

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

**Investigação da ligação do Fator H de mamíferos ao
epitélio intestinal de *Lutzomyia longipalpis*
e à superfície de diferentes espécies de *Leishmania* do velho e novo mundo**

NATÁLIA ALVIM ARAÚJO SAAB

BELO HORIZONTE
MINAS GERAIS – BRASIL

2018

NATÁLIA ALVIM ARAÚJO SAAB

**Investigação da ligação do Fator H de mamíferos ao
epitélio intestinal de *Lutzomyia longipalpis*
e à superfície de diferentes espécies de *Leishmania* do velho e novo mundo**

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

Área de concentração: Entomologia

Orientador: Dr. NELDER DE FIGUEIREDO GONTIJO

Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos

Departamento de Parasitologia – ICB - UFMG

Fevereiro/2018

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

AGRADECIMENTOS

Após essa longa jornada finalmente chegamos ao final com muito crescimento pessoal e conhecimento adquirido! Agradeço primeiramente aos meus pais, Andréa Alvim Araújo e Faisal Saab, pois sem eles eu não estaria aqui hoje e, sem o apoio e o incentivo deles, eu não teria vencido várias etapas da vida. Ao meu irmão, Lucas Alvim, por me fazer ver tudo de uma perspectiva diferente a cada dia e aprender com isso.

Ao meu namorado Bruno Fehlberg pelo apoio praticamente incondicional a todas as minhas realizações e por ser um ser humano ótimo, que só acrescenta à minha vida todos os dias.

Ao meu orientador, Excelentíssimo Professor Nelder, pela confiança, paciência, ensinamentos e por ser o melhor orientador de todos.

Aos professores, técnicos e colegas do LFIH pela construção de um ambiente de trabalho excelente, com muita troca de conhecimento, muita ajuda e muito companheirismo. Aos que ajudaram de forma mais próxima, seja na bancada, nas conversas ou nas intempéries da pós graduação, sintam-se agradecidos de maneira mais especial ainda. Sem vocês no dia a dia dessa fase da minha vida, as coisas não seriam as mesmas.

À turma do Mestrado, pela convivência agradável e cooperação durante as disciplinas, especialmente à Sílvia, Zélia e Jéssica que se tornaram amigas pessoais.

Aos demais professores, técnicos, amigos e colegas do Departamento de Parasitologia da UFMG que tenham passado pelo meu caminho e contribuído de certa forma para meu crescimento como bióloga e parasitologista. Agradecimentos especiais à coordenação do Programa de Pós Graduação em Parasitologia e às melhores secretárias, Sumara Aparecida e Sibeles Abreu, sempre dispostas a ajudar.

Aos amigos de antes da universidade por muitas vezes se interessarem em assuntos acadêmicos mesmo sem ter ideia do que se trata. Aos amigos da biologia e todos os agregados que chegaram à minha vida nos últimos anos, vocês são incríveis, brilhantes e maravilhosos!

Às agências de fomento que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho. E a todos que não se encaixam em nenhuma das categorias acima, mas tiveram seu papel no desenvolvimento dessa dissertação.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

O sistema complemento é um dos mecanismos do sistema imune presente no sangue dos vertebrados voltado ao combate de agentes estranhos ao organismo, capaz de reconhecer, se ligar e eliminar tais agressores. Sua ativação envolve cascatas proteolíticas que podem ser iniciadas de três formas diferentes (via clássica, via das lectinas e via alternativa) e podem culminar em danos ao trato digestivo das fêmeas dos flebotomíneos e na lise de protozoários que sejam identificados como estranhos. Um dos mecanismos para evasão do sistema do complemento é a ligação ao Fator H do plasma inibindo a via alternativa do complemento. Este mecanismo já foi descrito em diversos patógenos. Recentemente foi detectado em mosquitos do gênero *Anopheles* e pelo nosso grupo de pesquisa em protozoários da espécie *Leishmania infantum* desafiados com soro humano. Uma vez que os flebotomíneos realizam a hematofagia em diferentes hospedeiros e são capazes de transmitir protozoários do gênero *Leishmania* a esses diversos vertebrados, se torna insuficiente que a maioria dos estudos seja realizada apenas com o enfoque no hospedeiro humano. Deste modo, o objetivo desse estudo foi investigar a capacidade de ligação do FH do soro humano, de cão e de rato ao epitélio do intestino médio de flebotomíneos *Lutzomyia longipalpis* e à superfície de protozoários do gênero *Leishmania*. Para isso intestinos desses insetos e formas promastigotas dos protozoários foram incubados no soro dos diferentes mamíferos e ensaiados através da metodologia ELISA. Os resultados mostram que o FH presente no soro humano, de cão e de rato é capaz de se ligar à superfície interna do intestino médio de *L. longipalpis*. Apenas o FH humano se ligou de maneira significativa à superfície de *L. infantum*, porém é notável a existência de uma tendência de ligação do FH de cão e rato às leishmanias. Ao analisarmos a ligação do FH humano, de cão e rato à superfície de outras espécies de *Leishmania*, também notamos uma tendência de ligação em alguns grupos, entretanto os resultados ainda são preliminares. Além disso, o presente trabalho foi precursor nas investigações sobre a ativação da via clássica do complemento no intestino médio dos flebotomíneos. Através da mesma metodologia de ELISA verificou-se a ligação de anticorpos IgG e da molécula C1 ao epitélio intestinal de *L. longipalpis*. Não houve deposição de IgG nesse epitélio entretanto a ligação do C1 presente no soro humano, de cão e de rato foi confirmada, indicando uma maneira pela qual a via clássica pode estar sendo disparada na superfície celular do trato digestivo dos insetos.

ABSTRACT

Complement is an immune system element that acts against foreign intruders by recognizing, binding and eliminating them. It can be triggered through different pathways that promote lysis of foreign microorganisms and can harm the hematophagous digestive system, as *Leishmania* and sandflies. Complement system can be evaded by capturing Factor H from plasma resulting in the inhibition of the alternative pathway. This is a mechanism established in several pathogens. Recently, it was detected in *Anopheles* mosquitoes and by our research group in *Leishmania infantum* assayed with human serum. Since phlebotomines feed on distinct hosts and are able to transmit *Leishmania* to these vertebrates, it's not sufficient that the majority of researches are developed only on human. Thereby, our studies purpose was to investigate the capacity of humans, dogs and rats Factor H to bind in phlebotomines *Lutzomyia longipalpis* midgut epithelium as immune complement system evasion mechanism. Sandflies midguts and *Leishmania* promastigotes were incubated in those mammalians serum and analysed using ELISA methodology. Our results show that humans, dogs and rats FH is able to bind to *L. longipalpis* midgut epithelium. Only humans FH binds to *L. infantum* cellular surface. Other *Leishmania* species were analysed but the results are preliminary. The present work also explored aspects about complement classic pathway activation inside sandflies midgut. Through the same ELISA methodology we verified the possibility of IgG antibodies and C1 protein binding to *L. longipalpis* midgut epithelium. No IgG binding was detected but C1 molecule from humans, dogs and rats indeed binds to sandflies midgut epithelium. Besides scientific value, this research enables the development of novel sandflies control strategies and contributes to a greater knowledge of the blood feeding mechanisms which are pivotal to sandflies reproductive and vectorial capacity.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	<i>Lutzomyia longipalpis</i> macho (A) e fêmea (B)	1
FIGURA 2	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> no inseto vetor e no hospedeiro vertebrado	4
FIGURA 3	Status de endemidade da LC no mundo, 2015	7
FIGURA 4	Status de endemidade da LV no mundo, 2015	8
FIGURA 5	Representação esquemática das vias de ativação do sistema complemento e seus mecanismos efetores	11
FIGURA 6	Interação entre Fator H e vários patógenos com indicação do domínio da proteína ao qual o organismo se liga	16
FIGURA 7	Porcentagem de hemólise da via alternativa de humano (A), cão (B) e rato (C) na presença de diferentes concentrações (1, 2, 4 e 8 intestinos) de CI de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	31
FIGURA 8	Reação entre anticorpos humanos anti C1q (A) e anti FH (B) frente aos soros de humano, cão e rato	32
FIGURA 9	Ligação de Fator H humano (A), de cão (B) e de rato (C) no epitélio intestinal de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	33
FIGURA 10	Ligação de Fator H presente no soro humano (SHN), de cão (SCN) e de rato (SRN), e de Fator H humano purificado na superfície de <i>Leishmania infantum</i>	34
FIGURA 11	Ligação de Fator H presente no soro humano (SHN), de cão (SCN) e de rato (SRN), e de Fator H humano purificado na superfície de espécies de <i>Leishmania</i>	36
FIGURA 12	Ausência da deposição de anticorpos presentes no soro humanos da classe IgG no epitélio intestinal de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	37
FIGURA 13	Ligação de C1 humano (A), de cão (B) e de rato (C) no epitélio intestinal de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	38

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Espécies do gênero <i>Leishmania</i> segundo subgênero, distribuição geográfica e de acordo com Lainson e Shaw (1987, revisado em 2010) e Organização Mundial de Saúde (revisado em 2010)	6
TABELA 2	Artrópodes hematófagos e a atividade inibidora do sistema do complemento	18

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS: Síndrome da imunodeficiência adquirida

CI: Conteúdo intestinal

DAF: Fator de aceleração de decaimento

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGTA: Ácido etilenoglicol tetra-acético

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática

FB: Fator B

FH: Fator H

FI: Fator I

IgG: Imunoglobulina tipo G

IgM: Imunoglobulina tipo M

LPG: Lipofosfoglicano

LT: Leishmaniose tegumentar

LTA: Leishmaniose tegumentar americana

LV: Leishmaniose visceral

LVA: Leishmaniose visceral americana

MAC: Complexo de ataque à membrana

MASPs: Serino proteases associadas à MBL

MBL: Lectina ligante da manose

OMS: Organização Mundial de Saúde

PAMPs: Padrões moleculares de reconhecimento de patógenos

PBS: Tampão fosfato salino

PCR: reação em cadeia da polimerase

pH: Potencial hidrogenionico

PRRs: Receptores de reconhecimento padrão

PMSF: Fenilmetilsulfonil fluorido

RFLP: Polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição

RPM: Rotações por minuto

SCN: Soro de cão normal

SHN: Soro humano normal

SRN: Soro de rato normal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Biologia e Aspectos Vetoriais dos Flebotomíneos	1
1.2 <i>Leishmania</i> e Leishmanioses	3
1.3 O Sistema do Complemento	10
1.4 Fator H	14
1.5 Inibição do Complemento por Artrópodes Hematófagos	17
2. JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo Geral	23
3.2 Objetivos Específicos	23
4. METODOLOGIA	24
4.1 Criação dos insetos	24
4.2 Obtenção do conteúdo intestinal de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	24
4.3 Obtenção dos intestinos médios de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	24
4.4 Obtenção dos soros	25
4.5 Cultivo dos parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	25
4.6 Investigação da influência do conteúdo intestinal de <i>Lutzomyia longipalpis</i> sobre a atividade lítica da via alternativa do complemento de humanos, cães e ratos	26
4.7 Investigação da reação cruzada entre anticorpos anti C1q e anti FH humanos e moléculas de C1q e FH de cães e ratos	27

4.8 Investigação da capacidade de ligação do FH do soro de humanos, cães e ratos ao epitélio do intestino médio de <i>Lutzomyia longipalpis</i> utilizando o anticorpo anti-FH	28
4.9 Investigação da capacidade de ligação do FH do soro de humanos, cães e ratos � superfície de parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	28
4.10 Investigação da ligação de anticorpos humanos naturais da classe IgG ao epitélio intestinal de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	29
4.11 Investigação da capacidade de ligação do C1 do soro de humanos, cães e ratos ao epitélio do intestino médio de <i>Lutzomyia longipalpis</i> utilizando o anticorpo anti C1q humano	30
4.12 Análises estatísticas	30
5. RESULTADOS	31
5.1 Influência do conteúdo intestinal de <i>Lutzomyia longipalpis</i> sobre a atividade lítica da via alternativa do complemento humano, de cão e de rato	31
5.2 Investigação da reação cruzada entre anticorpos anti C1q e anti FH humanos e seus respectivos fatores de cão e de rato	32
5.3 Ligação do FH do soro humano, de cão e de rato ao epitélio do intestino médio de <i>Lutzomyia longipalpis</i> utilizando o anticorpo anti-FH humano	33
5.4 Ligação do FH do soro humano, de cão e rato a parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	34
5.5 Ligação de anticorpos humanos naturais da classe IgG ao epitélio intestinal de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	37
5.6 Ligação do C1 do soro humano, de cão e de rato ao epitélio do intestino médio de <i>Lutzomyia longipalpis</i> utilizando o anticorpo anti C1q humano	38
6. DISCUSSÃO	39
6.1 Interação entre o FH e o epitélio do intestino médio de <i>Lutzomyia longipalpis</i> e a superfície de parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	39
6.2 Ligação do componente C1 ao epitélio intestinal de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	44

7. CONCLUSÃO **46**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **47**

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biologia e Aspectos Vetoriais dos Flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos dípteros pertencentes à subordem Nematocera e à família Psychodidae (Young & Ducan, 1994). Na subfamília Phlebotominae, estão incluídos dentre outros flebotomíneos, os insetos de importância médica e veterinária. Trata-se de insetos com tamanho reduzido, entre 2 e 4 mm de comprimento, corpo densamente coberto por cerdas, pernas compridas e esbeltas e quando em repouso, as asas lanceoladas encontram-se semieretas (Killick-Kendrick, 1999). A cabeça forma um ângulo de 90° com o tórax e apresentam dimorfismo sexual, podendo ser diferenciados pela extremidade posterior do abdome (FIGURA 1). Os flebotomíneos são holometábolos, apresentando um ciclo de vida que inclui as fases ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto (Sherlock, 2003).



FIGURA 1: *Lutzomyia longipalpis* macho (A) e fêmea (B). Foto: Nelder de Figueiredo Gontijo.

As formas imaturas desses insetos vivem em solo úmido e rico em matéria orgânica de origem vegetal em decomposição, da qual as larvas se alimentam. Os criadouros são variados (por exemplo: detritos de rochas, forquilhas de árvores, tocas de animais) e difíceis de localizar, impossibilitando a aplicação de métodos de controle efetivos das formas imaturas. As larvas possuem até 5mm, grande mobilidade, são claras, vermiformes, com capa cefálica escura e esclerotizada. Antes de se alimentar, as larvas excretam todo o conteúdo intestinal e procuram locais menos úmidos, se fixando ao substrato pela extremidade posterior (Young & Ducan, 1994). A emergência dos adultos ocorre entre 7 e 21 dias depois. O ciclo de vida dos

flebotomíneos tem duração aproximada de 40 dias, podendo variar dependendo das condições de criação.

Os adultos machos e fêmeas se alimentam de substâncias açucaradas tais como seiva de plantas, néctar de flores e secreções de afídeos (Molyneux et al., 1991). Apenas as fêmeas exercem a hematofagia, fundamental à ovogênese (Soares & Turco, 2003). As fêmeas alimentam-se principalmente durante o período crepuscular e noturno e são atraídas às residências pelo fototropismo positivo (Killick-Kendrick, 1999; Sharma & Singh, 2008). Algumas espécies possuem um alto grau de antropofilia e endofilia, enquanto que outras são ecléticas quanto aos vertebrados dos quais se alimentam e exofílicas.

Os flebotomíneos possuem peças bucais curtas e rígidas, não canulando vasos sanguíneos como fazem várias espécies de insetos hematófagos que possuem peças bucais mais longas e flexíveis. Ao realizarem a hematofagia, as fêmeas desses insetos dilaceram a pele do vertebrado e formam um pequeno poço subcutâneo contendo sangue e restos de tecido, que são então ingeridos pelo inseto. Esse processo, a telmofagia, é fundamental à capacidade vetorial dos flebotomíneos em relação à transmissão dos protozoários do gênero *Leishmania*, uma vez que as formas amastigotas presentes nos vertebrados raramente são encontradas em macrófagos circulantes no sangue, mas, normalmente se alojam em macrófagos da pele (Bates, 2007).

O órgão responsável pelo armazenamento e digestão do sangue ingerido é o intestino médio dos insetos, constituinte da maior parte do tubo digestivo dos mesmos. O intestino médio possui um epitélio composto de uma monocamada de células colunares cilíndricas densamente cobertas por microvilosidades voltadas para o lúmen intestinal. Estas células estão ativamente envolvidas na produção e secreção de enzimas, bem como na absorção de nutrientes (Billingsley & Lehane, 1996) e se apoiam numa lâmina basal fina, que separa o tubo digestivo da hemocele do inseto (Rudin & Hercker 1982). A ingestão de sangue por fêmeas de flebotomíneos induz respostas fisiológicas no intestino médio do inseto, incluindo a produção de uma matriz peritrófica, secreção de enzimas digestivas e diurese. Essa matriz leva cerca de 4 horas até que envolva completamente o bolo alimentar e é a primeira barreira física de proteção do epitélio intestinal em relação ao sangue do hospedeiro vertebrado ingerido e contra microrganismos, entretanto (Kamhawi, 2006).

Esses insetos estão distribuídos por quase todas as regiões do mundo, sendo encontrados sob as mais diversas condições climáticas e de altitude, em ambientes

silvestres, rurais e urbanos. São representados por mais de 800 espécies, das quais muitas são importantes devido a sua capacidade vetorial (Young & Duncan, 1994). A distribuição geográfica das espécies de flebotomíneos é influenciada por diversos fatores abióticos como barreiras físicas, precipitação pluviométrica, vegetação e luminosidade (Arias et al., 1985). Entretanto, a presença de animais domésticos no peridomicílio, principalmente cães e galinhas, tem papel fundamental na epidemiologia das leishmanioses, pois possibilita a concentração de um grande número de flebotomíneos nesse ambiente (Teodoro et al. 2001, 2007).

As espécies de flebotomíneos realizam picadas dolorosas e causadoras de reações alérgicas, e podem transmitir patógenos como a bactéria *Bartonella*, numerosos arbovírus e, principalmente, grande variedade de protozoários do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), agentes etiológicos das leishmanioses (Sherlock, 2003). No Novo Mundo a subfamília Phlebotominae é composta pelos gêneros *Lutzomyia* França, 1924, *Brumptomyia* França & Parrot, 1921 e *Warileyia* Hertig, 1940. No Velho Mundo são conhecidos os gêneros *Phlebotomus* Rondani & Berté, 1840, *Sergentomyia* França & Parrot, 1920 e *Chinius* Leng, 1987. Os flebotomíneos importantes como vetores das leishmanioses estão compreendidos nos gêneros *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (Young & Duncan, 1994).

1.2 *Leishmania* e Leishmanioses

Os parasitos transmitidos pelos flebotomíneos pertencem ao gênero *Leishmania*, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. O gênero é subdividido em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, baseado no desenvolvimento dos parasitos no interior do aparelho digestório do inseto vetor. As espécies do subgênero *Leishmania* se encontram restritas ao trato digestório médio e anterior, enquanto que o desenvolvimento das espécies do subgênero *Viannia* apresenta uma fase que se passa no intestino posterior (Lainson et al., 1979; Lainson & Shaw, 1987; Lainson, 2010).

Esses protozoários possuem dois estágios distintos de desenvolvimento, as amastigotas e promastigotas, alternando entre os hospedeiros vertebrado e invertebrado, respectivamente. Ao se alimentar do sangue de vertebrados, os flebotomíneos infectados regurgitam as formas promastigotas metacíclicas do parasito, juntamente com saliva e uma matriz gelatinosa de proteoglicanos (Rogers et al., 2002, 2004). Essas formas são

internalizadas por células do sistema monocítico fagocitário, inicialmente por neutrófilos (Peters et al., 2008) seguidos por macrófagos. Tornam-se então amastigotas ovoides, com aproximadamente 2,5 a 5 μm de diâmetro, flagelo não exteriorizado e se multiplicam dentro do fagolisossomo (Peter & Sacks, 2009). Na célula hospedeira ocorre multiplicação intensa por divisão binária dos parasitos e de alguma maneira ainda não elucidada pela literatura, as amastigotas infectam outros macrófagos, reiniciando o processo de infecção das células do hospedeiro vertebrado (FIGURA 2).

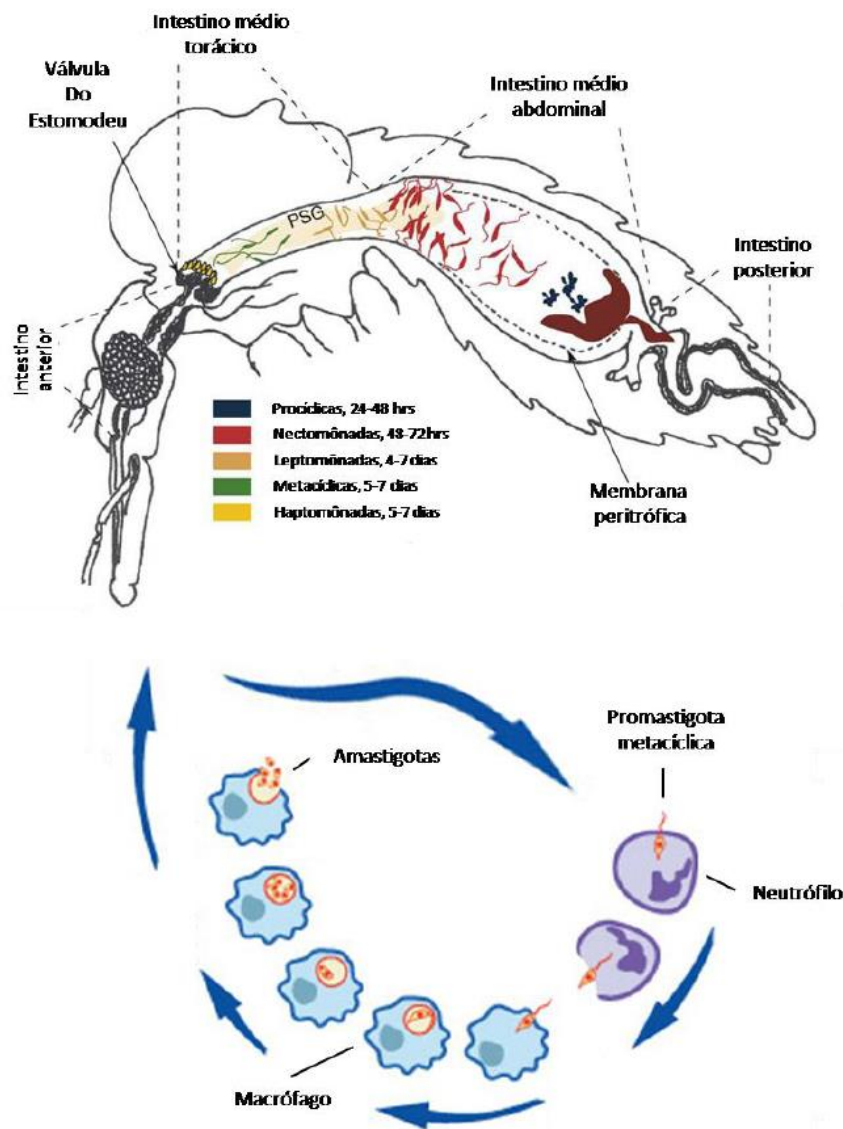


FIGURA 2: Ciclo biológico de *Leishmania* no inseto vetor e no hospedeiro vertebrado. Adaptado de Kamhawi et al. 2006.

No trato digestivo dos flebotomíneos, as formas amastigotas ingeridas se diferenciam em formas promastigotas flageladas, alongadas, medindo entre 14 e 20 μm cujo desenvolvimento culmina com o aparecimento das promastigotas metacíclicas,

infectantes para os vertebrados. Esse processo, a metaciclogênese, é estimulado pela alteração das condições do ambiente em que o parasito se encontra como diminuição da temperatura e elevação do pH, e se inicia após o término da digestão sanguínea. As leishmanias se diferenciam na medida em que migram do intestino médio abdominal para a válvula do estomodeu, na porção anterior do aparelho digestório do inseto. Cada uma das fases (promastigota procíclica, nectomonodas, leptomonodas, e metacíclicas) possui características morfológicas próprias e alterações funcionais que visam garantir sua sobrevivência no vetor. As promastigotas metacíclicas são transmitidas a outro hospedeiro durante o repasto sanguíneo, completando o ciclo biológico do protozoário (Kamhawi, 2006; Bates, 2007; Dostálová & Volf, 2012) (FIGURA 2).

Nos vertebrados, os protozoários do gênero *Leishmania* são os agentes etiológicos das leishmanioses. As leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias que podem ser de caráter antroponótico, zoonótico ou antropozoonótico. Apresentam sintomatologia variável de acordo com a espécie e cepa do parasito e com fatores relacionados ao hospedeiro vertebrado como condições sociais precárias, estado nutricional, idade e estado imunológico. Acometem uma ampla gama de hospedeiros vertebrados mamíferos: canídeos, roedores, edentados (tatu, preguiça, tamanduá), marsupiais (gambás), primatas não humanos e o homem (Brasil, 2007), e podem se manifestar principalmente sob as formas clínicas: cutânea e mucocutânea (Leishmaniose Tegumentar), e visceral (Leishmaniose Visceral) (Dantas-Torres, 2007).

As leishmanioses estão entre as doenças negligenciadas mais importantes devido a suas altas taxas de prevalência e ampla distribuição geográfica mundial. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, estima-se que ocorram entre 900.000 e 1.3 milhões de novos casos de leishmaniose e cerca de 20.000 mortes anualmente no mundo. Em 2015 cerca de 200.000 novos casos de leishmaniose cutânea e 25.000 novos casos de leishmaniose visceral foram reportados à OMS. As leishmanioses são endêmicas em 97 países, constituindo um problema de saúde pública em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Mais de um bilhão de pessoas vivem nessas áreas sob risco de contrair uma infecção e estima-se que mais de 12 milhões de pessoas encontram-se atualmente infectadas no mundo (OMS, 2017).

As leishmanioses estão presentes em todas as regiões do Brasil. Cerca de 3.000 casos de leishmaniose visceral (LV) e 28.000 casos de leishmaniose tegumentar (LT) são relatados por ano no país (Brasil, 2011), sendo a LV mais prevalente na região Nordeste e a LT mais prevalente na região Norte (Lindoso & Lindoso, 2009).

O gênero *Leishmania* compreende aproximadamente 30 espécies, das quais cerca de 20 são patogênicas para a espécie humana (Lainson & Shaw, 1998; Ashford, 2000; Desjeux, 2004; Ready, 2013). A LV, causada pela *Leishmania donovani* no Velho Mundo e *Leishmania infantum* tanto no Velho como no Novo Mundo, é a forma mais grave, comumente fatal quando não tratada. Por outro lado, as LT, cutânea (forma mais recorrente) e mucocutânea, são causadas por uma gama de espécies de *Leishmania*, sendo responsáveis por grande morbidade nos focos endêmicos da doença (Gramiccia & Gradoni, 2005) (TABELA 1)

TABELA 1: Espécies do gênero *Leishmania* segundo subgênero, distribuição geográfica e de acordo com Lainson e Shaw (1987, revisado em 2010) e Organização Mundial de Saúde (revisado em 2010). Adaptado de Neves et al. 2016.

	Subgênero	
	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Velho Mundo	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum infantum</i> <i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. killicki</i> ^a <i>L. gerbelli</i> ** <i>L. aethiopica</i>	
Novo mundo	<i>L. infantum chagasi</i> * <i>L. mexicana</i> <i>L. pifanoi</i> ^a <i>L. venezuelensis</i> <i>L. garnhami</i> ^a <i>L. amazonensis</i> * <i>L. enrietti</i> ** <i>L. aristidesi</i> ** <i>L. hertigi</i> ** ^b <i>L. deanei</i> ** ^b <i>L. forattinii</i>	<i>L. braziliensis</i> * <i>L. guyanensis</i> * <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i> * <i>L. naiffi</i> * <i>L. lainsoni</i> * <i>L. lindenbergi</i> * <i>L. peruviana</i> <i>L. colombiensis</i> ^b <i>L. equatorensis</i> ** ^b <i>L. utingensis</i> **

Em negrito espécies relatadas em infecções humanas. *Espécies encontradas parasitando humanos no Brasil. **Espécies exclusivamente de animais. ^aEspécies sob discussão. ^bPosição taxonômica sob discussão.

Na LT, a forma mais comum é a forma cutânea, com incidência anual de novos casos variando entre 0.7 a 1.3 milhões no mundo (Alvar et al., 2012). No homem as

formas clínicas de LT, chamada nas Américas genericamente de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), incluem desde quadros assintomáticos, formas tegumentares de gravidade variável, que podem se apresentar como uma simples lesão cutânea até forma cutaneomucosa, que causa desfiguração grave (Gontijo & Carvalho, 2003). A maioria dos casos de LT ocorre nas Américas, Bacia do Mediterrâneo, Ásia Central e Oriente Médio. Grande parte dos casos da doença está associada à desnutrição, deslocamento populacional, condições precárias de habitação, sistema imunológico debilitado e falta de recursos (OMS, 2017) (FIGURA 3).

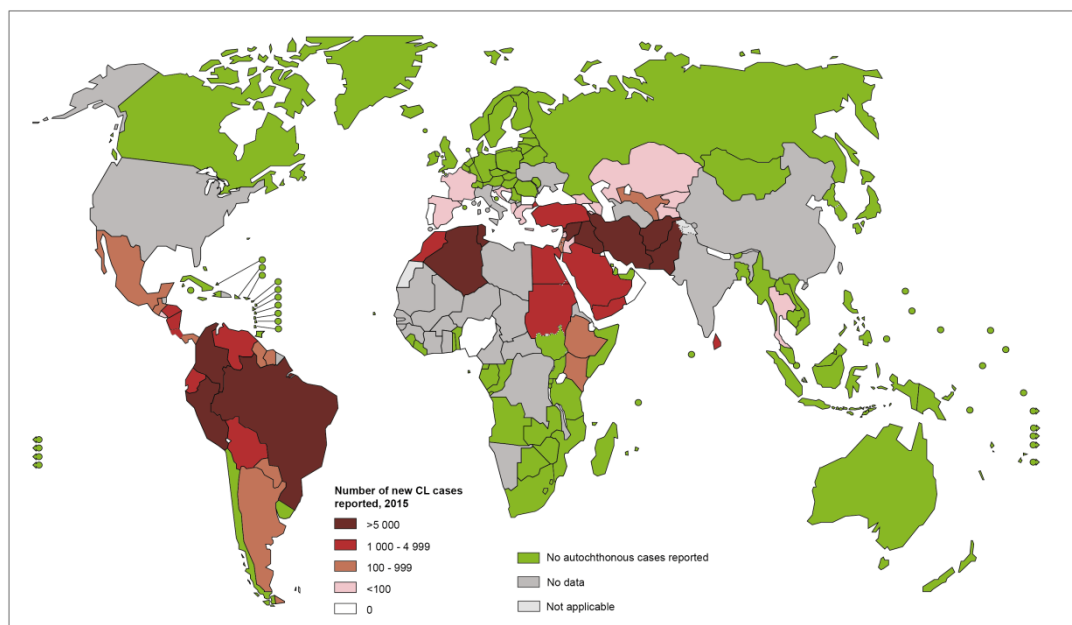


FIGURA 3: Status de endemicidade da LC no mundo, 2015. Fonte: OMS, 2017 http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leish_CL_2015_rev.png

A LTA é tradicionalmente uma zoonose, com o homem sendo infectado após se encontrar exposto aos ciclos de transmissão silvestre. O crescente número de casos humanos nas Américas demonstra uma mudança nesse padrão epidemiológico, causada principalmente pela urbanização e alteração do ecossistema onde a transmissão ocorre (Desjeux, 2001).

No Brasil, a doença já era uma endemia na região amazônica no início do século XIX, e se difundiu para as regiões Norte e Nordeste do país, por meio de migrações humanas, iniciadas com o ciclo da borracha (Vale & Furtado, 2005). No início do século XX, essa protozoose, passou a apresentar grande impacto médico e social, devido à abertura de estradas e de áreas de colonização agrícola, onde os trabalhadores

ficavam expostos à infecção, devido ao contato com ambientes naturais, antes inalterados, onde existiam os reservatórios e vetores das diferentes espécies.

Na última década casos de LTA foram detectados em todos os estados do Brasil. A doença ganhou importância em saúde pública no país, sendo observada em áreas intradomiciliares ou no peridomicílio, especialmente na região Nordeste, onde fatores socioeconômicos, como condições de habitação, pobreza, processo de migração e falta de saneamento básico, têm contribuído para esta situação (Costa, 2005; Brasil, 2006; Brasil, 2007). Este aumento pode ser explicado, em parte, pela melhoria no diagnóstico e na notificação dos casos, mas também pelo controle inadequado do inseto vetor, aumento da detecção de LTA associada a infecções oportunistas (como exemplo a AIDS) e o aparecimento de resistência aos medicamentos utilizados no tratamento das leishmanioses (Reithinger et al., 2007).

Por outro lado, a LV é uma doença negligenciada endêmica em aproximadamente 88 países, sendo encontrada na Ásia, Europa, Oriente Médio, África, e nas Américas (OMS, 2017) (FIGURA 4). Nas Américas, a doença é também chamada de leishmaniose visceral americana (LVA) ou calazar (Brasil, 2003). A LVA é uma zoonose de evolução crônica de grande importância epidemiológica nas Américas, sobretudo no Brasil, devido a sua alta incidência, ampla distribuição, podendo apresentar formas graves que levam a morte, se não tratadas adequadamente (Gontijo & Melo, 2004).

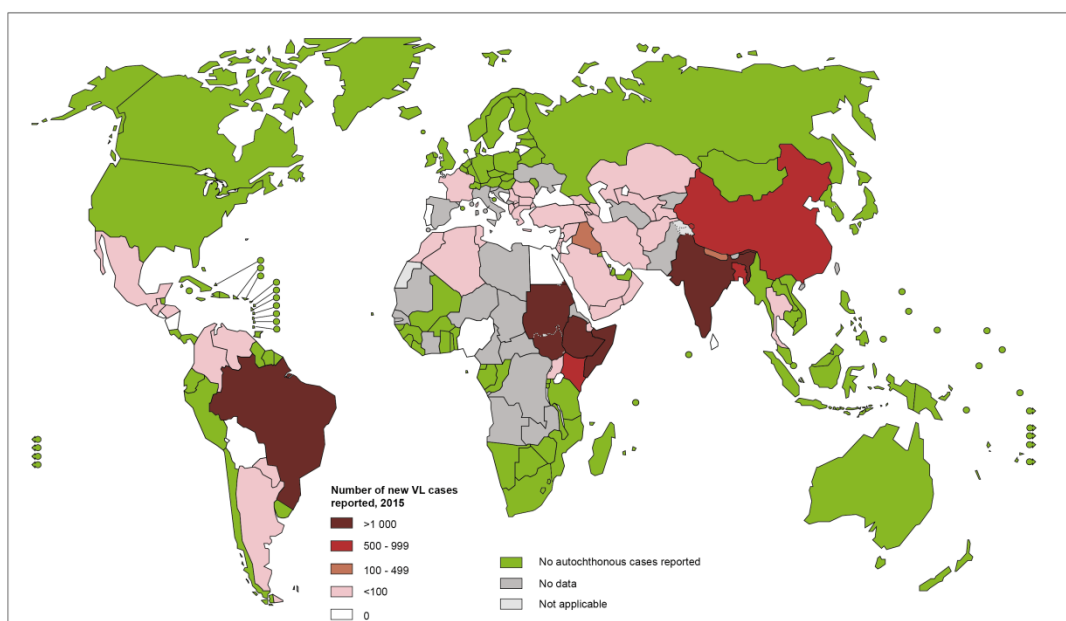


FIGURA 4: Status de endemidade da LV no mundo, 2015. Fonte: OMS, 2017 http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leish_CL_2015_rev.png

A LVA é uma zoonose, que acomete predominantemente canídeos e humanos. Flebotomíneos da espécie *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) são os principais transmissores da *Leishmania (Leishmania) infantum* (sinonímia *L. (L.) chagasi*), agente etiológico da LVA e podem ser encontrados desde o sul do México até o norte da Argentina (Young & Duncan, 1994; Willians, 1989).

Esses insetos são primariamente silvestres, mas demonstram grande capacidade em adaptar-se a vários ambientes como o peridomicílio e o intradomicílio, encontrando diferentes fontes para a realização do repasto sanguíneo e facilitando a transmissão da doença (Barata et al., 2005). Além disso, é considerada uma espécie oportunista quanto à fonte de sangue da qual as fêmeas se alimentam, realizando a hematofagia em diversos hospedeiros, favorecendo a transmissão da *L. infantum* entre os animais e entre os animais e os seres humanos (Quinnel et al., 1992; Dias et al., 2003; Oliveira et al., 2008).

Nas duas últimas décadas, a LV reapareceu no mundo de forma preocupante. De acordo com o Ministério da Saúde, em 2015 no Brasil, foram confirmados casos de LVA em 21 unidades da federação e no Distrito Federal, atingindo as cinco regiões brasileiras. Epidemias urbanas foram observadas em várias cidades e a doença tem sido verificada como infecção oportunista em pacientes com AIDS, à semelhança do que se observa no sul da Europa. Apesar dos esforços no controle de vetores e reservatórios, a LVA se encontra em rápida expansão territorial, acometendo indivíduos de diferentes grupos de idades (MS, 2009 2011 2017).

Os canídeos domésticos são o principal reservatório do parasito devido ao alto parasitismo cutâneo, maior índice de infecção natural quando comparados aos humanos e à proximidade em que vivem com os humanos em relação a outros reservatórios silvestres (Evans et al., 1992; Dantas-Torres, 2007; Gomes et al., 2007). Presume-se que a maioria dos cães em áreas altamente endêmicas esteja exposta à infecção por *Leishmania* (Baneth & Aroch, 2008). Nestas regiões, a proporção de cães infectados é muito alta, podendo chegar a 80% (Berrahal et al., 1996), porém o espectro da infecção é bastante variável. Enquanto os cães mostrando doença progressiva, representam menos da metade dos cães soropositivos (Fisa et al. 1999), a maioria deles são assintomáticos ou apresentam sinais clínicos leves, sendo ainda assim reservatórios do parasito (Carrillo & Moreno, 2009). Apesar do medicamento Milteforan (cujo registro e comercialização no Brasil foram liberados em 2016) apresentar resultados promissores, não há garantia de cura.

Estima-se que pelo menos 2,5 milhões de cães estejam infectados no sudoeste europeu. Na América do Sul o número de cães infectados também é estimado em milhões, existindo altos níveis de infecção na Venezuela e no Brasil, condição intimamente relacionada ao elevado risco de doença humana nesses locais (Baneth et al., 2008).

Certas espécies de raposas e marsupiais são consideradas reservatórios secundários e/ou silvestres da *L. infantum*, sendo importantes na manutenção do ciclo enzoótico do parasito. Também existem evidências de infecções naturais em roedores domésticos e selvagens. Embora a relevância desses animais como reservatórios ainda não esteja estabelecida, o comportamento sinantrópico desses vertebrados poderia favorecer a transmissão intradomiciliar da doença (Travi et al., 1994; Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006; Marcelino et al., 2011; Quaresma et al., 2011).

As galinhas domésticas também apresentam papel relevante na epidemiologia da LVA, uma vez que a criação destas aves no peridomicílio é frequentemente citada como fator de risco em áreas endêmicas, pois está associada ao aumento do número de flebotomíneos no local (Caldas et al., 2002; Moreira et al., 2003). Apesar de serem refratárias ao parasito, eliminando-o em seu organismo, essas aves atuam como fonte alimentar para os flebotomíneos devido a hábitos e características físicas das mesmas. (Alexander et al., 2002).

Nesse contexto é evidente que os flebotomíneos estão sujeitos a uma gama de moléculas e mecanismos dos hospedeiros nos quais realizam a hematofagia como componentes do sistema imune dos animais que poderiam causar danos ao trato digestivo das fêmeas desses insetos. Dentre os fatores potencialmente prejudiciais destaca-se o sistema do complemento, presente no sangue dos vertebrados.

1.3 O Sistema do Complemento

O sistema imunológico dos seres vivos é constituído por diversos processos bioquímicos interativos que possibilitam a detecção e combate de patógenos que ameaçam a saúde de seus hospedeiros, dentre outras funções. O sistema complemento é um dos principais mecanismos efetores da imunidade humoral e é também um importante mecanismo efetor da imunidade inata dos vertebrados. A estrutura do sistema parece ter surgido primeiramente em deuterostômios invertebrados, mas se tornou uma cascata interligada e eficiente durante a evolução dos vertebrados. Consiste

na atividade e interação de cerca de 30 proteínas séricas e de superfície celular de maneira altamente regulada, agindo como um importante sistema de vigilância que discrimina células e tecidos saudáveis de um organismo de detritos celulares, células apoptóticas e organismos invasores, promovendo a sua opsonização, fagocitose ou lise celular (Nonaka & Yoshizaki, 2004; Ricklin et al., 2010).

A ativação do sistema complemento envolve cascatas proteolíticas (FIGURA 5), ocorrendo por meio de três vias diferentes nas quais ocorrem clivagens proteolíticas sucessivas de alguns de seus componentes: as vias clássica, das lectinas e alternativa (Dunkelberger & Song, 2010). As cascatas enzimáticas culminam na formação do complexo de ataque à membrana (MAC) responsável pela lise celular (Sim & Dodds, 1997). Além de agir diretamente em microrganismos, o sistema complemento tem um papel importante no sistema imune adaptativo, contribuindo para o processamento e internalização de antígenos, tornando a resposta humoral muito mais eficiente (Ricklin et al., 2010).

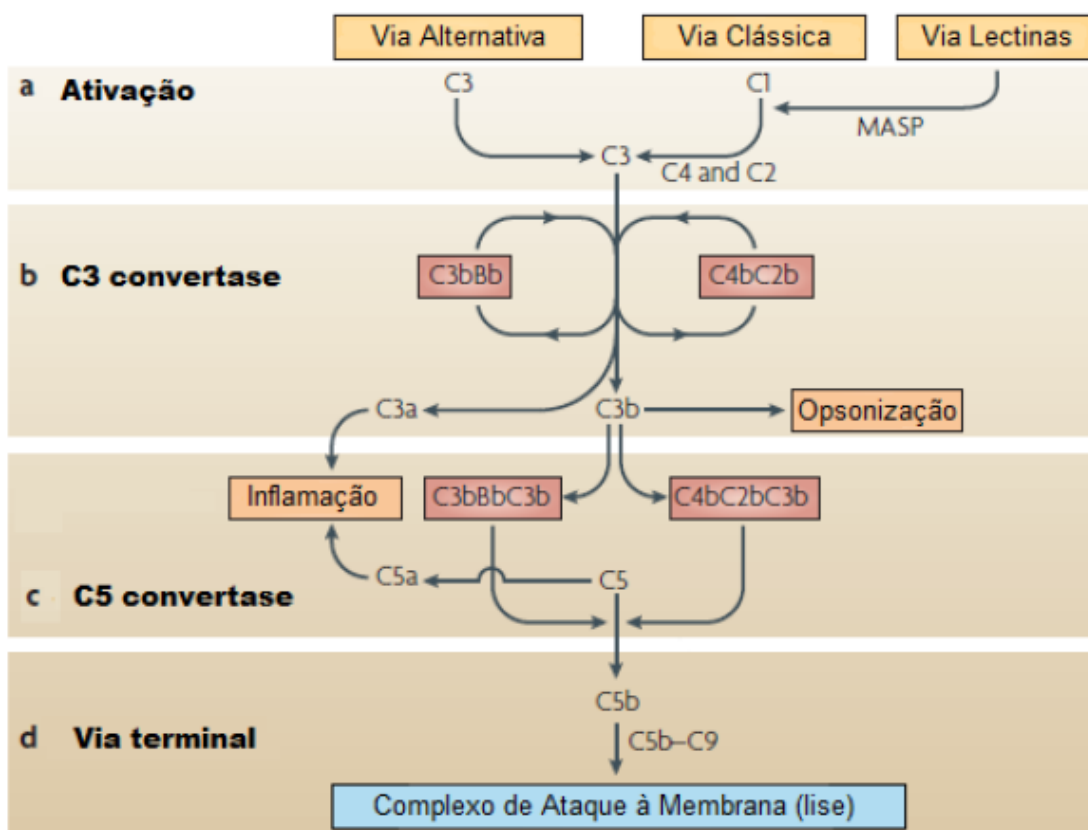


FIGURA 5: Representação esquemática das vias de ativação do sistema complemento e seus mecanismos efetores. Adaptado de Zipfel & Skerka, 2009.

A via clássica é ativada principalmente pela ligação do componente C1 a imunocomplexos com anticorpos do tipo IgM ou IgG, contudo deve-se considerar que a ativação também pode ocorrer através do reconhecimento direto de estruturas dos microrganismos ou de células apoptóticas pelo complexo C1. O grande complexo proteico denominado C1 é formado pela associação entre uma molécula de C1q, duas de C1r e duas de C1s, que é dependente de Ca^{+2} . (Sim & Dodds, 1997). Quando o C1q se liga a uma substância ativadora da via clássica, principalmente a região Fc de anticorpos, o C1r se torna ativo devido a uma mudança conformacional nessa molécula, promovendo a hidrólise de C1s, que após ser clivada também irá possuir atividade de serino-protease (Gaboriaud et al., 2004). O C1s ativado hidrolisa então os componentes C4 e C2, formando fragmentos maiores (C4b, C2a) e menores (C4a e C2b). Os fragmentos maiores associaram-se para formar o complexo C4bC2a na superfície do patógeno, a C3 convertase da via clássica. Essa convertase possui atividade de serino-protease uma vez que o fator C2a presente é capaz de clivar e ativar o C3 solúvel na presença de íons Mg^{+2} , gerando a anafilotoxina C3a e a opsonina C3b. O complexo C4bC2a pode gerar inúmeras moléculas de C3b que irão se depositar na superfície do agente patogênico, opsonizando esse microrganismo e favorecendo a sua ingestão por fagócitos. Quando uma molécula de C3b se liga próximo ao C4b presente no complexo, forma-se então a C5 convertase da via clássica (C4bC2aC3b). O C4b e o C3b desse novo complexo se ligam ao C5 solúvel no plasma e orientam esse componente para ser clivado por C2a e posterior deposição do C5b e liberação do C5a (Janeway et al., 2005; Dunkelberg & Song, 2010).

A via das lectinas é a mais recente descrita e ativada de forma similar à via clássica, porém independentemente de anticorpos. Diferentemente do reconhecimento de complexos antígeno-anticorpo que ocorre na via clássica, a via das lectinas utiliza receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como as lectinas ligantes de manose (MBL) e ficolinas, para identificar estruturas “*nonsel*” (Janeway et al., 2005; Dunkelberger & Song, 2010). Os PRRs agem sobre poucas estruturas altamente conservadas presentes em um grande número de grupos de microrganismos, referidos como padrões moleculares de reconhecimento de patógenos (PAMPs) (Medzhitov & Janeway, 2000). Exemplos de PAMPs incluem endotoxina ou lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas, ácido lipoteicóico de bactérias gram-positivas, e β -glicanos de fungos (Dunkelberger & Song, 2010). MBL pode se ligar a carboidratos na parede de bactérias gram-positivas e gram-negativas e fungos, bem como em alguns vírus e

parasitos, tal como ocorre com a camada de lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania* (Sacks et al., 1994). Similarmente ao C1q da via clássica, a MBL também é dependente de íons Ca^{+2} e possui serino-proteases associadas a sua estrutura. Essas enzimas recebem o nome de MASP-1, -2 e -3 e desempenham função semelhante a C1r e C1s. Após a clivagem de C4 e C2, a via das lectinas segue o mesmo caminho da via clássica do sistema do complemento (Kawasaki et al., 1983; Sim & Laich, 2000; Chen & Wallis, 2004). A MBL e MASP-1, -2 e -3 estão menos presentes no soro do que C1q, C1r e C1s, tendo esta via, portanto, menor importância dentro do sistema do complemento comparado à via clássica (Speth et al., 2008).

A rota mais comum de ativação da via alternativa independe da presença de anticorpos e está relacionada a inúmeras substâncias presentes na superfície de bactérias, fungos, vírus, protozoários e parasitos multicelulares (Sim & Dodds, 1997). Algumas moléculas de C3 muito abundantes no plasma sofrem hidrólise espontânea, formando $\text{C3}(\text{H}_2\text{O})$ que é capaz de formar, na presença de fator B e fator D, uma C3 convertase solúvel, a $\text{C3}(\text{H}_2\text{O})\text{Bb}$. Esta C3 convertase da via alternativa irá então clivar o C3 solúvel em C3a e C3b, de forma análoga a C3 convertase das outras vias. Os fragmentos de C3b se ligarão às superfícies próximas, sendo elas do próprio hospedeiro ou não. A ativação da via alternativa por uma superfície e a formação da cascata do complemento vai depender de quanto tempo o primeiro C3b depositado vai permanecer ativo. Se o C3b estiver depositado sobre uma superfície *self* ele deverá ser clivado e inativado na forma iC3b , impedindo que a cascata do complemento continue. Sobre uma superfície estranha, o C3b pode associar-se ao fator B, que será clivado então pelo fator D para formar, uma serino-protease. O complexo formado (C3bBb), é a enzima C3 convertase da via alternativa e, como no caso da via clássica, é dependente de Mg^{+2} , capaz de clivar outras moléculas de C3 e depositar mais C3b sobre a superfície ativadora. A C5 convertase da via alternativa é subsequentemente formada pela ligação de uma segunda molécula de C3b ao complexo C3bBb , formando então C3bBbC3b . Quando o C5 se liga a C5 convertase da via alternativa, a unidade catalítica da enzima, o Bb, é capaz de clivar esse componente, gerando C5a e C5b que irá iniciar a formação da via citolítica (Sim & Dodds, 1997).

As três vias de ativação do complemento convergem para a formação do MAC na superfície da célula ativadora. O fragmento de C5b que é depositado tanto pela ação da C4bC2aC3b quanto da C3bBbC3b é estabilizado ao se ligar com C6, formando o complexo C5b6 . A esse complexo se ligará a molécula C7, formando um novo

complexo (C5b67), capaz de se ligar firmemente a membranas biológicas em locais próximos ao da ativação do complemento. Somente tal ligação não causa nenhum tipo de dano na integridade da bicamada lipídica. Com a ligação do oitavo componente do complemento (C8), formam-se poros de pequeno diâmetro e a membrana celular se encontra pouco estável. O complexo C5b-8 atua como agente polimerizante de C9 e quando o mesmo entra em contato com o C8 depositado, transforma-se em uma proteína alongada e anfipática que atravessa a membrana e aumenta ainda mais a porosidade. Este C9 depositado ainda é capaz de recrutar outras moléculas iguais, aumentando assim o tamanho dos poros e promovendo a lise da célula alvo (Hänsch, 1988; Ambrósio, 2005). Além disso, a ativação do sistema do complemento produz, através da clivagem de C3 e C5, os mediadores solúveis C3a e C5a, anafilatoxinas pró-inflamatórias potentes que interagem com diversas células do sistema imune. (Klos et al., 2009).

1.4 Fator H

A ação eficiente do sistema complemento como mecanismo de defesa contra infecções microbianas deve ser extremamente controlada para prevenir a ativação do sistema em células normais do hospedeiro e limitar a duração da ativação em células microbianas e pelos complexos antígeno-anticorpo (Rodriguez de Córdoba et al., 2004). A regulação ocorre no início e ao longo da cascata, com a inibição da atividade de proteínas iniciais do processo, ao nível das convertases, (tanto em sua formação quanto na sua atividade enzimática) e também durante a montagem do MAC (Liszewski et al., 1996). Um exemplo dessa regulação é a inativação de moléculas de C4b ou C3b caso as mesmas se liguem indevidamente à superfície de uma célula do próprio organismo, através do Fator I (FI), que identifica tais ligações e destrói essas moléculas com a ajuda do Fator H (FH). Além do FI, outras moléculas reguladoras podem estar presentes no plasma ou na superfície de células do organismo (C4bp inibitor, DAF, vitronectina, proteína S, CD59 e Fator H). Estas evitam a formação desregulada de C3 convertases ou atuam na inibição da montagem do MAC, ajudando a limitar as atividades destrutivas do complemento aos tecidos normais do organismo (Turnberg & Botto, 2003).

O Fator H é uma glicoproteína reguladora da atividade do complemento, identificado pela primeira vez por Nilsson e Mueller-Eberhard (1965) como β 1H

globulina. É uma das proteínas mais abundantes no plasma, de aproximadamente 155kD, composto por 20 domínios sushi concatenados em um total de 1231 aminoácidos (Schmidt et al., 2008). Sua expressão constitutiva ocorre no fígado, podendo também ser expresso localmente por diversas células como células epiteliais, endoteliais e plaquetas, dentre outras (Ferreira et al., 2010).

O FH regula a ativação do complemento tanto na fase fluida quanto sobre as superfícies celulares predominantemente de duas maneiras: acelerando o decaimento da C3-convertase da via alternativa (C3bBb), ao competir com o Fator B (FB) pela ligação no C3b; ou atuando como cofator para o FI, mediando a inativação proteolítica de C3b. Na presença do FH e do FI, a proteólise do fragmento C3b resulta na clivagem da cadeia α' do C3b, gerando dois fragmentos de 68 e 43 kDa, respectivamente. No caso do C3b ligado à superfície de células, o C3b inativado, chamado iC3b, permanece ligado de forma covalente à superfície ativadora (Rodriguez de Córdoba et al., 2004).

Em fase fluida o FH se liga e inativa prontamente o C3b. No entanto, a inativação de C3b ligado à superfície celular é dependente da composição química dessa mesma superfície (Rodriguez de Córdoba et al., 2004). As células do organismos vertebrados são normalmente cobertas com um glicocálice rico em ácido siálico, que não é produzido pelos patógenos. Uma molécula de C3b, ao se ligar a uma célula do organismo, fixa-se junto a resíduos de ácido siálico. O FH reconhece a proximidade de C3b com os resíduos de ácido siálico, se ligando a este complexo. Essa ligação sinaliza para que o FI reconheça o complexo C3b-H-ácido siálico, clivando especificamente C3b até sua forma inativa, o iC3b, interrompendo a cascata do complemento (Ricklin et al., 2010).

Problemas de reconhecimento de células do próprio hospedeiro pelo FH podem gerar patologias que envolvem excesso de ativação da via alternativa, degeneração macular relacionada à idade e glomerulonefrite causada por eliminação inadequada de imunocomplexos e deposição renal de subprodutos do complemento (Ferreira et al., 2010)

As estratégias de evasão ao sistema do complemento dos patógenos podem ser inespecíficas como paredes celulares espessas no caso de bactérias e fungos ou específicas como, por exemplo, a utilização do FH para aumento do controle da ação do complemento no ambiente aonde se encontram. Dessa forma algumas células cancerosas e microrganismos patogênicos passam por células normais do organismo e escapam da eliminação pela via alternativa do complemento (Ferreira et al., 2010). O

mesmo é descrito para patógenos que apresentam o FH do plasma ligado em suas superfícies. Essa ligação foi demonstrada em alguns vírus e fungos, em várias bactérias e parasitos (FIGURA 6).

Podem existir diferenças quanto à ação do complemento em microrganismos em diferentes estágios de desenvolvimento. As formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* que se encontram no vetor, são facilmente lisadas pela ação da via alternativa do sistema do complemento humano, enquanto que as amastigotas e tripomastigotas sanguíneas e metacíclicas, formas que estarão em contato com o hospedeiro vertebrado, são mais resistentes a essa lise (Nogueira et al., 1975; Kipnis et al., 1981; Kierszenbaum & Lima, 1983). Joiner e colaboradores (1986) constataram que os componentes C3 e C9 do complemento humano se ligam em maior proporção às epimastigotas do que às promastigotas metacíclicas, em detrimento ao FH que se liga mais a essas últimas formas e parece ser um dos fatores que promove a inibição da ação do complemento sob as formas infectantes.

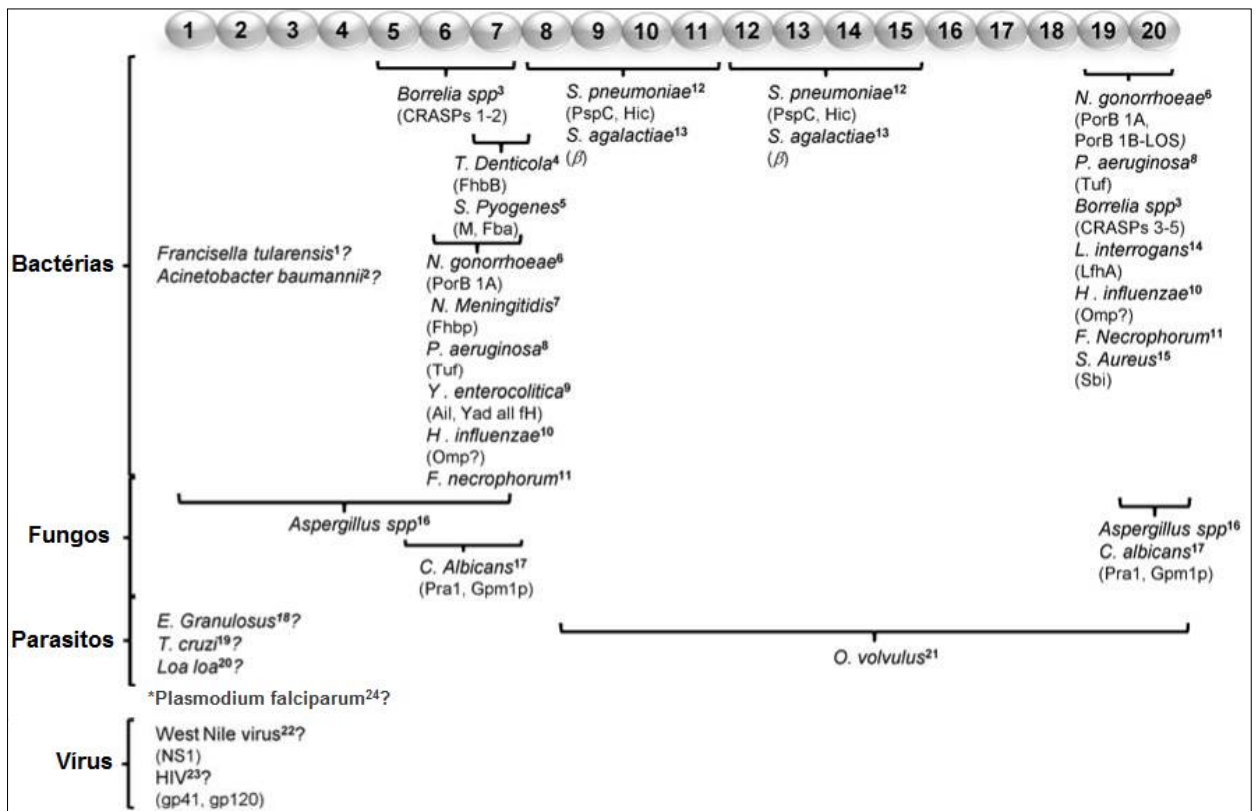


FIGURA 6: Interação entre FH e vários patógenos com indicação do domínio da proteína ao qual o organismo se liga (domínio desconhecido indicado por interrogação). Proteínas envolvidas na ligação em parênteses. Adaptado de Ferreira et al., 2010 e Simon et al. 2013

Meri e colaboradores (2002) mostraram que *Onchocerca volvulus* é capaz de captar FH após a incubação com o soro humano ou com FH humano purificado. Adicionalmente, na presença do FI, as microfilárias ligadas ao FH foram capazes de promover a clivagem do C3b a sua forma inativa (iC3b), comprovando a capacidade destes nematódeos em se evadir das defesas do sistema imunológico humano através da captação de proteínas reguladoras do complemento.

Ao analisar gametas de *Plasmodium falciparum*, Simon e colaboradores (2013) constataram que uma proteína de superfície desses protozoários liga-se ao FH humano, protegendo-se, desta forma, da lise mediada pelo complemento no interior do intestino médio do mosquito, durante o repasto sanguíneo, através da inativação do C3b. A perda da proteção mediada pelo FH prejudicou a gametogênese e assim, a transmissão do parasito pelo inseto vetor. Posteriormente, a ligação ao FH também foi comprovada em merozoítos e esquizontes de *P. falciparum* (Rosa et al. 2016).

Dados não publicados do nosso grupo de pesquisa indicam que *L. infantum* é capaz de ativar as vias do complemento e que a saliva de seus hospedeiros invertebrados pode influenciar na sobrevivência das promastigotas. Além disso, o mesmo estudo verificou que o FH humano se liga à superfície de ambas as formas do protozoário, sendo relevantes na inativação do componente C3b.

1.5 Inibição do Complemento por Artrópodes Hematófagos

A forte pressão evolutiva da ação do sistema do complemento culminou no desenvolvimento de estratégias de inibição dessa ativação por parasitos e vetores (Schroeder et al., 2009). Os artrópodes hematófagos estão incluídos no grupo de seres que enfrentam e devem transpor vários componentes do sistema imune dos vertebrados dos quais ingerem o sangue, entre eles a ativação do sistema do complemento, que resultaria em dano a esses organismos. Dentre esses animais, a atividade inibidora e/ou moléculas inibidoras do sistema do complemento podem estar presentes na saliva e/ou intestino (TABELA 2).

A capacidade dos artrópodes hematófagos em interferir na atividade do sistema complemento foi descrita pela primeira vez em carrapatos do gênero *Ixodes*, com a inibição da via alternativa pela saliva desses animais (Ribeiro, 1987). Desde então foram descritas atividades inibidoras do sistema do complemento na saliva e intestino de diversos artrópodes hematófagos incluindo flebotomíneos *Lutzomyia longipalpis*

(TABELA 2). Algumas das moléculas responsáveis pela inibição foram identificadas, por exemplo, em carrapatos *Ixodes scapularis* (Valenzuela et al., 2000), mosquitos *Anopheles* do Novo Mundo (Mendes-Sousa et al., 2016) e flebotomíneos (Ferreira et al., 2016; Mendes-Sousa et al., 2017).

TABELA 2: Artrópodes hematófagos e a atividade inibidora do sistema do complemento. Em destaque, os trabalhos do nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos – UFMG) ou trabalhos com a participação de nossos pesquisadores.

Espécie de artrópode	Autor	Fonte dos inibidores
<i>Ixodes dammini</i>	Ribeiro 1987	saliva
<i>Ixodes ricinus</i> , <i>Ixodes hexagonus</i> , <i>Ixodes uriae</i>	Lawrie et al. 1999	saliva
<i>Ixodes scapularis</i>	Valenzuela et al. 2000	saliva
<i>Lutzomyia longipalpis</i> , <i>L. migonei</i>	Cavalcante et al. 2003; Mendes-Sousa et al. 2013; Ferreira et al. 2016; Mendes-Sousa et al. 2017	saliva e intestino
<i>Ornithodoros moubata</i>	Roversi et al. 2007	saliva
<i>Rhodnius prolixus</i> , <i>Triatoma</i> <i>infestans</i> , <i>T. brasiliensis</i>	Barros et al. 2009	saliva e intestino
<i>Aedes aegypti</i>	Barros et al. 2009	intestino
<i>Sarcoptes scabiei</i>	Mika et al. 2012	intestino
<i>Anopheles sp</i>	Khattab et al. 2015	Intestino
<i>Glossina morsitans morsitans</i>	Ooi et al. 2015	intestino
<i>Anopheles albimanus</i>	Mendes-Sousa et al. 2016	saliva
<i>Rhipicephalus (B.) microplus</i>	Silva et al. 2016	saliva
<i>Amblyomma cajennense</i>	Franco et al. 2016	saliva
<i>Anopheles aquasalis</i>	Mendes-Sousa et al. 2017	saliva

A inibição do complemento pela saliva dos vetores é muito importante, pois diminui a resposta inflamatória local durante a hematofagia, diminuindo a percepção do hospedeiro e favorecendo a realização de um repasto sanguíneo completo (Schroeder et al., 2009). Além disso, existe a hipótese de que os inibidores salivares reduziram a opsonização de antígenos salivares no local da picada, diminuindo a apresentação desses antígenos ao sistema imune do hospedeiro, desfavorecendo a produção de anticorpos contra proteínas salivares o que interferiria negativamente na hematofagia e na infecção e transmissão de patógenos.

Uma vez que o epitélio intestinal dos artrópodes hematófagos é composto por uma camada única de células e assim, muito sensível ao dano, os inibidores ingeridos junto com o repasto também promoveriam a proteção desse epitélio durante a ingestão e digestão sanguínea. Naturalmente as células são agentes estranhos ao sistema imune dos vertebrados, presente no sangue ingerido, e podem ser danificadas, levando a sua ruptura e morte do inseto. Nesse contexto, foi demonstrado que triatomíneos que ingeriam soro humano forçadamente (sem a ingestão de saliva) apresentaram células do epitélio intestinal mortas devido à ação do complemento (Barros et al., 2009).

No entanto, existem casos em que a saliva de artrópodes hematófagos não apresentou atividade inibitória frente ao complemento como em *Aedes aegypti* *Ctenocephalides felis* (Cavalcante et al., 2003). A ausência dessa atividade sugere a que a inibição do complemento possa ocorrer no trato digestivo dos artrópodes hematófagos. Barros e colaboradores (2009) foram pioneiros em demonstrar a importância de tal inibição pelo conteúdo intestinal de insetos que se alimentam de sangue em seus estudos envolvendo *Aedes aegypti* e triatomíneos (*Triatoma braziliensis*, *T. infestans* e *Rhodnius prolixus*).

A saliva de *L. longipalpis* inibe a ação do sistema do complemento de maneira irregular de acordo com o hospedeiro vertebrado em que esses insetos exercem a hematofagia. A via clássica e a via alternativa do complemento humano são inibidas por essa saliva (Cavalcante et al., 2003). Mendes-Sousa e colaboradores (2013) demonstraram que a saliva desses flebotomíneos também inibe a atividade da via clássica do complemento de ratos, cães e cobaias, mas é ineficaz frente ao complemento de galinhas. Por outro lado, não houve inibição da via alternativa de nenhum desses vertebrados não humanos. Uma vez que o sistema do complemento representa uma grande ameaça aos artrópodes hematófagos, esses estudos reforçam a hipótese da inibição da atividade lítica desse componente imune no trato digestivo dos artrópodes hematófagos.

Nesse contexto, a inibição da via clássica do complemento humano, de cães, e de ratos e de galinhas pelo conteúdo intestinal de *L. longipalpis* foi confirmada. Enquanto a via clássica do complemento de galinha havia sido inibida pelo conteúdo intestinal de *L. longipalpis* a via alternativa não foi inibida (Mendes-Sousa et al., 2013; Queiroz, 2016). É possível que não somente moléculas solúveis encontradas no conteúdo intestinal atuem como inibidores. Outras moléculas, aderidas às membranas

do epitélio, poderiam atuar como inibidores do complemento como, por exemplo, alguma molécula que sirva como receptor de fator H responsável pela inativação da via alternativa.

Khatab e colaboradores (2015) recentemente constataram que apesar do complemento estar ativo no lúmen intestinal de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* após o repasto sanguíneo, as células nesse local não estavam danificadas. Através da captação do FH as células epiteliais dos mosquitos promoveram a inativação de C3b e inibiram a atividade da via alternativa do complemento (Khatab et al., 2015). Experimentos preliminares do nosso grupo de pesquisa (não publicados) mostram que o FH humano também se liga ao epitélio intestinal de mosquitos *Aedes aegypti* e à superfície de protozoários da espécie *Leishmania infantum*.

JUSTIFICATIVA

O sistema complemento é um dos mecanismos do sistema imune presente no sangue dos vertebrados voltado ao combate de agentes estranhos ao organismo, capaz de reconhecer, se ligar e eliminar tais agressores. Sua ativação envolve cascatas proteolíticas que podem culminar em danos a agentes identificados como estranhos, por exemplo, protozoários e células do epitélio intestinal do trato digestivo dos artrópodes hematófagos. Nesse contexto, inibidores do complemento foram detectados na saliva e intestino de diversos desses artrópodes.

Um dos mecanismos para evasão do sistema do complemento é a ligação ao Fator H do plasma inibindo a via alternativa do complemento. Este mecanismo já foi descrito em diversos patógenos (bactérias, protozoários e helmintos) e recentemente foi detectado em mosquitos do gênero *Anopheles* e pelo nosso grupo de pesquisa em protozoários da espécie *Leishmania infantum* desafiados com soro humano.

Entretanto, uma vez que os flebotomíneos exercem a hematofagia nos mais variados hospedeiros e que as leishmanioses também ocorrem em diversos vertebrados, se torna insuficiente que a maioria dos estudos seja realizada apenas com o enfoque no hospedeiro humano, em detrimento a outros animais susceptíveis a picadas do inseto como cães e roedores. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi investigar a capacidade de ligação do Fator H do soro de diferentes hospedeiros ao epitélio do intestino médio de flebotomíneos *Lutzomyia longipalpis* como forma de evadir o sistema do complemento. Foi nosso objetivo também estudar a ligação do FH à superfície de protozoários do gênero *Leishmania* que possam ser transmitidos por esses vetores.

A existência de um receptor para o FH leva a possibilidade de uso do mesmo como um componente vacinal. Anticorpos produzidos contra o receptor do FH interfeririam na ligação do FH ao epitélio intestinal dos artrópodes hematófagos e à superfície dos parasitos, bloqueando esse mecanismo de proteção. Os flebotomíneos e as formas metacíclicas ao entrarem em contato com o sangue dos vertebrados durante o repasto sanguíneo não poderiam utilizar mais este mecanismo, e tornariam-se mais susceptíveis ao ataque do sistema complemento, contribuindo para o controle desses organismos. O mesmo aconteceria com as formas amastigotas durante sua transmissão do vertebrado para o inseto vetor, momento este único em seu ciclo em que as amastigotas entram em contato direto com o sangue, e conseqüentemente com os fatores líticos do complemento em mais alta concentração. Obviamente, para um melhor

funcionamento, esta vacina deveria contar com outros antígenos, tais como os inibidores das vias clássica e alternativa.

Além disso, iniciamos as investigações sobre como acontece a ativação da via clássica na superfície interna do intestino médio dos flebotomíneos, outra forma de início da cascata proteolítica do sistema do complemento. A necessidade de impedimento do dano ao epitélio que pode ser gerado por esse processo justifica a presença de inibidores salivares e intestinais da via clássica anteriormente descritos na literatura. As abordagens apresentadas nesse trabalho iniciam e fundamentam futuras pesquisas que busquem melhor entendimento sobre a ativação do sistema do complemento na superfície celular do trato digestivo desses animais.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a capacidade de ligação de moléculas de Fator H do sistema do complemento de mamíferos ao epitélio do intestino médio de flebotomíneos *Lutzomyia longipalpis* e à superfície de espécies de *Leishmania* do velho e novo mundo, assim como investigar como se daria a ativação da via clássica sobre o epitélio intestinal.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar se o conteúdo intestinal de *L. longipalpis* atua como inibidor da via alternativa do complemento de seres humanos, cães e ratos;
- Investigar a ligação do FH do soro humano, soro de cães e soro de ratos ao epitélio do intestino médio de *L. longipalpis*;
- Investigar a ligação de FH humano, de cães e ratos à superfície de sete espécies de protozoários do gênero *Leishmania*.
- Investigar a ligação de anticorpos naturais humano da classe IgG no epitélio intestinal de *L. longipalpis*;
- Investigar a ligação do componente C1 humano, de cão e de rato ao epitélio intestinal de *L. longipalpis*.

4. METODOLOGIA

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos do Departamento de Parasitologia, inserido na Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA 159/2017).

4.1 Criação dos insetos

Os insetos utilizados pertencem à colônia de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) procedentes de Teresina (PI), mantida no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH), localizado no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os flebotomíneos são mantidos sob condições de temperatura e umidade controladas de acordo com Modi e Tesh (1983) em torno de 25°C e umidade relativa entre 60 e 80%.

4.2 Obtenção do conteúdo intestinal de *Lutzomyia longipalpis*

Para a obtenção do CI de *L. longipalpis* foram utilizadas fêmeas com idades entre 3 e 6 dias alimentadas somente com açúcar. Os insetos foram dissecados em solução de NaCl 0,9% (salina) em microscópio estereoscópico para a extração do intestino inteiro. Os intestinos foram transferidos para outro sítio contendo também solução salina onde foram abertos e lavados para que todo o CI em seu lúmen fosse transferido para a solução fisiológica. O CI de um total de 8 insetos foi armazenado em 12,5µl de solução salina. A partir da diluição dessa solução estoque, os testes envolvendo o CI utilizaram as concentrações equivalentes ao conteúdo de 1, 2, 4 e 8 intestinos.

4.3 Obtenção dos intestinos médios de *Lutzomyia longipalpis*

Para obtenção dos intestinos médios, fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas somente com açúcar foram dissecadas em solução salina, em microscópio estereoscópico, com auxílio de estiletos entomológicos. Após a dissecação dos intestinos, os divertículos, túbulos de Malpighi e intestino posterior foram extraídos e descartados.

Os experimentos utilizaram intestinos mantidos em sua forma original fechados ou abertos com auxílio de estiletes, através de um corte longitudinal, expondo assim o epitélio interno dos mesmos.

4.4 Obtenção dos soros

O soro de humanos foi obtido a partir de sangue cedido pelos alunos, professores e técnicos do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos.

Os soros de cães foram provenientes de quatro animais adultos, sem raça definida, nascidos e criados em canil da Universidade Federal de Minas Gerais. Os cães tiveram sangue coletado através de punção das veias jugular ou braquial.

Os soros de ratos (*Rattus norvegicus*) foram obtidos através de punção cardíaca de animais anestesiados mantidos no biotério do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG.

Em laboratório, o sangue coletado foi deixado em repouso por uma hora a 37°C para a formação de coágulo e em seguida, centrifugado a 5.000g por 5 minutos. Os soros foram aliquotados em pools, identificados e armazenados em freezer -80°C até o momento dos experimentos.

4.5 Cultivo dos parasitos do gênero *Leishmania*

As formas promastigotas usadas nos experimentos foram oriundas do banco de parasitos mantido em nitrogênio líquido no LFIH. A espécie de *Leishmania infantum* (MCAN/BR/2002/BH401) foi isolada em Belo Horizonte/MG de um caso canino. As espécies de *Leishmania* são de cepas de referência da Organização Mundial da Saúde: *Le. guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *Le. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2904), *Le. shawi* (MCEB/BR/1984/M8408), *Le. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), *Le. mexicana* (MNYC/BZ/62/M379), *Le. major* (MHOM/IL/1980/Friedlin).

As espécies de parasitas foram confirmadas por PCR-RFLP como descrito por Schonian et al. 2003. Os tubos contendo as cepas criopreservadas foram descongeladas e cultivadas no meio Schneider (SIGMA®), suplementado com 2% de urina humana estéril, solução de vitamina 1% BME (SIGMA®), 1% de L-glutamina (200 mM), 10% de soro bovino fetal (Gibco®), 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (Gibco®). As culturas foram mantidas em BOD a uma temperatura de 23 °C ± 1°C, até

atingirem a fase estacionária, para serem então utilizadas nos experimentos descritos a seguir.

4.6 Investigação da influência do conteúdo intestinal de *Lutzomyia longipalpis* sobre a atividade lítica da via alternativa do complemento de humanos, cães e ratos (protocolo baseado em Cavalcante et al. 2003)

Para testar a atividade do CI de *L. longipalpis* sobre a via alternativa do sistema complemento, foram realizados ensaios de hemólise utilizando hemácias de coelho coletadas por punção da veia central auricular e mantidas a 4°C na concentração de 1:1 de solução conservadora (glicose 2,05%, citrato de sódio 0,8%, NaCl 0,42%, ácido cítrico 0,05%). Para o experimento as hemácias foram lavadas três vezes em tampão Mg-EGTA (Hepes 1,04mM, NaCl 30,16mM, gelatina 0,0208%, EGTA 10mM, MgCl₂ 7mM, glicose 3,15%) através de centrifugação (480g/ 5 minutos/4°C). A concentração foi ajustada para 1x10⁸ células/mL.

Nos ensaios, 12,5µl de solução fisiológica contendo a quantidade desejada de CI (1 a 8 intestinos) foram adicionados a microtubos e em seguida, 25µl de solução contendo soro da espécie desejada também foram adicionados ao tubo. Por fim foram adicionados 25µl da suspensão contendo as hemácias de coelho na concentração de 1x10⁸ células/mL e o tubo foi incubado por 30 minutos a 37°C. Após a incubação, 250µl de solução fisiológica NaCl 0,9% gelada foram adicionados ao tubo para interromper a atividade hemolítica do soro. Os tubos foram centrifugados a 1700g por 30 segundos e 200µl do sobrenadante foram transferidos para uma placa de 96 poços. A placa foi lida no espectrofotômetro a 415nm.

Os soros utilizados devem ser diluídos em Mg-EGTA em concentrações suficientes para lisar entre 80% e 90% das hemácias na concentração de 1x10⁸ células/mL (na relação de 1:1 entre volume de soro e volume de hemácias utilizados nos testes). No presente trabalho os soros humano e de cão foram diluídos na concentração de 1:10 e o soro de rato foi diluído na concentração de 1:2. Para determinar essas diluições, a atividade hemolítica de diferentes concentrações de soro é testada em comparação ao valor de 100% de hemólise gerado pela adição de água às hemácias.

Em cada teste, foram utilizados três controles: hemólise total, no qual eram acrescidos 250µl de água destilada gelada após a incubação responsável hemolisar todas as células; hemólise espontânea, no qual não havia adição de soro – esse controle

funciona como branco, devendo ser descontado dos demais valores; hemólise pelo complemento (controle positivo), no qual era acrescentado soro, mas não havia adição de CI confirmando que o soro em questão está funcionando.

4.7 Investigação da reação cruzada entre anticorpos anti C1q e anti FH humanos e seus respectivos fatores de cão e de rato

A existência da reação cruzada entre anticorpos humanos anti C1q e anti FH e tais moléculas do soro de cães e ratos foi investigada através do teste de ELISA (Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay) para averiguação da possibilidade da utilização desses anticorpos em ensaios com os esse outros mamíferos. O soro dos animais foi diluído em tampão carbonato/bicarbonato (Na_2CO_3 15mM, NaHCO_3 35mM, pH 9.6) na concentração final de 1%. A placa de 96 poços foi então sensibilizada com 100 μL dessa solução. Em todos os experimentos também foi feito um grupo com soro humano com a função de ser o controle positivo. Poços sensibilizados apenas com o tampão carbonato/bicarbonato (Na_2CO_3 15mM, NaHCO_3 35mM, pH 9.6) foram utilizados com o branco. Após 24 horas de secagem da placa a 37°C, a mesma foi bloqueada uma solução de leite em pó diluído em PBS (NaCl 136,8mM, KCl 2,7mM, Na_2HPO_4 4,76mM, KH_2PO_4 1,76mM, pH 7.4) na concentração final de 5% (150 μL /poço) por 60 minutos sob agitação em temperatura ambiente. A placa foi então incubada com os anticorpo primário anti C1q (Complement Technology® A200) ou anti FH humano (Complement technology® A237) ambos produzidos em cabra, na diluição 1:1000 (100 μL /poço) de acordo com a molécula para a qual estava sendo investigada a reação cruzada. Em seguida foi aplicado o anticorpo secundário anti IgG de cabra conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich® A5420) na diluição 1:3000 (100 μL /poço) para ambos os anticorpos. As incubações com os anticorpos foram feitas durante 30 minutos sob agitação em temperatura ambiente. Entre cada processo, as placas foram lavadas com PBS Tween 1% (150 μL /poço) três vezes por 2 minutos. Ao final do ensaio, foram adicionados 200 μL da solução de tampão citrato (Ácido cítrico 50mM, Na_2HPO_4 50mM pH 5.0) + OPD (SIGMA ®) 0,1% + peróxido de hidrogênio 0,025% em cada poço e a placa foi incubada a 37°C por 10 minutos. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1M (100 μL /poço) e a placa lida a 450nm no módulo end point.

4.8 Investigação da capacidade de ligação do FH do soro humano, de cão e de rato ao epitélio do intestino médio de *Lutzomyia longipalpis* utilizando o anticorpo anti FH humano

A capacidade de ligação do FH presente no soro humano, de cão e de rato ao epitélio do intestino médio de *L. longipalpis* também foi investigada através do teste de ELISA. Intestinos médios de *L. longipalpis* obtidos de acordo com o item 4.3 foram ensaiados em três grupos (7 intestinos cada): i) intestinos preservados em sua forma original incubados em 100 µL de soro puro da espécie investigada para verificação da ligação FH ao epitélio externo; ii) intestinos abertos incubados em 100 µL de soro da espécie investigada para verificação da ligação externa e interna do FH ao epitélio intestinal; iii) intestinos incubados apenas em solução fisiológica NaCl 0,9% (grupo controle). Após as incubações, os intestinos foram lavados e cada grupo dos mesmos foi transferido para um microtubo contendo 350µM de tampão carbonato/bicarbonato (Na₂CO₃ 15mM, NaHCO₃ 35mM, pH 9.6) e inibidores de protease (concentrações: PMSF 2mM, EDTA 1,5mM, E64 10µM). Os microtubos foram sonicados por 30 segundos e 100µL do conteúdo de cada grupo foram transferidos para uma placa de 96 poços. Após 24 horas de secagem da placa a 37°C, a mesma foi revelada de acordo com o item 4.7, sendo utilizado apenas o anticorpo primário anti FH de humanos (Complement technology® A237) e o anticorpo secundário anti IgG de cabra conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich® A5420). Poços sensibilizados apenas com o tampão carbonato/bicarbonato (Na₂CO₃ 15mM, NaHCO₃ 35mM, pH 9.6) foram utilizados com o branco e esse valor foi descontado dos demais grupos após a leitura.

4.9 Investigação da capacidade de ligação do FH do soro humano, de cão e de rato à superfície de parasitos do gênero *Leishmania*

Os parasitos foram lavados duas vezes por centrifugação (3.000g/10 minutos/4°C) e ressuspensos em PBS (NaCl 136,8mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ 4,76mM, KH₂PO₄ 1,76mM, pH 7.4). Em seguida os microtubos contendo 1x10⁷ parasitos foram incubados por 10 minutos a 37°C sob agitação em 1 mL das seguintes soluções: i) *Leishmania* + soro 5% diluído em PBS; ii) *Leishmania* + soro 5% + EDTA 10mM diluídos em PBS; iii) *Leishmania* + PBS (grupo controle). Foram utilizados soro humano, soro de cão e soro de rato. Para avaliação da captação do FH do soro humano,

também foi ensaiado um grupo em que os parasitos foram incubados em 1 mL de PBS + FH humano purificado 0,01 mg/mL.

Após a sensibilização dos parasitos com o soro, foram realizadas outras duas lavagens como descrito anteriormente. Ao final os parasitos foram ressuspensos em tampão carbonato de forma que a concentração final dos mesmos fosse ajustada para 2×10^6 células/mL.

As amostras de cada grupo foram distribuídas em placas de 96 poços próprias para realização do ensaio de ELISA (100µL/poço). Após 24 horas de secagem da placa a 37°C, a mesma foi revelada de acordo com o item 4.7, sendo utilizado apenas o anticorpo primário anti FH de humanos (Complement technology® A237) e o anticorpo secundário anti IgG de cabra conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich® A5420). Poços sensibilizados apenas com o tampão carbonato/bicarbonato (Na_2CO_3 15mM, NaHCO_3 35mM, pH 9.6) foram utilizados com o branco e esse valor foi descontado dos demais grupos após a leitura.

4.10 Investigação da ligação de anticorpos humanos naturais da classe IgG ao epitélio intestinal de *Lutzomyia longipalpis*

A capacidade de ligação de anticorpos da classe IgG humano ao epitélio do intestino médio de *L. longipalpis* também foi investigada através do teste de ELISA por ser uma das formas conhecidas de disparo da via clássica do sistema do complemento. Intestinos médios de *L. longipalpis* obtidos de acordo com o item 4.3 foram ensaiados em dois grupos (4 intestinos cada): i) intestinos abertos longitudinalmente incubados em 100 µL de soro puro da espécie investigada para verificação da ligação externa e interna do IgG humano ao epitélio intestinal; ii) intestinos incubados apenas em solução fisiológica NaCl 0,9% (grupo controle). Após as incubações, os intestinos foram lavados e cada grupo dos mesmos foi transferido para um microtubo contendo inibidores de protease (PMSF 2mM, EDTA 1,5mM, E64 10µM). Os microtubos foram sonicados por 30 segundos e 100µL do conteúdo de cada grupo foram transferidos para uma placa de 96 poços. Após 24 horas de secagem da placa a 37°C, a mesma foi revelada de acordo com o item 4.7, utilizando nesse caso apenas o anticorpo secundário anti IgG humano conjugado com peroxidase (Imuny® IC-1H01) na concentração 1:5.000. Poços sensibilizados apenas com o tampão carbonato/bicarbonato (Na_2CO_3 15mM, NaHCO_3 35mM, pH 9.6) foram utilizados com o branco.

4.11 Investigação da capacidade de ligação do C1 do soro humano, de cão e de rato ao epitélio do intestino médio de *lutomyia longipalpis* utilizando o anticorpo anti C1q humano

A capacidade de ligação do C1 presente no soro humano, de cão e de rato ao epitélio do intestino médio de *L. longipalpis* também foi investigada através do teste de ELISA, sendo o C1 outra molécula que apresenta a capacidade de disparar a via clássica do complemento. Os ensaios foram feitos de acordo com o item 4.8., porém, com a utilização do anticorpo anti C1q humano (Complement Technology® A200) e do anticorpo secundário anti IgG de cabra conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich® A5420).

4.12 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Variáveis com distribuição normal foram testadas pelo Teste T (no caso de comparação entre 2 grupos) ou ANOVA pareado (no caso de comparação entre 3 ou mais grupos) seguido pelo teste de Tukey. No caso de variáveis que não apresentarem distribuição normal, as análises foram feitas com o teste Mann-Whitney (no caso de comparação entre 2 grupos) ou Friedman (no caso de comparação entre 3 ou mais grupos) seguido pelo teste de Dunn. Todos os testes foram considerados significativos quando apresentaram um valor de $P \leq 0.05$.

5.RESULTADOS

5.1 Influência do conteúdo intestinal de *Lutzomyia longipalpis* sobre a atividade lítica da via alternativa do complemento humano, de cão e de rato

O conteúdo intestinal de *L. longipalpis* não foram capazes de inibir a ação da via alternativa do complemento de nenhuma das espécies de vertebrados analisadas (FIGURA 7), em concordância com o que havia sido observado utilizando o soro de galinha (Mendes-Sousa et al., 2013). A via alternativa desses animais também não foi inibida pela saliva desse inseto, exceto a via alternativa do complemento humano, o que sugere que a inibição ocorra por meio de outro mecanismo uma vez que a ação do sistema do complemento presente no sangue ingerido pelos artrópodes hematófagos danificaria o epitélio intestinal dos mesmos.

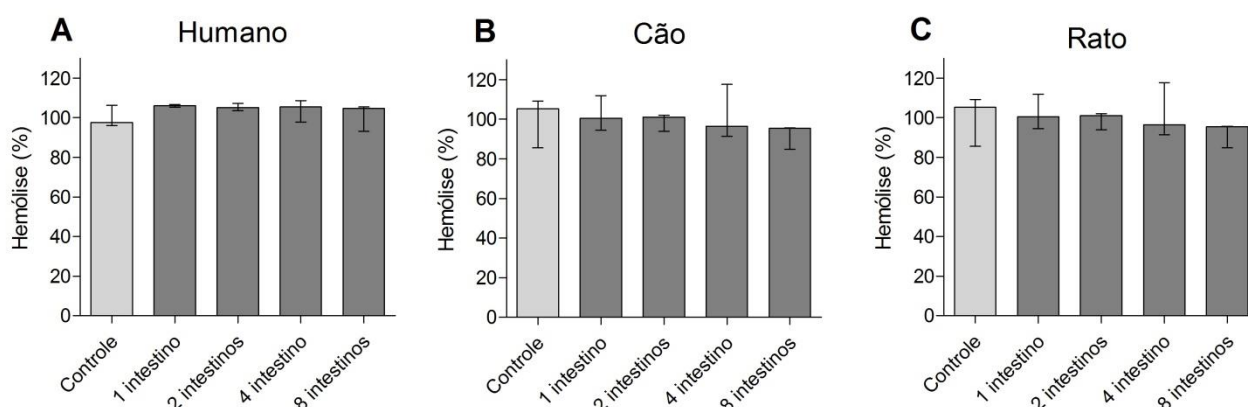


FIGURA 7: Porcentagem de hemólise da via alternativa de humano (A), cão (B) e rato (C) na presença de diferentes concentrações (1, 2, 4 e 8 intestinos) de CI de *Lutzomyia longipalpis*. O grupo controle é estabelecido pela comparação da atividade hemolítica do soro de interesse (sem a presença de CI) em relação à da água destilada gelada (responsável por hemolisar todas as células). A atividade do soro deve estar entre 80 e 90% da porcentagem da hemólise total. Em seguida esse valor é normalizado em 100% a título de facilitar a comparação entre a atividade hemolítica do soro na ausência (controle) e na presença de CI. Os resultados foram expressos como a mediana da porcentagem de hemólise e as barras verticais representam os intervalo mínimo-máximo. Para cada grupo de dados n=3. Não houve diferença significativa (Kruskal-Wallis $p < 0.05$) entre os grupos.

5.2 Investigação da reação cruzada entre anticorpos anti C1q e anti FH humanos e seus respectivos fatores de cão e rato

Todos os soros (humano, cão e rato) apresentaram perceptível reatividade com os anticorpos inicialmente destinados à detecção de C1q e de FH humanos (FIGURA 8). Assim concluímos que os anticorpos humanos anti C1q e anti FH podem ser utilizados para investigar a presença ou ligação desses respectivos fatores em determinadas células ou organismo como *L. longipalpis* e protozoários do gênero *Leishmania*.

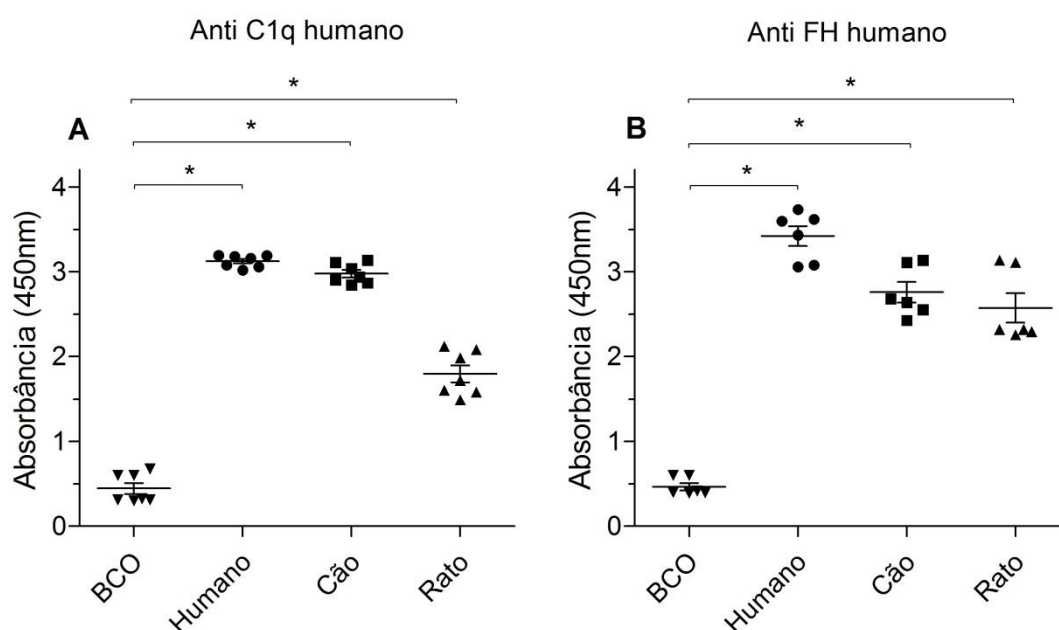


FIGURA 8: Reação entre anticorpos humanos anti C1q (A) e anti FH (B) frente aos soros de humano, cão e rato. O soro humano foi utilizado como controle positivo da atividade dos anticorpos e o branco (BCO) corresponde à adição apenas de tampão carbonato/bicarbonato à placa. Os resultados foram expressos como a média dos valores obtidos através da leitura no espectrofotômetro e as barras verticais representam os erros padrões. Para os testes com o anticorpo anti C1q $n=7$ e para os testes com o anticorpo anti FH $n=6$. (*) representa diferença significativa (ANOVA e Tukey $p<0.05$) entre os grupos.

5.3 Ligação do FH do soro humano, de cão e de rato ao epitélio do intestino médio de *Lutzomyia longipalpis* utilizando o anticorpo anti-FH humano

A metodologia utilizada nesse estudo permitiu a comprovação da ligação do FH humano, de cão e de rato no epitélio intestinal de *L. longipalpis*, mais especificamente à parte interna dos intestinos médios desses insetos e não tanto do lado externo (FIGURA 9). A presença do FH de vertebrados junto às células epiteliais de *L. longipalpis* pode contribuir para a inativação do complemento na superfície dessas células sendo um co fator para que o Fator I inative o C3b em iC3b.

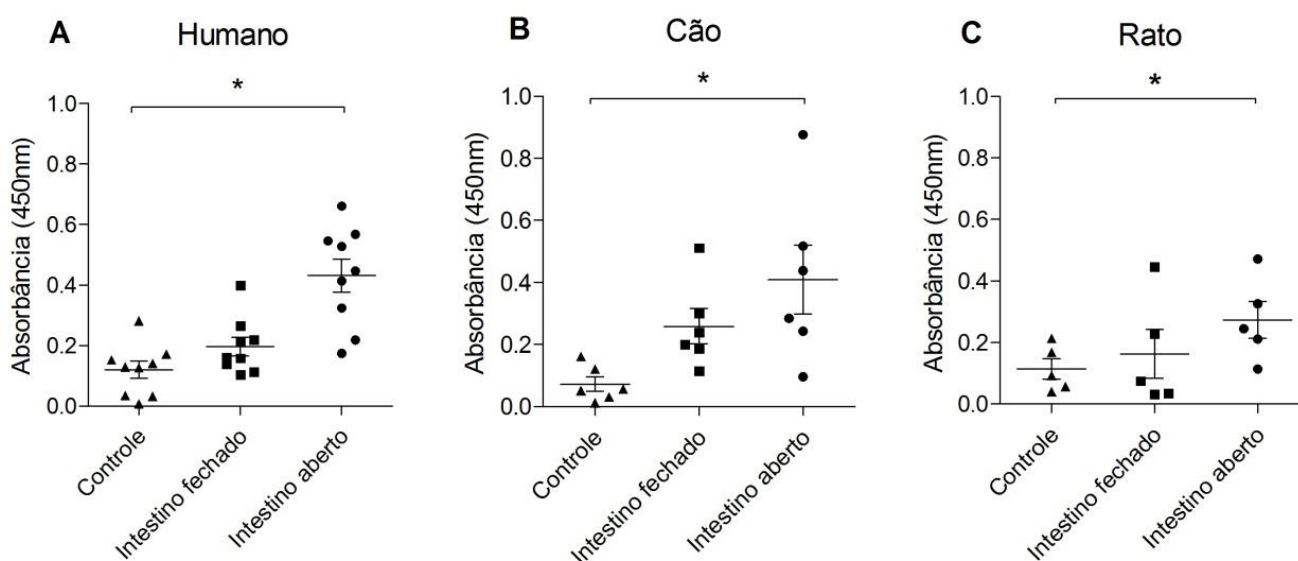


FIGURA 9: Ligação do FH humano (A), de cão (B) e de rato (C) ao epitélio intestinal de *Lutzomyia longipalpis*. O grupo controle é composto por intestinos incubados apenas em solução fisiológica. Os resultados foram expressos como a média dos valores obtidos através da leitura no espectrofotômetro e as barras verticais representam os erros padrões. Para os testes com soro humano n=9, com soro de cão n=6 e com soro de rato n=5. (*) representa diferença significativa (ANOVA e Tukey $p < 0.05$) entre os grupos.

5.4 Ligação do FH do soro humano, de cão e rato a parasitos do gênero *Leishmania*

O presente estudo constatou que ao contrário do FH humano, o FH de cão e de rato não parece se ligar à superfície de *Leishmania infantum* (FIGURA 10). Os grupos de intestinos tratados com soro humano e soro humano inativado com EDTA apresentam diferença significativa no valor de ligação ao FH em relação ao controle, sendo que o FH parece se ligar menos aos intestinos incubados em soro humano com EDTA. Esses dados confirmam achados prévios de estudos com soro humano do nosso grupo de pesquisa e sugerem que a ligação ao FH possa não ser relevante na proteção das leishmanias contra a ação do complemento de cão e rato.

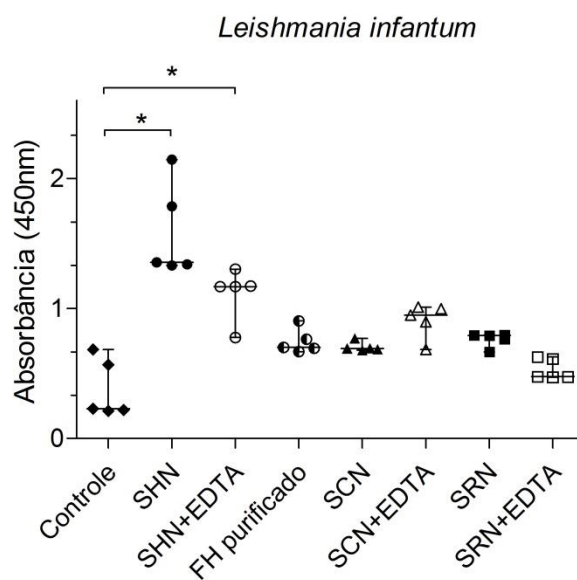


FIGURA 10: Ligação de FH presente no soro humano (SHN), de cão (SCN) e de rato (SRN), e de FH humano purificado na superfície de *Leishmania infantum*. Também foram ensaiados grupos de leishmanias incubadas em soro inativado por EDTA. O grupo controle é composto por protozoários incubados apenas em PBS. Os resultados foram expressos como a mediana dos valores obtidos através da leitura no espectrofotômetro e as barras verticais representam os intervalos mínimo-máximo. N=5 (*) representa diferença significativa (Friedman e Dunns, $p < 0.05$) entre o grupo controle e os grupos de *L. infantum* incubadas em soro humano.

Dentre as demais espécies de *Leishmania* analisadas (*L. braziliensis*, *L. amazonenses*, *L. guyanensis*, *L. mexicana*, *L. shawi* e *L. major*) não houve diferença estatística entre nenhum dos grupos experimentais e seus respectivos controles (FIGURA 11) embora em alguns casos seja muito provável que a ligação esteja ocorrendo. Provavelmente, um aumento no número de experimentos poderia levar a obtermos diferença estatística da ligação de fator H em algumas espécies de *Leishmania* como por exemplo em *L. amazonenses*, *L. shawi* e *L. major*. Em outras espécies, os dados podem indicar que a captação de FH não seja um mecanismo de grande importância.

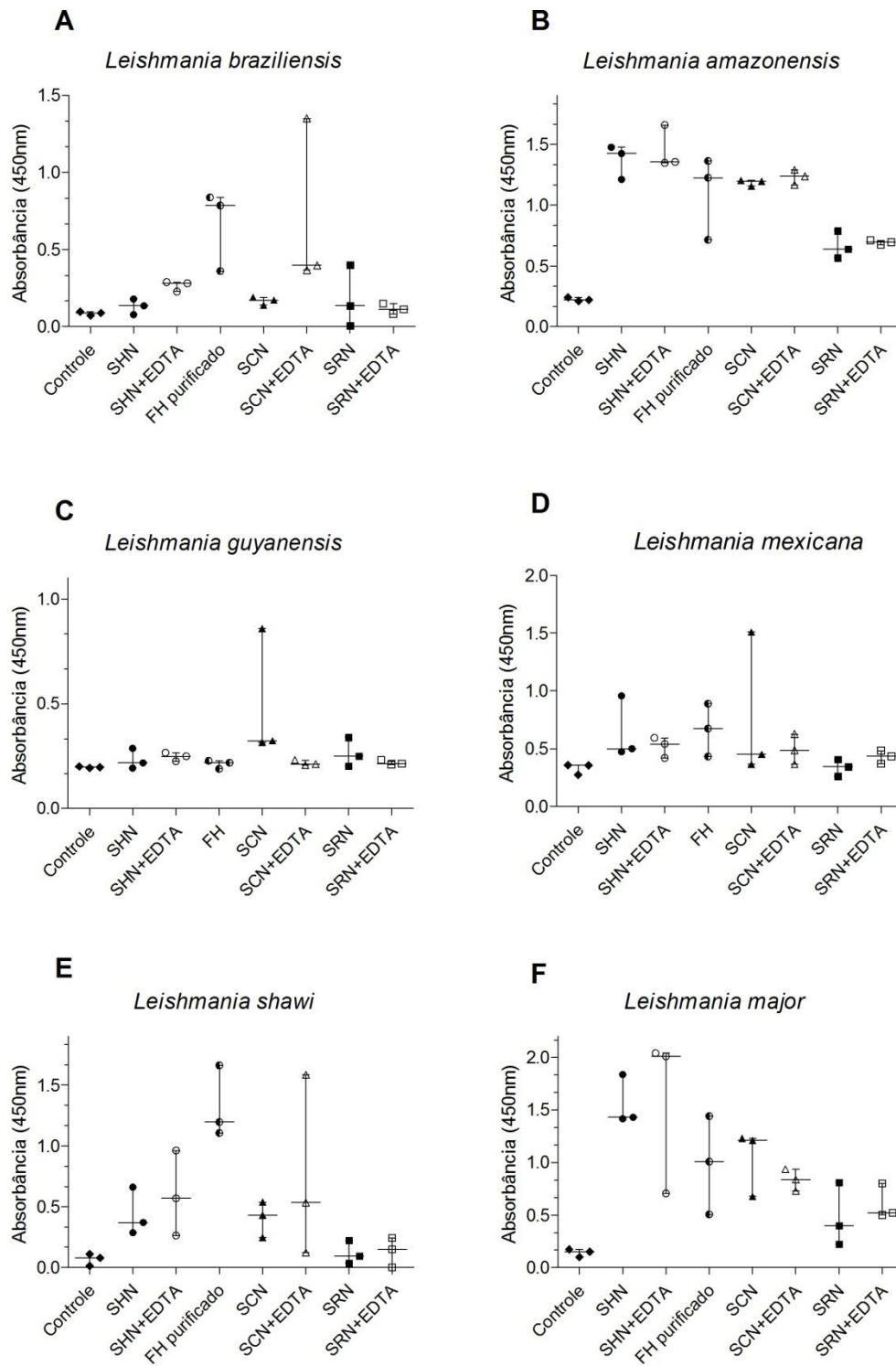


FIGURA 11: Ligação de FH presente no soro humano (SHN), de cão (SCN) e de rato (SRN), e de FH humano purificado na superfície de diferentes espécies de *Leishmania*. Também foram ensaiados grupos de leishmanias incubadas em soro inativado por EDTA. O grupo controle é composto por protozoários incubados apenas em PBS. Os resultados foram expressos como a mediana dos valores obtidos através da leitura no espectrofotômetro e as barras verticais representam os intervalo mínimo-máximo. N = 3 para todas as espécies ensaiadas. Não houve diferença significativa (Friedman e Dunns, $p < 0.05$) entre os grupos.

5.5 Ligação de anticorpos humanos naturais da classe IgG ao epitélio intestinal de *Lutzomyia longipalpis*

Os dados mostram que não houve deposição significativa de anticorpos naturais de humanos da classe IgG no epitélio intestinal de *L. longipalpis* (FIGURA 12). Conclui-se que a via clássica parece não ser ativada nos intestinos por meio de ligação inespecífica desses anticorpos.

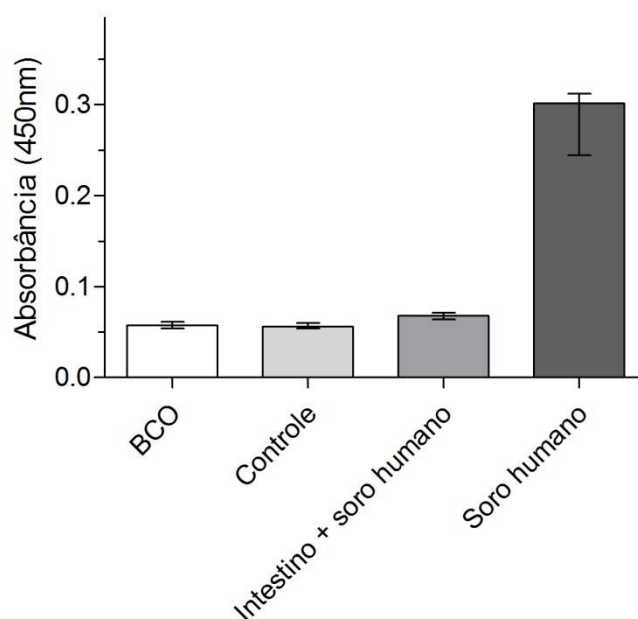


FIGURA 12: Ausência da ligação de anticorpos da classe IgG presentes no soro humanos no epitélio intestinal de *Lutzomyia longipalpis*. O branco (BCO) ou controle negativo corresponde à adição apenas de tampão carbonato/bicarbonato à placa, o grupo controle representa intestinos incubados em solução salina e o grupo em que houve apenas adição de soro humano à placa foi utilizado como controle positivo da reação. Os resultados foram expressos como a mediana dos valores obtidos através da leitura no espectrofotômetro e as barras verticais representam os intervalos mínimo-máximo. N=4. Não houve diferença significativa (Friedman e Dunns, $p < 0.05$) entre o grupo de intestinos incubados com soro humano e os controles negativos.

5.6 Ligação do C1 do soro humano, de cão e de rato ao epitélio do intestino médio de *Lutzomyia longipalpis* utilizando o anticorpo anti C1q humano

Os resultados do nosso trabalho mostram que houve deposição do componente C1 do soro humano, de cão e de rato no epitélio intestinal de *L. longipalpis*, mais especificamente à parte interna dos intestinos médios desses insetos e não do lado externo (FIGURA 13). A deposição de C1 é uma das formas pela qual a via clássica do sistema do complemento pode ser ativada, sendo um indicativo de que essa via poderia estar sendo ativada assim logo após a ingestão de sangue pelo inseto. Não fosse a presença dos vários inibidores ou até mesmo um processo de reparação celular, isso poderia levar a lise de enterócitos.

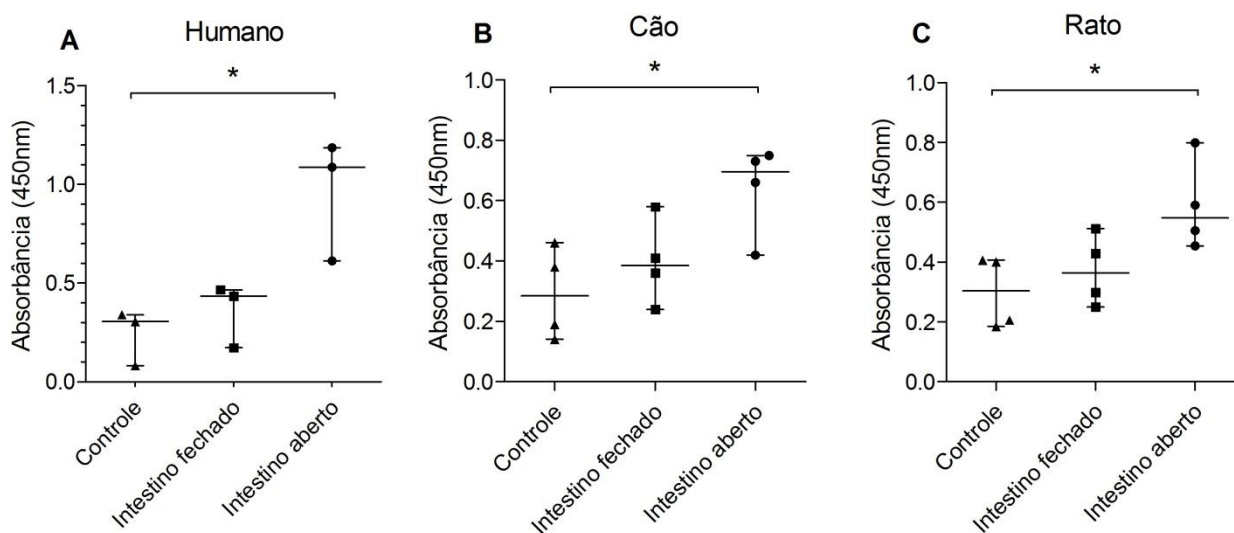


FIGURA 13: Ligação de C1 humano (A), de cão (B) e de rato (C) no epitélio intestinal de *Lutzomyia longipalpis*. O grupo controle é composto por intestinos incubados apenas em solução salina. Os resultados foram expressos como a mediana dos valores obtidos através da leitura no espectrofotômetro e as barras verticais representam os intervalos mínimo-máximo. N=3. (*) representa diferença significativa (Friedman e Dunns, $p < 0.05$) entre os grupos.

6. DISCUSSÃO

6.1 Interação entre o FH e o epitélio do intestino médio de *Lutzomyia longipalpis* e a superfície de parasitos do gênero *Leishmania*

Durante o repasto sanguíneo, os insetos hematófagos são submetidos a uma série de componentes do sistema imune dos animais dos quais se alimentam. Esses insetos devem apresentar estratégias que garantam o sucesso da alimentação frente à homeostase do hospedeiro e após a ingestão do sangue, uma vez que este alimento estará em contato direto com o epitélio intestinal dos insetos, formado por única camada de células e muito sensível a quaisquer danos. Além disso, os flebotomíneos são oportunistas e exercem a hematofagia nos mais variados hospedeiros, tornando-se necessário que os estudos sejam realizados também com modelos vertebrados não humanos.

Nesse contexto, o sistema do complemento é um componente do sistema imune dos vertebrados que deve ter sua ação controlada. Uma das formas de combate à ação lítica do complemento presente no sangue ingerido durante o repasto sanguíneo é a presença de inibidores salivares que são ingeridos juntamente com o alimento. Estudos mostram que a atividade lítica da via clássica do complemento humano, de cão, de rato e de cobaia é inibida frente à presença da saliva de flebotomíneos *L. longipalpis*. Entretanto, apenas a via alternativa do complemento humano é inibida por essa saliva em detrimento à via alternativa de outros vertebrados ensaiados (Cavalcante et al. 2003; Mendes-Sousa et al. 2013). Recentemente, as proteínas salivares SALO e Lufaxin foram descritas como inibidoras das vias clássica e alternativa do complemento humano respectivamente (Ferreira et al., 2016; Mendes-Sousa et al., 2017) contribuindo para avanços nessa área de pesquisa. Apesar de identificadas essas proteínas, é possível que outros mecanismos e moléculas estejam agindo sinergicamente para inibição do dano às células do o epitélio intestinal desses flebotomíneos.

Tal inibição pode ocorrer no trato digestivo de *L. longipalpis* e demais insetos hematófagos, devido ao fato de ser o local que receberá o alimento do repasto sanguíneo. Dados não publicados do nosso grupo de pesquisa mostraram que inibidores solúveis presentes no conteúdo intestinal de *L. longipalpis* são capazes de inibir a via clássica do complemento humano, de cão, de rato e de galinha. Buscando completar esses estudos e expandir o conhecimento sobre os inibidores intestinais solúveis de *L.*

longipalpis, o presente trabalho mostra que o conteúdo intestinal desses insetos não é capaz de inibir a ação da via alternativa do complemento humano, de cão e de rato. Esses resultados estão em concordância com os experimentos feitos com soro de galinha por Mendes-Sousa e colaboradores (2013).

A deficiência de inibidores salivares e inibidores solúveis intestinais da via alternativa do complemento de vertebrados não humanos em *L. longipalpis* indica que o combate à ação hemolítica dessa via possa estar acontecendo ao nível das membranas das células no epitélio intestinal. Uma das possibilidades de inibição do sistema do complemento na superfície celular ocorre através da ligação ao FH que pode tanto competir com o Fator B pela ligação ao C3b, diminuindo a formação de novas convertases da via, ou servindo como cofator para ligação do Fator I e inativação do C3b em iC3b nas convertases já formadas (Rodriguez de Córdoba et al., 2004). A ligação ao FH ocorre em diversas bactérias, fungos, protozoários e até mesmo em vermes (Ferreira et al., 2010). Em insetos, a interação com FH foi investigada utilizando mosquitos do gênero *Anopheles*. Khattab e colaboradores (2010) mostraram que o complemento está ativo no sangue humano ingerido. Entretanto as células do intestino desses insetos não são danificadas, o que foi diretamente relacionado à ligação do FH ao epitélio intestinal dos mosquitos. Além disso, os pesquisadores também comprovaram a ligação do FH de roedores à tais células intestinais (Khattab et al., 2010).

Nossos estudos comprovaram que a ligação do FH humano, de cão e rato ao epitélio intestinal de insetos hematófagos também ocorre em flebotomíneos *L. longipalpis*, dado inédito na literatura. Ainda são desconhecidos os mecanismos que permeiam essa ligação, mas nossos resultados são o primeiro passo da investigação sobre a relação entre o FH e as células epiteliais desses insetos. Além disso, os dados abrangem outros hospedeiros vertebrados além de humanos, que também servem como fonte de repasto aos flebotomíneos. Dados não publicados do nosso grupo de pesquisa mostram que o FH humano também se liga ao epitélio intestinal de *Aedes aegypti*, indicando que possa ser uma das formas utilizadas por vários artrópodes hematófagos para controlar a ação do complemento dos vertebrados.

Além desses artrópodes, os parasitos que em algum momento se desenvolvem em vertebrados também apresentam diversas estratégias para controlar a ação do sistema imune dos hospedeiros, entre elas a ativação do complemento nas suas superfícies celulares. Em espécies de *Schistosoma*, por exemplo, ocorre a expressão de moléculas receptoras do complemento capazes de se ligar ao componente C2 e inibir a

ação da via clássica (Inal & Sim 2000). Além disso, *Schistosoma mansoni* é capaz de sequestrar DAF, outro inibidor da ação do sistema do complemento, do meio em que se encontra e utilizar essa estratégia como mecanismo de evasão (Horta & Ramalho Pinto, 1991). Em tripanosomatídeos, a presença de uma cobertura glicoproteica é uma dos fatores que impedem que eles sejam lisados pela via alternativa do complemento (Ferrante & Allison, 1983). É importante ressaltar que os inibidores salivares e intestinais do complemento de vertebrados presentes em muitos hospedeiros invertebrados de parasitos também funcionam como uma proteção para esses organismos durante a fase de vida em se desenvolvem nos invertebrados.

Além de diversos componentes, o FH também apresenta papel relevante na proteção de protozoários frente ao complemento, impedindo a ação da via alternativa ou o loop de amplificação da cascata iniciada a partir da via clássica. As formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Joiner et al. 1986) e formas sexuadas e assexuadas de *Plasmodium falciparum* (Simon et al. 2013; Rosa et al. 2016) apresentam o FH presente no soro dos vertebrados em que se desenvolvem ou no sangue do repasto ingerido pelos hospedeiros invertebrados ligado à sua superfície. Recentemente nosso grupo de pesquisa também comprovou a existência da ligação do FH humano à superfície de *Leishmania infantum* (dados não publicados). O estudo pioneiro mostrou que tal ligação ocorre nas formas promastigotas, amastigotas e amastigotas *like*.

Durante o desenvolvimento dos protozoários do gênero *Leishmania*, os mesmos podem ser encontrados dentro do intestino dos flebotomíneos, e no espaço extracelular e células do sistema mononuclear fagocitário do hospedeiro vertebrado. Apesar das formas amastigotas estarem protegidas do complemento dentro das células dos vertebrados, nos demais momentos as amastigotas extracelulares e promastigotas estão sujeitas a ação lítica desse componente imune (Pearson & Steigbigel, 1980; Mosser & Edelson, 1984). A metaciclogênese parece conferir mais resistência às formas promastigotas em fase estacionária de desenvolvimento, sendo essas as formas infectantes que entrarão em contato com o soro dos vertebrados (Pinto-da-Silva et al. 2002; Rogers et al. 2002).

No presente trabalho, nossos experimentos com *L. infantum* não mostraram ligação significativa do FH de cão e rato à sua superfície quando comparados grupos incubados com soro (ativo e inativo) e o grupo controle incubado com PBS. Entretanto, é notável a existência de uma tendência de ligação do FH dos vertebrados não humanos verificados às leishmanias. Nas demais espécies de *Leishmania* analisadas, não houve

diferença estatística entre nenhum dos grupos experimentais e seus controles. Em todos os casos também é perceptível uma tendência de ligação do FH de pelo menos alguns dos vertebrados aos protozoários. Apesar de ocorrer a reação cruzada entre o anticorpo anti FH humano e o FH de cão e rato, a menor resposta desse anticorpo em relação aos mamíferos não humanos interfere em nossos resultados. Além disso, o baixo número amostral e a grande amplitude das leituras podem influenciar negativamente a análise estatística.

Apesar dos nossos dados ainda não nos permitem fazer comparações entre as espécies de *Leishmania* analisadas nesse estudo, sugerimos que a ligação ao FH de diferentes vertebrados deve ocorrer de maneira heterogênea, podendo estar relacionada à coevolução entre o parasito e seus hospedeiros a até interferir na patologia causada por determinada espécie de *Leishmania* em diferentes vertebrados. Nascimento e colaboradores (2014) mostraram que promastigotas e amastigotas *like* de *L. infantum* são mais resistentes ao soro de cão do que ao soro humano, ou seja, esses protozoários têm mais sucesso na infecção dos canídeos. Esses dados estão em concordância com o fato de os cães domésticos serem os reservatórios mais relevantes na epidemiologia da LVA, sendo considerados a principal fonte de infecção para o vetor nas regiões urbanas e peri-urbanas (Costa-Val et al. 2007).

A tendência de ligação ao FH humano, de cão e de rato aos parasitos do gênero *Leishmania* foi detectada quando incubados em soro normal, soro inativado com EDTA e até mesmo FH humano purificado. A ligação do FH dos soros inativados sugere que o processo ocorra nesses parasitos de forma independente do sistema complemento e pode estar relacionada à existência de um possível receptor para esta proteína reguladora na membrana plasmática de *Leishmania*. Apesar da ligação ao FH ocorrer com a incubação em soro inativado, os parasitos parecem se ligar mais ainda com o soro ativado, sugerindo que a própria formação das C3b convertases age como um receptor adicional nesse processo.

Sabe-se que os glicolipídios e lipofosfoglicanos (LPG) abundantes na superfície das leishmanias conferem maior resistência à lise pelo soro humano (Spath et al., 2003). A proteína de membrana GP63 também é um fator de virulência desses protozoários, pois aumenta a ligação do C3 aos organismos, é capaz de inativar essa molécula em iC3b e sua ausência gera maior sensibilidade ao complemento (Brittingham et al. 1995; Joshi et al., 2002). Além disso, a expressão aumentada de outra glicoproteína de membrana presente nestes protozoários, a GP46 (PSA), também vem sendo implicada

como mecanismo de resistência à lise pelo complemento (Lincoln et al., 2004). Se houver ligação do FH à superfície das leishmanias, qualquer uma dessas moléculas ou até mesmo moléculas ainda desconhecidas podem estar funcionando como receptor para o fator.

A inibição da atividade lítica do complemento parece ocorrer de maneira multifatorial de modo a garantir que a proteção ocorra tanto nos flebotomíneos quanto nos protozoários. Além das moléculas ou mecanismos já conhecidos (inibidores salivares SALO e Lufaxin, e inibidores solúveis intestinais), sugerimos que a ligação ao FH em *L. longipalpis* e em *L. infantum* age de maneira sinérgica com as outras formas de proteção contra o complemento de modo a permitir que esses seres vivos continuem a se beneficiar da interação com os vertebrados.

A existência de um receptor para o FH leva a possibilidade de uso do mesmo como um componente vacinal. Anticorpos produzidos contra o receptor do FH interfeririam na ligação do FH ao epitélio intestinal dos artrópodes hematófagos e à superfície dos parasitos, bloqueando esse mecanismo de proteção. Os flebotomíneos e as formas metacíclicas ao entrarem em contato com o sangue dos vertebrados durante o repasto sanguíneo não poderiam utilizar mais este mecanismo, e tornariam-se mais susceptíveis ao ataque do sistema complemento. O mesmo aconteceria com as formas amastigotas durante sua transmissão do vertebrado para o inseto vetor, momento este único em seu ciclo em que as amastigotas entram em contato direto com o sangue, e conseqüentemente com os fatores líticos do complemento em mais alta concentração. Obviamente, para um melhor funcionamento, esta vacina deveria contar com outros antígenos, tais como os inibidores das vias clássica e alternativa.

6.2 Ligação do componente C1 ao epitélio intestinal de *Lutzomyia longipalpis*

A ativação da via clássica do sistema do complemento é tradicionalmente iniciada quando o complexo C1 (composto pelas proteínas C1q, C1r e C1s) reconhece imunocomplexos com anticorpos do tipo IgM ou IgG (Sim & Dodds, 1997). Os resultados obtidos em nosso trabalho mostram que não houve ativação da cascata da via clássica do complemento mediada pela ligação de anticorpos naturais humanos da classe IgG ao epitélio intestinal de *L. longipalpis*. Os anticorpos IgM não foram ensaiados e pode estar havendo deposição dos mesmos nesses intestinos. Entretanto, se sabe que outras moléculas além dos anticorpos são ativadoras da via clássica do sistema do complemento. O C1q também é capaz de se ligar aos PAMPs presentes em patógenos e o C1 pode ser ativado ao se ligar à pentraxinas ou a receptores de macrófagos do fígado, por exemplo (Pangburn et al., 2008).

Dados não publicados do nosso grupo de pesquisa mostram que o sistema do complemento foi ativado no intestino de *L. longipalpis pelo epitélio* na ausência de inibidores solúveis. Também sabemos que moléculas do fator C3 se encontram no intestino de fêmeas alimentadas naturalmente com sangue em sua forma não ativada (C3) indicando que em condições naturais os inibidores foram suficientes para não permitir a ativação do complemento após a ingestão do sangue. Nessas fêmeas, algumas moléculas de C3 chegaram a ser ativadas até C3b no intestino, porém, rapidamente foram inativadas até iC3b. Entretanto ainda não existem dados sobre a ativação de cada uma das vias separadamente.

O presente estudo detectou a ligação de C1 do soro humano, de cão e rato ao intestino médio dos flebotomíneos, sendo possível supor que a via clássica poderia ser disparada por esse caminho. Entretanto a mesma pode ser inibida pelo inibidor salivar de via clássica SALO, normalmente ingerido com o sangue, e pelos inibidores solúveis intestinais (Cavalcante et al., 2003; Mendes-Sousa et al., 2013; Ferreira et al., 2016). A existência desses inibidores é inclusive uma evidência evolutiva de que houve a necessidade do controle da ativação da via clássica do complemento de vertebrados dentro dos flebotomíneos para que as células intestinais desses insetos não sofressem danos.

Bactérias gram-negativas como *E. coli* apresentam componentes em sua membrana capazes de inibir a ativação a via clássica por meio de C1 e assim contribuir para a resistência à atividade lítica do complemento (Morrison & Kline, 1977; Jack and

Turner, 2003; Shang et al., 2005). Essas bactérias também são capazes de inibir a ação da via clássica no início da cascata através da mimetização do receptor humano solúvel de C1q, que se liga a essa molécula, impedindo que ela se una ao C1r e C1s, formando o complexo C1 funcional (van den Berg et al., 1996). Além disso, existem evidências que até mesmo o FH contribui para a inibição da via clássica ao se ligar a um conhecido lipídio ativador do complemento presente na membrana de tais bactérias (Tan et al., 2011).

Nossos dados ainda são preliminares sendo necessário o aprofundamento nas pesquisas relacionadas à ligação de C1 ou parte dele ao epitélio intestinal de flebotomíneos como forma de ativação da via clássica do complemento ou até mesmo como forma de inibição dessa ativação.

CONCLUSÕES

- Os inibidores solúveis presentes no conteúdo intestinal de *Lutzomyia longipalpis* não são capazes de inibir a via alternativa do sistema do complemento humano, de cão e de rato;
- O Fator H presente no soro humano, de cão e de rato se liga à superfície interna do intestino médio de *Lutzomyia longipalpis*;
- O FH de cão e rato não se liga de maneira significativa à superfície de *Leishmania infantum*, ao contrário do FH humano, porém é notável a existência de uma tendência de ligação do FH dos vertebrados não humanos verificados às leishmanias.
- O FH humano, de cão e de rato não se ligou de maneira significativa às demais espécies de *Leishmania* analisadas (*L. brazieliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. mexicana*, *L. shawi* e *L. major*), porém também é perceptível uma tendência de ligação do FH de pelo menos alguns dos vertebrados aos protozoários.
- Não houve deposição de anticorpos naturais de humanos da classe IgG no epitélio intestinal de *Lutzomyia longipalpis*;
- O C1 presente no soro humano, de cão e de rato se liga à superfície interna do intestino médio de *Lutzomyia longipalpis*.

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.

ALVAR J, VÉLEZ DI, BERN C, HERRERO M, DESJEUX P, CANO J, JANNIN J, BOER M, WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *Plos One* 7 (5): e35671.

ARIAS JR, MILES MA, NAIFF RD, POVOA MM, DE FREITAS RA, BIANCARDI CB, CASTELLON EG 1985. Flagellate infections of Brazilian sand flies (Diptera: Psychodidae): isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania*. *Am J Trop Med Hyg* 34 (6): 1098-1108.

ASHFORD RW 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 30: 1269-1281.

BANETH G, AROCH I 2008. Canine leishmaniasis - a diagnostic and clinical challenge. *Vet. J.* 175:14-15.

BANETH G, KOUTINAS AF, SOLANO-GALLEGO L, BOURDEAU P, FERRER L 2008. Canine Leishmanioses – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitol.* 24: 324-330.

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, ASSUMPTIÃO 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.

BATES PA 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Inter J for Parasit* 37: 1097-1106.

BERRAHAL F, MARY C, ROZE M, BERENGER A, ESCOFFIER K, LAMOUREUX D, DUNAN S 1996. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am. J Trop Med Hyg* 55: 273-277.

BILLINGSLEY PF, LEHANE MJ 1996. Biology of the insect midgut. Chapman & Hall, Cambridge. <http://dx.doi.org/10.1007/978-94-009-1519-0>.

BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE 2003. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. Editora do Ministério da Saúde, Brasília, 120 pp.

BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE 2006. *Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana Diagnóstico clínico e diferencial*. Editora do Ministério da Saúde, Brasília, 136 pp.

BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE 2007. *Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Editora do Ministério da Saúde, Brasília, 180 pp. 111

BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE 2011. *Manual de vigilância da Leishmaniose Visceral*. Editora do Ministério da Saúde, Brasília, 78 pp.

BRITTINGHAM A, MORRISON CJ, MCMASTER WR, MCGWIRE BS, CHANG K-P, MOSSERJ DM 1995. Role of the Leishmania Surface Protease gp63 in Complement Fixation, Cell Adhesion, and Resistance to Complement-mediated Lysis. *Immunol*. 155(3): 102-3.

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.

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

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.

CHEN CB, WALLIS R 2004. Two mechanisms for mannose-binding protein modulation of the activity of its associated serine proteases. *J of Biol Chemistry* 279: 26058-26065.

COSTA-VAL AP, CAVALCANTI RR, GONTIJO NF, MICHALICK MSM, ALEXANDER B, WILLIAMS P, MELO MN 2007. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *The Vet Journal*. 174: 636-643.

COSTA CH, WERNECK GL, RODRIGUES JR L, SANTOS MV, ARAUJO IB, MOURA LS, MOREIRA S, GOMES RB, LIMA SS 2005. Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 99: 229-236.

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 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92: 239-243.

- 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.
- DOSTÁLOVÁ A, VOLF P 2012. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & Vectors*. 5:276.
- DUNKELBERGER JR, SONG WC 2010. Complement and its role in innate and adaptive 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.
- FERRANTE A, ALLISON AC 1983. Alternative pathway activation of complement by African trypanosomes lacking a glycoprotein coat. *Par Immunol* 5, 491-498.
- FERREIRA VP, PANGBURN MK, CORTÉS C 2010. Complement control protein factor H: The good, the bad, and the inadequate. *Mol Immunol* 47: 2187–2197.
- FERREIRA VP, VALE VF, PANGBURN MK, ABDELADHIM M, MENDES-SOUSA AF, COUTINHO-ABREU IV, RASOULI M, BRANDT EA, MENESES C, LIMA K, ARAÚJO RN, PEREIRA MH, KOTSYFAKIS M, OLIVEIRA F, KAMHAWI S, RIBEIRO JMC, GONTIJO NF, COLLIN N, VALENZUELA JG 2016. SALO, a novel classical pathway complement inhibitor from saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Scientific reports*, 6:19300 10.1038/srep19300.
- FISA R, GALLEGO M, CASTILLEJO S, AISA MJ, SERRA T, RIERA C, CARRIO J, GALLEGO J, PORTUS M 1999. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. *Vet. Parasitol.* 83, 87–97.
- FRANCO PF, SILVA NCS, VALE VF, ABREU J, SANTOS V, GONTIJO NF, VALENZUELA JG, PEREIRA MH, SANT'ANNA MRV 2016. Inhibition of the classical pathway of the complement system by saliva of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Exp Parasitology* 164: 91-96.
- GABORIAUD C, THIELENS NM, GREGORY LA, ROSSI V, FONTECILLA-CAMPS JC, ARLAUD GJ 2004. Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle. *Trends in Immunol* 25: 368-373.
- 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.

GONTIJO B, CARVALHO MLR 2003. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop* 36(1): 71-80.

GONTIJO CMF, MELO MN 2004. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. *Rev Bras Epidemiol* 7: 338-349.

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

HORTA MF, RAMALHO-PINTO FJ 1991. Role of human decay-accelerating factor in the evasion of *Schistosoma mansoni* from the complement-mediated killing in vitro. *J Exp Med.* 174(6):1399-1406.

INAL JM, SIM RB 2000. A *Schistosoma* protein, Sh-TOR, is a novel inhibitor of complement which binds human C2. *FEBS Lett.* 470 (2):131-4.

JANEWAY CA JR, TRAVERS P, WALPORT MJ, SHLOMCHIK M 2005. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, Vol. VI, Garland Publishing, New York, 547pp.

JOINER K, SHER A, GAITHER T, HAMMER C 1986. Evasion of alternative complement pathway by *Trypanosoma cruzi* results from inefficient binding of factor B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6593-6597.

JOSHI PB, KELLY BL, KAMHAWI S, SACKS DL, MCMASTER WR 2002. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Mol Biochem Parasitol* 120: 33-40.

KAMHAWI S 2006. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol* 22: 439-445.

KAWASAKI N, KAWASAKI T, YAMASHINA I 1983. Isolation and characterization of a mannan-binding protein from human-serum. *Journal of Biochemistry* 94: 937-947.

KHATTAB A, BARROSO M, MIETTINEN T, MERI S 2015 Anopheles Midgut Epithelium Evades Human Complement Activity by Capturing Factor H from the Blood Meal. *PLoS Negl Trop Dis* 9(2): e0003513. doi:10.1371/journal.pntd.0003513

KIERSZENBAUM F, LIMA MF 1983. Susceptibility of Insect-Borne, Metacyclic Forms of *Trypanosoma Cruzi* to Antibody-Mediated Mechanisms of Destruction. *Ame Jour Trop Med Hygi* 32(6): 1236-1241.

KILLICK-KENDRICK R 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology* 17: 279-289.

KIPNIS TL, DAVID JR, ALPER CA, SHER A, da SILVA WD 1981. Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. *PNAS* 78(1): 602-605.

- KLOS A, TENNER AJ, JOHNSWICH KO, AGER RR, REIS ES, KOEHL J 2009. The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol Immunol* 46: 2753-2766.
- LAINSON R. 2010. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev Pan-Amaz Saude* 1: 13-32.
- LAINSON R & SHAW JJ 1998. New World Leishmaniasis - The Neotropical *Leishmania* species, p. 242-266. In: Cox, F.E.G., J.P. Kreier & D. Wakelin (Eds.). Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Parasitology, 701p.
- LAINSON R, READY PD, SHAW JJ 1979. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian "uta", as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B. Biological Science* 206 (1164): 307-318.
- LAINSON R, SHAW JJ 1987. *Evolution, classification and geographical distribution*. In: Peters W, Killick-Kendrick R (eds), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine* 1: 1- 120.
- LAWRIE CH, RANDOLPH SE, NUTTALL PA 1999. *Ixodes* Ticks: Serum Species Sensitivity of Anticomplement Activity. *Exp Parasitol* 93: 207-214.
- LINCOLN LM, OZAKI M, DONELSON JE, BEETHAM JK 2004. Genetic complementation of *Leishmania* deficient in PSA (GP46) restores their resistance to lysis by complement. *Mol Bioch Par* 137: 185-189.
- LINDOSO JAL, LINDOSO AABP 2009. Neglected tropical diseases in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo* 51 (5) 247-253.
- LISZEWSKI MK, FARRIES TC, LUBLIN DM, ROONEY IA, ATKINSON JP 1996. Control of the complement system. *Adv Immunol*. 61:201-283.
- LUTZ A, NEIVA A 1912. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. *Mem. Inst. O. Cruz.* 4:84-95.
- 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.
- MEDZHITOV R, JANEWAY C JR 2000. Innate immunity. *N Engl J Med*. 343: 338-344.
- MENDES-SOUSA AF, VALE VF, SILVA NCS, GUIMARAES-COSTA AB, PEREIRA MH, SANT'ANNA MRV, OLIVEIRA F, KAMHAWI S, RIBEIRO JMC, ANDERSEN JF, VALENZUELA JG AND ARAUJO RN 2017. The Sand Fly Salivary Protein Lufaxin Inhibits the Early Steps of the Alternative Pathway of Complement by Direct Binding to the Proconvertase C3b-B. *Front. Immunol*. 8:1065. doi: 10.3389/fimmu.2017.01065

MENDES-SOUSA AF, NASCIMENTO A, QUEIROZ DC, VALE VF, FUJIWARA RT, ARAÚJO RN, PEREIRA MH, GONTIJO NF 2013. Different host complement systems and their interactions with saliva from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) and *Leishmania infantum* promastigotes. *PloS One*. 8(11): e79787.

MENDES-SOUSA AF, QUEIROZ DC, VALE VF, RIBEIRO JMC, VALENZUELA JG, GONTIJO NF, ANDERSEN JF 2016. An Inhibitor of the Alternative Pathway of Complement in Saliva of New World Anopheline Mosquitoes. *J Immunol*. 197: 000–000.

MERI T, JOKIRANTA TS, HELLWAGE J, BIALONSKI A, ZIPFEL PF, MERI S 2002. *Onchocerca volvulus* microfilariae avoid complement attack by direct binding of factor H. *J of Infect Diseases* 185: 1786-1793.

MIKA A, REYNOLDS SL, MOHLIN FC, WILLIS C, SWE PM, PICKERING DA, HALILOVIC V, WIJEYEWICKREMA LC, PIKE RN, BLOM AM, KEMP DJ, FISCHER K 2012. Novel scabies mite serpins inhibit the three pathways of the human complement system. *PLoS One* 7(7): e40489.

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.

MOLYNEUX DH, MOORE J, MAROLI M 1991. Sugars in sandflies. *Parassitologia* 33: 431-6.

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.

MORRISON DC, KLINE LF 1977. Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharides (LPS). *J Immunol* 118(1): 362-368.

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

NASCIMENTO, A. A. S. Mecanismos de evasão de *Leishmania infantum* ao ataque do sistema complemento: o papel da saliva de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) e da captação da proteína reguladora fator H. 2015. 113f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

NEVES DP, MELO AL, LINARDI PM, VITOR RWA 2016. Parasitologia Humana. 13ª edição. Atheneu, São Paulo, SP, Brasil.

NILSSON UR, MUELLER-EBERHARD HJ 1965. Isolation of Beta IF-Globulin from human serum and its characterization as the fifth component of complement. *J. Exp. Med.* (1)122: 277-298.

NOGUEIRA N, BIANCO C, COHN Z 1975. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med* 142: 224-229

NONAKA M, YOSHIZAKI F 2004. Primitive complement system of invertebrates. *Immunological Reviews.* 198: 203-215.

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.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE 2017. Leishmaniasis – Fact Sheet. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en>. Acesso em: 15 fev. 2017.

OOI C-P, HAINES LR, SOUTHERN DM, LEHANE MJ, ACOSTA-SERRANO A (2015) Tsetse GmmSRPN10 Has Anti-complement Activity and Is Important for Successful Establishment of Trypanosome Infections in the Fly Midgut. *PLoS Negl Trop Dis* 9(1): e3448. doi:10.1371/journal.pntd.0003448

PANGBURN MK, FERREIRA VP, CORTES C 2008. Discrimination between Host and Pathogens by the Complement System. *Vaccine* 26(8): I15-I21.

PEARSON RD, STEIGBIGEL RT 1980. Mechanism of lethal effect of human serum upon *Leishmania donovani*. *J. Immunol.*

PETERS NC, EGEN JG, SECUNDINO N, DEBRABANT A, KIMBLIN N, KAMHAWI S, LAWYER P, FAY MP, GERMAIN RN, SACKS D 2008. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science.* 321(5891): 970-974.

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

PINTO-DA-SILVA LH, CAMURATE M, COSTA KA, OLIVEIRA SM, DA CUNHA-E-SILVA NL, SARAIVA EM 2002. *Leishmania (Viannia) braziliensis* metacyclic promastigotes purified using *Bauhinia purpurea* lectin are complement resistant and highly infective for macrophages in vitro and hamsters in vivo. *Int J Parasitol.* 32(11): 1371-7.

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.

QUEIROZ, D. C. Caracterização da atividade do conteúdo intestinal de *Lutzomyia longipalpis* sobre a via clássica do sistema complemento de hospedeiros vertebrados. 2016. 31f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.

QUINNEL RJ, DYE C, SHAW JJ 1992. Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. *Med Vet Entomo* 6: 195- 200.

READY P 2013. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Annual Rev Entomology* 58: 227-250.

REITHINGER R, DUJARDIN JC, LOUZIR H, PIRMEZ C, ALEXANDER B, BROOKER S 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 7(9): 581-596.

RIBEIRO JM 1987. *Ixodes dammini*: salivary anti-complement activity. *Exp Parasitol* 64: 347-353.

RICKLIN D, HAJISHENGALLIS G, YANG K, LAMBRIS JD 2010. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 11: 785- 797.

RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA S, ESPARZA-GORDILLO J, GOICOECHEA DE JORGE E, LOPEZ-TRASCASA M, SÁNCHEZ-CORRAL P 2004. The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. *Mol Immunol*. 41(4): 355–367.

ROGERS ME, CHANCE ML, BATES PA 2002. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*. 124: 495-507.

ROGERS ME, ILG T, NIKOLAEV AV, FERGUSON MA, BATES PA 2004. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 430: 463–467.

ROSA TFA, FLAMMERSFELD A, NGWA CJ, KIESOW M, FISCHER R, ZIPFEL PF, SKERKA C, PRADEL G 2016. The Plasmodium falciparum blood stages acquire factor H family proteins to evade destruction by human complement. *Cell Microbiol* 18(4): 573-590.

ROVERSI P, LISSINA O, JOHNSON S, AHMAT N, PAESEN GC, PLOSS K, BOLAND W, NUNN MA, LEA SM 2007. The structure of OMCI, a novel lipocalin inhibitor of the complement system. *J Mol Biol* 369(3): 784-793.

RUDIN W, HECKER H 1982. Functional morphology of the midgut of a sandfly as compared to other hematophagous Nematocera. *Tissue & Cell*, 14: 751-758.

SACKS DL, SARAIVA EM, ROWTON E, TURCO SJ, PIMENTA PFP 1994. The role of lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence. *Parasitol*. 108, S55–S62.

SCHMIDT CQ, HERBERT AP, KAVANAGH D, GANDY C, FENTON CJ, BLAUM BS, LYON M, UHRIN D, BARLOW PN 2008. A new map of glycosaminoglycan and C3b binding sites on factor H. *J. Immunol.* 181(4): 2610-2619.

SCHROEDER H, SKELLY P, ZIPFEL PF, LOSSON B, VANDERPLASSCHEN A 2009. Subversion of complement by hematophagous parasites. *Dev Comp Immunol* 33: 5-13.

SHARMA U, SINGH S 2008. Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis* 45: 255-272.

SHERLOCK I 2003. A Importância dos flebotomíneos. In: Rangel EF e Lainson R, Flebotomíneos do Brasil, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 15-22.

SILVA NC, VALE VF, FRANCO PF, GONTIJO NF, VALENZUELA JG, PEREIRA MH, SANT'ANNA MR, RODRIGUES DS, LIMA WS, FUX B, ARAUJO RN 2016. Saliva of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) inhibits classical and alternative complement pathways. *Parasit Vectors* 9(1):445

SIM RB, DODDS AW 1997. The complement system: an introduction. In: Dodds AW, Sim RB (ed.) *Complement: a practical approach*. Oxford University Press., Cap 1, p.1-18.

SIM RB, LAICH A 2000. Serine proteases of the complement system. *Biochem Soc Trans* 28: 545-550.

SIMON N, LASONDER E, SCHEUERMAYER M, KUEHN A, TEWS S, FISCHER R, ZIPFEL PF, SKERKA C, PRADEL G 2013. Malaria Parasites Co-opt Human Factor H to Prevent Complement-Mediated Lysis in the Mosquito Midgut. *Cell Host & Microbe* 13: 29-41.

SOARES RPP, TURCO SJ 2003. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *An Acad Bras Cienc* 75: 301-330.

SPETH GF, GARRAWAY LA, TURCO SJ, BEVERLEY SM 2003. The role(s) of Lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *PNAS* 100(16): 9536-9541.

TAN LA, YANG AC, KISHORE U, SIM RB 2011. Interactions of complement proteins C1q and factor H with lipid A and Escherichia coli: further evidence that factor H regulates the classical complement pathway. *Protein Cell* 2(4): 320-332.

TEODORO U, LONARDONI MVC, SILVEIRA TGV, DIAS AC, ABBAS M, ALBERTON D, SANTOS DR 2007. Luz e galinhas como fatores de atração de *Nyssomyia whitmani* em ambiente rural, Paraná, Brasil. *Rev Saude Publica* 41: 383-388.

TEODORO U, SILVEIRA TGV, SANTOS DR, SANTOS ES, SANTOS AR, OLIVEIRA O, KÜHL JB 2001. Frequência da fauna de flebotomíneos no domicílio e em abrigos de animais domésticos no peridomicílio, nos municípios de Cianorte e

Doutor Camargo, Estado do Paraná, Brasil. *Revista de Patologia Tropical* 30(2): 209-224.

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.

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

VALE ECS, FURTADO T 2005. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. *An Bras Dermatol* 80: 421-428.

VALENZUELA JG, CHARLAB R, MATHER TN, RIBEIRO JMC 2000. Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *Journal of Biological Chemistry* 275: 18717-18723.

VAN DEN BERG RH, FABER-KROL MC, VAN DE KLUNDERT JA, VAN ES LA, DAHA MR 1996. Inhibition of the hemolytic activity of the first component of complement C1 by an *Escherichia coli* C1q binding protein. *J Immunol* 156: 4466-4473.

WILLIAMS P 1989. Patterns in the geographical distribution of members of the genus *Lutzomyia*. *Contributions to the Knowledge of Diptera.* 1: 455-502.

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

ZIPFEL PF, SKERKA C 2009. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol.* 9 (10): 729 – 740.