PAMPs) presentes na superfície de patógenos. A MBL é semelhante estruturalmente ao componente C1q da via clássica, e como tal, uma vez ligada ao patógeno, ativa as proteases MASP-1 e MASP-2, que são semelhantes estruturalmente e funcionalmente a C1r e C1s, respectivamente. Uma vez ativadas, as MASPs clivam C4 e C2, formando a C3 convertase C4b2a, que ativa o componente C3, dando continuidade à cascata proteolítica até a formação do CAM (Dunkelberger e Song, 2010). MBL e MASPs são muito menos abundantes no soro que C1q, C1r e C1s, tendo, portanto, uma importância menor dentro do sistema complemento (Speth *et al.*, 2008).

A ativação da via alternativa se dá de maneira diferente das anteriores, pois não há uma molécula de reconhecimento definida, como C1q ou MBL. Ela é iniciada pela hidrólise espontânea de C3, com formação de C3b solúvel (C3b-H₂O), que se liga ao componente Fator B. Uma vez associados, o complexo C3b-H₂O-B é clivado pela serino-protease Fator D, que cliva o Fator B, formando C3b-H₂O-Bb solúvel. Este produto possui baixa atividade, mas é capaz de ativar vagarosamente outras moléculas de C3. Se alguma molécula de C3b se liga a alguma célula do organismo ela acaba sendo inativada. Se, por acaso, ela se liga a uma superfície estranha, como a superfície de uma bactéria, ela vai continuar ativa e é capaz de receber moléculas do fator B que é imediatamente ativado a Bb formando C3bBb (Dunkelberger e Song, 2010). Com a ligação de mais uma molécula de C3b ao lado do complexo, forma-se a C5 convertase (C3bBb3b) da via alternativa, que é bastante eficaz na ativação de C5 (Banda *et al.*, 2009). Este processo também culmina na formação do CAM. Esta via pode ser amplificada ou inibida através da ligação de properdina ou Fator H, respectivamente, ao C3b aderente (Dunkelberger e Song, 2010). A properdina, também conhecida como Fator P, estabiliza o complexo C3bBb3b funcionando assim como uma proteína ativadora. O Fator H atua na C3 convertase da via alternativa removendo Bb do complexo C3bBb ou servindo como cofator para a proteólise mediada por Fator I (Ricklin *et al.*, 2010).

A atividade lítica do sistema complemento pode ser experimentalmente avaliada. Hemácias de carneiro previamente sensibilizadas com anticorpos ativam a via clássica e são lisadas ao entrarem em contato com soro humano e animal. Já hemácias de coelho disparam a via alternativa do soro humano independentemente de anticorpos e são lisadas quando adicionadas ao soro. Quando os ensaios são realizados juntamente com inibidores, observa-se a redução da intensidade da hemólise (Ribeiro, 1987; Cavalcante *et al.*, 2003). Soro de cobaia (*Cavia porcellus*) é conhecido por possuir a via clássica mais hemolítica com esta metodologia e é há muito tempo bastante utilizado nos testes de diagnóstico por fixação do complemento (Rice, 1950).

Outra forma de avaliar a atividade do complemento é através de ensaios imunológicos do tipo ELISA. Sabe-se que o mesmo dispara em contato com anticorpos (via clássica) ou agarose (via alternativa) aderidos a uma placa de ELISA. Uma vez ativado, seus componentes se ligam à superfície ativadora e podem ser quantificados por meio de anticorpos específicos. Se o ensaio é feito na presença de inibidores, o número de moléculas do complemento aderidas à placa diminui. Utilizando anticorpos específicos para cada componente, é possível ter uma idéia sobre em qual ponto da cascata o inibidor está atuando (Barros *et al.*, 2009).

1.5 Importância da Inibição do Sistema Complemento para Artrópodes Hematófagos

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

Ribeiro (1987) demonstrou que a saliva do carrapato *Ixodes dammini* possui a capacidade de inibir a via alternativa do sistema complemento humano. Trabalhos subsequentes demonstraram que outras espécies dos gêneros *Ixodes* e *Ornithodoros* possuem a mesma capacidade, porém através de mecanismos diferentes (Schroeder *et al.*, 2009).

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

Recentemente, Fazito do Vale (2011) descreveu o mecanismo de ação do inibidor da via clássica presente na saliva de *L. longipalpis*. Através de cromatografia líquida (HPLC) e testes imunoenzimáticos, mostrou tratar-se de uma proteína de aproximadamente 22 kDa que atua ligando-se ao componente C1q, bloqueando a ativação de C1r e C1s e, conseqüentemente, o fluxo normal da cascata. Além disso, ficou demonstrado também que a proteína recombinante LJM19, cuja forma natural está presente na glândula salivar de *L. longipalpis*, apresenta a mesma ação sobre a via clássica do sistema complemento humano.

Para os vetores, a inibição do complemento tem funções muito importantes. Durante a hematofagia, essa ação levaria a uma diminuição parcial da resposta inflamatória no local devido à produção reduzida de anafilotoxinas, diminuindo assim a percepção pelo hospedeiro e permitindo o repasto sanguíneo completo (Schroeder *et al.*, 2009). Adicionalmente, no local da picada, os inibidores salivares reduziram consideravelmente a quantidade de antígenos salivares opsonizados com C3b, diminuindo assim a apresentação desses antígenos ao sistema imune do hospedeiro. Em decorrência disso, o hospedeiro seria menos eficiente em produzir anticorpos contra proteínas salivares, preservando suas propriedades necessárias para o sucesso da hematofagia (Barros *et al.*, 2009).

Além disso, a função aparentemente mais óbvia desses inibidores salivares é a proteção do epitélio intestinal contra injúrias mediadas pelo complemento. Uma vez que o trato digestivo dos flebotomíneos é formado por apenas uma camada de células (Andrade-Coelho *et al.*, 2001), o dano provocado pela ativação do CAM poderia levar à sua ruptura e morte do inseto. De fato, Barros *et al.* (2009) demonstraram que triatomíneos que ingeriram forçadamente (sem a ingestão de saliva) soro humano concentrado, apresentavam células mortas em seu epitélio intestinal provocados pela ação do complemento.

A inibição do sistema complemento pela saliva de *L. longipalpis* provavelmente favorece o sucesso da infecção por *Leishmania* sp pois, apesar de formas promastigotas deste protozoário possuírem meios de evasão do complemento, como a metalo-protease gp63, que cliva C3b em iC3b (C3b inativado), e a presença de lipofosfoglicano (LPG) em toda sua superfície lhe conferindo proteção parcial contra o CAM (Mosser e Brittingham, 1997; Nunes e Ramalho-Pinto, 1996), trabalhos com *L. donovani*, *L. tropica*, *L. enrietti* e *L. amazonensis*, demonstraram que a ativação do complemento pode resultar na morte dos parasitos quando o soro humano e de diferentes espécies, incluindo cães, galinhas e cobaias, está mais concentrado (Rezai *et al.*, 1975; Noronha *et al.*, 1998).

2. Justificativa

Lutzomyia longipalpis é a principal espécie vetora de *Leishmania infantum* na América Latina e, dada sua importância, muitos estudos têm sido realizados focando na sua interação com os hospedeiros, especialmente na ação da saliva nos processos de hematofagia e de transmissão do parasito, tentando preencher lacunas no conhecimento dessas interações.

Entretanto, a maioria desses estudos tem sido realizada apenas com o hospedeiro humano ou com modelo experimental murino. Levando em consideração que a LVA é uma zoonose e que *L. longipalpis* é uma espécie oportunista e, portanto, se alimenta de sangue de uma grande variedade de vertebrados, é de grande importância o entendimento de como este inseto interage com outras espécies animais.

Estudos voltados para a interação da saliva com o sistema imune de hospedeiros vertebrados fazem-se ainda mais necessários depois da demonstração *in vivo* de proteção contra infecção por *Leishmania* conferida através da imunização com componentes salivares (Kamhawi *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2008). Considerando que os cães seriam os hospedeiros a serem vacinados, é essencial que se saiba como seu organismo interage com antígenos salivares com potencial vacinal.

Por ser *L. longipalpis* uma espécie que se alimenta em uma extensa diversidade de vertebrados, é de esperar que seus inibidores salivares do sistema complemento sejam capazes de atuar também sobre o complemento de todos os vertebrados nos quais se alimenta.

Considerando este contexto, a demonstração e caracterização da capacidade da saliva de inibir o complemento de várias espécies de vertebrados nos quais os flebotomíneos se alimentam podem acrescentar importantes informações para compreensão da sua biologia, da interação parasito-hospedeiro e da epidemiologia da LVA.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Investigar a ação da saliva de *L. longipalpis* sobre o sistema complemento de cães (*Canis familiaris*), galinhas (*Gallus gallus*) e cobaias (*Cavia porcellus*).

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar se a atividade lítica das vias clássica e alternativa de cães, galinhas e cobaias é inibida pela saliva de *L. longipalpis*;
- Investigar se saliva de *L. longipalpis* é capaz de inibir a deposição de C3b das vias clássica e alternativa do sistema complemento de cães e cobaias;
- Avaliar a ação dos inibidores salivares em pH 7,4 (pH normal do sangue) e em pH 8,15 (pH do lúmen intestinal do inseto logo após o repasto sanguíneo);
- Investigar se a proteína recombinante LJM19 é capaz de inibir a atividade hemolítica e a deposição de C3b da via clássica do sistema complemento de cães;
- Avaliar a influência do pH na ativação do complemento das três espécies e a influência da temperatura na ativação do complemento das aves.

4. Metodologia

4.1 Aprovação em Comitê de Ética

Todos os procedimentos utilizando animais realizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais em 06/07/2011 sob o protocolo de número 087/11.

4.2 Criação dos Insetos

Os flebotomíneos utilizados pertencem a uma linhagem oriunda de Teresina (PI), criados em colônia fechada no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH), localizado no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, seguindo metodologia descrita por Modi e Tesh (1983), com algumas alterações.

As larvas são mantidas em potes de plástico com fundo coberto por gesso (Fig. 5 - A) e alimentadas com dois tipos de ração: uma a base de fezes e ração de coelho juntamente com húmus, oferecida principalmente às larvas de primeiro e segundo estádios, e a outra a base de flocos de cereais integrais (Neston®) e proteína de soja, que suplementa a alimentação das larvas de terceiro e quarto estádios.

Os adultos são mantidos em gaiolas de náilon presas em armações de metal (Fig. 5 – B) e se alimentam em bolinhas de algodão embebidas em solução de sacarose 30% oferecidas em pequenas placas de Petri no interior da gaiola. Como fonte de sangue para as fêmeas são utilizados hamsters machos anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax®) e colocados no interior da gaiola até que todas tenham se alimentado.

As condições climáticas do insetário são controladas, com temperatura em torno de 25°C e umidade relativa entre 60 e 80%.

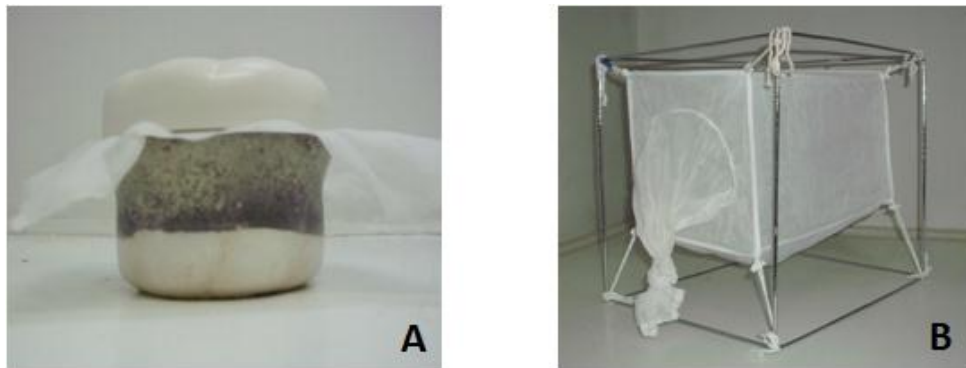


Figura 5: Manutenção dos flebotomíneos em colônia: (A) Pote para criação das larvas; (B) Gaiola para manutenção dos adultos.

4.3 Obtenção do Extrato de Glândulas Salivares (EGS) e da Proteína Recombinante LJM19

Para obtenção do EGS, glândulas de fêmeas de quatro a oito dias não alimentadas com sangue foram dissecadas em solução salina (NaCl 0,9%) com auxílio de microscópio estereoscópico e estiletos entomológicos. O material dissecado era transferido para tubo de 1,5 ml mantido constantemente em gelo, contendo solução específica para o teste a ser realizado (Fig. 6).

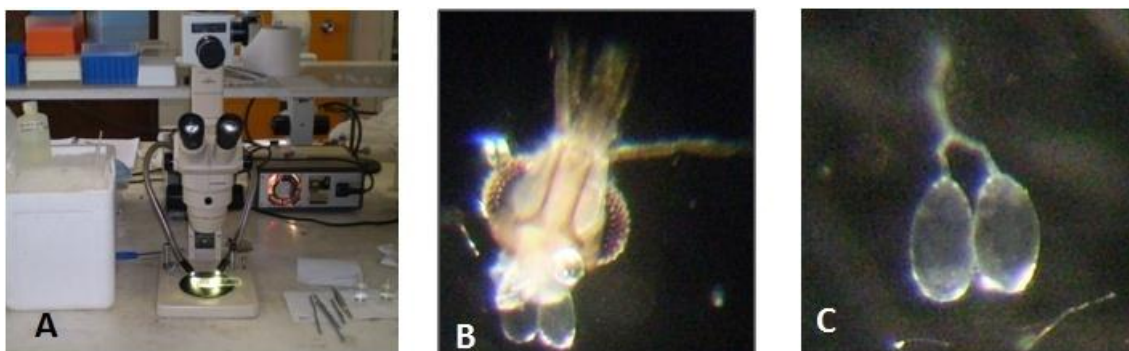


Figura 6: (A) Microscópio estereoscópico e material utilizado para dissecação de glândulas salivares de *L. longipalpis*; (B) Cabeça dissecada contendo glândula salivar; (C) Uma glândula salivar composta por dois ácinos salivares e ducto salivar.

Para os ensaios de hemólise, as glândulas foram armazenadas em solução salina 0,9%. Para ensaios de deposição de C3b decorrente da ativação da via clássica, as glândulas foram armazenadas em solução HNCM (HEPES 4mM; NaCl 145mM; CaCl₂ 2mM; MgCl₂ 1mM) e para os ensaios de deposição de C3b por ativação da via alternativa, em solução HMEBN (HEPES 5mM; MgCl₂ 7mM; EGTA 10mM; Albumina de soro bovino 5mg/ml; NaCl 140mM). O material dissecado foi então sonificado por 30-60 segundos, centrifugado a 10.000g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante utilizado nos experimentos. Desta forma, quando nos referirmos à “saliva”, estamos nos referindo ao extrato de glândulas salivares.

Para cada teste, as glândulas foram dissecadas e armazenadas na maior concentração desejada. A partir desta solução eram feitas diluições específicas para chegar às concentrações menores. O material era dissecado e testado no mesmo dia.

A proteína recombinante LJM19 foi gentilmente cedida pelo Dr. Jesus G. Valenzuela, da Unidade de Biologia Molecular de Vetores do *National Institute of Health* – NIH (EUA). O processo utilizado para a clonagem, expressão e purificação dessa proteína pode ser encontrado em Collin *et al.*, 2009 e Teixeira *et al.*, 2010.

4.4 Obtenção de Soros

Os soros de cães foram provenientes de dez animais adultos, sem raça definida, soro-negativos para *Leishmania*, nascidos e criados em canil da Universidade Federal de Ouro Preto. Para obtenção de soro de galinhas, foram utilizados três animais, mantidos em baia no Instituto de Ciências Biológicas sem evidências da presença de flebotomíneos. As quatro cobaias utilizadas como fonte de soro foram mantidas no biotério do Departamento de Parasitologia da UFMG.

Os cães e as aves tiveram o sangue coletado através de punção das veias jugular e braquial, respectivamente. Dos roedores, a coleta se deu via punção cardíaca em animais anestesiados.

Em laboratório, o sangue coletado foi deixado em repouso por uma hora a 37°C para a formação do coágulo e, em seguida, centrifugado a 5000g por 5 minutos. *Pools* de soros foram formados para cada espécie, aliquotados, identificados e armazenados em freezer -70°C até o momento dos experimentos. Cada alíquota foi utilizada apenas uma vez.

4.5 Determinação da Influência do pH e da Temperatura na Atividade do Sistema Complemento de Cães, Galinhas e Cobaias

Durante a padronização dos ensaios de hemólise e de deposição de C3b descritos abaixo, foram realizados os testes para as vias clássica e alternativa com hemácias de carneiro e de coelho e soro das três espécies estudadas diluídos em solução com pH 7,4 e pH 8,15, sem a presença de inibidores salivares, para avaliar se apenas a alcalinização do pH alterava a eficiência do sistema complemento destas espécies. Especialmente com o soro das aves, foram realizados também ensaios de hemólise com incubação a 37°C e 40°C para observar se havia diferença na ativação do complemento, uma vez que a temperatura corporal natural das mesmas mantém-se em torno de 40°C.

4.6 Estudo da Ação do EGS sobre a Hemólise provocada pelo Sistema Complemento de Cães, Galinhas e Cobaias (Baseado em Cavalcante *et al.*, 2003)

Para os testes de hemólise pela via clássica foram coletados 10 ml de sangue de carneiro através de punção da veia jugular e mantidos a 4°C em solução conversadora (glicose 2,05%, citrato de sódio 0,8%, NaCl 0,42% e ácido cítrico 0,05%) na proporção de 1:1. Para utilização das hemácias, 500µl do sangue foram lavados três vezes com 5ml de solução GHB-EDTA (HEPES 5mM, NaCl 145mM, EDTA 10mM e gelatina 0,1%, pH 7,4) através de centrifugação a 480g por 5 minutos a 4°C. Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em 3 ml de GHB-EDTA e opsonizadas com anticorpo anti-hemácia de carneiro produzido em coelho (SIGMA®) diluído 1:1000

durante incubação a 37°C por 30 minutos sob leve agitação. Após a sensibilização, as células foram lavadas uma vez com solução GHB-EDTA e, em seguida, duas vezes com solução GHB²⁺ (HEPES 5mM, NaCl 145mM, CaCl₂ 0,15mM, MgCl₂ 0,5mM e gelatina 0,1%). Após a última lavagem, a concentração das hemácias foi ajustada para 2x10⁸ células/ml.

Nos testes, 25µl de EGS na concentração desejada (concentração de saliva variando de 0,5 a 20 ácidos, de acordo com a espécie animal testada) foram adicionados a 50µl de soro diluído em tubos de 1,5ml. Os soros foram diluídos em solução GHB²⁺ o suficiente para lisar cerca de 90% das hemácias. O soro canino foi utilizado na diluição 1:40, o das aves, 1:30 e o das cobaias, 1:200. Em seguida, foram adicionados 50µl de solução de hemácias opsonizadas e os tubos foram então incubados a 37°C por 30 minutos. Seguindo a incubação, 500µl de salina gelada foram acrescentados a cada tubo para parar a reação de hemólise. Após centrifugação a 1700g por 30 segundos, transferiu-se 200µl do sobrenadante para uma placa de 96 poços, para ser lida em leitor de ELISA (Bio-Rad Benchmark®) a 415nm.

Em cada teste, foram utilizados três controles: hemólise total, no qual eram acrescentados 500µl de água destilada fria após a incubação; hemólise espontânea, no qual não havia adição de soro; e hemólise pelo complemento (controle positivo), no qual era acrescentado soro, mas não havia adição de EGS.

Nos ensaios com a via alternativa foram utilizadas hemácias de coelho obtidas através de punção da veia central auricular e mantidas a 4°C como descrito anteriormente. Estas células não foram opsonizadas, pois as hemácias de coelho disparam a via alternativa do complemento humano e de outras espécies animais, e no dia do experimento, 500µl de sangue foram lavados três vezes com 5 ml de solução Mg-EGTA (HEPES 5mM, NaCl 145mM, EGTA 10mM, MgCl₂ 7Mm e gelatina 0,1%). Esta solução inibe a via clássica, pois o EGTA é quelante de íons Ca⁺, necessários à ativação desta via. Para os testes, a concentração das hemácias foi ajustada para 1x10⁸ células/ml e os soros de cães, galinhas e cobaias diluídos, respectivamente, 1:5, 1:10 e 1:5. Como inibidor, foram utilizadas concentrações de saliva referentes a 1, 2, 5 e 10

ácinos salivares. O restante do ensaio se deu como para a via clássica, descrito anteriormente.

Foram realizados ensaios de inibição de hemólise com as três espécies animais e as duas vias de ativação utilizando soro e hemácias diluídos em solução GHB^{2+} e Mg-EGTA com pH 7,4 e pH 8,15. Para ambas as vias e ambos os pHs, os testes foram feitos em duplicata, com no mínimo três repetições

4.7 Estudo da Ação do EGS sobre a Deposição de C3b de Cães e Cobaias (Baseado em Barros *et al.*, 2009)

Os ensaios com a via clássica foram iniciados com a sensibilização dos poços de uma placa de ELISA (Costar®: 9017) por uma noite em câmara úmida com 2µg de IgG purificado da espécie a ser testada (50µl por poço) diluído em solução carbonato/bicarbonato (Na_2CO_3 15mM, NaHCO_3 35mM, pH 9,6). Os anticorpos foram purificados por cromatografia de afinidade utilizando Proteína A Sepharose como descrito por Barros (2009) e armazenados em freezer a -20°C .

Depois de sensibilizados, os poços foram bloqueados uma vez com 200µl de solução TNB (Tris 10mM, NaCl 140mM e Albumina de soro bovino 3%) por 30 minutos sob agitação constante (160 rpm) e, em seguida, com 200 µl de solução TNBTC (Tris 10mM, NaCl 140mM, Albumina de soro bovino 3%, Tween 20 0,05% e CaCl_2 5mM), de forma semelhante ao bloqueio anterior. Então, adicionou-se soro diluído 1:20 em solução HNCM juntamente com quantidade de saliva referente a 0,5, 1, 2, 3 ou 4 ácinos salivares e a placa incubada por 30 minutos a 37°C sob agitação (160 rpm). Em cada teste, eram acrescentados 20µl de soro diluído a 80µl de solução HNCM contendo EGS, totalizando 100µl de volume no poço. Poços sem saliva e sem soro foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente.

Após a incubação, os poços foram lavados duas vezes com 200µl de solução de lavagem (Tris 10mM, NaCl 140mM e Albumina de soro bovino 0,1%) por dois minutos. Então, foram adicionados 50µl de anticorpo anti-C3

específico da espécie a ser testada e a placa incubada por 30 minutos a temperatura ambiente sob agitação. O anticorpo anti-C3 de cão (ICS®: GC3-401) foi diluído a 1:3000 em solução HN (HEPES 10mM e NaCl 140mM, pH 7,4) e o anti-C3 de cobaia (ICS®: GC3-601-Z) diluído a 1:1000 na mesma solução. Após duas lavagens, os poços foram tratados com 50µl de anticorpo conjugado com peroxidase (CALBIOCHEM®: 401504) diluído a 1:1500 em solução HN e incubados novamente por 30 minutos, a temperatura ambiente, sob agitação. Após mais duas lavagens, os poços foram preenchidos com 200µl de tampão citrato/fosfato (C₆H₈O₇ 50mM e Na₂HPO₄ 50mM, pH 5,0) contendo OPD (Orto-fenileno-diamina - SIGMA®) 1mg/ml e peróxido de hidrogênio 0,075% e a leitura feita em leitor de ELISA no modo cinético a 450nm por 10 minutos (uma leitura a cada 30 segundos). As velocidades máximas (taxa de aumento de absorvância) das reações foram calculadas pelo software SoftMax Pro 5.2 e os dados gerados, utilizados para os cálculos estatísticos.

Para ensaios com a via alternativa, os poços foram recobertos previamente com 100µl de solução de agarose 0,1% e deixados secar a 37°C por uma noite. Então foram adicionados 20µl de soro diluído 1:3 (cão) ou 1:5 (cobaia) em solução HMEBN, juntamente com quantidade de saliva referente a um, dois, cinco ou dez ácidos salivares diluídos em 80µl de HMEBN, totalizando assim 100µl de volume no poço. Para esta técnica é necessário uma concentração maior de soro. Por isso, aumentamos proporcionalmente a concentração da saliva neste experimento. A diluição dos anticorpos e as lavagens entre as incubações foram realizadas com solução HNB (HEPES 10mM, NaCl 140mM e Albumina de soro bovino 1mg/ml, pH 7,4). Os outros passos do teste ocorreram como descritos para a via clássica.

Para as duas espécies, foram feitos ensaios com soro e saliva diluídos em soluções HNCM e HMEBN com pH 7,4 e pH 8,15. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, com mínimo de três repetições.

Devido à inexistência de anticorpo comercial anti-C3 de galinhas, não foram realizados ensaio de inibição de deposição de C3b para esta espécie animal.

4.8 Estudo da Ação da Proteína Recombinante LJM19 sobre a Via Clássica do Sistema Complemento de Cães

Foram realizados ensaios hemolíticos para a via clássica utilizando a proteína recombinante LJM19. Inicialmente, 12,5µl de solução salina fosfatada (PBS; pH 7,4) contendo diferentes concentrações da proteína (0,5µg; 0,25µg; 0,125µg e 0,06µg) foram adicionados a 25µl de soro canino diluído 1:40 em tubos de 0,5ml. Em seguida, acrescentou-se 25µl de hemácias de carneiro opsonizadas na concentração de 2×10^8 células/ml. Após incubação a 37°C, foram acrescentados 250µl de solução salina gelada e o restante do ensaio se deu como descrito para os ensaios com EGS.

Foram realizados também testes de deposição de C3b da via clássica de cães em pH 7,4, seguindo a metodologia descrita anteriormente. A proteína foi testada nas concentrações de 0,25µg, 0,125µg e 0,06µg, diluídos em 80µl de solução HNCM por poço.

4.9 Análise Estatística

Os cálculos estatísticos foram realizados com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0.

De cada experimento isolado foram calculadas as médias das duplicatas (ensaios de hemólise) ou triplicatas (ensaios de deposição de C3b), das quais foram subtraídas a média do controle negativo. Os resultados foram então transformados em porcentagem de hemólise ou de deposição de C3b, considerando o controle positivo como 100% de atividade do sistema complemento.

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. As variáveis com distribuição normal foram analisadas através do teste T pareado (no caso de 2 grupos) ou pelos testes ANOVA e Teste de Tukey (no caso de mais de 2 grupos). Valor de $P < 0,01$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. Resultados

5.1 Determinação da Influência do pH e da Temperatura na Ativação do Complemento de Cães, Galinhas e Cobaias

5.1.1 Influência do pH na Ativação da Via Clássica

De acordo com os resultados apresentados na Figura 7, a alcalinização do pH não causou diferença significativa na ativação da via clássica das três espécies testadas .

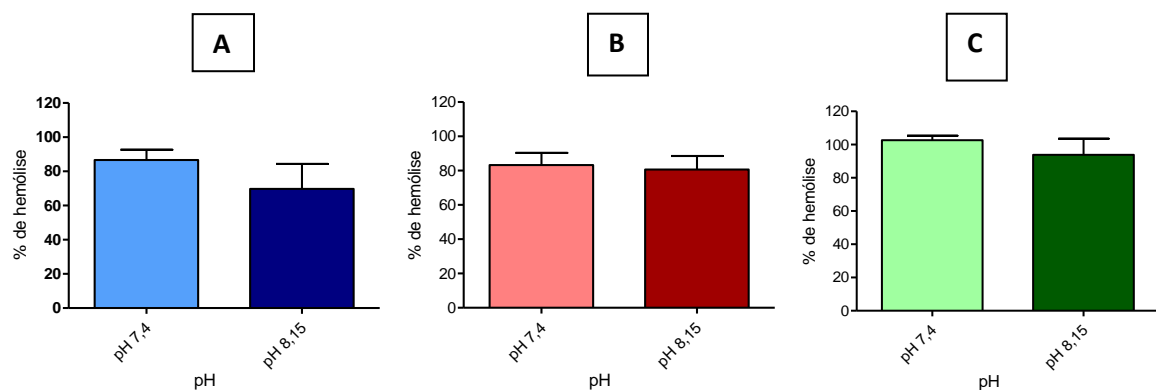


Figura 7: Atividade hemolítica da via clássica de cães (A), galinhas (B) e cobaias (C) em diferentes pHs. Os resultados foram expressos como a média da porcentagem de hemólise e as barras verticais representam os desvios padrões.

5.1.2 Influência do pH na Ativação da Via Alternativa

Diferentemente dos resultados encontrados nos testes com via clássica, a alteração do pH influenciou negativamente a atividade hemolítica causada pela via alternativa de cães e cobaias, reduzindo esta atividade em torno de 35% (Fig. 8 – A e C). A deposição de C3b das duas espécies também foi diminuída de forma estatisticamente significativa com o aumento do pH (Fig. 9). Entretanto, este aumento não afetou a ativação da via alternativa das aves (Fig. 8 – B).

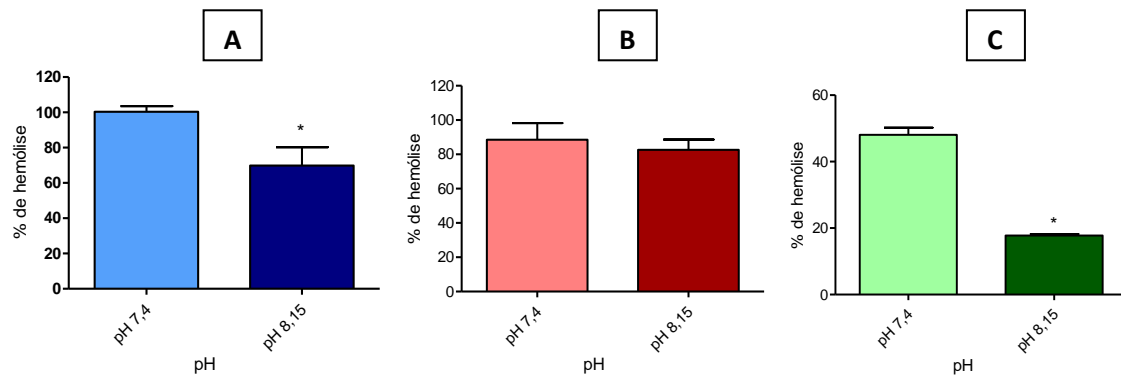


Figura 8: Atividade hemolítica da via alternativa de cães (A), galinhas (B) e cobaias (C) em diferentes pHs. Os resultados foram expressos como a média da porcentagem de hemólise e as barras verticais representam os desvios padrões.

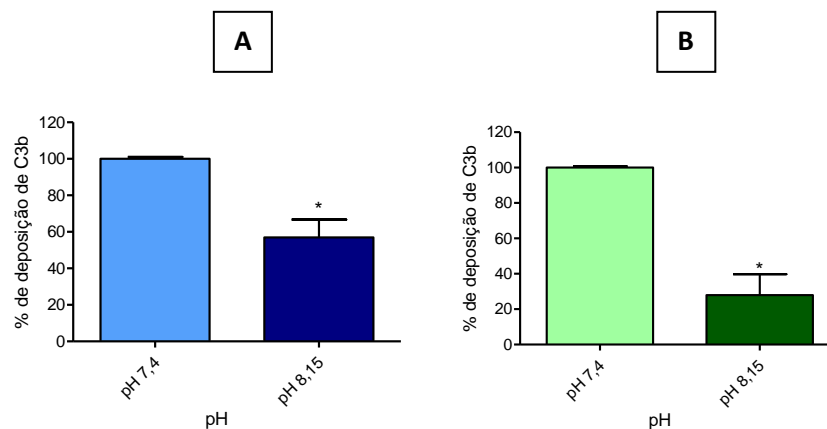


Figura 9: Deposição de C3b proveniente da via alternativa de cães (A) e cobaias (B) em pH 7,4 e pH 8,15. Os resultados foram expressos como a média da porcentagem de deposição de C3b e as barras verticais representam os desvios padrões.

5.1.3 Influência da Temperatura na Ativação do Sistema Complemento das Aves

Para investigar se a temperatura influenciaria na ativação das vias clássica e alternativa do sistema complemento de galinhas, foram realizados ensaios hemolíticos com incubação a 37°C e a 40°C (temperatura corporal

natural das mesmas), ambos em pH 7,4. Os resultados demonstram que não houve diferença estatística na ativação das duas vias, nas duas temperaturas testadas (Fig. 10).

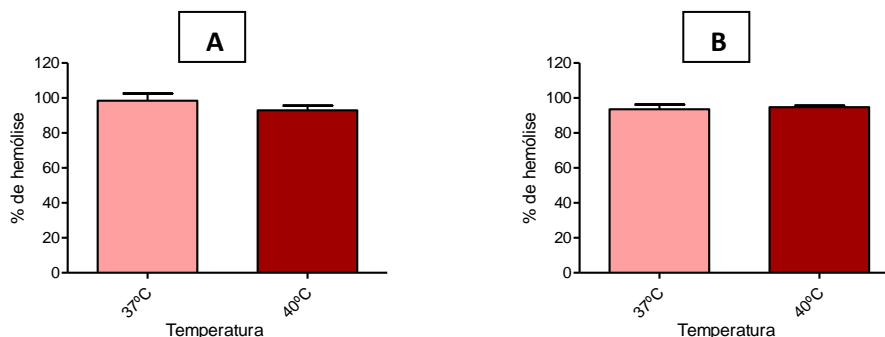


Figura 10: Ativação das vias clássica (A) e alternativa (B) do complemento de galinhas em diferentes temperaturas. As barras verticais representam o desvio padrão dos valores observados.

5.2 Ação do EGS sobre a Atividade Hemolítica da Via Clássica das Três Espécies Estudadas

Todas as concentrações testadas de extrato de glândulas salivares de *L. longipalpis* foram capazes de inibir significativamente a atividade hemolítica da via clássica de cães em ambos os pHs. Com quantidade de saliva referente a 2, 3 e 4 ácidos, a inibição observada foi de mais de 90% da atividade da via clássica (Fig. 11).

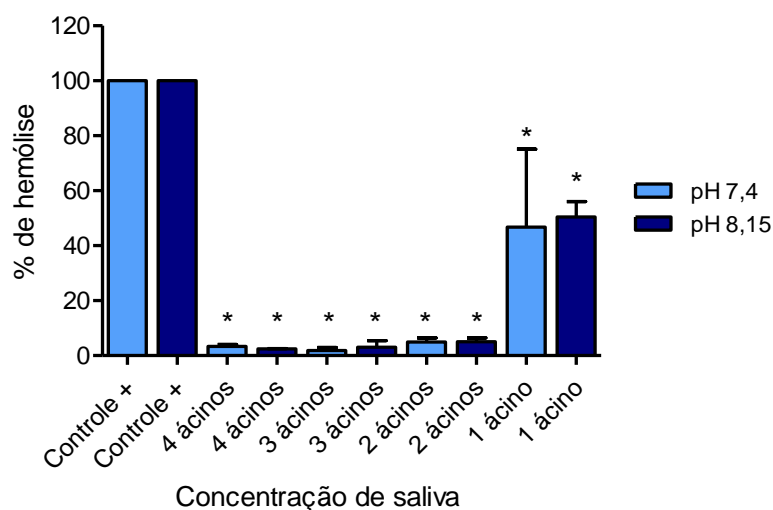


Figura 11: Porcentagem de hemólise pela via clássica de cães na presença de diferentes concentrações de EGS em pH 7,4 e pH 8,15. Os resultados foram expressos como média da porcentagem de hemólise e as barras verticais representam os desvios padrões. Os dados marcados com (*) apresentaram diferença estatística em relação ao controle.

Em ambos os pHs, a via clássica das aves foi inibida apenas com concentrações mais elevadas de EGS. Com quantidade de saliva referente a 8 e 20 ácidos, houve inibição de hemólise em torno de 20% e 35%, respectivamente (Fig. 12).

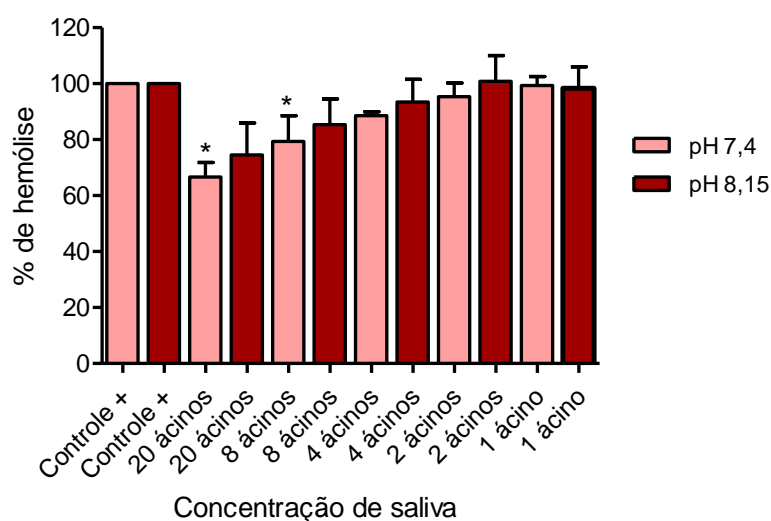


Figura 12: Porcentagem de hemólise pela via clássica de galinhas na presença de diferentes concentrações de EGS em pH 7,4 e pH 8,15. Os resultados foram expressos como média da porcentagem de hemólise e as barras verticais representam os desvios padrões. Os dados marcados com (*) apresentaram diferença estatística em relação ao controle.

Em pH 7,4, a via clássica de cobaias foi inibida por todas as concentrações de EGS, até mesmo a concentração referente a 0,5 ácido salivar, de forma estatisticamente significativa. Em pH 8,15, tal inibição foi observada com quantidade de saliva referente a 4 e 2 ácidos salivares (Fig. 13).

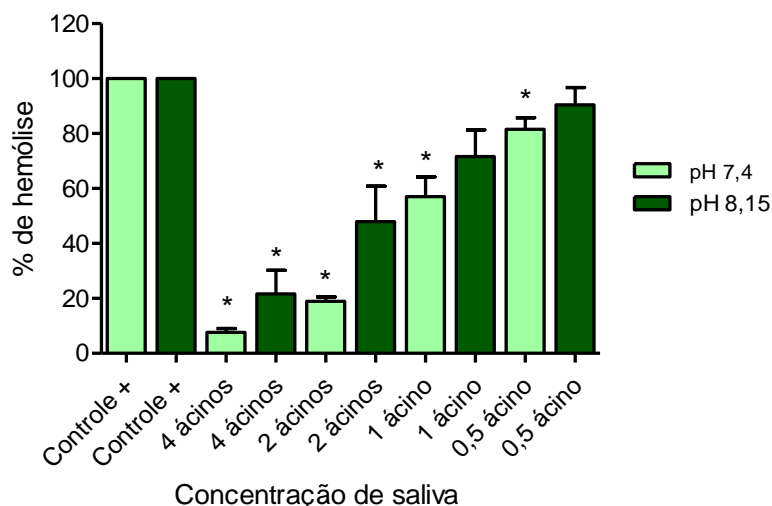


Figura 13: Porcentagem de hemólise pela via clássica de cobaias na presença de diferentes concentrações de EGS em pH 7,4 e pH 8,15. Os resultados foram expressos como média da porcentagem de hemólise e as barras verticais representam os desvios padrões. Os dados marcados com (*) apresentaram diferença estatística em relação ao controle.

5.3 Ação do EGS sobre a Atividade Hemolítica da Via Alternativa das Três Espécies Estudadas

Contrastando com os resultados observados para a via clássica de cães, foi observada apenas uma leve inibição da via alternativa (em torno de 5%) com a maior concentração de saliva testada em pH 7,4. No entanto, ao elevar o pH para 8,15, foi demonstrada uma inibição de mais de 60% com quantidade de saliva referente a 10 ácidos, e em torno de 20% com 5 ácidos (Fig. 14)

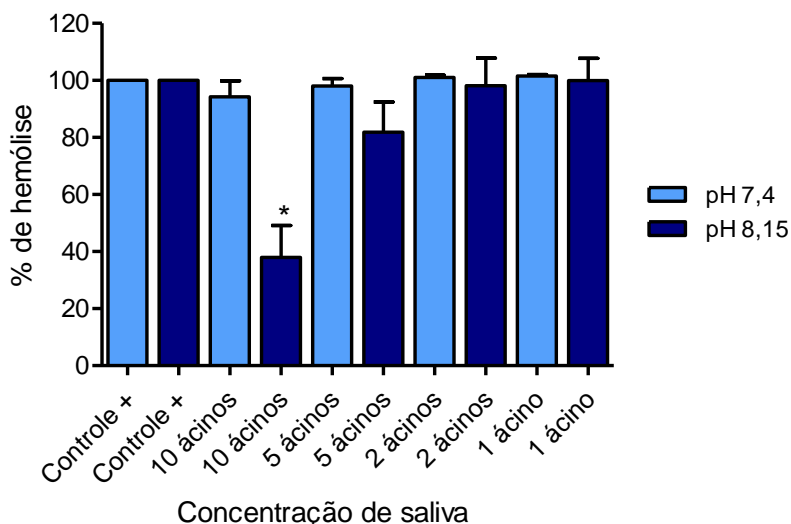


Figura 14: Porcentagem de hemólise pela via alternativa de cães na presença de diferentes concentrações de EGS em pH 7,4 e pH 8,15. Os resultados foram expressos como média da porcentagem de hemólise e as barras verticais representam os desvios padrões. Os dados marcados com (*) apresentaram diferença estatística em relação ao controle.

Como demonstrado na Figura 15, o EGS não causou inibição da hemólise pela via alternativa de galinhas em nenhum dos pHs testados, nem mesmo com concentrações bem elevadas de saliva (20 ácidos).

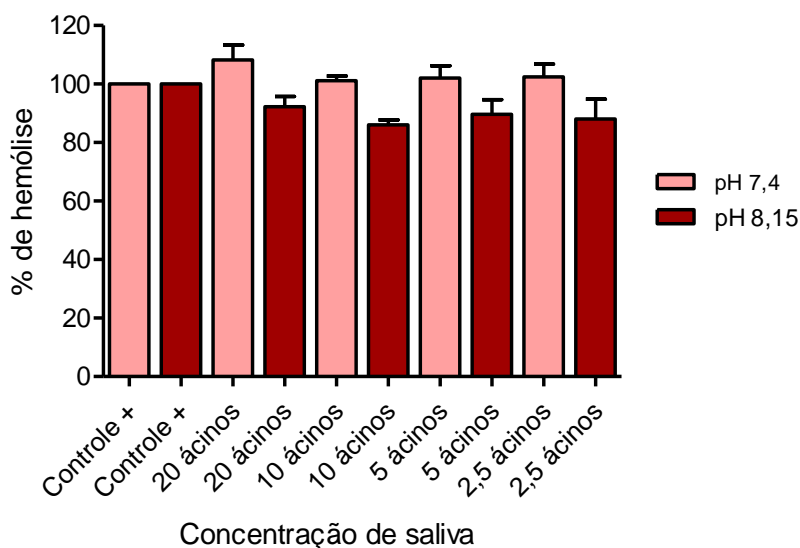


Figura 15: Porcentagem de hemólise pela via alternativa de galinhas na presença de diferentes concentrações de EGS em pH 7,4 e pH 8,15. Os

resultados foram expressos como média da porcentagem de hemólise e as barras verticais representam os desvios padrões.

De forma semelhante aos resultados encontrados para os cães e para as aves, não foi observada inibição da via alternativa de coaias em pH 7,4 com nenhuma das concentrações testadas (Fig. 16). Não foi realizado ensaio em pH 8,15 pois como observamos na Figura 8 – C, a alcalinização do pH leva a uma intensa redução da hemólise (menos de 20% da hemólise total), inviabilizando a detecção da ação dos inibidores com esta metodologia.

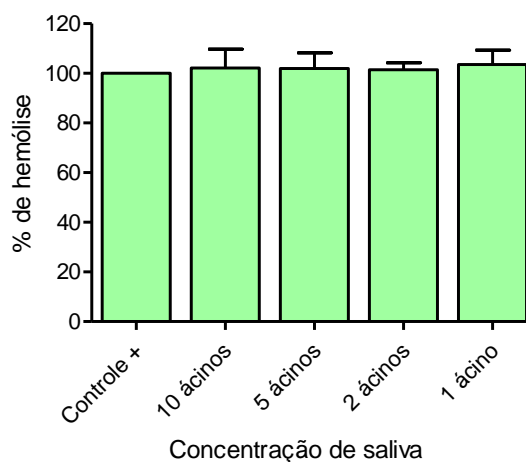


Figura 16: Porcentagem de hemólise pela via alternativa de coaias na presença de diferentes concentrações de EGS em pH 7,4. Os resultados foram expressos como média da porcentagem de hemólise e as barras verticais representam os desvios padrões.

5.4 Ação do EGS sobre a Deposição de C3b da Via Clássica de Cães e Cobaias

Conforme demonstrado na Figura 17, o EGS foi capaz de inibir a deposição de C3b da via clássica de cães de forma significativa (inibição em torno de 80%) com quantidade de saliva referente a 4, 3 e 2 ácidos salivares em pH 7,4 e com 4 e 3 ácidos em pH 8,15.

Com intensidade similar, houve inibição da deposição de C3b de coaias com todas as concentrações de saliva testadas, em ambos os pHs (Fig. 18).

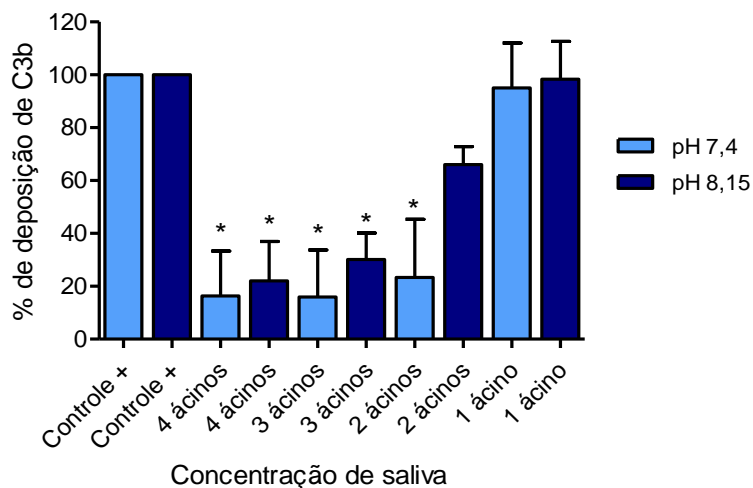


Figura 17: Porcentagem de deposição de C3b da via clássica de cães na presença de diferentes concentrações de EGS em pH 7,4 e pH 8,15. Os resultados foram expressos como média da porcentagem de deposição de C3b e as barras verticais representam os desvios padrões. Os dados marcados com (*) apresentaram diferença estatística em relação ao controle.

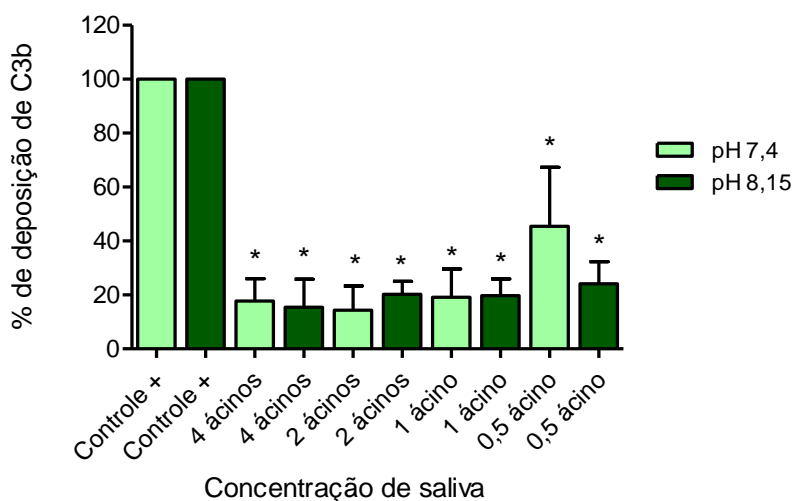


Figura 18: Porcentagem de deposição de C3b da via clássica de cobaias na presença de diferentes concentrações de EGS em pH 7,4 e pH 8,15. Os resultados foram expressos como média da porcentagem de deposição de C3b e as barras verticais representam os desvios padrões. Marcação com (*) representa diferença estatística em relação ao controle.

5.5 Ação do EGS sobre a Deposição de C3b da Via Alternativa de Cães e Cobaias

Corroborando os resultados encontrados nos ensaios de hemólise, o EGS provocou a inibição da deposição de C3b da via alternativa de cães com quantidade de saliva referente a 10 e 5 ácidos salivares (aproximadamente 90% e 65% de inibição, respectivamente) em pH 8,15. Em pH 7,4, nenhuma inibição estatisticamente significativa foi observada (Fig. 19).

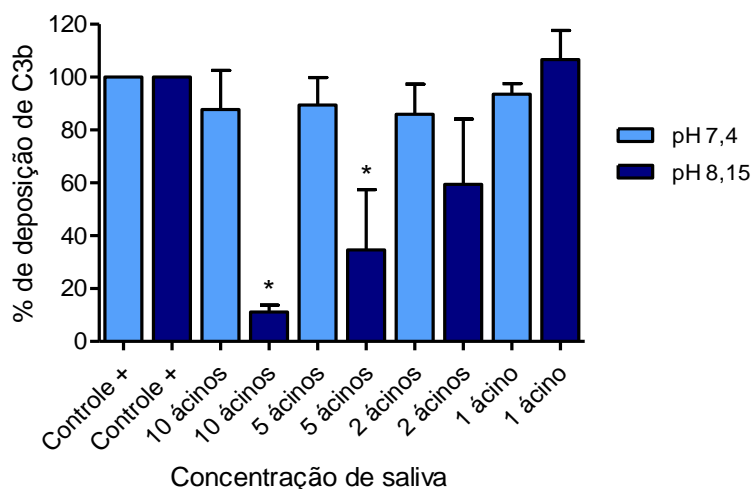


Figura 19: Porcentagem de deposição de C3b da via alternativa de cães na presença de diferentes concentrações de EGS em pH 7,4 e pH 8,15. Os resultados foram expressos como média da porcentagem de deposição de C3b e as barras verticais representam os desvios padrões. Marcação com (*) representa diferença estatística em relação ao controle.

Em relação à via alternativa de cobaias, similarmente aos resultados encontrados nos ensaios de hemólise, nenhuma das concentrações de saliva testadas foi capaz de inibir a deposição de C3b (Fig. 20). Como demonstrado na Figura 9 – B, a alcalinização do pH para 8,15 causa uma redução significativa na deposição de C3b da via alternativa desta espécie a níveis que inviabilizam a avaliação da ação dos inibidores salivares. Por este motivo, não foi realizado ensaio de inibição de deposição de C3b em pH 8,15.

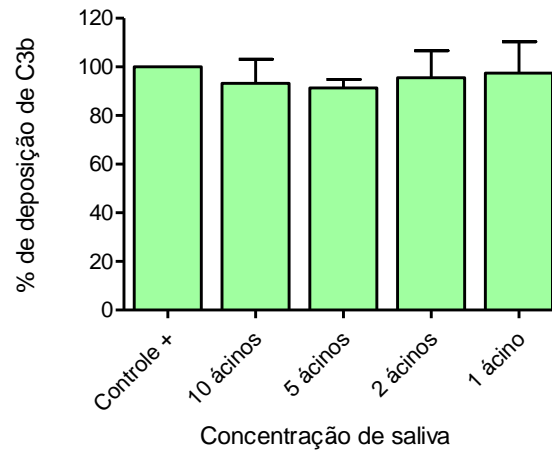


Figura 20: Porcentagem de deposição de C3b decorrente da ativação da via alternativa de cobaias na presença de diferentes concentrações de EGS em pH 7,4. Os resultados foram expressos como média da porcentagem de deposição de C3b e as barras verticais representam os desvios padrões.

Os dados obtidos com os diferentes ensaios de atividade do sistema complemento (ensaios hemolíticos e de deposição de C3b) das três espécies animais na presença de saliva foram sumarizados a seguir (Tabela 1 e 2) visando uma maior facilidade de observação e comparação dos mesmos.

Tabela 1: Porcentagem de inibição da via clássica do sistema complemento de cães, cobaias e galinhas pela saliva de *L. longipalpis*

Espécie animal	Número de ácidos por ensaio	Inibição da atividade hemolítica		Inibição da deposição de C3b	
		pH 7,4	pH 8,15	pH 7,4	pH 8,15
Cão	4	97 ± 0,6*	97 ± 0,1*	84 ± 16,9*	78 ± 14,8*
	3	98 ± 1,0*	97 ± 2,4*	84 ± 17,8*	70 ± 10,0*
	2	95 ± 1,5*	95 ± 1,4*	76 ± 21,9*	36 ± 10,2
	1	53 ± 28,4*	50 ± 5,6*	5 ± 17,0	5,9 ± 7,0
Cobaia	4	92 ± 1,4*	78 ± 8,5*	82 ± 8,3*	85 ± 10,4*
	2	81 ± 1,6*	52 ± 12,8*	85 ± 9,0*	80 ± 4,8*
	1	43 ± 7,2*	28 ± 9,7	81 ± 10,5*	80 ± 6,2*
	0,5	18 ± 4,1*	9 ± 6,3	54 ± 21,9*	75 ± 8,2*
Galinha	20	33 ± 5,2*	25 ± 11,4	-	-
	8	20 ± 9,2*	15 ± 9,2	-	-
	4	11 ± 1,4	7 ± 8,2	-	-
	2	5 ± 4,9	0 ± 9,3	-	-
	1	1 ± 3,2	2 ± 7,7	-	-

Resultados apresentados como média ± desvio padrão. (*): diferença estatística em relação ao controle (P< 0,01); (-): ensaio não realizado.

Tabela 2: Porcentagem de inibição da via alternativa do sistema complemento de cães, cobaias e galinhas pela saliva de *L. longipalpis*

Espécie animal	Número de ácidos por ensaio	Inibição da atividade hemolítica		Inibição da deposição de C3b	
		pH 7,4	pH 8,15	pH 7,4	pH 8,15
Cão	10	6 ± 5,6	62 ± 11,2*	12 ± 14,7	89 ± 2,6*
	5	2 ± 2,6	18 ± 10,6	10 ± 10,4	65 ± 22,8*
	2	0 ± 0,8	1,8 ± 9,7	14 ± 11,4	40 ± 24,6
	1	0 ± 0,5	0 ± 7,8	6 ± 3,9	0 ± 10,9
Cobaia	10	0 ± 7,6	-	6,7 ± 9,9	-
	5	0 ± 6,3	-	8,6 ± 3,4	-
	2	0 ± 2,8	-	4,4 ± 11,1	-
	1	0 ± 5,9	-	2,5 ± 12,8	-
Galinha	20	0 ± 5,1	7,8 ± 3,5	-	-
	10	0 ± 1,6	14 ± 1,8	-	-
	5	0 ± 4,2	10 ± 4,9	-	-
	2,5	0 ± 4,4	12 ± 6,9	-	-

Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. (*): diferença estatística em relação ao controle (P< 0,01). (-): ensaio não realizado.

5.6 Ação da Proteína LJM19 sobre a Via Clássica de Cães

A proteína recombinante LJM19 foi capaz de inibir a hemólise pela via clássica de cães em todas as concentrações testadas, com diferença significativa em relação ao controle (Fig. 21). Além da hemólise, a proteína inibiu também a deposição de C3b de forma significativa com 0,25 μ g e 0,125 μ g (Fig. 22). Devido a pouca quantidade disponível desta proteína recombinante em nosso laboratório, não foram realizados ensaios em pH 8,15.

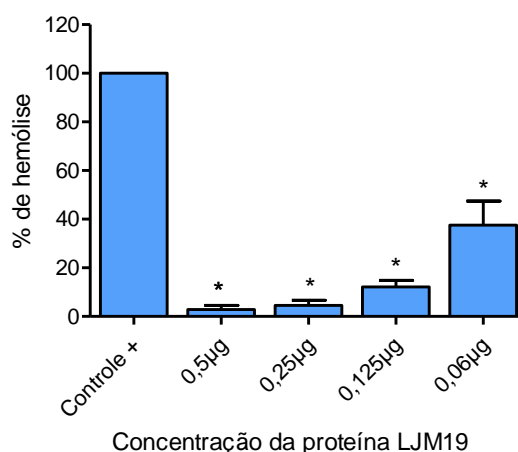


Figura 21: Porcentagem de hemólise pela via clássica de cães na presença de diferentes concentrações da proteína LJM19 em pH 7,4. Os resultados foram expressos como média da porcentagem de hemólise e as barras verticais representam os desvios padrões. Os dados marcados com (*) apresentaram diferença estatística em relação ao controle.

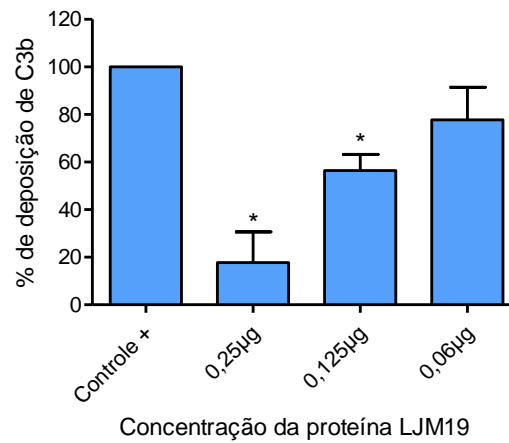


Figura 22: Porcentagem de deposição de C3b da via clássica de cães na presença de diferentes concentrações da proteína LJM19 em pH 7,4. Os resultados foram expressos como média da porcentagem de deposição de C3b e as barras verticais representam os desvios padrões. Os dados marcados com (*) apresentaram diferença estatística em relação ao controle.

6. Discussão

O sistema complemento é um importante componente da resposta imune inata dos vertebrados constituído por cerca de 30 proteínas solúveis no plasma sanguíneo ou associadas à superfície celular. O pH normal do sangue dos seres humanos e animais gira em torno de 7,4 (Reece e Swenson, 2006), sendo, portanto, o pH natural em que ocorre a ativação do sistema complemento. Santos *et al.* (2008) mostraram que quando fêmeas de *L. longipalpis* se alimentam com sangue de hamster, o pH do intestino médio abdominal rapidamente sofre alcalinização, subindo para 8,15, principalmente devido à volatilização do CO₂ sanguíneo. Desta forma, realizamos ensaios para verificar se esta mudança de pH afetaria a ativação das vias clássica e alternativa do complemento de cães, galinhas e cobaias, uma vez que só seria necessário para o inseto inibir este sistema se o mesmo fosse eficaz no novo pH.

Pudemos observar que a alcalinização do sangue no intestino do vetor não afeta de forma significativa a ativação da via clássica das três espécies (Fig. 7), o que nos permite sugerir que esta via poderia ser ativada no interior do trato digestivo do flebotomíneo caso algum anticorpo inespecífico presente no sangue ingerido se ligue a células intestinais, constituindo assim um risco para o inseto. Já a via alternativa dos mamíferos (cães e cobaias), foi inibida significativamente com a alteração do pH, com redução de cerca de 35% da atividade hemolítica das duas espécies (Fig. 8). Ensaios de deposição de C3b com estas espécies demonstraram que a mudança de pH afeta negativamente a opsonização por C3b, diminuindo em aproximadamente 50% e 70% a deposição de C3b da via alternativa de cães e cobaias, respectivamente (Fig. 9), justificando a inibição na atividade hemolítica observada previamente.

Barros *et al.* (2009) encontraram resultados semelhantes estudando a influência do pH na ativação do sistema complemento humano. O aumento para pH 8,0 não alterou a ativação da via clássica, mas provocou uma inibição de cerca de 60% da deposição de C3b da via alternativa. Desta forma, a mudança de pH no intestino do inseto pode atuar como uma proteção parcial

contra a via alternativa presente no sangue de mamíferos. Interessantemente, a alcalinização não afetou a via alternativa das aves (Fig. 8), permanecendo com a mesma capacidade lítica em ambos os pHs.

A temperatura corporal das galinhas domésticas mantém-se em torno de 40°C (Robertshaw, 2006). Durante a padronização dos ensaios hemolíticos com soro desta espécie, foram realizados testes com as vias clássica e alternativa em pH 7,4 nos quais os tubos contendo soro e hemácias foram incubados a 37°C ou a 40°C. Como apresentado na Figura 10, não houve diferença estatística na atividade hemolítica de ambas as vias do complemento das aves entre as duas temperaturas testadas. Desta forma, por uma questão de padronização para todas as espécies estudadas, realizamos os ensaios de hemólise a 37°C.

Extrato de glândula salivar de *L. longipalpis*, mesmo em baixas concentrações, foi capaz de inibir fortemente a hemólise decorrente da ativação da via clássica de cães e cobaias. Inibição semelhante já havia sido observada sobre a via clássica de humanos pela saliva de *L. longipalpis* e *L. migonei* (Cavalcante *et al.*, 2003). No mesmo trabalho, os autores demonstraram que saliva de *L. longipalpis* não possui nenhuma hemolisina e que a hemólise observada era decorrente apenas da ativação do sistema complemento.

Por atuar em ambos os pHs testados, pode-se sugerir que o inibidor salivar é capaz de proteger o inseto contra a ação lítica da via clássica do complemento destas espécies. Sabe-se que os flebotomíneos ingerem saliva ao se alimentarem de carboidratos (Cavalcante *et al.*, 2006). Supondo que a ingestão de saliva ocorra também durante a hematofagia, o inibidor do complemento poderia atuar também no interior do seu intestino, inativando o complemento e protegendo-o.

A inibição da via clássica de seres humanos, cães e roedores pela saliva de *L. longipalpis* pode favorecer à infecção por *Leishmania infantum*, pois Rezai *et al.* (1975) demonstraram que soro destas espécies é letal para formas promastigotas de outras espécies do parasito, e que quando o soro era incubado previamente a 56°C, tal letalidade era diminuída, evidenciando que a morte celular era causada pelo sistema complemento. Além disso, Pearson e

Steigbigel (1980) demonstraram que a ativação da via clássica de humanos é responsável por uma porcentagem significativa de morte de formas promastigotas de *L. donovani*, espécie viscerotrópica, assim como *L. infantum*. Considerando que formas promastigotas são as formas regurgitadas pelo vetor e, portanto, as primeiras a entrarem em contato com o organismo do hospedeiro, a inibição do complemento, juntamente com a ação das outras moléculas imunomoduladoras presentes na saliva do inseto, criaria nestes hospedeiros um microambiente favorável à infecção. De fato, Nascimento (2011) demonstrou que a atividade lítica do complemento humano sobre formas promastigotas de *L. infantum* foi significativamente reduzida na presença de saliva de *L. longipalpis*, seu vetor natural. A partir dos resultados obtidos em nosso trabalho, podemos sugerir que a inibição do complemento pela saliva do vetor pode ser um fator decisivo na determinação de um bom hospedeiro/reservatório de *L. infantum*.

Formas amastigotas de *Leishmania* sp são altamente sensíveis ao sistema complemento (Hoover *et al.*, 1985) e, portanto, também devem se beneficiar com a inibição da via clássica de mamíferos, pois durante a hematofagia, células infectadas do hospedeiro são rompidas pelas peças bucais do vetor, liberando formas amastigotas do parasito. Neste momento, o complemento presente no *pool* de sangue formado pela picada ou no sangue ingerido pelo inseto poderia atacá-las, levando-as a morte.

De forma contrastante, a via clássica das aves foi inibida apenas com concentrações muito elevadas de saliva (8 e 20 ácidos). Esta é uma inibição bastante fraca se compararmos com a observada sobre a via clássica dos mamíferos. Considerando que *L. longipalpis* se alimenta muito bem em galinhas (Sant'Anna *et al.*, 2008) sendo até mesmo utilizadas para alimentação dos insetos em algumas colônias de laboratório, esta espécie deve apresentar outras maneiras de evasão do complemento das aves, de modo a preservarem suas células intestinais. Barros (2009) demonstrou a presença de inibidores do complemento no conteúdo intestinal de três espécies de triatomíneos e do mosquito *Aedes aegypti*. Fazito do Vale (2011), por sua vez, demonstrou que conteúdo intestinal de *L. longipalpis* inibe de maneira significativa a deposição de C3b da via clássica do complemento humano. Este inibidor intestinal

poderia atuar também sobre a via clássica das aves, protegendo assim o inseto. Outros inibidores podem também estar presentes no intestino dos insetos.

Em pH 7,4, a via alternativa de nenhuma das espécies estudadas foi suprimida. Estes dados contrastam com os observados por Cavalcante *et al.* (2003) e Fazito do Vale (2011), que observaram inibição da via alternativa de seres humanos com quantidade de saliva referente a 5, 10 e 20 ácidos. Entretanto, em pH 8,15 houve inibição significativa nos testes com soro de cães. Considerando que apenas a alcalinização do pH já diminui cerca de 35% da atividade hemolítica, a ação dos inibidores salivares levaria a proteção completa do trato digestivo do inseto contra a ação lítica pela via alternativa de cães.

A via alternativa de cobaias apresentou-se menos hemolítica que a de cães, pois na mesma diluição (1:5) o soro dos roedores causou apenas 50% de lise celular, contra 90% de lise causada pelo soro de cães. A alcalinização do pH após o repasto sanguíneo inibiu a atividade hemolítica de cobaias a níveis que inviabilizaram o estudo de inibidores salivares em pH 8,15 pois a diferença entre o controle positivo e o controle de hemólise espontânea tornou-se praticamente imperceptível. Desta forma, podemos sugerir que o próprio aumento do pH no intestino do inseto, constitui uma forma de proteção contra a ação lítica da via alternativa de roedores.

Saliva de *L. longipalpis* não inibiu de forma estatisticamente significativa a via alternativa de galinhas em nenhum dos pHs. Tal ausência de inibição, associada ao fato das aves serem fonte de sangue freqüente para o vetor, reforça nossa hipótese da existência e importância de inibidores intestinais do complemento.

Considerando que um flebotomíneo ingere 0,8µl de sangue por repasto (Gontijo, NF, comunicação pessoal) e que o hematócrito das espécies animais utilizadas em nosso estudo permanece em torno de 45% (Windberger *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2007; Mota *et al.*, 2008), o volume de soro ingerido pelo vetor é de aproximadamente 0,44µl. Nascimento (2011) demonstrou que durante a hematofagia, uma fêmea de *L. longipalpis* inocula no hospedeiro quantidade de saliva referente à um ácido salivar. Desta forma, a quantidade

de saliva referente a um ácido deveria inibir o complemento presente em 0,44µl de soro.

Nos ensaios com a via clássica de cães, em cada tubo foi acrescentado 50µl de soro diluído a 1:40, ou seja, havia 1,25µl de soro por tubo. Com quantidade de saliva referente a dois ácidos salivares, houve inibição em torno de 90%. Isto quer dizer que dois ácidos foram capazes de inibir a via clássica presente em 1,25µl de soro. Desta forma, podemos concluir que um ácido inibiu a via clássica de 0,6µl de soro. Nos ensaios com via alternativa, a diluição do soro foi de 1:5 e, portanto, cada tubo continha 10µl de soro. Com quantidade de saliva referente a 10 ácidos, houve inibição de forma estatisticamente significativa em pH 8,15, demonstrando que 10 ácidos consegue inibir a via alternativa de 10µl de soro e, portanto, 1 ácido seria suficiente para inibir a via alternativa de 1µl de soro. As inibições observadas são, portanto, representativas do que acontece na natureza durante a hematofagia de *L. longipalpis* em cães.

Devido ao seu forte poder hemolítico, o soro de cobaias foi diluído a 1:200 para os ensaios com a via clássica. Assim, em cada tubo havia 0,25µl de soro (50µl de soro diluído a 1:200) e quantidade de saliva de um ácido inibiu significativamente a hemólise. Considerando que o inseto ingere 0,44µl de soro, o inibidor salivar atua sobre mais de 50% do soro ingerido.

A inibição da via clássica de galinhas por quantidade de saliva referente a 20 ácidos, entretanto, não representa um fenômeno natural, pois se considerarmos que 20 ácidos inibe em torno de 30% de 1,7µl de soro (50µl de soro diluído 1:30), 1 ácido inibiria em torno de 30% de 0,085µl de soro, quantidade bem inferior à ingerida pelo inseto durante o repasto.

Inibidores salivares do complemento com ação espécie-específica já foram demonstrados para três espécies de carrapatos. *Ixodes ricinus*, o carrapato vetor da Doença de Lyme na Europa, é considerado um hematófago altamente promíscuo que já foi encontrado parasitando mais de 65 espécies, incluindo mamíferos, aves e répteis (Milne, 1949). Sua saliva é capaz de inibir de forma potente a via alternativa de seres humanos, cervos e ouriços, de forma pouco intensa a de pombos, mas não inibe a de cães e faisões. Saliva de *I. hexagonus* inibiu a mesma via de seres humanos, cervos, cães e ouriços,

mas não inibiu a de pombos e faisões. Já a saliva de *I. uriae* foi capaz de inibir a ação da via alternativa de pombos, mas não afetou a de humanos e faisões (Lawrie *et al.*, 1999). Nossos resultados permitem sugerir que o inibidor salivar de *L. longipalpis* segue essa forma de atuação espécie-específica. Infelizmente, informações sobre diferenças estruturais e funcionais do sistema complemento, bem como diferenças nas concentrações plasmáticas dos seus componentes entre diferentes espécies animais são escassas, o que dificulta nossa compreensão sobre como e porque o inibidor salivar é capaz de atuar sobre uma espécie, mas não sobre outra.

Otranto *et al.* (2009) tentaram infectar experimentalmente galinhas com inóculos subcutâneos de *Leishmania infantum* na concentração de 1×10^7 células/ml. Como resultados, nenhum animal apresentou sinais clínicos da doença, soroconversão ou presença de *Leishmania* em cultura de tecidos. Alguns animais apresentaram resultados PCR-positivos para o parasito, mas os próprios autores afirmam que a detecção de kDNA nos tecidos não significa viabilidade do parasito. De fato, a ausência de parasitos nas culturas de tecidos, sugere que os parasitos estavam inviáveis, concluindo que as aves são verdadeiramente incapazes de desenvolver a infecção. Entretanto, o mecanismo exato pelo qual as aves eliminam *Leishmania* sp ainda não foi totalmente elucidado.

A ausência ou fraca inibição do complemento das aves observada em nossos resultados pode ser um dos fatores relacionados com a refratariedade das mesmas à *Leishmania* sp, pois com o sistema complemento totalmente funcional no local de inoculação, as formas promastigotas não resistiriam à formação do CAM e acabariam lisadas. Juntamente com este fator, a temperatura corporal das aves em torno de 40°C deve ser outro fator limitante ao sucesso da infecção, pois a elevada temperatura corporal poderia danificar proteínas e membranas celulares do parasito, levando-o à morte. Estudos mostraram que culturas de *L. mexicana* e *L. major* são completamente eliminadas à 37,5°C e 39°C, respectivamente. *L. donovani*, espécie viscerotrópica e, portanto adaptada à temperaturas corporais em torno de 37°C, tem crescimento parcialmente limitado com o aumento de temperatura para 39°C (Zilberstein e Shapira, 1994).

Sant'Anna *et al.* (2010) realizaram alimentação artificial de *L. longipalpis* com sangue de galinha contendo formas amastigotas de *L. mexicana* e observaram sucesso na infecção do vetor, com mais de 90% dos insetos apresentando formas promastigotas após 6 dias da alimentação sanguínea. Com estes resultados, concluíram que sangue de galinha não possuía nenhum componente capaz de inibir o desenvolvimento do parasito. Entretanto, analisando a metodologia utilizada neste trabalho, notamos que a alimentação artificial foi realizada com sangue de galinha adquirido comercialmente e diluído em solução contendo ácido cítrico e citrato de sódio, substâncias que quelam íons Ca^+ , necessários à ativação da via clássica do complemento. Além disso, a alimentação foi realizada com sangue a 35°C. Tais condições não representam a hematofagia natural. Considerando nossos resultados, se a alimentação artificial fosse realizada com sangue de galinha em solução sem quelante e a 40°C, provavelmente a viabilidade dos parasitos seria diminuída ou inexistente, em decorrência da lise pelo complexo de ataque a membrana ou pela temperatura elevada.

De fato, as aves também são refratárias ao *Trypanosoma cruzi*, protozoário pertencente à mesma família das leishmânias e causador da Doença de Chagas. Este fenômeno ocorre devido à ação lítica do sistema complemento das aves sobre as formas tripomastigotas do *T. cruzi*, que tornam-se indetectáveis após 4 minutos da inoculação feita em galinhas (Kierszenbaum *et al.*, 1976). Kierszenbaum *et al.* (1976) demonstraram que 1 μ l de soro de galinha tem a capacidade de lisar cerca de $1-3 \times 10^7$ *T. cruzi*.

Os resultados observados nos ensaios de deposição de C3b confirmam os resultados dos ensaios hemolíticos. A deposição de C3b da via clássica de cães e cobaia foi inibida de forma dose-dependente em ambos os pHs (Figs. 17 e 18). A inibição da via alternativa de cães foi observada apenas em pH 8,15 (Fig. 19). Esta via em cobaias foi testada apenas em pH 7,4 pois a alteração do pH provoca redução significativa da atividade desta via, inviabilizando a detecção da ação de inibidores. Não houve inibição em pH 7,4 nos testes com soro de cobaias. Infelizmente, por não haver anticorpo anti-C3 de galinha, não realizamos ensaios de deposição para esta espécie.

Fazito do Vale (2011), utilizando anticorpos monoclonais para componentes específicos do sistema complemento humano, observou que EGS de *L. longipalpis* inibe a deposição de C4b, C3b, C5b e C9, mas não a deposição de C1q. Através de diferentes ensaios, ficou demonstrado que o inibidor salivar atua ligando-se ao componente C1q, permitindo que este se ligue ao anticorpo ativador, mas bloqueando a ativação de C1r e C1s, inibindo em consequência a cascata da via clássica.

Infelizmente, não encontram-se disponíveis comercialmente anticorpos contra outros componentes do complemento de cães e cobaias, além do anti-C3. Por isso analisamos a ação da saliva apenas sobre a deposição deste componente, que é o mais abundante e o mais importante. A partir da inibição da deposição de C3b destas espécies, podemos concluir que o inibidor salivar da via clássica atua em um ponto anterior à ativação de C3 e podemos sugerir que seja a mesma molécula que inibe a via clássica das três espécies (seres humanos, cães e cobaias).

A saliva de *L. longipalpis* tem a capacidade de inibir a deposição de C3b da via alternativa de seres humanos (Fazito do Vale, 2011), mas não a de cães e cobaias em pH 7,4, confirmando a eficácia espécie-específica destes inibidores. Em pH 8,15, houve forte inibição com soro de cães com quantidade de saliva referente a 5 e 10 ácidos salivares, o que nos permite concluir que este inibidor pode proteger o intestino do inseto contra ambas as vias do complemento de cães. A alcalinização leva a uma intensa redução da deposição de C3b de cobaia, o que explica a inibição observada na atividade hemolítica da via alternativa desta espécie em pH 8,15.

A proteína recombinante LJM19 apresentou atividade inibitória sobre a hemólise pela via clássica de cães de forma estatisticamente significativa mesmo em concentrações muito baixas (0,06µg), confirmando ser a mesma proteína que atua sobre a via clássica de cães e seres humanos. Essa proteína também provocou inibição da deposição de C3b da via clássica de cães. Desta forma, podemos concluir que este inibidor age sobre o complemento de cães da mesma maneira que age sobre o de seres humanos: ligando-se ao componente C1q, inibindo a ativação do componente C4 e o restante da cascata. Isso explicaria a inibição da deposição de C3b de cão observada em

nossos resultados. Fazito do Vale (2011) demonstrou que a proteína LJM19 não atua sobre a via alternativa de seres humanos e o modo de ação do inibidor desta via permanece a ser esclarecido.

Por atuar no início da cascata da via clássica o inibidor salivar, além de proteger o intestino do inseto e formas do parasito contra a lise, atua também favorecendo a hematofagia, pois bloqueando a clivagem de C3 e C5, haverá formação diminuída das anafilotoxinas C3a e C5a, responsáveis pela atração de leucócitos para o local e aumento da resposta inflamatória. Diminuindo a degranulação de mastócitos e a liberação de histamina, a percepção do hospedeiro será diminuída, permitindo que o flebotomíneo realize o repasto sanguíneo completo. Além disso, C3a possui a capacidade de induzir a ativação e agregação plaquetária, levando à coagulação sanguínea (Marliewski *et al.*, 2007). Desta forma, o inibidor salivar do complemento, ao bloquear o fluxo da cascata e conseqüentemente a produção de C3a, atua indiretamente como um anti-coagulante, evitando a hemostasia e favorecendo o fluxo de sangue pelas peças bucais do vetor.

Gomes *et al.* (2008) demonstraram que hamsters previamente imunizados com a proteína LJM19 tornavam-se protegidos contra o desfecho fatal da infecção por *L. infantum*. Os animais imunizados mantiveram baixa carga parasitária quando comparados com animais controle, além de baixos títulos de anticorpos IgG anti-*Leishmania* e inexistência de sinais clínicos de leishmaniose visceral. Estes dados reforçam a idéia de utilização de componentes salivares do vetor como componentes vacinais em estratégias de controle da leishmaniose visceral. Considerando que os cães, por serem os principais reservatórios de *L. infantum* nas Américas, seriam os animais vacinados, é de extrema importância a compreensão de como seu organismo reage a componentes salivares do vetor, como a proteína LJM19. Se a imunização de cães com esta proteína também vier a protegê-los contra a doença, sua incorporação a uma vacina para leishmaniose visceral canina torna-se uma possibilidade promissora no controle desta doença.

7. Conclusões

- Saliva de *L. longipalpis* é capaz de inibir a via clássica do sistema complemento de cães e cobaias tanto em pH 7,4 como em pH 8,15;
- Em pH 7,4, saliva de *L. longipalpis* não inibe a via alternativa de cães ou cobaias, mas em pH 8,15 há inibição da via alternativa de cães;
- Saliva de *L. longipalpis* é incapaz de inibir as vias clássica e alternativa do complemento de galinhas em pH 7,4 e pH 8,15;
- A alcalinização do pH no lúmen intestinal do vetor após o repasto sanguíneo, propicia inibição da via alternativa de cães e cobaias;
- Os inibidores salivares de *L. longipalpis* atuam de forma espécie-específica;
- A proteína salivar recombinante LJM19 inibe a atividade hemolítica e a deposição de C3b da via clássica de cães.

8. Referências Bibliográficas

Alexander B, Carvalho RL, McCallum H, Pereira MH 2002. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg Infect Dis* 8: 1480-1485.

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.

Andrade-Coelho CA, Santos-Mallet J, Souza NA, Lins U, Meirelles MNL, Rangel EF 2001. Ultrastructural Features of the Midgut Epithelium of Females *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 1141-1151.

Banda NK, Levitt B, Wood AK, Takahashi K, Stahl GL, Holers VM, Arend WP 2009. Complement activation pathways in murine immune complex-induced arthritis and in C3a and C5a generation in vitro. *Clin Exp Immunol* 159: 100-108.

Barata RA, França-Silva JC, Mayrink W, Silva JC, Prata A, Lorosa ES, Fiúza JA, Gonçalves CM, Paula KM, Dias ES 2005. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 38: 421-425.

Barros VC. *O papel dos inibidores salivares e intestinais do complemento humano na proteção do intestino médio de triatomíneos*. 2009. 77f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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* 25: e6047.

Brodie TM, Smith MC, Morris RV, Titus RG 2007. Immunomodulatory effects of the *Lutzomyia longipalpis* salivary gland protein Maxadilan on mouse macrophages. *Infect Immun* 75: 2359–2365.

Caldas AJM, Costa JML, Silva AAM, Vinhas V, Barral A 2002. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96: 21-28.

Cavalcante RR, Pereira MH, Freitas JM, Gontijo NF 2006. Ingestion of saliva during carbohydrate feeding by *Lutzomyia longipalpis* (Diptera; Psychodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 85-87.

Cavalcante RR, Pereira MH, Gontijo NF 2003. Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitol* 127: 87-93.

Cerf BJ, Jones TC, Badaro R, Sampaio D, Teixeira R, Johnson Jr WD 1987. Malnutrition as a Risk Factor for Severe Visceral Leishmaniasis. *J Infec Dis* 156: 1030-1033.

Charlab R, Valenzuela JG, Rowton ED, Ribeiro JMC 1999. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proc Natl Acad Sci* 96: 15155-15160.

Collin N, Gomes R, Teixeira C, Cheng L, Laughinghouse A, Ward JM, Elnaiem DE, Fischer L, Valenzuela JG, Kamhawi S 2009. Sand fly salivary proteins induce strong cellular immunity in a natural reservoir of visceral leishmaniasis with adverse consequences for *Leishmania*. *Plos Pathogens* 5: e1000441.

- Dantas-Torres F 2007. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol* 149: 139-146.
- Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP 2006. Visceral leishmaniasis in Brazil: Revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 48: 151-156.
- Desjeux P 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27: 305-318.
- Dias FOP, Lorosa ES, Rebêlo JMM 2003. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cad Saúde Pública* 19: 1373-1380.
- DiScipio RG, Schraufstatter IU 2007. The role of the complement anaphylatoxins in the recruitment of eosinophils. *Int Immunopharmacol* 7: 1909-1923.
- Dunkelberger JR, Song WC 2010. Complement and its role in innate and adaptative immune responses. *Cell Res* 20: 34-50.
- Evans TG, Teixeira MJ, McAuliffe IT, Vasconcelos I, Vasconcelos AW, Sousa AQ, Lima JW, Pearson RD 1992. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *J Infect Dis* 166: 1124-1132.
- Fazito do Vale V. *Estudo da atividade inibidora do sistema do complemento humano presente na saliva e conteúdo intestinal de Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae)*. 2011. 115f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

- Gomes RB, Mendonça IL, Silva VC, Ruas J, Silva MB, Cruz MSP, Barral A, Costa CHN 2007. Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101: 127-133.
- Gomes R, Teixeira C, Teixeira MJ, Oliveira F, Menezes MJ, Silva C, Oliveira CI, Miranda JC, Elnaïem DE, Kamhawi S, Valenzuela JG, Brodskyn CI 2008. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proc Natl Acad Sci* 105: 7845-7850.
- Gouvêa MV, Werneck GL, Costa CHN, Carvalho FAA 2007. Factors associated to Montenegro skin test positivity in Teresina, Brazil. *Acta Trop* 104: 99-107.
- Hoover DL, Berger M, Oppenheim MH, Hockmeyer WT, Meltzer MS 1985. Cyto-toxicity of human-serum for *Leishmania donovani* amastigotes - antibody facilitation of alternate complement pathway-mediated killing. *Infect Immun* 47: 247-252.
- Kamhawi S 2000. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microb Infect* 2: 1765-1773.
- Kamhawi S, Belkaid Y, Modi G, Rowton E, Sacks D, 2000. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290: 1351-1354.
- Kamhawi S 2006. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes ? *Trends Parasitol* 22: 439-445.
- Kane MM, Mosser DM 2001. The Role of IL-10 in Promoting Disease Progression in Leishmaniasis. *J Immunol* 166: 1141-1147.

- Kierszenbaum F, Ivanyi J, Budzko DB 1976. Mechanisms of natural resistance to trypanosomal infection – Role of Complement in Avian Resistance to *Trypanosoma cruzi* Infection. *Immunol* 30: 1-6.
- Lainson R, Rangel EF 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 811-827.
- Lawrie CH, Randolph SE, Nuttall PA 1999. *Ixodes* Ticks: Serum Species Sensitivity of Anticomplement Activity. *Exp Parasitol* 93: 207-214.
- Lerner EA, Iuga AO, Reddy VB 2007. Maxadilan, a PAC-1 receptor agonist from sand flies. *Peptides* 28: 1651-1654.
- 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.
- Marcelino AP, Ferreira EC, Avendanha JS, Costa CF, Chiarelli D, Almeida G, Moreira EC, Leite RC, Reis JKP, Gontijo CMF 2011. Molecular detection of *Leishmania braziliensis* in *Rattus norvegicus* in an area endemic for cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol* 183: 54-58.
- Markiewski MM, Nilsson B, Ekdahl KN, Mollnes TE, Lambris JD 2007. Complement and coagulation: strangers or partners in crime ? *Trends Immunol* 28:184-192
- Mbow ML, Bleyenbergh JA, Hall LR, Titus RG 1998. *Phlebotomus papatasi* Sand Fly Salivary Gland Lysate Down-Regulates a Th1, but Up-Regulates a Th2, Response in Mice Infected with *Leishmania major*. *J Immunol* 161: 5571-5577.

- Milne, A 1949. The ecology of the sheep tick *Ixodes ricinus* L: Host relationships of the tick. 2. Observations on hill and moorland grazings in Northern England. *Parasitol* 39, 173–194.
- MS - Ministério da Saúde, Brasil 2006. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, Ministério da Saúde (acessado em 15 de janeiro de 2012). Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_viscerar2006.pdf.
- 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.
- Moreira ED, Souza-Jr VMM, Sreenivasan M, Lopes NL, Barreto RB, Carvalho LP 2003. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 69: 393-397.
- Morgan BP, Marchbank KJ, Longhi MP, Harris CL, Gallimore AM 2004. Complement: central to innate immunity and bridging to adaptive responses. *Immunol Lett* 97: 171-179.
- Morris RV, Shoemaker CB, David JR, Lanzaro GC, Titus RG 2001. Sandfly Maxadilan Exacerbates Infection with *Leishmania major* and Vaccinating Against It Protects Against *L. major* Infection. *J Immunol* 167: 5226-5230.
- Mosser DM, Brittingham A 1997. *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitol* 115: 09-23.
- Mota RA, Galiza Silva LB, Cunha AP, Sobrinho ESN, Pinheiro Júnior JW, Rabelo SSA, Oliveira AAF 2008. Alterações clínicas em cobaias (*Cavia porcellus*) inoculados experimentalmente com isolados de campo de *Burkholderia mallei* de eqüídeos com mormo. *Med Vet* 2: 1-9.

Nascimento AA. *Atividade lítica pelo sistema de complemento em promastigotas de Leishmania (Leishmania) infantum frente a componentes salivares de Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis (Diptera: Psychodidae)*. 2011. 76f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Noronha FS, Nunes AC, Souza KT, Melo MN, Ramalho-Pinto FJ 1998. Differential sensitivity of New World *Leishmania* spp. promastigotes to complement-mediated lysis: correlation with the expression of three parasite polypeptides. *Acta Trop* 69: 17-29.

Nunes AC, Ramalho-Pinto FJ 1996. Complement resistance of *Leishmania amazonensis* promastigotes is independent of parasite proteases and lysis of sensitive forms is not due to natural antibodies in normal human serum. *Braz J Med Bio Res* 29: 1633-1640.

Oliveira AG, Marassá AM, Consales CA, Dorval MEC, Fernandes CE, Oliveira GR, Brazil RP, Galati EAB 2008. Observations on the feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Campo Grande, an endemic area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brasil. *Acta Trop* 107: 238-241.

Otranto D, Testini G, Buonavoglia C, Parisi A, Brandonisio O, Circella E, Dantas-Torres F, Camarda A 2009. Experimental and field investigations on the role of birds as hosts of *Leishmania infantum*, with emphasis on the domestic chicken. *Acta Trop* 113: 80-83.

Pearson RD, Steigbigel RT 1980. Mechanism of lethal effect of human serum upon *Leishmania donovani*. *J Immunol* 125: 2195-2201.

Quaresma PF, Rêgo FD, Botelho HA, Silva SR, Moura Júnior AJ, Teixeira Neto RG, Madeira FM, Carvalho MB, Paglia AP, Melo MN, Gontijo CMF 2011.

- Wild, synanthropic and domestic hosts of Leishmania in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105: 579:585.
- Quinnel RJ, Dye C 1994. Correlates of the peridomestic abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Amazonian Brazil. *Med Vet Entomo* 8: 219-224.
- Quinnel RJ, Dye C, Shaw JJ 1992. Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. *Med Vet Entomo* 6: 195-200.
- Reece WO, Swenson MJ 2006. Composição e Funções do Sangue. In: Reece WO, *Fisiologia dos animais domésticos*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 24-48.
- Rezai HR, Ardehali S, Gettner S 1975. Anti-leishmania activity of normal animal sera. *Ann Trop Med Parasitol* 69: 29-33.
- Ribeiro JM 1987. *Ixodes dammini*: salivary anti-complement activity. *Exp Parasitol* 64: 347-353.
- Ribeiro JMC, Francischetti IMV 2003. Role of Arthropod Saliva in Blood Feeding: Sialome and Post-Sialome Perspectives. *Annu Rev Entomol* 48: 73-88.
- Rice CE 1950. The interchangeability of the complement components of different animal species. I. Literature survey. *Can J Comp Med* 14: 369-379.
- Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD 2010. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 11: 785-797.

- Robertshaw D 2006. Regulação da Temperatura e o Ambiente Térmico. In: Reece WO, *Fisiologia dos Animais Domésticos*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 897-908.
- Sacks D, Noben-Trauth N 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2: 845-858.
- Sant'Anna MRV, Jones NG, Hindley JA, Mendes-Sousa AF, Dillon RJ, Cavalcante RR, Alexander B, Bates PA 2008. Blood meal identification and parasite detection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. *Acta Trop* 107: 230-237.
- Sant'Anna MRV, Nascimento A, Alexander B, Dilger E, Cavalcante RR, Diaz-Albiter, Bates PA, Dillon RJ 2010. Chicken blood provides a suitable meal for the sand fly *Lutzomyia longipalpis* and does not inhibit *Leishmania* development in the gut. *Parasit Vectors* 3:3.
- Santos VC, Araujo RN, Machado LAD, Pereira MH, Gontijo NF 2008. The physiology of the midgut of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva 1912): pH in different physiological conditions and mechanisms involved in its control. *J Exp Biol* 211: 2792-2800.
- Santos VC, Nunes CA, Pereira MH, Gontijo NF 2011. Mechanisms of pH control in the midgut of *Lutzomyia longipalpis*: roles for ingested molecules and hormones. *J Exp Biol* 214: 1411-1418.
- Schmidt EMS, Locatelli-Dittrich R, Santin E, Paulillo AC 2007. Patologia clínica em aves de produção – Uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola – Revisão. *Arch Vet Sci* 12: 9-20.
- Schroeder H, Skelly P, Zipfel PF, Losson B, Vanderplasschen A 2009. Subversion of complement by hematophagous parasites. *Dev Comp Immunol* 33: 5-13.

- Sherlock I, 2003. A Importância dos flebotomíneos. In: Rangel EF e Lainson R, *Flebotomíneos do Brasil*, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 15-22.
- Sim RB, Laich A 2000. Serine proteases of the complement system. *Biochem Soc Trans* 28: 545-550.
- Soares RPP, Turco SJ 2003. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *An Acad Bras Cienc* 75: 301-330.
- Speth C, Prodinger WM, Würzner R, Stoiber H, Dierich MP 2008. Complement. In: Paul WE, *Fundamental immunology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 1047-1078.
- Teixeira C, Gomes R, Collin N, Reynoso D, Jochim R, Oliveira F, Seitz A, Elnaiem DE, Caldas A, de Souza AP, Brodskyn CI, de Oliveira CI, Mendonca I, Costa C.H, Volf P, Barral A, Kamhawi S, Valenzuela JG 2010. Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum chagasi* in Latin America. *Plos Neglected Tropical Diseases* 4: e638.
- Titus RG, Ribeiro JMC 1988. Salivary Gland Lysates from the Sand Fly *Lutzomyia longipalpis* Enhance *Leishmania* Infectivity. *Science* 239: 1306-1308.
- Travi BL, Jaramilho C, Montoya J, Segura I, Zea A, Gonçalves A, Velez ID 1994. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 50: 557-565.

Windberger U, Bartholovitsch A, Plasenzotti R, Korak KJ, Heinze G 2008. Whole blood viscosity, plasma viscosity and erythrocyte aggregation in nine mammalian species: reference values and comparison of data. *Exp Physiol* 88.3: 431-440.

Zilberstein D, Shapira M 1994. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* 48: 449-470.

