

ALTAIR ROGERIO AMBROSIO

***Leishmania (Viannia) braziliensis*: Ativação do sistema complemento e interação com a Lectina Ligante da Manose (MBL).**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciência Farmacêuticas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Iara Taborda de
Messias Reason

CURITIBA
2005

A Andréa, Isadora e João Eduardo, razão do meu viver
A minha mãe e meus irmãos, com amor
A meu pai, com saudade eterna.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Iara Taborda de Messias-Reason, pela sabedoria na orientação desta dissertação. Agradeço também pelos ensinamentos técnicos e outros que me fez engrandecer como estudante e como ser humano.

À Professora Dra. Shirley Ramos da Rosa Utiyama, pela amizade e apoio no desenvolvimento do trabalho.

Ao Farmacêutico Bioquímico Renato Mitsunori Nisihara, pelo apoio junto ao Laboratório de Imunopatologia e pela amizade de muitos anos.

Aos Funcionários do Laboratório de Imunopatologia, pela cooperação na execução do trabalho.

Ao Professor Dr Marco Antonio Ferreira Randi, pelo apoio na obtenção das fotografias em microscopia confocal.

Ao Professor Dr Michael Kirschfink, pelo fornecimento do complexo MBL-MASP purificado.

Aos Drs Mario Stendel e Jose Hermenio Cavalcante Lima Filho, pelo fornecimento da cepa de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904).

A Farmacêutica Bioquímica Luine Tsuchia, pela cooperação na execução do trabalho.

Ao Laboratório de Imunogenética do Hospital de Clínicas da UFPR, pelo fornecimento do meio para cultivo dos parasitas.

As colegas de mestrado Elizandra Grangero e Luciana Dorneles pelo companheirismo e amizade durante o curso.

A Coordenação e Funcionários do Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo empenho e dedicação que têm conduzido o curso.

À Professora Dra Sandra Barreira, pela amizade e por acreditar que seria possível a execução deste trabalho.

Ao Departamento de Biologia Celular da UFPR, por permitir a utilização do microscópio confocal.

Agradeço especialmente a minha família Andréa minha esposa, Isadora e João Eduardo meus filhos, pela paciência e compreensão durante o desenvolvimento deste projeto.

E acima de tudo e sem o qual nada seria possível eu agradeço a Deus.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GERAL.....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1 LEISHMANIOSE.....	4
3.1.1 Ciclo biológico e transmissão	4
3.1.2 <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	6
3.1.3 Leishmaniose tegumentar americana.....	7
3.1.4 Leishmaniose mucocutânea.....	7
3.1.5 Epidemiologia.....	9
3.1.6 Imunologia na LTA	11
3.2 SISTEMA COMPLEMENTO.....	13
3.2.1 Via clássica.....	15
3.2.2 Via alternativa.....	16
3.2.3 Via das Lectinas.....	19

3.2.4 Via final efetora.....	19
3.2.5 Consequências biológicas da ativação do complemento.....	21
3.2.5.1 Lise de membranas celulares.....	21
3.2.5.2 Opsonização e fagocitose.....	22
3.2.5.3 Solubilização e remoção de complexos imunes.....	23
3.2.5.4 Remoção de células apoptóticas.....	24
3.2.5.5 Interface entre a imunidade inata e adaptativa.....	24
3.2.5.6 Efeito pró-inflamatório.....	24
3.2.5.7 Outros efeitos.....	25
3.2.6 O complemento na Patogenia das Doenças.....	26
3.2.7 MBL.....	28
3.2.7.1 Estrutura da MBL.....	29
3.2.7.2 Funções da MBL.....	32
3.2.7.3 Ligação da MBL a microorganismos.....	33
3.2.7.4 Associação da MBL com doenças.....	35
3.3 COMPLEMENTO E LEISHMANIOSE.....	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1 Parasitas.....	40
4.2 Complexo MBL-MASP purificado.....	40
4.3 Fonte de complemento e de MBL humana.....	40
4.4 Adsorção do SHN.....	41
4.5 Inativação do complemento no SHN.....	42
4.6 Ensaio de adesão da MBL purificada a promastigotas da <i>L. braziliensis</i>	42
4.7 Ensaio de inibição da adesão da MBL purificada a <i>L. braziliensis</i>	43

4.8 Ensaio de adesão da MBL humana a promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	44
4.9 Adesão de C1q, C4 e C3 na superfície da <i>L. braziliensis</i>	46
4.10 Efeito lítico do complemento sobre promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	47
5 RESULTADOS	50
5.1 Adesão da MBL purificada a superfície da <i>L. braziliensis</i>	50
5.2 Inibição da adesão da MBL purificada.....	52
5.3 Adesão da MBL plasmática humana as promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	54
5.4 Adesão de C1q, C4 e C3 na superfície do parasita.....	56
5.5 Efeito lítico do complemento	59
5.5.1 Participação da via alternativa na lise da <i>L. braziliensis</i>	59
5.5.2 Influência da MBL no efeito lítico do complemento sobre a <i>L. braziliensis</i>	60
5.5.3 Verificação da capacidade de crescimento da <i>L. braziliensis</i> após ensaio de lise..	61
6 DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – CICLO EVOLUTIVO DA <i>LEISHMANIA</i>	5
FIGURA 02 – FORMA AMASTIGOTA	5
FIGURA 03 – FORMA PROMASTIGOTA	6
FIGURA 04 – TRANSMISSOR DA <i>LEISHMANIA</i>	8
FIGURA 05 – PACIENTE COM LEISHMANIOSE.....	8
FIGURA 06 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA LEISHMANIOSE	10
FIGURA 07 – VIAS DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO	18
FIGURA 08 – ESTRUTURA DA MBL.....	31
FIGURA 09 – OLIGOMERIZAÇÃO DA MBL.....	32
FIGURA 10 – FUNÇÕES DA MBL	34
FIGURA 11 – ESQUEMA DO ENSAIO DE ADESÃO DA MBL PURIFICADA .	43
FIGURA 12 – ESQUEMA DO ENSAIO DE ADESÃO DA MBL HUMANA	45
FIGURA 13 – ESQUEMA DA DEPOSIÇÃO DE C1Q, C3 E C4.....	47
FIGURA 14 – IMUNOFLUORESCÊNCIA DA LIGAÇÃO DA MBL PURIFICADA	51
FIGURA 15 – IMUNOFLUORESCÊNCIA DO CONTROLE NEGATIVO DA LIGAÇÃO DA MBL PURIFICADA	52
FIGURA 16 – IMUNOFLUORESCÊNCIA DA INIBIÇÃO DA ADESÃO DA MBL PURIFICADA.....	53
FIGURA 17 – IMUNOFLUORESCÊNCIA DA LIGAÇÃO DA MBL HUMANA	55
FIGURA 18 – IMUNOFLUORESCÊNCIA DO CONTROLE NEGATIVO DA LIGAÇÃO DA MBL HUMANA.....	56

FIGURA 19 – IMUNOFLUORESCÊNCIA DA DEPOSIÇÃO DE C3 E DO EFEITO LÍTICO DO COMPLEMENTO	58
FIGURA 20 – VIABILIDADE DA <i>L. braziliensis</i> APÓS INTERAÇÃO COM SORO HUMANO NORMAL	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – DEPOSIÇÃO DE C1q, C4 E C3 NA <i>L. braziliensis</i> APÓS INTERAÇÃO COM SORO HUMANO NORMAL.....	56
TABELA 02 – EFEITO NA MOBILIDADE APÓS INTERAÇÃO COM SORO HUMANO NORMAL	58
TABELA 03 – INFLUÊNCIA DA MBL NO EFEITO LÍTICO DO COMPLEMENTO	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	- Soro albumina bovina
CR1	- Receptor do complemento tipo 1
CR3	- Receptor do complemento tipo 3
CR5	- Receptor do complemento tipo 5
CRD	- Domínio de reconhecimento de carboidrato
CI	- Complexo imune
EBV	- Vírus Epstein Baar
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetraacético
EGTA	- Ácido etileno glicol-bis β -aminoetileter N,N,N,N-tetraacético
ELISA	- Enzima imunoensaio
GIPL	- Fosfolipídio glicoinositol
LES	- Lúpus eritematoso sistêmico
LMC	- Leishmaniose mucocutânea
LPG	- Lipofosfoglicana
LTA	- Leishmaniose tegumentar americana
MAC	- Complexo de ataque a membrana
MASP-1	- Serina protease 1 associada a MBL
MASP-2	- Serina protease 2 associada a MBL
MBL	- Lectina ligante da manose
SFM	- Sistema fagocítico mononuclear
SHN	- Soro humano normal
SHN-MBL	- Soro humano normal com MBL superior a 3000 ng/ml
SHN-DEF	- Soro humano normal com MBL inferior a 10 ng/ml
SHN-EDTA	- Soro humano normal tratado com 10 mM de EDTA
SHN-EGTA	- Soro humano normal tratado com 10 mM de EGTA
SHN-I	- Soro humano normal inativado
TNF	- Fator de necrose tumoral

RESUMO

A *Leishmania (Viannia) braziliensis*, é o agente causador da leishmaniose cutânea mucosa, doença endêmica em algumas regiões do Brasil, que representa um grande problema de saúde pública para o país. A ativação do complemento na superfície de promastigotas de *Leishmania* é um importante fator para a infectividade do parasita em hospedeiros mamíferos, permitindo o seu ataque e invasão de macrófagos via receptores do complemento. A Lectina Ligante da Manose (MBL), possui a capacidade de ativar o complemento e também atua como uma eficiente opsonina. Neste estudo investigou-se a interação de MBL purificada com a superfície de promastigotas da *L. braziliensis* e a deposição de MBL, C1q, C4 e C3 na superfície do parasita após interação com soro humano normal (SHN), não imune. Foi também avaliada a influência das vias clássica, alternativa e das lectinas no efeito lítico do complemento sobre os parasitas. Observou-se que tanto a MBL do soro como o complexo MBL-MASP purificado ligam-se à superfície da *L. braziliensis*, através de ensaios de imunofluorescência e de inibição utilizando-se anticorpo monoclonal anti-MBL humana e microscopia confocal. A ligação da MBL demonstrou ser específica para manose presente na superfície do parasita. Foi também observado que a deposição da MBL na superfície da *L. braziliensis* não alterou o efeito lítico do complemento sobre os parasitas. Deposição de C1q, C4 e C3 foi observada após incubação do parasita com SHN. Ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), mas não ácido etileno glicol-bis β-aminoetileter N,N,N,N-tetraacético (EGTA) inibiram a deposição de C3 na superfície do parasita, indicando o envolvimento da via alternativa neste processo. Esses resultados indicam que a MBL pode ligar-se a *L. braziliensis* através de carboidrato específico na superfície do parasita e fornece evidências para um mecanismo de ativação do complemento independente de anticorpo.

Palavras Chave: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, MBL, complemento, lectina-ligante da manose, via clássica, via alternativa.

ABSTRACT

Leishmania (Viannia) braziliensis (L.braziliensis) is the causative agent of mucocutaneous leishmaniasis, a disease that presents high endemicity in some regions of Brazil that represents a major public health problem for the country. Activation of complement on the surface of *Leishmania* promastigotes appears to be an important factor for parasite infectivity in the mammalian host, allowing their attachment and invasion of macrophages via complement receptors. Mannan-binding lectin (MBL) is a well-known complement activator and an efficient opsonine. In this study, we have investigated whether serum and purified MBL bind to live promastigotes of *L. braziliensis* and evaluated the deposition of MBL, C1q, C4 and C3 on the parasite surface after interaction with non-immune human serum (NHS). Using immunofluorescence assays we have observed that both serum MBL and purified MBL-MASP complex bind to the surface of *L. braziliensis* using a mouse monoclonal anti-human MBL antibody and confocal microscopy. MBL binding to parasite surface was shown to be specific for mannose present on the surface of parasites, by inhibition assays. It was observed that the presence of MBL doesn't modify the lytic effect of complement on the parasites. Deposition of C1q, C4 and C3 was observed after parasite incubation with NHS. Ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA) but not ethylene glycol-bis β -aminoethylether N, N, N, N-tetra acetic acid (EGTA) abolished C3 deposition on parasite surface, indicating the involvement of the alternative pathway in this process. Our results indicate that *L. braziliensis* binds MBL and that this is mediated by specific carbohydrate on the surface of parasites and provide evidences for antibody-independent mechanisms complement activation on parasite surface.

Keywords: *Leishmania (Viannia) braziliensis*; mannose-binding lectin; complement; MBL; alternative pathway; classic pathway.

1 INTRODUÇÃO

Leishmania (Viannia) braziliensis, é o agente causador da leishmaniose cutânea mucosa, doença endêmica em vários países da América do Sul e um sério problema de saúde pública para o Brasil. Transmitidos através da picada das fêmeas de diversas espécies de flebotomos (*Díptera, Psychodidae, Phlebotominae*) dos gêneros *Lutzomyia* e *Psychodopygus*, o qual injeta no hospedeiro promastigotas do parasita. A *L. braziliensis* possui um ciclo vital digenético alternando entre o estágio promastigota que é a forma flagelada presente no estômago do mosquito transmissor e a amastigota sem flagelo, encontrada no interior dos macrófagos em mamíferos hospedeiros (Molyneux 1987; Killick-Kendrick 1990).

O complemento é um complexo sistema de defesa do hospedeiro designado a eliminar patógenos, que consiste de mais de 30 proteínas séricas e associadas a membranas. A ativação do complemento pode ocorrer através de três diferentes vias. A via clássica, que necessita da presença do anticorpo e envolve a ativação inicial de C1 e em seqüência de C4 e C2. A via alternativa é ativada diretamente por estruturas presentes na superfície do microorganismo invasor na ausência de anticorpo. E a via das lectinas por sua vez é ativada na ausência de C1 e de anticorpos pela ligação da lectina ligante da manose (MBL) a carboidratos presentes na superfície do microorganismo alvo (Thiel, Holmskov et al. 1992). Além da capacidade de ativar o complemento a MBL pode atuar diretamente como opsonina facilitando o ataque e interiorização do microorganismo nos fagócitos (Kuhlman, Joiner et al. 1989).

O complemento possui um importante papel na fase de estabelecimento de infecções causadas por parasitas do gênero *Leishmania* (Mosser, Springer et al. 1992).

Após a inoculação das promastigotas da *L. braziliensis* em mamíferos, ocorre o contato desses com o complemento presente no soro do hospedeiro. Diferentes autores demonstraram que formas promastigotas da *L. braziliensis* ativam complemento principalmente pela via alternativa e que *in vitro* essa ativação pode causar a lise dos parasitas (Pearson and Steigbigel 1980; Mosser and Edelson 1984; Franke, McGreevy et al. 1985; Mosser, Burke et al. 1986; Brittingham, Morrison et al. 1995). As espécies de *Leishmania* apresentam diferentes comportamentos quanto à sensibilidade ao complemento (Noronha, Nunes et al. 1998). Assim, a *L. braziliensis* afim de escapar do efeito lítico do complemento deve ser rapidamente fagocitada pelos macrófagos (Jokiranta, Jokipii et al. 1995). Quando em presença do complemento a superfície da *Leishmania* é recoberta por fragmentos de ativação como C3b e C3bi e a ligação aos macrófagos ocorre via receptores de complemento CR1 e CR3 (Wilson and Pearson 1988; Da Silva, Hall et al. 1989). Desta maneira a ativação do complemento e a ação dos receptores de complemento são importantes mecanismos utilizados na fagocitose de *Leishmania*.

Neste estudo demonstrou-se que tanto a MBL purificada como a MBL plasmática podem ligar-se especificamente ao carboidrato manose presente na superfície de promastigotas vivos da *L. braziliensis*. Além disso, observou-se que a via alternativa e a via clássica são ativadas pelo parasita após interação com soro humano normal (SHN).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a interação entre formas promastigotas de *L. braziliensis* com o sistema complemento e com a MBL.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar a capacidade das formas promastigotas de *L. braziliensis* de ativar as vias alternativa e clássica do sistema complemento.
- b) Verificar a habilidade da MBL humana purificada e/ou MBL sérica de se ligarem às formas promastigotas de *L. braziliensis*.
- c) Determinar se a ligação da MBL às formas promastigotas de *L. braziliensis* ocorre através da manose presente na superfície do parasita.
- d) Avaliar a capacidade do SHN de lisar às formas promastigotas da *L. braziliensis*, através das vias clássica ou alternativa.
- e) Verificar a influência da adesão de MBL no efeito lítico do complemento sobre formas infectivas do parasita.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 LEISHMANIOSE

3.1.1 CICLO BIOLÓGICO E TRANSMISSÃO

Os sítios onde ocorrem o ciclo evolutivo e a transmissão de *L. braziliensis* são basicamente nos flebotomíneos e nos hospedeiros vertebrados. Somente as flebotomíneas fêmeas são hematófagos. Quatro a cinco dias após o repasto em um hospedeiro infectado as formas amastigotas se transformam em promastigotas, multiplica-se por fissão binária, migram para as partes anteriores do tubo digestivo atingindo o aparelho picador sugador. Ao picar outro animal, ocorre a inoculação das formas promastigotas, que são englobadas por macrófagos do hospedeiro. Nas células fagocitárias do hospedeiro vertebrado, os parasitos se transformam em formas amastigotas, que se multiplicam por fissão binárias dentro dos vacúolos parasitóforos. A célula infectada multiplica-se, dividindo seus parasitos entre as células filhas, ou se rompe liberando as amastigotas que são, então, fagocitadas por outros macrófagos e tornam a se multiplicar. Em outros repastos sanguíneos, novos flebotomíneos ingerem macrófagos infectados. No tubo digestivo do inseto, as formas amastigotas transformam-se em promastigotas, multiplicam-se por fissão binária e o ciclo recomeça (figura 01) (Lainson 1987).

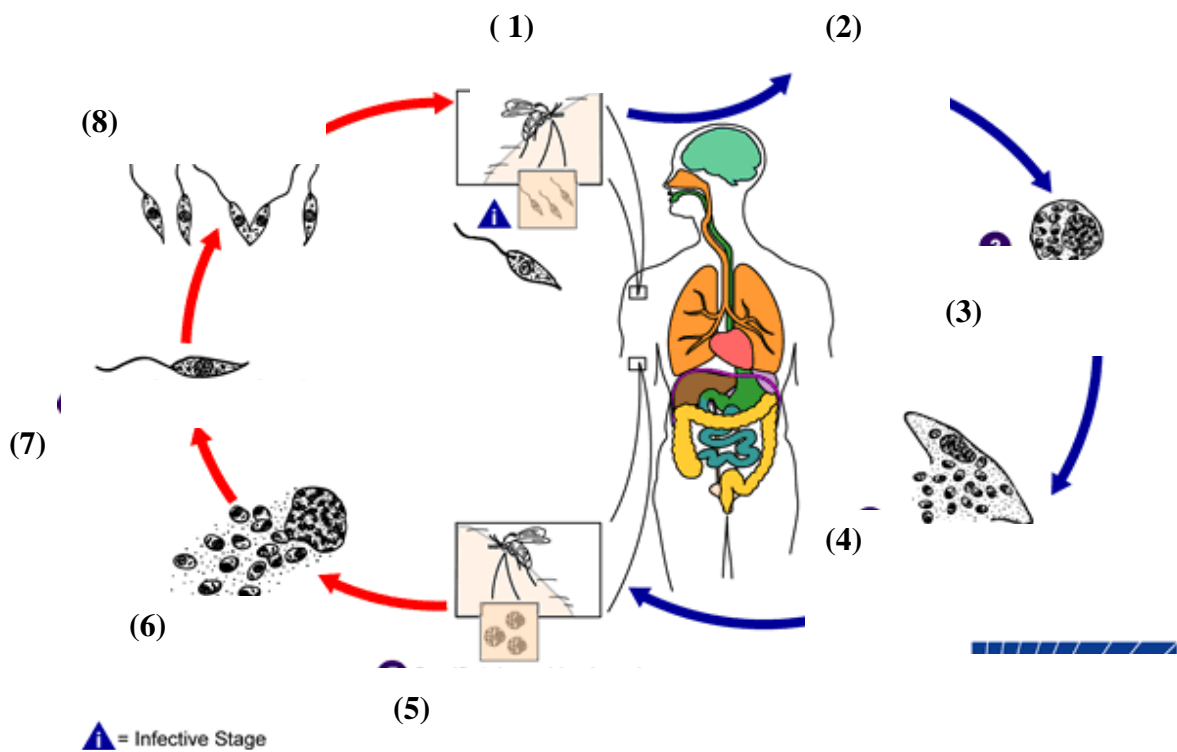


Fig. 01 Ciclo evolutivo da Leishmaniose

- (1) Mosquito retira sangue do hospedeiro e injeta promastigotas.
- (2) Promastigotas são fagocitados pelos macrófagos.
- (3) Promastigotas se transformam em amastigotas no interior dos macrófagos.
- (4) Amastigotas são liberados e infectam outras células.
- (5) Mosquito ingere sangue infectado do homem.
- (6) Ingestão de células parasitadas.
- (7) Amastigotas se transformam em promastigotas no estômago do mosquito.
- (8) Promastigotas se multiplicam no estômago do mosquito transmissor.

Adaptado de: www.dpd.cdc.gov/.../body_Leishmaniasis_page1.htm

3.1.2 *Leishmania (Viannia) braziliensis*

A *L. braziliensis*, é um protozoário digenético da ordem Kinetoplastida família Trypanosomatidae. Este parasita possui duas formas principais distintas: a forma aflagelada denominada de amastigota (figura 02), é observada “*in vivo*”, em tecidos humanos e de animais vertebrados sensíveis à inoculação do parasito, dentro e fora de macrófagos; e “*in vitro*”, em culturas de macrófagos a 37 ° C. As amastigotas têm formas arredondadas ou ovóides e medem conforme a espécie de 3-6 µm de comprimento por 2-4 µm de largura. A forma flagelada denominada promastigota (figura 03) está presente no tubo digestivo de flebotomíneos e nos meios de cultura a 25 ° C. Apresentam-se alongadas, com 10-15 µm de comprimento por 2-3,5 µm de largura, cinetoplasto anterior ao núcleo e flagelo livre geralmente mais longo que o corpo, saindo da extremidade anterior do parasito, mais larga do que a extremidade posterior (Marzochi 2002).

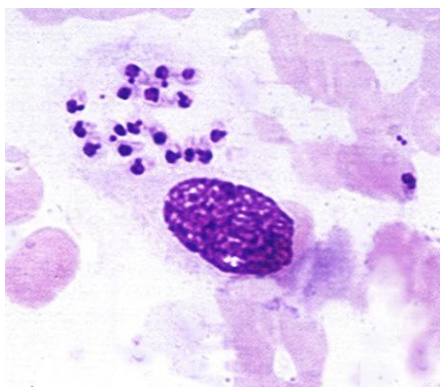


Fig. 02 Formas amastigotas de *Leishmania* no interior de macrófagos. Fonte: www.med-chem.com/Para/Prob%20of%20Month/Prob%...



Fig. 03 Forma flagelada (promastigota) de *Leishmania* em cultura. Fonte: www.cvm.okstate.edu/.../clinpara/lst11_20.htm

3.1.3 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA)

Por leishmaniose tegumentar americana (LTA) entendem-se as enfermidades causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que acometem a pele e/ou mucosas do homem e de diferentes espécies de animais silvestres e domésticos das regiões quentes e menos desenvolvidas do Velho e do Novo Mundo. Nas Américas são transmitidas entre os animais e o homem pela picada das fêmeas de diversas espécies de flebotômicos dos gêneros *Lutzomyia* e *Psychodopygus* (figura 04), que no Brasil recebem as denominações: cangalhinha, birigui, mosquito-palha, asa dura, asa branca, catuqui, catuqueira, escangalhado e murutinga (Marzochi 1992). A infecção se caracteriza pelo parasitismo das células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) da derme e mucosas do hospedeiro vertebrado (monócitos, histiócitos e macrófagos) (Marzochi 2002).

3.1.4 LEISHMANIOSE MUCOCUTÂNEA (LMC)

Leishmaniose mucocutânea é uma forma mais grave de LTA em que o principal agente causador é a *L. braziliensis*, com casos descritos desde o início do século passado (Pessoa 1948). Nesta forma de apresentação da doença o envolvimento do tecido mucoso pela *L. braziliensis* é geralmente secundário a úlcera cutânea primária, e isto se deve a disseminação dos parasitas por via linfática ou hematogênica. Evidências do envolvimento hematogênico foram obtidas pela cultura de leucócitos do sangue periférico de um paciente com a doença aparentemente adquirida no equador (Bowdre, Campbell et al. 1981). Na sua forma inicial, a doença se apresenta como uma úlcera cutânea crônica (úlceras tropicais) da perna, do antebraço, do tronco ou da face. Antes ou após a regressão da úlcera, às vezes até anos depois, lesões secundárias úmidas, com ou sem formação de úlcera, surgem ao redor ou perto das junções mucocutâneas; que podem localizar-se na laringe, no septo nasal, na

zona anal ou na vulva, podendo ser destrutivas e deformantes. Tais lesões sofrem exacerbações e remissões espontâneas e costumam durar por um período mais longo (Samuelson 1994). Na figura 04 está demonstrado um tipo clássico de lesão na mucosa nasal provocada pela infecção com *L. braziliensis*.



Fig. 04 Flebotomíneo transmissor da *Leishmania (Viannia) braziliensis* causador da LMC. Fonte: www.google.com



Fig. 05 Paciente portador de leishmaniose mucocutânea em estado avançado apresentando a clássica lesão do septo nasal provocada pela infecção com *L. braziliensis*.

Fonte: www.google.com

3.1.5 EPIDEMIOLOGIA

A LTA ocorre em quase todos os países americanos, do sul dos Estados Unidos ao Norte da Argentina, com exceção do Uruguai e do Chile (Shaw, Quigg et al. 1976; Lainson 1983). No Brasil, está distribuída em todas as regiões geográficas (Sampaio 1980; Furtado 1982). De acordo com o Ministério da Saúde, em média tem-se registrado 30 mil novos casos da doença a cada ano. Segundo a mesma fonte em 1996 a região Nordeste foi responsável por 39 % dos casos, com predomínio nos Estados do Maranhão, Bahia e Ceará; a região Norte por 35 % dos casos nos Estados do Pará, Rondônia e Amazonas; a região Centro-Oeste por 16 % dos casos principalmente no Estado do Mato Grosso e a região Sudeste por 8 % dos casos principalmente em Minas Gerais. Na região Sul ocorreram 2 % dos casos principalmente no Estado do Paraná. No entanto, a real prevalência das Leishmanioses no Brasil é difícil de ser estabelecida devido as subnotificações, ao diagnóstico incorreto, as afecções inaparentes, as variações de resposta do hospedeiro e a multiplicidade de agentes etiológicos envolvidos (Marzochi 1992).

Nas Américas são reconhecidas atualmente 11 espécies de *Leishmania* dermatrópicas causadoras de doença em humanos. Por outro lado, no Brasil, as principais espécies de *Leishmania* causadoras de LTA são: a *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) amazonensis* (Marzochi 2002). A figura 06 mostra a distribuição geográfica no Brasil das espécies que causam a LTA.

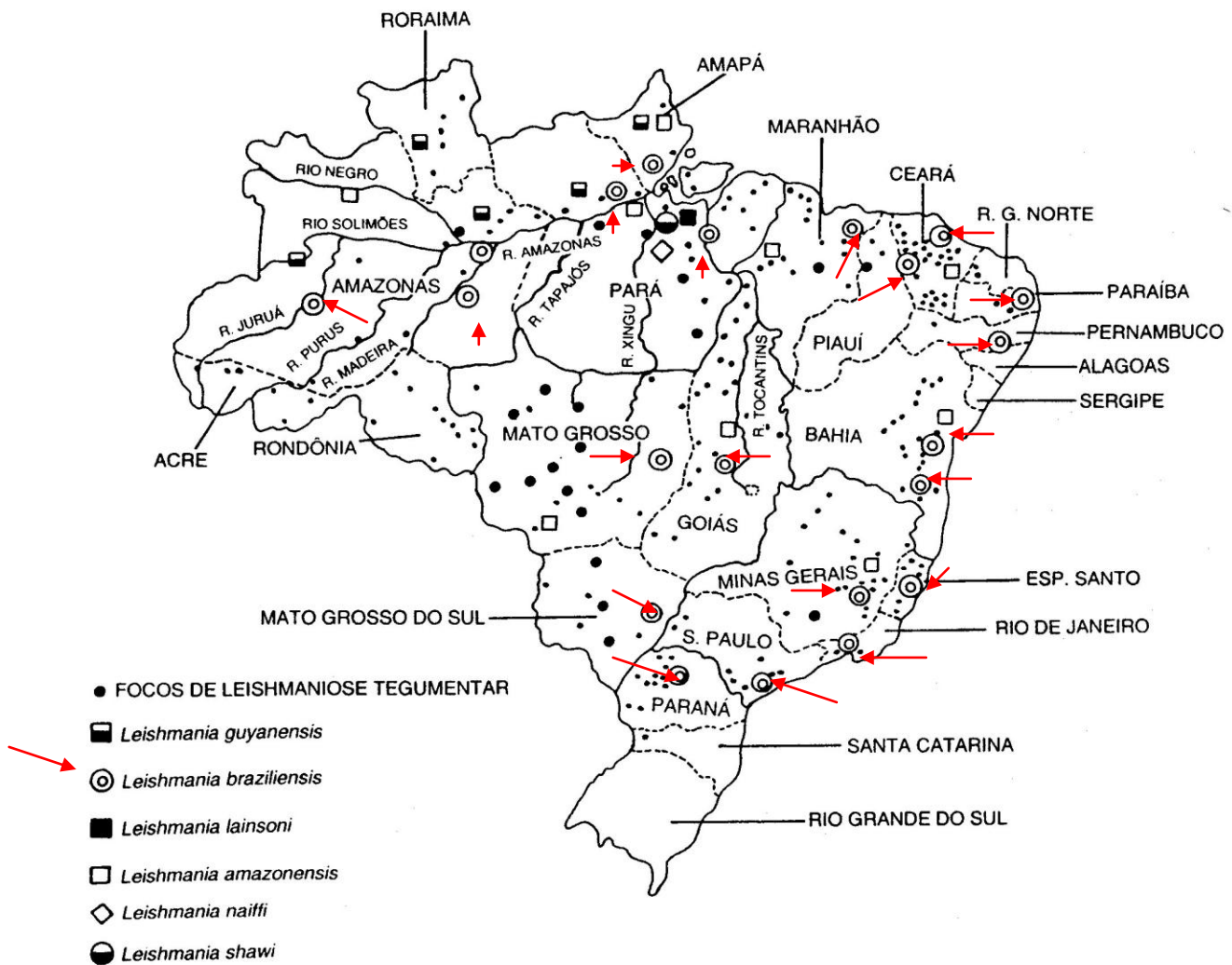


Fig. 06 Distribuição geográfica das principais espécies de *Leishmania* dermatópicas no Brasil (Marzochi & Marzochi, 1994).

3.1.6 IMUNOLOGIA NA LTA

O processo de instalação da LTA no hospedeiro é determinado por uma complexa associação entre os fatores tanto relacionados à virulência do parasita como a resposta imunológica do hospedeiro. O sistema complemento desempenha uma importante função na LTA já nos primeiros instantes após a introdução das promastigotas no hospedeiro, a sua atuação leva a deposição de fragmentos de ativação do complemento sobre o parasita, os quais são essenciais para o estabelecimento da doença. Maiores detalhes da função do sistema complemento na LTA estão descritos no ítem 3.3.

Nas leishmanioses a resposta imune é predominantemente mediada por células, a qual envolve todos os mecanismos associados à cura, proteção ou ao agravamento da doença. A função dos linfócitos T com fenótipo $CD4^+$ (Th1 e Th2) é importante na instalação da doença. Os linfócitos Th1 produzem interferon gama ($IFN-\gamma$), interleucina 2 (IL-2), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e fator de necrose tumoral (TNF), que levam a ativação de macrófagos e a destruição dos parasitas. Por outro lado os Th2, produzem IL-4, IL-5, IL-10, que inibem a ativação de macrófagos e levam a ativação de linfócitos B com a produção de anticorpos preferencialmente das classes IgG1 e IgE, enquanto que Th1 auxilia na produção de anticorpos do isotipo IgG2a (Coutinho, Oliveira et al. 1996).

Na fase ativa da leishmaniose localizada produzida pela *L. braziliensis* predomina uma resposta de linfócitos $CD4^+$, com produção de citocinas de “tipo 1” e “tipo 2” ($IFN-\gamma$, IL-2 e IL-4). No processo de cura, ocorre um aumento da resposta de células $CD8^+$ e um padrão de citocinas de “tipo 1” (Coutinho, Oliveira et al. 1996).

Formas graves envolvendo mucosas, evoluem com uma imunidade celular preservada e freqüentemente exacerbada, com alta produção de IL-4 nas lesões, assim como de IFN- γ , com poucos parasitas, paradoxal ao potencial destrutivo, sugerindo um processo imunopatológico autogênico (Coutinho, Oliveira et al. 1996).

Diferentes autores têm demonstrado a importância do estado imunológico do paciente na evolução da doença, atribuiu-se ao sistema imunológico uma função importante no controle da reativação da doença após longos períodos de desaparecimento das lesões primárias (Walton, Chinel et al. 1973).

3.2 SISTEMA COMPLEMENTO

O sistema complemento é composto por mais de 30 proteínas plasmáticas e associadas a membranas, que possui importante função na resposta imune e inflamatória. Após a sua ativação os fragmentos de componentes do complemento atuam modulando reações humorais e celulares. O principal local de síntese das proteínas do complemento é o fígado, por outro lado os macrófagos e fibroblastos realizam a síntese local nos tecidos (Prodinger 1999; Walport 2001).

O processo de ativação enzimática sequencial dos componentes do complemento gera uma resposta amplificada diante dos estímulos (Porcel 1993). Um perfeito funcionamento do processo de ativação do complemento é fundamental para a homeostasia do hospedeiro, pois este atua no combate a patógenos invasores e também na solubilização e remoção de complexos imunes (Sim 1992; Volanakis 1998).

Após a ativação do complemento através das vias: clássica, alternativa e das lectinas, o complemento pode gerar diversas funções biológicas, isto ocorre através da interação dos fragmentos de ativação com receptores celulares específicos ou pela deposição de complexos protéicos na membrana celular. Essas atividades são de vital importância no processo inflamatório, pois atuam na quimiotaxia e ativação de fagócitos (Porcel 1993; Kirschfink 1997). O produto final da ativação do complemento é o complexo C5b-9 que pode se inserir na membrana alvo e provocar a sua lise. Por outro lado em concentrações baixas este complexo induz a liberação de mediadores inflamatórios. Outras funções do complemento estão associadas as atividades imunoregulatórias de C3a, C5a e C3d (Porcel 1993; Volanakis 1998).

Para ativação da via clássica se faz necessário uma produção prévia de anticorpos e da formação do complexo antígeno e anticorpo, esta característica torna esta via parte da

resposta imune específica. Por outro lado, as vias alternativa e das lectinas, cuja ativação está relacionada com a presença de estruturas específicas na superfície dos microorganismos invasores são parte da resposta imune inata.

Cada via de ativação do complemento possui um grupo de componentes característicos. A via clássica utiliza-se dos componentes C1, C4, C2 e C3, da via alternativa participam o fator D, o fator B (BF), o fator P (properdina) e C3 e a via das lectinas utiliza a MBL (lectina ligante da manose), MASP-1 (MBL-serina protease associadas) e MASP-2. O complexo terminal de ataque à membrana (MAC) é formado pelos componentes C5, C6, C7, C8 e C9. O processo de ativação do complemento gera fragmentos que são designados por letras minúsculas, por exemplo, C4 gera C4a e C4b, sendo que o fragmento “b” é maior e permanece ligado a membrana para ser utilizado na seqüência de ativação, já o fragmento “a” é liberado para o meio. O componente C2 é exceção desta regra, pois o fragmento “a” é o maior. As proteínas de membrana do complemento possuem designações relacionadas com as funções que exercem, através de grupos de diferenciação ou ainda simplesmente numeradas consecutivamente, como os cinco receptores de complemento de CR1 a CR5 (Bing 1995; James 1997; Walport 2001).

O sistema complemento é uma importante ”arma” de defesa do organismo contra microorganismos agressores, logo possui uma função de destruição bastante eficaz. Diante disto, o organismo necessita dispor de um eficiente mecanismo de controle para evitar que a ativação exacerbada deste sistema cause dano ao hospedeiro. Com a função de regulação o organismo dispõe de aproximadamente 50 % de todas as proteínas do complemento. O mecanismo de controle sobre a geração de C3b necessita ser bastante eficaz diante da importante função deste fragmento no processo de ativação das três vias do complemento (Sim 1992; Prodinger 1999).

3.2.1 Via Clássica

Sendo a primeira descrita, a via clássica representa um potente mecanismo efetor da imunidade humoral. Na sua ativação o componente de fundamental importância é C1, o qual é composto de uma molécula de C1q ligado covalentemente a duas moléculas de C1r e duas de C1s, estabilizadas por íons cálcio (Roitt. I.; Brostoff).

O início da ativação pela via clássica é caracterizado pela ligação de C1q a complexos imunes contendo IgG ou IgM, ou a agregados de IgG (*in vitro*). Por outro lado, outros ativadores de C1q tem sido descritos: lipopolissacarídeos bacterianos, algumas espécies de micoplasma, vírus EBV e HIV, parasitas como Entamoeba, compostos polianiónicos e proteína C reativa, entre outros (Prodinger 1999). Produtos de lesão tecidual, como membrana mitocondrial e outras membranas subcelulares, filamentos citoplasmáticos, polinucleotídeos e componentes de mielina também têm demonstrado capacidade de ativar C1 (Sim 1992).

Após a interação do anticorpo com o antígeno ocorre alteração conformacional da região Fc da molécula de imunoglobulina, a qual leva a ligação com a molécula de C1q. Para a ativação de C1q são necessárias pelo menos duas moléculas de IgG1, IgG3 ou uma de IgM, a qual ao encontrar o antígeno muda de conformação. A ligação da molécula de C1q ao anticorpo induz alteração conformacional que leva a ativação seqüencial de C1r e C1s (James 1997; Reid 1998).

Uma vez ativada a molécula de C1s, esta cliva o componente C4 em C4a e C4b e C2 em C2a e C2b (figura 07). Os fragmentos C4a e C2b são subprodutos no processo de ativação com uma ação fisiológica limitada. Após a ligação de C4b a célula alvo, tanto este pode agir como uma opsonina, como pode se ligar com o fragmento C2a, gerando a enzima

C4b2a, que constitui a C3 convertase da via clássica. Esta enzima é capaz de clivar C3, em C3a e C3b (Prodinger 1999).

O componente C3 é a proteína do complemento em maior concentração no soro (1 a 1,4 mg/ml). Sua ativação possui um papel central e comum as três vias da cascata do complemento. Embora algumas proteases, como a plasmina, ou toxinas como o veneno de cobra tenham ação sobre C3, as C3 convertases das vias clássica e alternativa são as únicas enzimas fisiologicamente relevantes na ativação de C3.

O fragmento C3a, produto da clivagem de C3, é uma potente anafilatoxina que pode atuar a distância do sítio de ativação de C3. Por outro lado, a molécula de C3b, pode fazer ligação covalente com componentes da superfície do antígeno ou com receptores em superfícies próximas (Sim 1992; Prodinger 1999). Assim, a molécula de C3b atua como uma forte opsonina e ainda forma o complexo C4b2a3b, que é a enzima C5 convertase. Essa enzima atua na última etapa de ativação da via clássica, e faz a clivagem de C5 em C5a e C5b. Enquanto C5a é uma potente anafilatoxina, a ligação de C5b a C6 dá início a via efetora final da cascata do complemento, até a formação do complexo de ataque a membrana (MAC) (Sim 1992; Bing 1995).

3.2.2 Via alternativa

A via alternativa possui uma importante função de defesa natural contra microorganismos. Para uma ativação eficiente e uma amplificação instantânea dessa via se faz necessário uma superfície ativadora, tal como a parede celular bacteriana, de fungos e leveduras, lipopolissacarídeos bacterianos, toxinas, células infectadas por vírus e eritrócitos de coelho (Glovsky 1994; James 1997).

O fator B (BF), possui função central na ativação da via alternativa. Este consiste em uma serina protease, homóloga a C2. A ligação de BF ao C3b serve como subunidade catalítica das C3 e C5 convertases da via alternativa (Volanakis 1998).

O início da ativação da via alternativa é caracterizado pela ligação de C3b a uma célula alvo. Diante disto surge à questão a respeito da origem do C3b. Estudos *in vitro* demonstraram que na circulação C3 sofre hidrólise espontânea e contínua, gerando a moléculas de C3i ou C3(H₂O), que possui conformação semelhante a C3b (*C3b like*) (Lachmann 1992).

Tanto C3(H₂O), como C3b gerado pela via clássica, pode ligar-se ao BF, em reação dependente de magnésio, formando os respectivos complexos C3(H₂O)B e C3bB. Estes sofrem a ação do fator D que cliva BF em Ba e Bb. O peptídeo Ba vai para a fase fluída, enquanto Bb, liga-se a C3(H₂O) ou a C3b, formando duas C3 convertases uma de fase fluída, C3(H₂O)Bb e outra de superfície celular, C3bBb. Esses complexos são capazes de amplificar a reação pois fazem a geração de mais C3b reativo produzindo mais complexos C3 convertase (C3bBb) na superfície celular (Abbas 1997).

A properdina (fator P), tem a capacidade de estabilizar o complexo C3bBb, que pode clivar outras moléculas de C3 (Volanakis 1998; Prodinger 1999). Se moléculas adicionais de C3b são inseridas na C3 convertase C3bBbP(C3b)_n, é gerada a C5 convertase da via alternativa, que cliva C5 em C5a e C5b, de forma semelhante à via clássica. Nessa etapa, tanto a via clássica como a via alternativa convergem para a mesma seqüência terminal de eventos, levando à formação do complexo de ataque a membrana (figura 07) (James 1997).

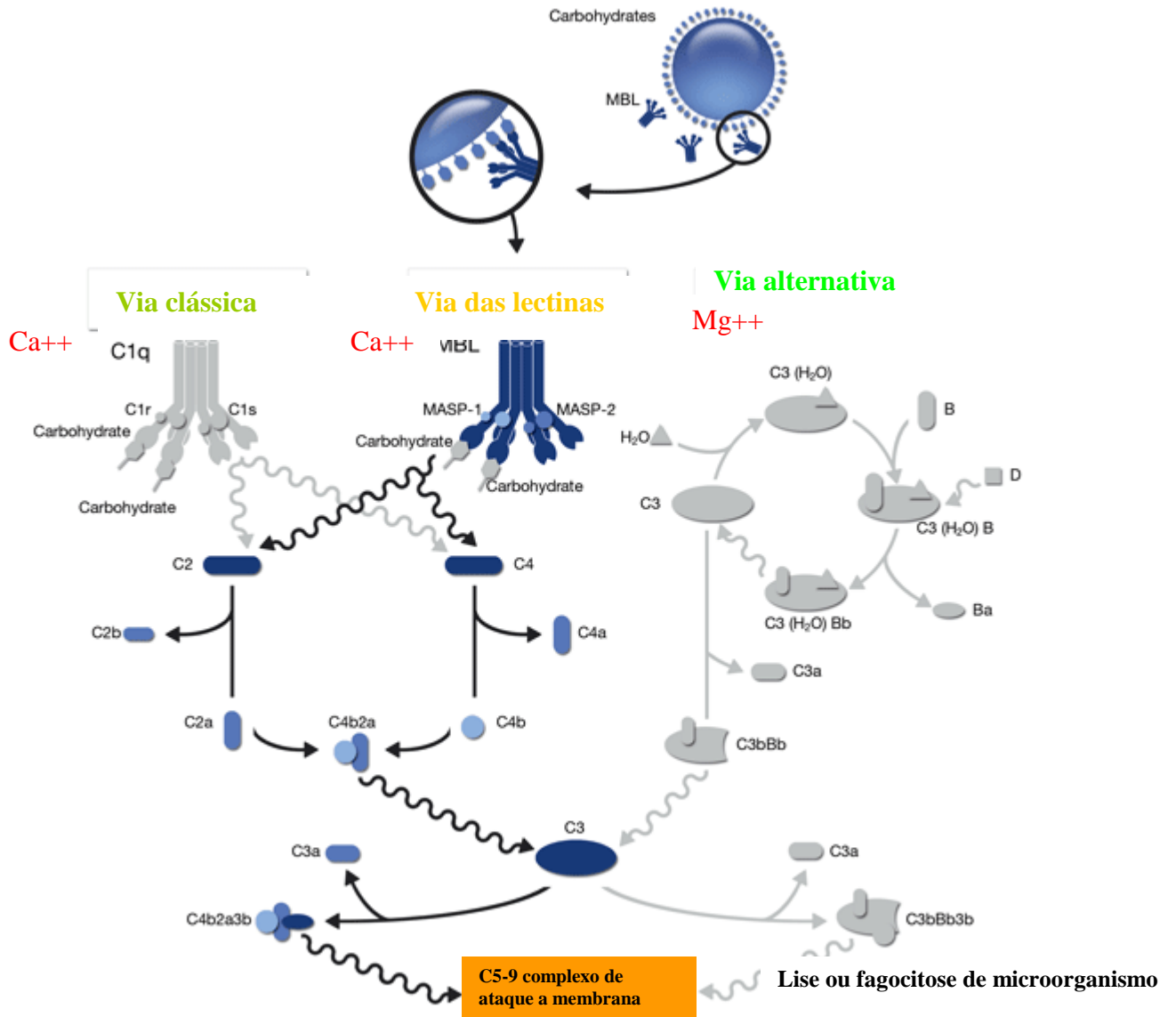


Figura. 07 Esquema demonstrando o processo de iniciação de cada uma das vias de ativação do sistema complemento e a via final efetora. Adaptado de: www.antibodyshop.com

3.2.3 Via das lectinas

Recentemente descrita a via das lectinas (figura 07) tem como principal constituinte a MBL, que está associada a uma família de serina proteases denominadas serino proteases associadas a MBL (MASPs), que incluem MASP-1, MASP-2, MASP-3 (Matsushita and Fujita 1992; Thiel, Vorup-Jensen et al. 1997; Dahl 2000) e a truncada versão de MASP-2 chamada Map19 (Stover, Thiel et al. 1999; Takahashi, Endo et al. 1999). Diferentes evidências indicam que MASP-2 é a mais importante na ativação do complemento (Thiel, Vorup-Jensen et al. 1997). O complexo MBL-MASPs torna-se ativo após a sua ligação ao microorganismo alvo, através do domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) da MBL a carboidratos da superfície microbiana. MASP-2 expressa atividade enzimática similar a C1s que resulta em uma clivagem seqüencial de C4 e C2. O fragmento C4b gerado liga-se covalentemente a superfície microbiana e subseqüentemente interage com C2 que também será clivado por MASP-2. O complexo C4b2a criado expressa atividade de C3 convertase similar as C3 convertases geradas nas vias clássica e alternativa. A seguir esse complexo é capaz de gerar o fragmento C3b através de sua ação enzimática sobre C3 amplificando a ativação do sistema complemento (Super, Thiel et al. 1989; Turner 2003). Outras características e funções da MBL estão descritas no item 3.2.7.

3.2.4 Via final efetora

A via final efetora será sempre a mesma independente da via inicial de ativação, e culminará com a formação do complexo lítico de membrana C5b-9 ou MAC. A primeira etapa desta via é a clivagem de C5, através das C5 convertases da via clássica ou alternativa, com conseqüente formação de C5a e C5b (James 1997; Prodinger 1999).

Uma seqüência de interações não enzimáticas entre C5b, C6, C7, C8 e C9 resulta na formação do MAC. O peptídeo C5b é estabilizado ao formar um complexo hidrofílico com C6 (C5b6). Quando C7 liga-se a esse complexo induz a uma transição do mesmo ao estado hidrofóbico, que permite ao complexo C5b67 inserir-se, firmemente, na camada bilipídica e ligar-se à molécula de C8, que também se insere na membrana da célula alvo (figura 07) (Delves 1992; Volanakis 1998).

O complexo C5b-8 possui capacidade lítica limitada, mas atua como agente polimerizante de C9. A ligação subsequente de até 12 ou 15 moléculas de C9, seguida da polimerização dessas, forma uma estrutura tubular não homogênea (poli-C9), inserida na superfície celular, à qual C5b-8 mantém-se ligado. O potencial lítico total do MAC depende de C9 produzir poros grandes suficientes para levar à lise da célula nucleada (Abbas 1997; Prodinger 1999).

A polimerização também é uma característica das moléculas de perforina, que formam canais transmembrânicos, ao serem liberadas de grânulos citoplasmáticos de linfócitos T citotóxicos e de células *natural killer* (NK). As perforinas apresentam grande homologia estrutural e funcional com C9 (Delves 1992).

Ainda que os poros produzidos por C5b-9 (MAC) permitam a passagem de íons potássio e cálcio para o interior da célula, esses são pequenos demais para permitir a saída de moléculas maiores como proteínas. Tal situação resulta no influxo de água para a célula, levando a lise osmótica ou ainda à morte celular devido a um acúmulo letal de altas concentrações de cálcio (Delves 1992; Abbas 1997).

Quantidades não letais do MAC parecem estimular a produção de uma variedade de mediadores inflamatórios, inclusive radicais de oxigênio, prostaglandinas, leucotrienos e

interleucinas. É portanto, possível que a resposta celular específica na ausência de lise possa ser uma importante função do MAC (Abbas 1997).

Possivelmente, o papel do MAC na defesa contra microorganismos parece ser menor do que quando atua patologicamente lesando células do hospedeiro (Abbas 1997).

3.2.5 Conseqüências biológicas da ativação do complemento

O complemento possui atividades biológicas envolvidas tanto com lise, decorrente da inserção do MAC na célula alvo, como com a ligação dos produtos de ativação a receptores de membrana específicos presentes em diferentes tipos de células.

3.2.5.1 Lise de membranas celulares

O mecanismo de destruição de microorganismos através do sistema complemento é uma importante máquina de defesa contra uma variedade de patógenos. Entretanto vários desses microorganismos têm adquirido resistência a destruição mediada pelo complemento, como algumas bactérias gram positivas, fungos, protozoários e helmintos (Bing 1995).

Diferentemente dos eritrócitos, muitas células, particularmente as nucleadas, são relativamente resistentes à lise pelo complemento, sendo que essa ativação na sua superfície é freqüentemente sublítica. Este ataque sublítico, além de proteger a célula do hospedeiro da citólise, estimula a neossíntese de proteínas, o metabolismo de ácido araquidônico e também ativa os leucócitos polimorfonucleares. Além de elevar transitoriamente o cálcio intracelular e ativar a proteína quinase C, tem o potencial de induzir atividade pró-coagulante e pró-inflamatória. Conseqüentemente, a ligação de MAC na superfície de células do sistema imunológico viáveis sugere um papel modulatório na sua fisiologia. É possível que a principal função biológica da cascata terminal do

complemento, como um importante braço efetor da defesa humoral do hospedeiro, vá além daquela originalmente descrita (Prodinger 1999).

3.2.5.2 Opsonização e fagocitose

O papel de favorecer a fagocitose através da opsonização, representa uma das mais importantes contribuições do complemento na defesa do organismo, mediando a ligação e a ingestão de partículas estranhas, incluindo vírus, bactérias, células tumorais e complexos imunes solúveis (Bing 1995). A principal opsonina do complemento é o componente C3, através das moléculas de C3b e iC3b ligadas, covalentemente, à superfície celular, mais especificamente a receptores de fagócitos como neutrófilos e monócitos/macrófagos. C3b e C4b ligam-se ao receptor CR1 e iC3b ao receptor CR3. Essas interações permitem a aderência de microorganismos aos fagócitos do hospedeiro, levando à sua ingestão e conseqüente destruição através das enzimas lisossomais (Bing 1995; James 1997).

As moléculas C5a e C5a *des* Arg também possuem um papel crítico na fagocitose ao atraírem e ativarem fagócitos para o sítio da reação. As células fagocíticas estimuladas por C5a expressam maior quantidade de CR3 e CR4 (moléculas de adesão), que ligam os neutrófilos ao endotélio vascular, permitindo a aderência e migração desses para o sítio inflamatório (Ross 1992; Prodinger 1999).

O receptor para C1q (C1q-R), também conhecido como receptor de colectinas, está presente em monócitos, macrófagos, célula B, granulócitos, células endoteliais, fibroblastos e plaquetas. Esse permite a interação não apenas com C1q, mas com outros membros da família colectina, como a MBL. Desta forma, a presença de C1q-R em diferentes células favorece que estas realizem o englobamento de bactérias opsonizadas com MBL e de

complexos imunes-C1q, mediando a fagocitose, induzindo a produção de radicais de oxigênio e favorecendo a citotoxicidade celular (Ross 1992; Prodinger 1999).

3.2.5.3 Solubilização e remoção de complexos imunes

Existe uma constante formação de complexos imunes (CI) na circulação, com conseqüente aumento de concentração, diante das respostas a estímulos antigênicos intensos. A possibilidade de deposição desses complexos na parede dos vasos, com posterior ativação do complemento, leva a reações inflamatórias altamente lesivas para os tecidos próximos (Abbas 1997). CI podem ser formados através de interações multivalentes entre a região Fab das imunoglobulinas e o antígeno e também por interações não covalentes das regiões Fc de imunoglobulinas justapostas. Através da ativação da via clássica o complemento inibe a formação de CI grandes nos estágios iniciais da reação antígeno-anticorpo, tornando-os pequenos e solúveis. Por outro lado, a via alternativa, através dos componentes B, P e C3, na presença do fator I e H, tem a habilidade de transformar complexos grandes pré-formados, em CI menores e solúveis (Bing 1995).

Os CI formados na circulação, ao ativarem o complemento, ficam opsonizados por C3b e C4b. Como os eritrócitos possuem o receptor CR1 específico para esses fragmentos, ligam-se aos complexos, e os transportam até as células fagocíticas do fígado e baço, onde estes serão eliminados, retornando os eritrócitos para a circulação (Ross 1992). Essa interação entre eritrócitos e CI permitiu estabelecer o papel do complemento na remoção dos CI da circulação, pois os eritrócitos possuem 85 % do CR1 na circulação (Prodinger 1999).

3.2.5.4 Remoção de células apoptóticas

Outra propriedade biológica do complemento, relacionada a interação com receptores celulares, é a remoção de células apoptóticas pelos macrófagos. A ligação de C1q, proteína C reativa e IgM às células que tenham sofrido apoptose, leva a ativação do complemento na superfície das mesmas, favorecendo a interação com receptores do complemento presentes em macrófagos, com subsequente captura e destruição das células. A eliminação de células mortas contribui para a redução da exposição de auto-antígenos ao sistema imunológico e conseqüentemente desenvolvimento de doenças auto-imunes (Mevorach, Mascarenhas et al. 1998; Walport 2001).

3.2.5.5 Interface entre a imunidade inata e adaptativa

Outra função do complemento é participar da interação entre a imunidade inata e a adaptativa. A molécula de C1q, quando se liga aos anticorpos nos complexos imunes, que leva a ativação da via clássica, representa um dos elos dessa interação. A opsonização via complemento facilita a apresentação de antígenos pelas células apresentadoras. Além disso, a ativação de células B, moduladas por co-receptores, especialmente CR2, favorece a interação dessa célula com antígenos e sua subsequente ativação (Walport 2001).

3.2.5.6 Efeito pró-inflamatório

As anafilatoxinas C3a, C4a e C5a são mediadores humorais reconhecidos devido suas funções pró-inflamatórias e imunoreguladoras atuando na defesa do organismo. Estes efeitos pró-inflamatórios das anafilatoxinas são benéficos nas infecções e injúrias localizadas, mas por outro lado, existe um grupo de doenças inflamatórias crônicas (não infecciosas e síndromes), nas quais este papel é deletério (Ember 1998).

As anafilatoxinas, principalmente C3a e C5a, ao ligarem-se aos receptores de mastócitos e basófilos, provocam degranulação e liberação de mediadores vasoativos, em especial histamina e leucotrienos. Esses induzem aumento na permeabilidade vascular e contração da musculatura lisa. C5a tem ainda múltiplos efeitos, promovendo derrame vascular e exocitose, além de favorecer a adesão de fagócitos ao endotélio vascular. C5a tem intensa atividade quimiotática sobre neutrófilos; induz maior expressão de proteínas de adesão, como CR3 e CR4, mediando o tráfico desses nos tecidos; além de estimular a produção de radicais de oxigênio e prostaglandinas. C3a possui atividade similar, porém menos intensa (Roitt. I.; Brostoff; Ember 1998; Prodinger 1999).

O fragmento C2b, liberado pela clivagem de C2, também participa do processo inflamatório. Esse interage com a plasmina, levando à contração da musculatura lisa, aumento da permeabilidade vascular e dor (Bing 1995; James 1997).

3.2.5.7 Outros efeitos

Recentemente foi atribuída a função bactericida a fragmentos produzidos na ativação do complemento. Os autores demonstraram que o fragmento C3a, que é formado através da ativação da molécula de C3 e liberado para o meio circulante, é capaz de destruir bactérias como: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus pyogenes*. Esta descoberta fornece uma importante ligação entre o sistema complemento e substâncias bactericidas, os quais são importantes constituintes da imunidade inata (Nordahl, Rydengard et al. 2004).

3.2.6 O Complemento na Patogenia das Doenças

Deficiências hereditárias de componentes do complemento têm sido relatadas em seres humanos por diferentes autores. Essas deficiências, frequentemente herdadas de forma autossômica recessiva, são raras, mas devido a pouca frequência de quantificação sérica de proteínas do complemento na população, a real incidência dessas deficiências é difícil de ser determinada. Além disso, apesar das várias atividades biológicas do complemento, muitas vezes as deficiências dos componentes não levam a sintomas clínicos, em função da atuação conjunta das diferentes vias de ativação (Rother 1992).

Basicamente, existem três associações principais entre complemento e doenças: 1) a deficiência associada à susceptibilidade a infecções; 2) as consequências de anormalidades na regulação do complemento e 3) deficiência associada às doenças inflamatórias (Walport 2001).

As deficiências do complemento envolvidas com aumento de susceptibilidade a infecções envolvem diversos componentes. Baixos níveis de C3 comprometem as atividades relacionadas com opsonização e fagocitose, causando uma maior susceptibilidade às infecções por bactérias piogênicas (Prodinger 1999). As alterações relacionadas com a deficiência de MBL encontram-se descritas no item 3.2.7. As deficiências dos componentes terminais do MAC vão comprometer a atividade lítica e estão relacionadas quase que exclusivamente com infecções por *Neisseria meningitidis* (Rother 1992; Bing 1995).

Deficiências do fator I e H estão associadas com anormalidade de degradar C3b, com conseqüente descontrole da clivagem de C3 pela C3 convertase da via alternativa (C3bBb). Isto induz a uma situação de deficiência secundária, por consumo, tanto de C3

como de BF, levando a infecções por bactérias piogênicas, assim como por meningococos e gonococos (Rother 1992; Glovsky 1994).

Comprometimento na expressão de DAF e CD59 na membrana celular levam a falhas na regulação do MAC, e a doença conhecida como hemoglobinúria paroxística noturna. A falta destas duas proteínas de controle é responsável pela grande sensibilidade do eritrócito à lise pelo complemento, especialmente na condição fisiológica de baixo pH noturno (Prodinger 1999).

O complemento contribui ainda para a inflamação e dano tecidual em doenças neurodegenerativas e autoimunes, especialmente com manifestações renais e dermatológicas, assim como na injúria isquêmica e reperfusão, ou ainda em situações de choque (Prodinger 1999).

Sob condições fisiológicas, o complemento contribui efetivamente na eliminação de microorganismos ligados a anticorpos, promovendo a sua remoção. Entretanto, quando os CI não são eliminados, o complemento torna-se cronicamente ativado, promovendo a inflamação. Um exemplo é na resposta de anticorpos a auto-antígenos que não podem ser carregados do organismo, por estarem limitados a um determinado órgão, no qual a doença se expressa, como na síndrome de Goodpasture e na miastenia gravis. Infecções crônicas como a hepatite C e endocardite bacteriana, também tendem a perpetuar a formação de CI, com intensa ativação e consumo de complemento (Walport 2001; Messias-Reason, Hayashi et al. 2002).

No lupus eritematoso sistêmico (LES), a ativação de complemento, por CI que se depositam em múltiplos órgãos, está diretamente ligada à fisiopatologia da doença. Por outro lado, a deficiência homocigótica hereditária de C1q, C1r, C1s, C4 e C2 está fortemente associada com a susceptibilidade ao LES. O comprometimento na ativação da

via clássica, decorrente dessa deficiência, vai refletir, diretamente, em defeito na solubilização, e remoção dos CI pelos eritrócitos. Deficiência de CR1 também compromete a remoção dos CI, favorecendo a deposição desses em diferentes tecidos e conseqüente inflamação (Glovsky 1994; Abbas 1997; Prodinger 1999). Outras doenças mediadas por CI, como artrite reumatóide, glomerulonefrites e vasculites, também apresentam mecanismos semelhantes a estes envolvidos na sua patogenia (Bing 1995).

Por outro lado o complemento tem participação ativa na remoção de células apoptóticas, e falhas nesta remoção levam a acúmulo de restos celulares propiciando doenças autoimunes (Walport 2001).

3.2.7 MBL

A lectina ligante da manose (MBL), também chamada lectina ligante da manana e proteína ligante da manose pertence à família das proteínas denominadas de colectinas (Holmskov, Malhotra et al. 1994), as quais são constituídas por um domínio de reconhecimento de carboidrato (região de lectina) associado a um domínio de colágeno. A MBL é um importante constituinte do sistema imune inato e uma das mais de trinta proteínas do sistema complemento (Turner 2003). A concentração circulante de MBL situa-se em torno de 1µg/ml a 20µg/ml e é determinada geneticamente, pela presença de mutações pontuais no exon 1 (codons 52, 54 e 57) e na região promotora do gene da MBL (Turner 1996). A presença de variantes alélicas, assim como a deficiência quantitativa de MBL levam a predisposição a infecções e outras doenças auto imunes (Turner 2003). Um aumento em torno de 1,5 a 3 vezes na concentração da MBL pode ocorrer em situações de

injúria tecidual ou resposta a infecções, caracterizando desta maneira a MBL como uma proteína de fase aguda fraca (Thiel, Holmskov et al. 1992).

Numerosos estudos durante a última década deram origem a terceira via de ativação do complemento mediada pela MBL. A importância biológica desta via é indicada pelas conseqüências clínicas que o seu estado de deficiência causa. Em populações humanas o estado de deficiência de MBL é relativamente comum e vários estudos procuram associar essa deficiência com situações clínicas diversas (Turner 2003).

3.2.7.1 Estrutura da MBL

Por microscopia eletrônica a estrutura da MBL lembra um bouquet semelhante ao de C1q. No entanto, várias estruturas oligoméricas são observadas (dímeros, trímeros, tetrâmeros, hexâmeros) e ainda não está claro qual é a forma circulante predominante (Lu, Thiel et al. 1990). Todas as atividades funcionais incluindo ligação a superfície de microorganismos e a ativação do complemento requerem pelo menos estruturas do tipo tetrâmeros (Yokota, Arai et al. 1995).

A estrutura da MBL está embasada em subunidades, as quais são formadas por três cadeias peptídicas idênticas de 32 kDa. Cada cadeia é caracterizada por um domínio de lectina (ou domínio de reconhecimento de carboidrato CRD), uma cabeça hidrofóbica, uma região de colágeno e uma região N-terminal rica em cisteína (Sastry, Herman et al. 1989; Taylor, Brickell et al. 1989). As três cadeias da região de colágeno interagem para formar a clássica hélice tripla (Weis and Drickamer 1994) (figuras 08 e 09).

A MBL é uma lectina dependente de cálcio (ou tipo C) que pode fazer ponte coordenada com os grupos hidroxilas 3 e 4 de vários açúcares, incluindo manose, N-acetil-

D-glucosamina, N-acetil-manosamina, fucose e glucose. O açúcar D-galactose não se liga de maneira significativa a MBL (Drickamer 1992; Weis, Drickamer et al. 1992).

Acredita-se que a estrutura repetitiva dos açúcares revestindo a superfície dos microorganismos seja o local de ligação da MBL, o arranjo desses açúcares deve possuir distâncias específicas de 45 Å para ocorrer a ligação (Sheriff, Chang et al. 1994; Weis and Drickamer 1994). Esta ligação simultânea é necessária, pois a interação açúcar-MBL é relativamente fraca (Iobst and Drickamer 1994). Todas estas características facilitam a ligação da MBL com estruturas não-próprias da superfície microbiana, mas por outro lado diminuem a chance desta ocorrer com estruturas próprias.

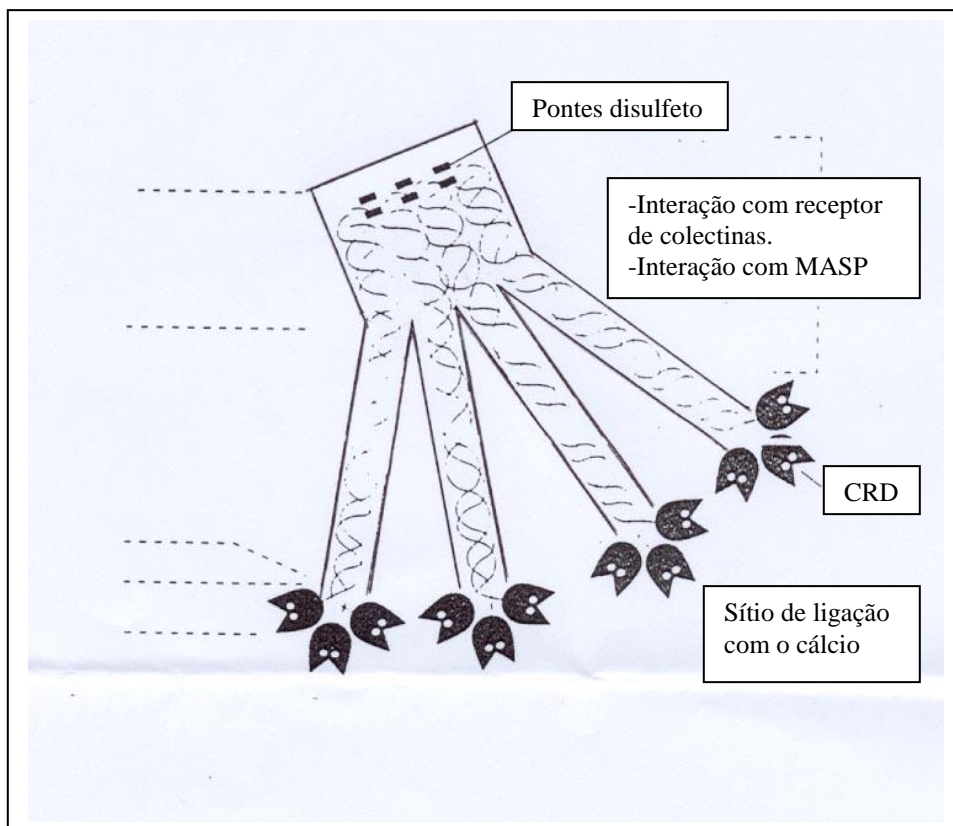


Figura. 08 Estrutura tetramérica da MBL que é capaz de ativar o complemento, esta possui quatro subunidades idênticas. Cada subunidade possui três cadeias peptídicas e estão associados por pontes disulfeto na região N-terminal, uma típica região de colágeno em tripla hélice e uma região de cabeça na porção C-terminal com três domínios de lectina. A região de colágeno está envolvida com a interação com MASP, sendo que o complexo MBL-MASP é capaz de ativar o complemento e também se presume ser esta região quando modificada que se liga aos receptores de colectinas. Abreviações: CRD, domínio de reconhecimento de carboidratos; MASP, MBL-associada a serina protease. Adaptado de Turner 1996.

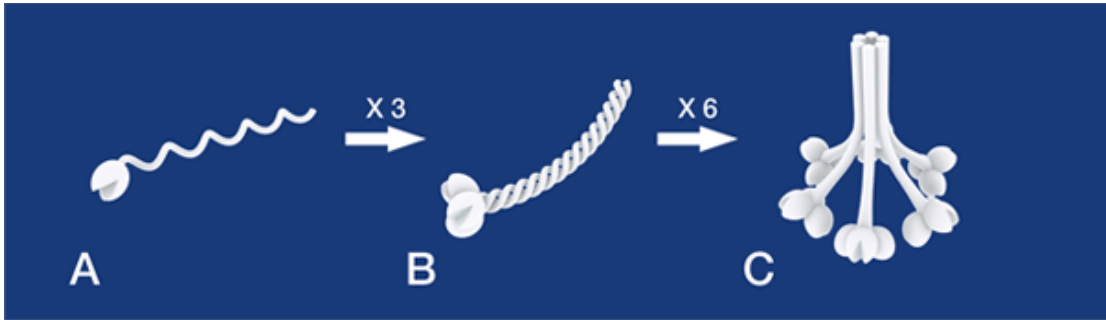


Figura. 09 Processo de oligomerização da MBL: A subunidade fundamental da MBL (32 kDa); B oligômero da MBL formado por 3 cadeias polipeptídicas; C estrutura completa de MBL formada por 6 oligômeros Fonte: www.antibodyshop.com.

3.2.7.2 Funções da MBL

Nas últimas duas décadas tem-se demonstrado que a MBL é um dos principais componentes do sistema imune inato. Existem evidências de que essa proteína desempenha pelo menos quatro funções distintas:

1. Ativação do sistema complemento
2. Opsonização independente de complemento e anticorpo
3. Modulação da inflamação
4. Promoção da apoptose

Destas funções a mais bem estudada é a ativação do complemento (figura 10) (Turner 2003).

A ativação do complemento mediada pela MBL representa a terceira via de ativação, distinta de ambas as vias alternativa e clássica, como já descrito na página 21.

A promoção da opsonização pela MBL está associada a vários receptores ou proteínas ligantes da MBL como cC1qR/calreticulina (Malhotra, Thiel et al. 1990), C1qRp (Tenner, Robinson et al. 1995) e CR1 (Klickstein, Barbashov et al. 1997; Ghiran, Barbashov et al. 2000).

Recentes estudos com doenças têm aumentado evidências de uma provável função da MBL na modulação da inflamação. O mecanismo ainda não está claro, mas sugere-se que a proteína exerça um efeito modulador sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos monócitos (Jack, Read et al. 2001).

Outras evidências têm indicado que a MBL (assim como C1q) pode ligar-se a células apoptóticas e mediar seu ataque por macrófagos (Ogden, deCathelineau et al. 2001). Este processo requer a participação do receptor cC1qR o qual liga-se a região de colágeno da MBL, que por sua vez parece estar associado ao CD91.

3.2.7.3 Ligação da MBL a microorganismos

A MBL pode ligar-se a uma variedade de microorganismos (Neth, Jack et al. 2000) e em alguns casos essa ligação está associada a características estruturais próprias do organismo ligante.

Estudos com mutantes isogênicas da *Neisseria meningitidis* forneceram informações a respeito do papel da cápsula e do ácido siálico terminal na ligação da MBL (Turner 2003). Esse estudo demonstrou que microorganismos com ácido siálico na sua estrutura são resistentes a ligação da MBL, enquanto aqueles que não possuem ácido siálico são vulneráveis. Ao contrário, a presença ou ausência de cápsula é menos significativa na ligação de MBL que a presença do ácido siálico em estruturas lipopolissacarídeas. Em um estudo com cepas mutantes de *Salmonella enterica* variante Typhimurium, foi demonstrado

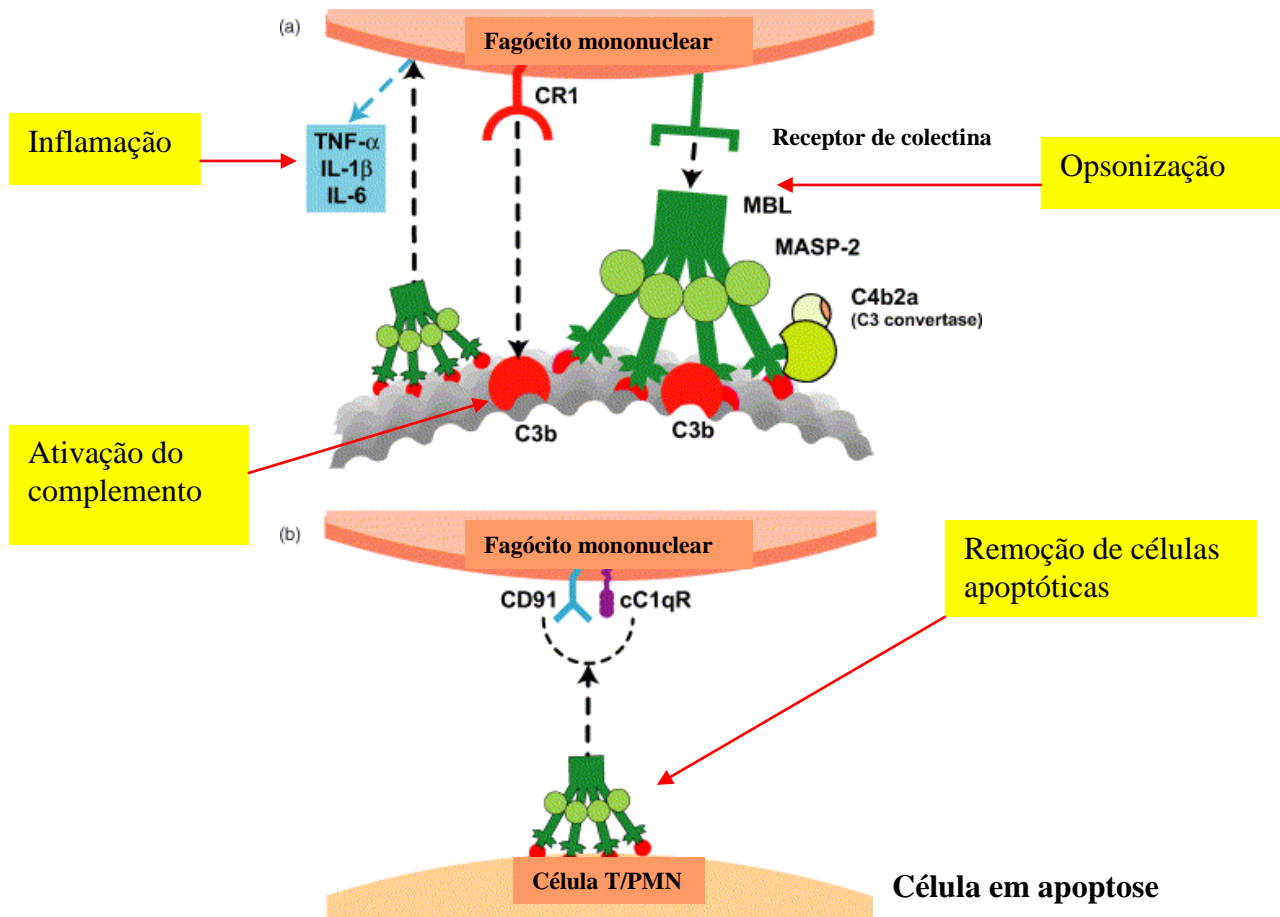


Fig. 10 Funções da MBL. (a) A ligação da MBL à superfície de microrganismos promove a fagocitose através de dois mecanismos. O mais importante é através de ativação do complemento pela via das lectinas. Este é mediado pela MASP-2, que no final leva a grande deposição de C3 na superfície alvo. Ainda pode ocorrer ligação direta da MBL a célula fagocítica. A MBL pode promover a inflamação através da liberação de citocinas dos monócitos. (b) Um papel da MBL na apoptose é proposto. Tem sido demonstrado que a lectina liga-se a células T e neutrófilos polimorfonucleares (PMN) apoptóticos através da região globular. Para a subsequente remoção da célula apoptótica é necessário o reconhecimento da região de colágeno da MBL pelo cC1qR em associação com o CD91 das células fagocíticas. Fonte: Turner 2003.

que a adição do antígeno O não permitiu a ligação da MBL. Estudando-se estruturas truncadas de lipopolissacarídeos (LPS), observou-se que nem sempre a identidade do açúcar terminal vai determinar a ligação da MBL. Foi concluído que a estrutura tridimensional dos LPS têm um importante papel na ligação da MBL. Assim a expressão de certas estruturas de LPS pode atuar como um mecanismo de virulência das bactérias por reduzir a ligação com MBL (Turner 2003).

3.2.7.4 Associação da MBL com doenças

A deficiência da MBL foi inicialmente reconhecida em crianças com um defeito funcional de opsonização, o qual estava associado a presença de infecções recorrentes e *déficit* de crescimento (Super, Thiel et al. 1989). Foi então sugerido nesse trabalho que a principal função desta proteína estaria em proteger as crianças durante a janela de vulnerabilidade que ocorre após diminuição dos anticorpos maternos, antes do desenvolvimento de uma efetiva produção de anticorpos. Trabalhos posteriores demonstraram que a MBL de fato possui um papel importante na primeira linha de defesa contra muitos microorganismos antes da produção de anticorpos. Essa função atribuiu a MBL um papel de ante-anticorpo (Alan and Ezekowitz 1991), isto é, anteceder os anticorpos no combate a microorganismos invasores.

A deficiência de MBL foi associada com aumento na suscetibilidade a muitas doenças infecciosas, principalmente para patógenos extracelulares (Summerfield, Sumiya et al. 1997) e particularmente com microorganismos que causam infecções agudas do trato respiratório durante a infância (Koch, Melbye et al. 2001). Entretanto, demonstrou-se que a MBL pode também conferir proteção contra certos parasitas intracelulares como *Leishmania* (Santos, Costa et al. 2001).

A bem estabelecida associação entre a deficiência de componentes da via clássica e a suscetibilidade a doenças autoimunes sugere que esta similar associação possa ocorrer também com a MBL. Estudos com pacientes portadores de lupus eritematoso sistêmico (LES) da Inglaterra (Davies, Snowden et al. 1995), de Hong Kong (Lau, Lau et al. 1996), negros dos Estados Unidos (Sullivan, Wooten et al. 1996) e da Espanha (Davies, Teh et al. 1997), evidenciaram aumento na frequência dos alelos mutantes ou baixas concentrações séricas de MBL nesses pacientes. Sugerindo, portanto um papel da deficiência de MBL na suscetibilidade a doenças autoimunes.

Outros autores evidenciaram na Dinamarca e Hong Kong que os alelos variantes de MBL estão associados com a gravidade e aparecimento precoce dos sintomas de artrite reumatóide (Graudal, Homann et al. 1998; Garred, Madsen et al. 2000; Graudal, Madsen et al. 2000; Ip, Lau et al. 2000).

Diversos estudos tem sugerido que a MBL pode modular a gravidade de doenças infecciosas e autoimunes. As primeiras evidências surgiram num estudo com portadores de AIDS, cuja sobrevida foi bastante reduzida nos pacientes com alelos mutantes da MBL (Garred, Madsen et al. 1997). Um estudo posterior confirmou o efeito da deficiência da MBL na progressão da doença, a qual esteve associada ao desenvolvimento de sarcoma de Kaposi (Maas, de Roda Husman et al. 1998).

Estudos em pacientes portadores de Hepatite C sugerem um papel regulatório da MBL na doença, sendo observada uma associação da deficiência de MBL com a resistência ao tratamento com interferon. Se esta associação for confirmada, a deficiência de MBL poderá ser um importante fator prognóstico no tratamento desses pacientes (Matsushita, Hijikata et al. 1998; Matsushita, Hijikata et al. 1998).

3.3 Complemento e leishmaniose

Nas últimas décadas uma grande variedade de estudos tem demonstrado a importância do sistema complemento na resposta imune da leishmaniose. Na década de 80, foi demonstrado o efeito lítico do soro humano fresco em promastigotas de *L. donovani*, efeito este não observado sobre a forma amastigota. Os autores também observaram que o aquecimento do soro humano a 56°C por 30 minutos retirava este efeito, ficando assim evidente que o sistema complemento era o responsável por este fenômeno (Pearson and Steigbigel 1980). Nessa mesma década diferentes estudos determinaram a ativação das vias clássica e/ou alternativa do complemento por algumas espécies de *Leishmanias*. Mosser et al. demonstrou a ativação da via clássica por formas promastigotas de *L. donovani*, assim como da alternativa por formas promastigotas de *L. major*, *L. mexicana mexicana*, *L. mexicana amazonensis*, *L. braziliensis guyanensis* (Mosser, Burke et al. 1986). Num outro estudo esses autores demonstraram que a ativação do complemento e deposição de fragmentos como C3b na superfície do parasita promove um aumento da sua fagocitose (Mosser and Edelson 1984).

Na década de 90 Mosser et al., realizaram um trabalho com o objetivo de verificar a importância do receptor CR3 na ligação de espécies de *Leishmania* a macrófagos humanos. O resultado obtido mostrou que as formas promastigotas de *Leishmania* necessitam da ativação do complemento ou mais especificamente da deposição de C3bi na sua superfície para que possam ser fagocitadas pelos macrófagos via receptor CR3. Como a fagocitose é uma importante etapa na instalação de doenças causadas por microrganismos intracelulares como as *Leishmanias*, estes resultados forneceram evidências de como estes parasitas utilizam o sistema imune para instalação da doença no hospedeiro mamífero (Mosser, Springer et al. 1992).

Juntamente com o envolvimento de receptores para complemento na fagocitose de promastigotas de *Leishmanias*, Wilson and Pearson demonstraram que o receptor para manose está também envolvido no processo de fagocitose dos parasitas por macrófagos (Wilson and Pearson 1986). Estes mesmos autores também observaram que o receptor CR3 e o receptor para manose participam de maneira independente na ligação de formas promastigotas de *L. donovani* a macrófagos humanos (Wilson and Pearson 1988). Um outro estudo com formas amastigotas de *L. major* demonstrou que a ingestão de formas amastigotas de *L. major* por macrófagos ocorre primariamente através dos receptores Fc e CR3, e sugeriu que outros receptores devem também estar envolvidos neste processo (Guy and Belosevic 1993).

Recentemente Cavalcante et al. investigando os mosquitos transmissores da leishmaniose no Brasil, *Lutzomyia longipalpis* e *Lu. Migonei* demonstraram a presença de substância com atividade inibitória sobre as vias alternativa e clássica do sistema complemento na saliva destes insetos. Estes resultados indicam que a inibição do sistema complemento pode fazer parte do processo de transmissão da leishmaniose (Cavalcante, Pereira et al. 2003).

Green et al. demonstraram que a MBL reconhece a manose presente nas lipofosfoglicanas, principal glicoconjugado de superfície da *L. major* e *L. mexicana*, promovendo a ativação do complemento na superfície dos parasitas (Green, Feizi et al. 1994).

Uma função imunomoduladora da MBL foi demonstrada na leishmaniose visceral. Santos et al. observaram a associação entre a concentração sérica de MBL em pacientes e a suscetibilidade a leishmaniose visceral causada *L. chagasi*. Esses autores observaram que a fagocitose das formas promastigotas opsonizadas com MBL induz a secreção de alta

concentração de fator de necrose tumoral alfa e interleucina 6 por monócitos humanos. Demonstrando assim que a MBL pode modular o curso clínico da doença e a função dos monócitos infectados (Santos, Costa et al. 2001).

Todos estes estudos demonstram que o sistema complemento e a MBL estão envolvidos diretamente no processo de instalação da leishmaniose e também evidenciam que as diferentes espécies de *Leishmania* podem apresentar comportamentos distintos frente a esse sistema.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Parasitas

Formas amastigotas da *L. braziliensis* cepa MHOM/BR/75/M2904, foram isoladas de um paciente com Leishmaniose mucocutânea na região norte do Brasil no estado do Pará. As formas promastigotas foram cultivados *in vitro* a 23°C em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma Chemicals Co., St Louis, Missouri USA), suplementado com 20 mM de HEPES (Sigma), 15% de soro bovino fetal inativado (Gibco Laboratories, Paisley, Scotland), 100 µg/ml de estreptomicina e 2UI/ml de penicilina. Os parasitas foram mantidos em cultura por sete dias, para atingirem a fase estacionária de crescimento, sendo então retirados da cultura e lavados por três vezes com salina tamponada (PBS) pH 7,6 sob baixa velocidade de centrifugação e usados em todos os experimentos.

4.2 Complexo MBL-MASP purificado

A MBL humana purificada utilizada nos experimentos foi obtida de uma solução estéril contendo 300 µg de MBL/ml em solução salina (Statens Serum Institute, Copenhagem, Dinamarca).

4.3 Fonte de complemento e de MBL humana

Como fonte de complemento, utilizou-se um conjunto de soro fresco humano (SHN) obtido de doadores normais sem história de leishmaniose e com imunofluorescência indireta negativa para *Leishmania*.

Para os ensaios que envolveram a MBL sérica, a fonte de MBL utilizada foi um conjunto de SHN cuja concentração individual de MBL em cada soro era superior a 3.000 ng/ml (SHN-MBL). Este conjunto continha dois soros com concentração de 3.500 ng/ml, um soro com 3.600 ng/ml e outro soro com 4.000 ng/ml. Também foi utilizado em alguns experimentos, soro humano deficiente em MBL (SHN-MBL-def.) obtidos de quatro indivíduos voluntários que apresentavam concentração sérica da MBL inferior a 10 ng/ml, isto é, concentração não detectável por ELISA. A concentração de MBL sérica foi determinada por método de enzima imunoensaio (ELISA) utilizando-se reagente comercial (Statens Serum Institute, Denmark) de acordo com a técnica descrita em Schafranski et al 2004. Todos os soros utilizados neste procedimento também foram obtidos de doadores sem história de leishmaniose e com imunofluorescência indireta negativa para *Leishmania*.

4.4 Adsorção do SHN

O SHN utilizado em todos os experimentos foi previamente adsorvido com o parasita, com o objetivo de retirar anticorpos naturais que poderiam estar presentes, assegurando-se assim que no processo não haveria participação de quaisquer tipos de anticorpos contra a *L. braziliensis*. Este procedimento foi realizado da seguinte maneira: a 200 µl de SHN puro foram adicionados 50 µl de parasitas na concentração de 1×10^9 /ml e incubados a 4°C durante 60 minutos, após este tempo as suspensões foram centrifugadas durante 10 minutos a 3.000 rpm em centrífuga refrigerada (4°C), em seguida o sobrenadante foi transferido para outro tubo e o procedimento repetido. O sobrenadante final foi separado do sedimento e imediatamente utilizado nos experimentos.

4.5 Inativação do complemento no SHN (SHN-I)

Para alguns experimentos foi efetuada a inativação do sistema complemento, através da incubação do SHN a temperatura de 56°C durante 30 minutos. Este procedimento inativa o fator B e C2, bloqueando as três vias de ativação do complemento clássica, alternativa e das lectinas.

4.6 Ensaio de adesão da MBL humana purificada a promastigotas da *L. braziliensis*

Formas promastigotas vivas de *L. braziliensis* em fase estacionária de crescimento foram lavadas por três vezes em tampão tris (TBS) pH 7,6 com 10 mM de CaCl₂ a 4°C, e a sua concentração ajustada para 1 x 10⁶ células/ml em TBS com 10 mM de CaCl₂. Em seguida, 100 µl da suspensão de parasitas foram incubados em 100 µl de solução com 6 e 1 µg de MBL (Statens Serum Institute)/ml em TBS, 10 mM de CaCl₂ e 1% de albumina bovina (BSA) por 60 minutos a 4°C. Subseqüentemente os parasitas foram lavados por duas vezes em TBS com 10 mM CaCl₂ e ajustados ao volume de 100 µl, sendo então incubados com 100 µl de anticorpo monoclonal de camundongo anti-MBL-Humana (clone 131-01; Statens Serum Institute) na diluição de 1:1000 em TBS, 10 mM CaCl₂ e 1% de BSA, por 60 minutos a 4°C. Na seqüência as formas promastigotas foram lavadas duas vezes em TBS com 10 mM de CaCl₂, e ajustadas ao volume de 100 µl e incubadas com 100 µl de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com fluoresceína (Sigma) na diluição de 1:500 em TBS, CaCl₂ e 1% de BSA por 60 minutos a 4°C. Finalmente os parasitas foram lavados por duas vezes em TBS com 10 mM de CaCl₂ e mantidos em 50 µl de suspensão, e observados em microscópio de imunofluorescência (Nikon E 800) com sistema confocal (Bio-Rad Radiance 2100), (figura 11).

O controle deste experimento foi realizado na ausência de MBL no procedimento, sendo os parasitas submetidos à mesma seqüência de reação descrita acima. Este experimento foi realizado em duplicata e repetido por três vezes.

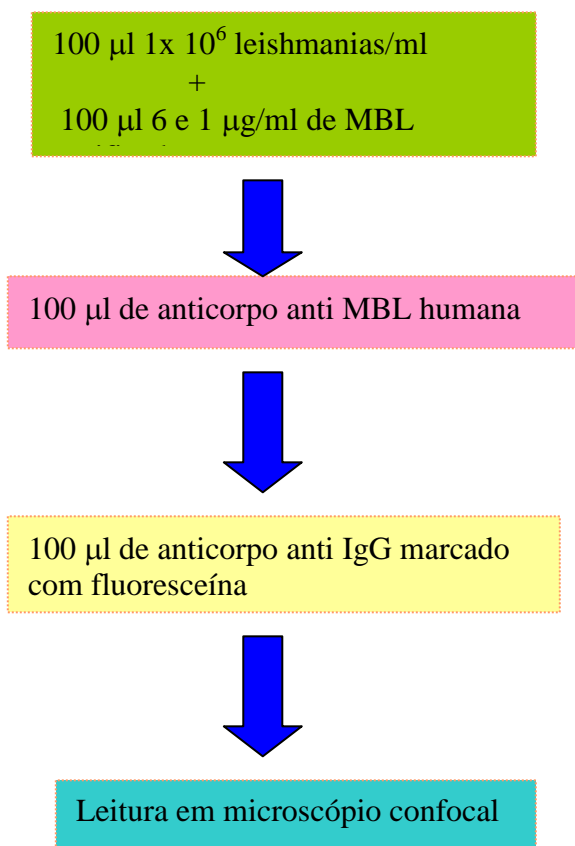


Fig. 11 Esquema ilustrando o ensaio de adesão da MBL purificada aos promastigotas da *L. braziliensis*.

4.7 Ensaio de inibição da adesão da MBL purificada a promastigotas de *L. braziliensis*

Para determinar a ligação específica da MBL a açúcares presentes na superfície do parasita, um ensaio de adesão da MBL foi realizado utilizando-se previamente o seguinte procedimento. Baseado no conhecimento de que MBL é capaz de ligar-se a estruturas com

grande quantidade de manose, MBL na concentração de 6 µg/ml em TBS, 10 mM CaCl₂ e 1% de BSA foi pré-incubada com manana (Sigma) na concentração de 20 mg/ml, 50 mM de manose (Sigma) e 50 mM de galactose (Sigma) por 60 minutos a 4°C. Após este procedimento esta solução foi incubada com 1 x 10⁶ *Leishmanias*/ml em TBS com 10 mM de CaCl₂ por 60 minutos a 4°C. Na seqüência os parasitas foram lavados por duas vezes em TBS com 10 mM CaCl₂ e ajustados ao volume de 100 µl, sendo então incubados com 100 µl de anticorpo monoclonal de camundongo anti-MBL-humana (clone 131-01; Statens Serum Institute) na diluição de 1:1000 em TBS, 10 mM CaCl₂ e 1% de BSA, por 60 minutos a 4°C. A seguir as formas promastigotas foram lavadas duas vezes em TBS com 10 mM de CaCl₂, e ajustadas ao volume de 100 µl e incubadas com 100 µl de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com fluoresceína (Sigma) na diluição de 1:500 em TBS, CaCl₂ e 1% de BSA por 60 minutos a 4°C. Finalmente os parasitas foram lavados por duas vezes em TBS com 10 mM de CaCl₂ e mantidos em 50 µl de suspensão, e observados em microscópio de imunofluorescência (Nikon E 800) com sistema confocal (Bio-Rad Radiance 2100). Este experimento foi realizado em duplicata e repetido por três vezes.

4.8 Ensaio de adesão da MBL humana sérica a promastigotas de *L. braziliensis*

Formas promastigotas vivas de *L. braziliensis* em fase estacionária de crescimento foram lavadas por três vezes em tampão tris (TBS) com 10 mM de CaCl₂ a 4°C, e a sua concentração ajustada para 1 x 10⁶ células/ml em TBS com 10 mM de CaCl₂. Em seguida, 100 µl da suspensão de parasitas foram incubados com 100 µl de SHN (MBL > 3000 ng/ml) na diluição de 1 a 90 % em TBS com 10 mM de CaCl₂ e 1 % BSA por 18 horas a 4°C. Em seguida os parasitas foram lavados por duas vezes em TBS com 10 mM CaCl₂ e

ajustados ao volume de 100 μ l, sendo então incubados com 100 μ l de anticorpo monoclonal de camundongo anti-MBL-Humana (clone 131-01; Statens Serum Institute) na diluição de 1:1000 em TBS, 10 mM CaCl_2 e 1% de BSA, por 60 minutos a 4°C. No passo seguinte as formas promastigotas foram lavadas duas vezes em TBS com 10 mM de CaCl_2 , e ajustadas ao volume de 100 μ l e incubadas com 100 μ l de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com fluoresceína (Sigma) na diluição de 1:500 em TBS, CaCl_2 e 1% de BSA por 60 minutos a 4°C. Na ultima etapa do procedimento os parasitas foram lavados por duas vezes em TBS com 10 mM de CaCl_2 e mantidos em 50 μ l de suspensão, e observados em microscópio de imunofluorescência com sistema confocal, (figura 12).

O controle deste experimento foi realizado na ausência de SHN-MBL, sendo o procedimento o mesmo da seqüência descrita acima. Este experimento foi realizado em duplicata e repetido por três vezes.

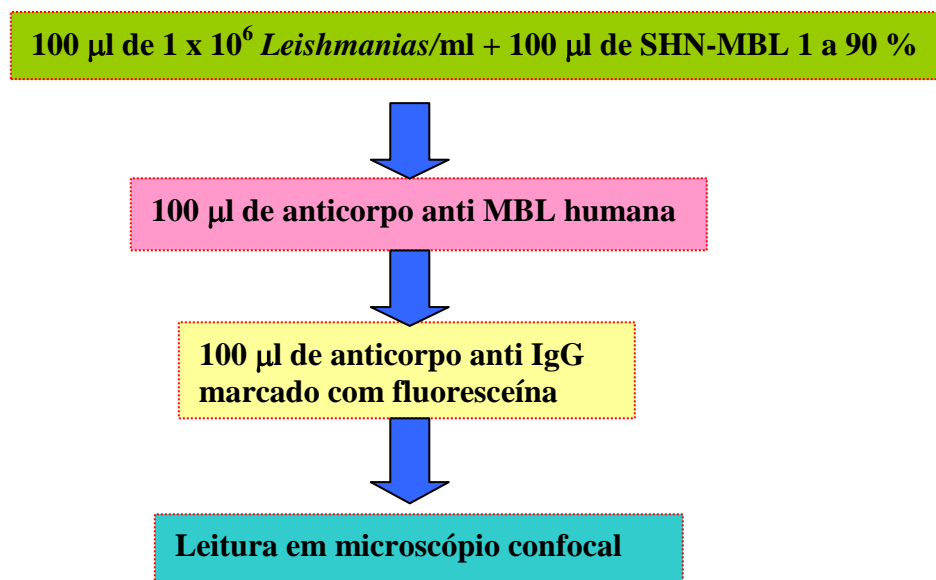


Fig. 12 Esquema demonstrando o ensaio de adesão da MBL humana as formas promastigotas da *L. braziliensis*.

4.9. Deposição de C1q, C4 e C3 na superfície da *L. braziliensis*

Formas promastigotas vivas da *L. braziliensis* em fase estacionária de crescimento foram lavadas três vezes em PBS e sua concentração ajustada para $1,5 \times 10^7$ parasitas/ml. 100 μ l da suspensão foram incubados por 45 minutos a 37°C com 100 μ l das seguintes soluções a 9.0 % em PBS: SHN, SHN-EDTA (ácido etilenodiamino tetra acético)(Sigma) 10 mM, SHN-EGTA (ácido etilenoglicol-bis β -aminoetileter N, N, N, N-tetra acético)(Sigma) 10 mM/MgCl₂ 6mM e SHN-I. Na seqüência os parasitas foram fixados em 100 μ l de PBS contendo 1.0 % de formaldeído por 60 minutos a 4°C e lavados três vezes em PBS. Finalmente os parasitas foram resuspensos em 100 μ l de PBS e incubados com 100 μ l de anticorpos policlonais de camundongo anti-C1q humano (Sigma), anti-C3 humano (Sigma) e anti-C4 humano (Sigma) conjugados com fluoresceína, por 60 minutos a temperatura ambiente. Em seguida os parasitas foram lavados três vezes e resuspensos em 50 μ l de PBS e observados em microscópio de imunofluorescência confocal (figura 13). Este experimento foi realizado em duplicata e repetido três vezes.

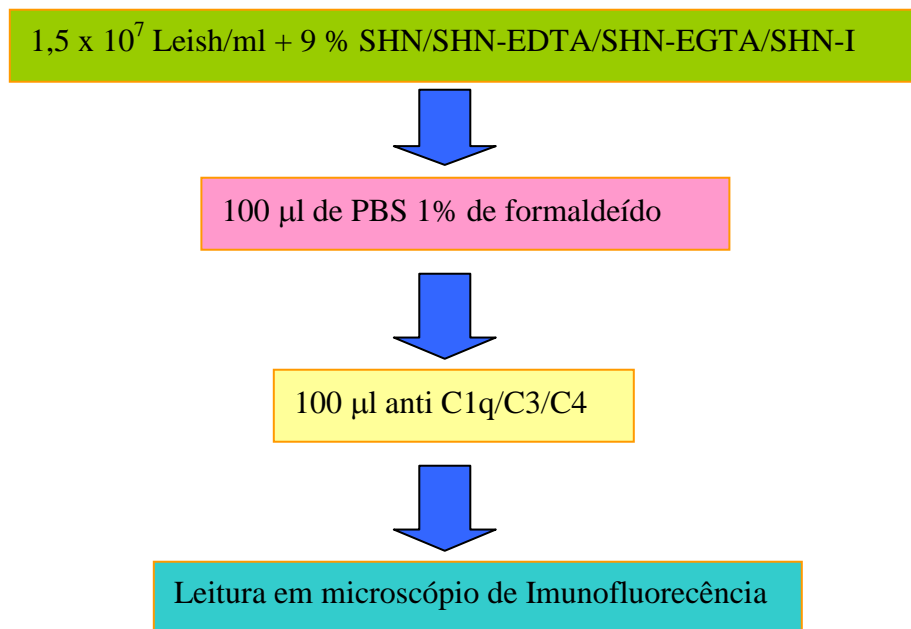


Fig. 13 Esquema ilustrando a deposição de C1q, C3, C4 na superfície da *L. braziliensis*.

4.10 Efeito lítico do complemento sobre promastigotas de *L. braziliensis*

O efeito lítico do complemento sobre as formas promastigotas da *L. braziliensis* foi avaliado através da determinação da mobilidade do parasita, incorporação do corante Trypan Blue (Sigma) e da habilidade de crescimento do parasita em cultura, após tratamento com SHN, sob diferentes condições:

- a) Com o objetivo de avaliar a participação da via alternativa na lise dos parasitas, 100 µl de parasitas na concentração de $1,5 \times 10^7$ /ml foram incubados com 100 µl de SHN, SHN-EDTA, SHN-EGTA, SHN-I e RPMI (Sigma) a 25 % em PBS por 30 minutos a 37°C e a reação interrompida pela adição de 1 ml de PBS a 4°C . Em seguida, foi adicionado 200µl de Trypan Blue (Sigma) 0,4 % em PBS. Finalmente,

dois observadores realizaram a contagem dos parasitas utilizando um hemocitômetro em aumento de 400 vezes. Parasitas imóveis e corados em azul foram considerados mortos. O resultado foi expresso em porcentagem de parasitas vivos. Este experimento foi realizado em duplicata e repetido seis vezes.

- b) Para identificação de uma possível influência da MBL sobre o efeito lítico do complemento contra as formas promastigotas da *L. braziliensis*, foi realizado um ensaio de lise em que alíquotas de 100 µl dos parasitas foram previamente tratadas com 100 µl de solução com 6µg de MBL/ml em TBS com 10 mM de CaCl₂ e 1 % BSA por 60 minutos a 4°C e logo em seguida submetidos ao teste de lise com 25% de SHN. Por outro lado, outras amostras de 100 µl dos parasitas sem nenhum tipo de tratamento foram submetidas ao ensaio de lise em presença de 100 µl de solução a 25% de SHN-MBL-def, 100µl de solução a 25% de SHN-MBL e com 100 µl de solução com 6 µg de MBL em TBS com 10 mM de CaCl₂ e 1 % BSA. O ensaio de lise foi realizado através da incubação de todos os tubos descritos acima por 30 minutos a 37°C e a reação parada pela adição de 1 ml de PBS gelado. Em seguida, foi adicionado 200µl de Trypan Blue (Sigma) 0,4 % em PBS. Finalmente, dois observadores realizaram a contagem dos parasitas utilizando um hemocitômetro em aumento de 400 vezes. Parasitas imóveis e corados em azul foram considerados mortos. O resultado foi expresso em porcentagem de parasitas vivos. Este experimento foi realizado em duplicata e repetido três vezes.
- c) O efeito lítico do complemento sobre os promastigotas foi também avaliado através da habilidade de crescimento em cultura após o tratamento com diferentes

concentrações de SHN em PBS (0 %, 2,5 %, 5,0 %, 7,5 %, 10,0 %, 12,5 %, 15,0 %, 20,0 %, 25,0 %, 30,0 % e 50,0 %), 30,0 % SHN-I e RPMI (Sigma), sendo utilizados sempre 100 µl dos parasitas para 100 µl da diluição do SHN. Todos os tubos contendo os parasitas, diferentes concentrações de SHN e controles foram incubados por 30 minutos a 37°C e a reação bloqueada com 200 µl de RPMI (Sigma) a 4°C. Na seqüência, uma amostra de 200µl de cada suspensão foi cultivada a 23°C em RPMI (Sigma) resultando em uma concentração final de 3×10^6 parasitas/ml. A porcentagem de parasitas vivos foi determinada após 44 horas de incubação, por dois observadores que realizaram a contagem dos parasitas utilizando um hemocitômetro em aumento de 400 vezes. Parasitas imóveis e corados em azul foram considerados mortos. O resultado foi expresso em porcentagem de parasitas vivos. Este experimento foi realizado em duplicata e repetido seis vezes.

5 RESULTADOS

5.1 Adesão da MBL purificada à superfície da *L. braziliensis*

Utilizando-se os recursos da microscopia confocal a superfície das formas promastigotas da *L. braziliensis* foi reconhecida pelo complexo MBL-MASP, através de microscopia confocal, utilizando-se anticorpo de camundongo anti-MBL-humana e anticorpo anti-IgG-camundongo conjugado com fluoresceína, nas concentrações de 1 e 6 $\mu\text{g/ml}$ (figura 14). Foi observado que a ligação da MBL purificada ocorreu sobre a superfície do corpo e flagelo dos parasitas vivos (figuras 14 A e B) não se difundindo no tegumento nem sendo a mesma endocitada no citoplasma. O padrão de fluorescência sobre a superfície do parasita ocorreu de forma irregular e granular. A maioria dos parasitas demonstrou uma maior intensidade de ligação a MBL purificada na base do flagelo, (figura 14 B).

No experimento controle, na ausência de MBL purificada, não foi observado qualquer sinal de fluorescência nem “background” visível sobre a superfície dos parasitas. Em microscopia de imunofluorescência ela apresenta-se completamente escura (figura 15).

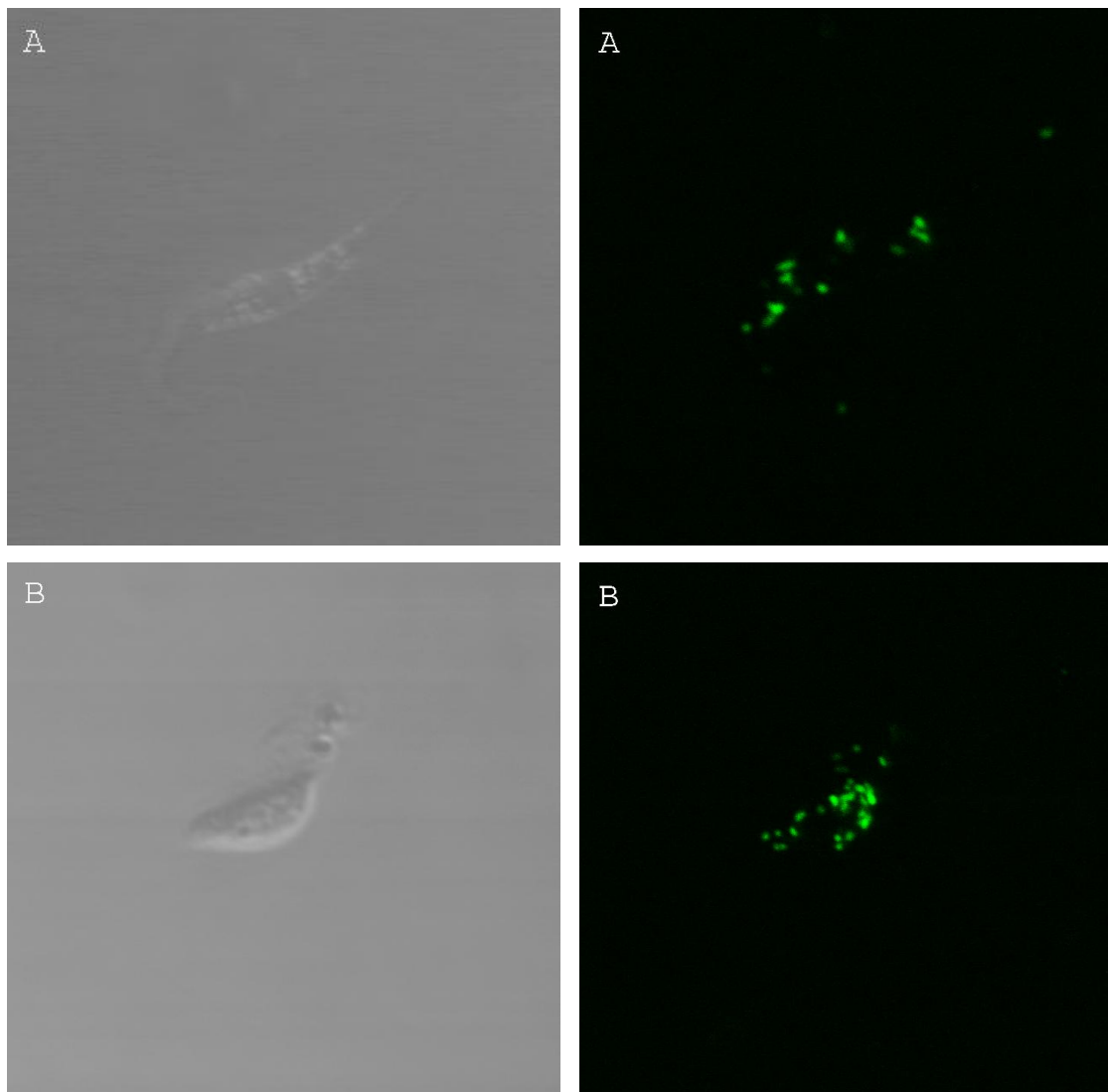


Fig. 14 Imunofluorescência confocal da ligação da MBL purificada na superfície de promastigotas da *L. braziliensis*. Na esquerda são observadas imagens sob luz transmitida e a direita sob luz fluorescente. Os promastigotas foram incubados com MBL purificada, na seqüência com anticorpo monoclonal anti-MBL-humana e com anticorpo anti-IgG-camundongo conjugado com fluoresceína. (A) ligação da MBL no corpo e flagelo do parasita, em (B) intensa e irregular ligação da MBL na base do flagelo. Foi utilizado zoom eletrônico para melhor visualização. Aumento: 600 x.



Fig. 15 Imunofluorescência confocal do controle negativo do experimento de ligação da MBL purificada à superfície das formas promastigotas da *L. braziliensis*. Na esquerda são observadas imagens sob luz transmitida e a direita sob luz fluorescente. Os parasitas foram incubados na ausência de MBL purificada, na seqüência com anticorpo monoclonal anti-MBL-humana e com anticorpo anti-IgG-camundongo conjugado com fluoresceína. Na esquerda é observado o parasita e na direita imagem completamente escura indicando ausência de fluorescência na superfície do parasita. Aumento: 600 x.

5.2 Inibição da adesão da MBL purificada

Para verificar a especificidade da ligação da MBL a manose presente na superfície da *L. braziliensis*, a MBL a ser utilizada no ensaio foi previamente tratada com manana que é o homopolissacarídeo da manose, e com manose purificada. Este tratamento levou ao

bloqueio dos domínios de reconhecimento dos carboidratos (CRD) da MBL, fazendo com que esta perca a capacidade de se ligar a estruturas contendo manose na superfície do parasita, o resultando observado foi de ausência completa de fluorescência na superfície da *L. braziliensis*, demonstrando assim que a manose é o açúcar envolvido na ligação da MBL a superfície das formas promastigotas da *L. braziliensis*. Em microscopia de imunofluorescência esta se apresenta completamente escura (figura 16). Quando se utilizou a galactose não foi detectado efeito inibitório na ligação da MBL.

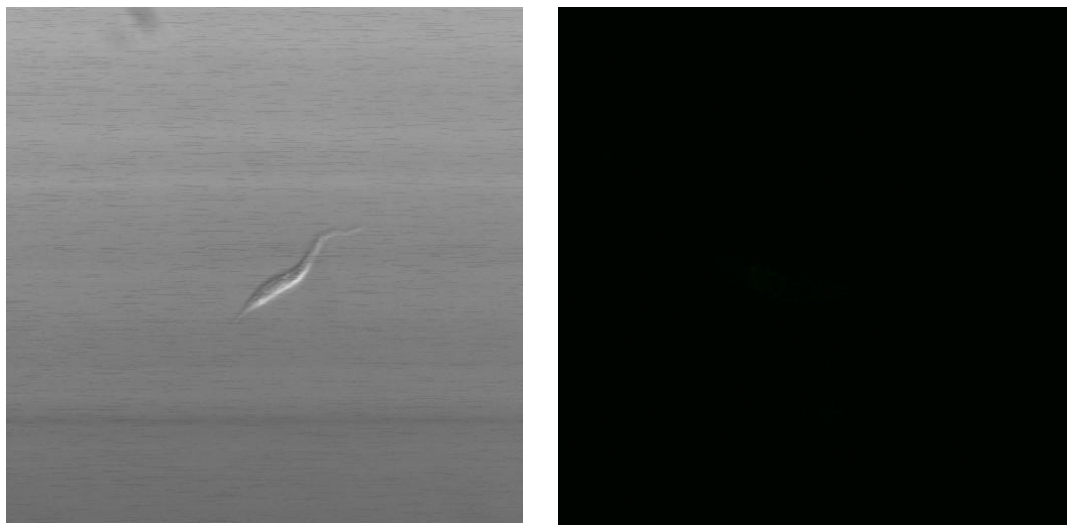


Fig. 16 Imunofluorescência confocal da inibição da adesão da MBL através do tratamento prévio da MBL com manana. Na esquerda são observadas imagens sob luz transmitida e a direita sob luz fluorescente. A MBL foi tratada com manana e em seguida incubada com a *L. braziliensis*, na seqüência com anticorpo monoclonal anti-MBL-humana, e com anticorpo anti-IgG-camundongo conjugado com fluoresceína. Na esquerda é observado o parasita e na direita imagem completamente escura indicando ausência de fluorescência na superfície do parasita. Aumento: 600 x.

5.3 Adesão da MBL plasmática humana às promastigotas de *L. braziliensis*

Da mesma maneira que a MBL purificada reconheceu estruturas contendo alta concentração de manose na superfície dos parasitas, a MBL plasmática também reconheceu a superfície das formas promastigotas da *L. braziliensis*, observado a partir da concentração de 10 % de SHN-MBL.

A ligação da MBL plasmática ocorreu tanto no flagelo como no corpo do parasita, apresentando-se de forma irregular e granular. A maioria dos parasitas apresentou uma reação mais intensa na base do flagelo (figura 17).

Utilizando-se dos recursos da microscopia confocal detectou-se que a ligação da MBL plasmática localizou-se na superfície do parasita, não se difundindo no tegumento nem sendo endocitada no citoplasma. Os parasitas apresentavam-se ainda vivos independente da ligação da MBL a sua superfície.

Na ausência de MBL não foi observado qualquer sinal de fluorescência nem visível “background” na superfície do parasita. Em microscopia de fluorescência esta imagem aparece completamente escura (figura 18).

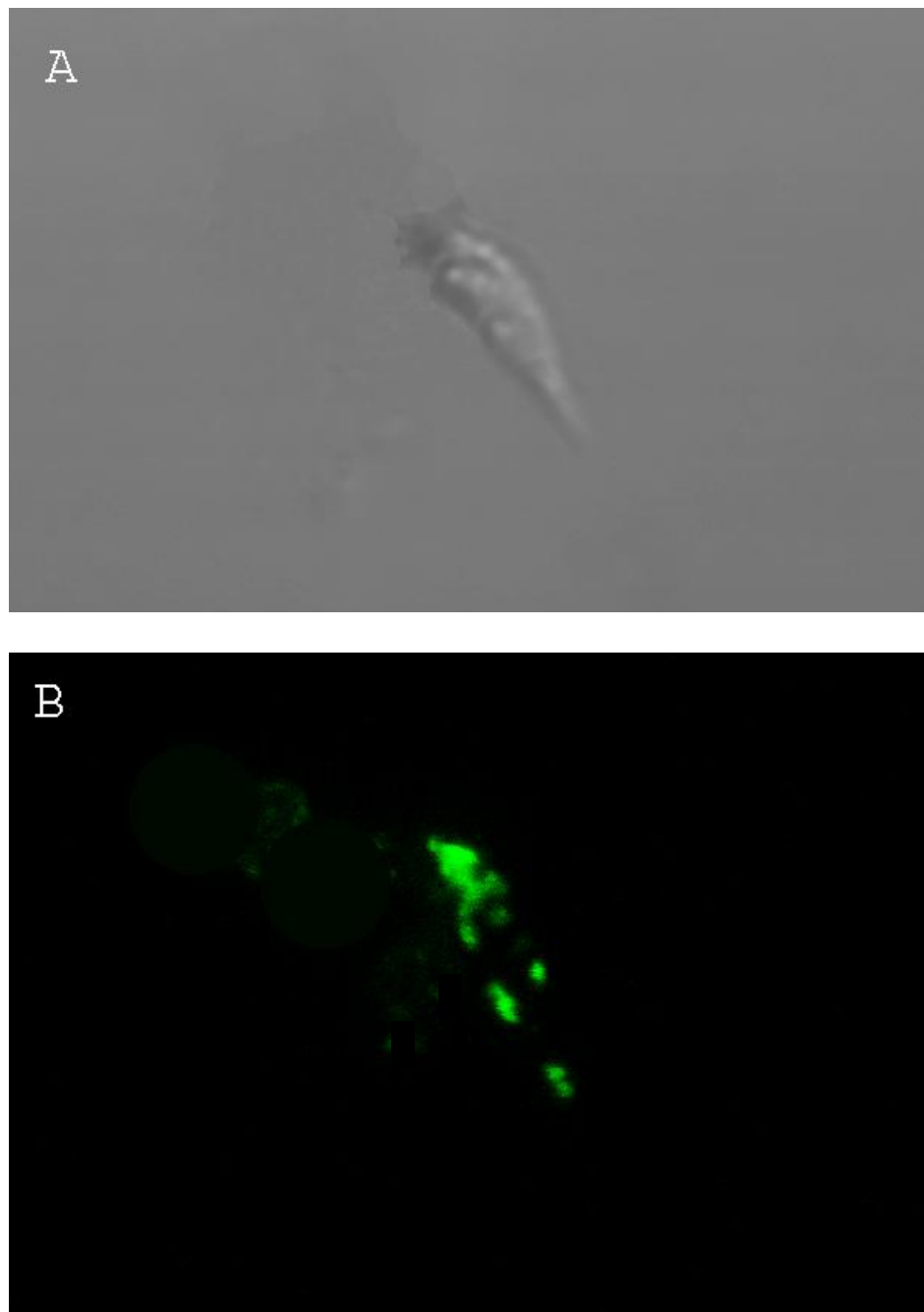


Fig. 17 Imunofluorescência confocal da ligação da MBL do SHN sobre a superfície dos promastigotas de *L. braziliensis*. Em A é observado o parasita sob luz transmitida, em B sob luz fluorescente. Os promastigotas foram incubados com SHN, em seguida com anticorpo monoclonal anti-MBL humana, e com anticorpo anti-IgG-camundongo conjugado com fluoresceína. Foi utilizado zoom eletrônico para melhor visualização. Aumento: 600 x.

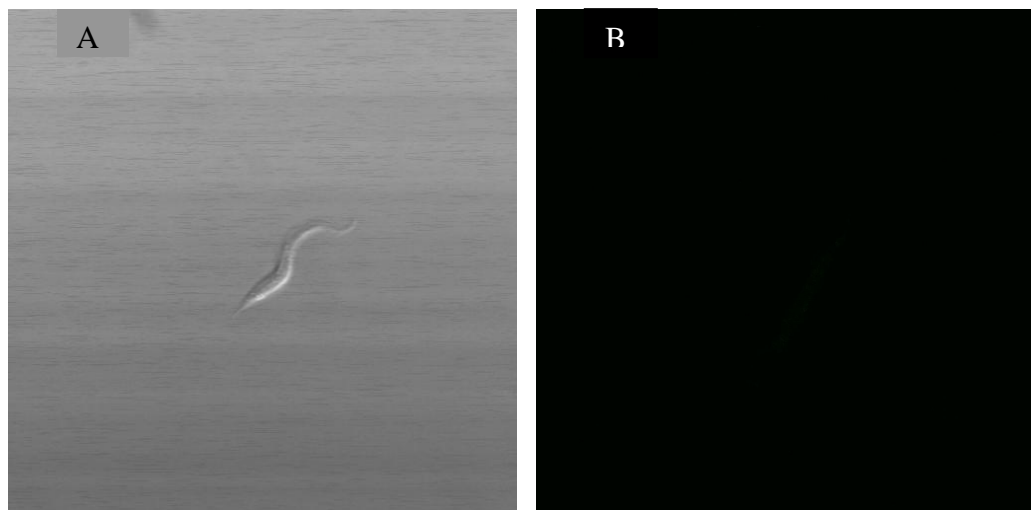


Fig. 18 Imunofluorescência confocal do controle negativo do ensaio de ligação da MBL plasmática sobre a superfície das promastigotas de *L. braziliensis*. Em A é observado o parasita sob luz transmitida, em B sob luz fluorescente. Os parasitas foram incubados na ausência de SHN-MBL, em seguida com anticorpo monoclonal anti-MBL humana, e com anticorpo anti-IgG-camundongo conjugado com fluoresceína. Aumento: A e B 600 x.

5.4 Adesão de C1q, C4 e C3 na superfície do parasita

Foi observado que após a interação com 9,0 % de SHN a 37°C por 45 minutos a deposição de C1q, C4 e C3 ocorre na superfície das formas promastigotas de *L. braziliensis*.

A adesão destes componentes foi visualizada através de ensaios de imunofluorescência utilizando-se da microscopia confocal (figura 19).

A adesão de C1q, C4 e C3 foi totalmente inibida quando se utilizou SHN tratado com EDTA e SHN inativado pelo calor. Por outro lado, SHN tratado com EGTA inibiu a deposição de C1q e C4, mas não a de C3.

No experimento controle em que o SHN estava ausente não foram observados qualquer sinal de fluorescência nem visível background para C1q, C4 ou C3 (Tabela 1).

Tabela 1

Deposição de complemento na superfície da *L. braziliensis* após tratamento com 9,0 % de SHN por 45 minutos a 37°C, observados através de ensaios de imunofluorescência em microscopia confocal.

Meio de incubação	C1q	C4	C3
SHN	++	++	+++
SHN/EGTA	-	-	++
SHN/EDTA	-	-	-
PBS	-	-	-
SHN-I	-	-	-

Resultados são demonstrados como intensidade de fluorescência na superfície dos promastigotas:

-, sem fluorescência; +++, fluorescência máxima.

SHN, soro humano normal; SHN/EGTA, soro humano normal contendo 10 mM EGTA e 6 mM MgCl₂; SHN/EDTA, soro humano normal contendo 10 mM EDTA; SHN-I soro humano normal inativado pelo calor.

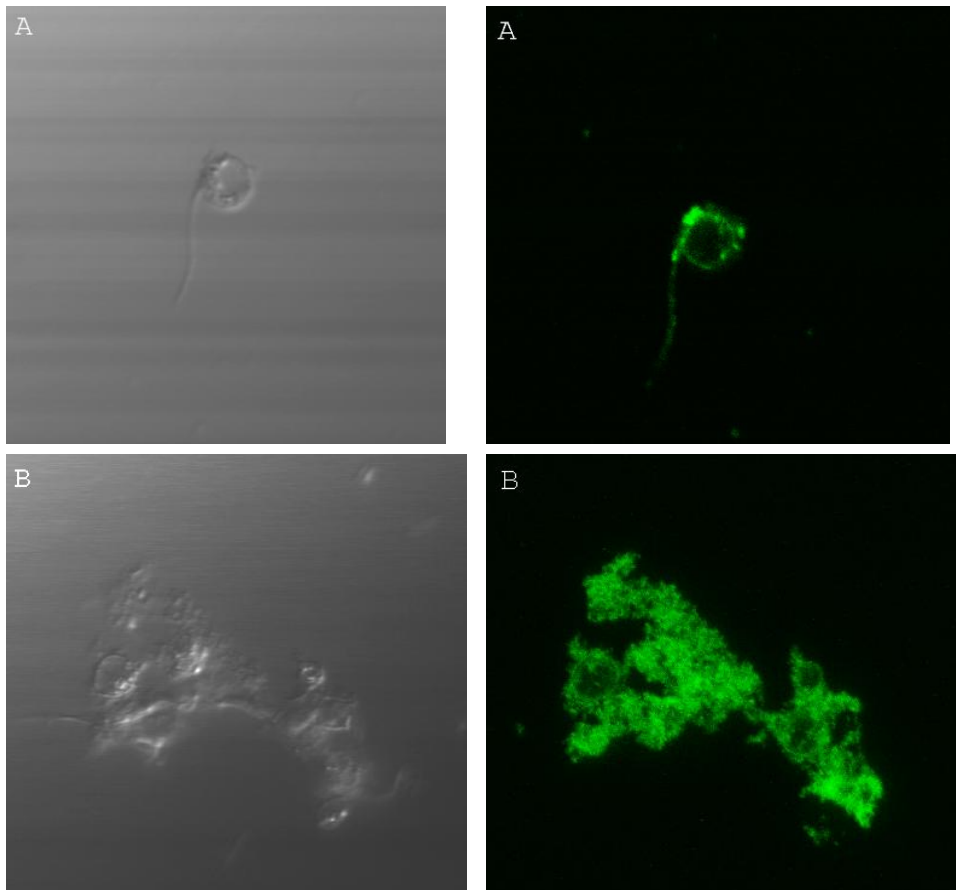


Fig. 19 Microscopia confocal da deposição de C3 (A) e efeito lítico do complemento (B) sob formas promastigotas da *L. braziliensis*. Na esquerda são observadas imagens sob luz transmitida e a direita sob luz fluorescente. Os parasitas foram incubados com 9,0 % de SHN, em seguida com anticorpo anti-C3-humano conjugado com fluoresceína. (A) parasita em fase pré-lítica (B) grupo de promastigotas com intenso depósito de C3 e que foram completamente destruídos pelo complemento. Aumento: 600 x.

5.5 Efeito lítico do complemento

5.5.1 Participação da via alternativa na lise das formas promastigotas de *L. braziliensis*

A incubação das formas promastigotas da *L. braziliensis* com 25,0 % de SHN, SHN tratado com EGTA resultou em completa imobilização dos parasitas e a sua marcação em azul demonstrando a incorporação do corante trypan blue e morte dos parasitas. Por outro lado, quando se utilizou SHN tratado com EDTA e SHN inativado pelo calor houve inibição deste efeito sobre os parasitas, indicando que o sistema complemento através da via alternativa foi o responsável pela destruição da *L. braziliensis* (Tabela 2)

Tabela 2

Efeito na mobilidade e incorporação de trypan blue sob promastigotas de *L. braziliensis* após interação com 25,0 % de SHN por 30 minutos a 37°C.

Meio de incubação	% Parasites móveis	Número de testes
SHN	0.0	6
SHN/EGTA	0.0	6
SHN/EDTA	25.1 ± 4.6 *	6
SHN-I	35.4 ± 2.9*	6
RPMI	35.3 ± 7.4*	6

* Erro padrão da média

SHN, soro humano normal; SHN/EGTA, soro humano normal contendo 10 mM EGTA e 6 mM MgCl₂; SHN/EDTA, soro humano normal contendo 10 mM EDTA; SHN-I soro humano normal inativado pelo calor.

5.5.2 Influência da MBL no efeito lítico do complemento sobre a *L. braziliensis*

Os ensaios para verificar a influência da MBL no processo de lise causado pelo sistema complemento, avaliado pelo pré-tratamento da *L. braziliensis* com 6 µg de MBL purificada/ml, demonstram a destruição de todos os parasitas, indicando que a ligação prévia da MBL a superfície das formas promastigotas da *L. braziliensis* não exerceu papel protetor na lise mediada pelo complemento. Os experimentos realizados com a finalidade de determinar se a presença da MBL era necessária na lise dos parasitas pelo complemento utilizando-se SHN com alta concentração de MBL e SHN deficiente em MBL demonstraram que tanto o SHN com alta concentração de MBL como o SHN deficiente em MBL levaram a lesão de todos os parasitas. Esses resultados demonstram que a presença da MBL não é necessária para que o sistema complemento provoque a lise das formas promastigotas da *L. braziliensis*.

Nos experimentos realizados com a finalidade de detectar se a MBL teria uma atividade lítica direta sobre as formas promastigotas de *L. braziliensis*, observou-se que a ligação da MBL não alterou a mobilidade e incorporação de trypan blue dos parasitas, quando comparados com o controle no qual utilizou-se RPMI, indicando que a MBL per se não possui efeito lítico sobre a *L. braziliensis*. (Tabela 3).

Tabela 3

Influência da MBL no efeito lítico do complemento sobre formas promastigotas da *L. braziliensis*, após incubação por 30 minutos a 37°C em diferentes condições.

Meio de incubação	% de parasitas móveis	Número de testes
SHN-MBL-def	0,0	3
SHN-MBL	0,0	3
Leish./MBL	0,0	3
MBL-MASP	32,5 ± 3,7 *	3
RPMI	35,3 ± 7,4	3

* Erro padrão da média

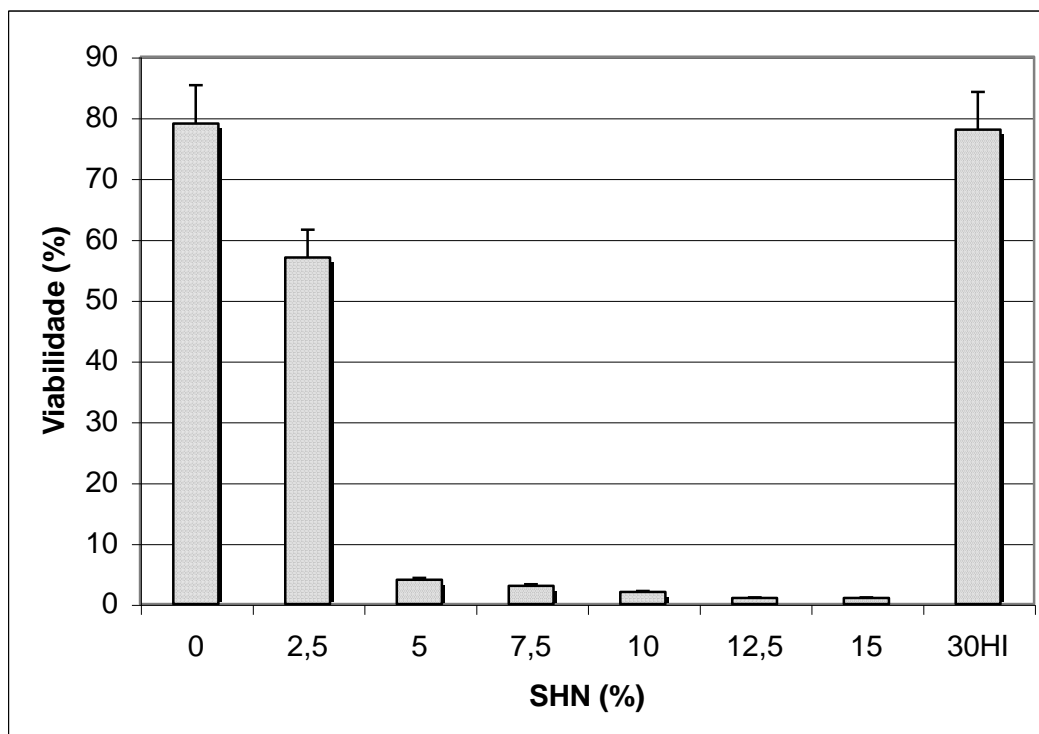
SHN-MBL-def, parasitas incubados com 25% de SHN-MBL-def; SHN-MBL, parasitas incubados com 25% de SHN-MBL; Leish./MBL, parasitas foram pré-tratados com 6 µg de MBL-MASP purificado e a seguir incubados com 25% de SHN; MBL-MASP, parasitas foram incubados com 6 µg/ml do complexo MBL-MASP purificado.

5.5.3 Verificação da capacidade de crescimento da *L. braziliensis* após ensaio de lise.

A avaliação da capacidade de crescimento das formas promastigotas da *L. braziliensis* após ensaio de lise com concentrações crescentes de SHN (2,5%, 5,0%, 7,5%, 10,0%, 12,5% e 15,0%) e submetidos a crescimento em cultura a 25°C por 44 horas, demonstrou que o processo de destruição dos parasitas promovido pelo complemento está diretamente relacionado com a concentração de SHN utilizada.

Na presença de 2,5 % de SHN observou-se que 57,5 % dos parasitas estavam vivos, com a utilização de 5,0 % apenas 4,0% dos parasitas encontravam-se viáveis, e quando foi utilizada a concentração de 15,0 % de SHN, o efeito lítico foi sobre 100 % dos parasitas.

Nos experimentos controles que foram realizados na ausência de SHN e na presença de 30 % de SHN inativado pelo calor, não foram observadas alterações na viabilidade dos parasitas, demonstrando que o efeito lítico do SHN sobre as formas promastigotas da *L. braziliensis* é mediado pelo sistema complemento (figura 20).



30HI: 30 % de SHN inativado pelo calor.

Fig. 20 Viabilidade da *L. braziliensis* após interação com diferentes concentrações de SHN por 30 minutos a 37°C, em cultura por 44 horas.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo foi demonstrada pela primeira vez, a interação *in vitro* entre formas promastigotas de *L. braziliensis* e MBL purificada e plasmática, além da influência desta ligação sobre a lise dos parasitas mediada pelo complemento. Demonstrou-se também que as três vias do complemento alternativa, clássica e das lectinas são ativadas pela *L. braziliensis*. A metodologia empregada visou utilizar condições *in vitro* que se aproximassem daquelas que ocorrem *in vivo* durante a infecção pela *L. braziliensis*. Com esta finalidade utilizou-se a forma promastigota da *L. braziliensis* em fase estacionária de crescimento, quando estão presentes grandes quantidades de formas metacíclicas do parasita, as quais são as formas infectivas da *L. braziliensis* (Pinto-da-Silva, Camurate et al. 2002).

No processo de infecção de um mamífero pela *L. braziliensis* o mosquito transmissor injeta as formas promastigotas do parasita no hospedeiro durante a picada. Uma vez na região subcutânea as promastigotas entrarão em contato com as proteínas presentes no conteúdo extracelular e no plasma humano, e um dos primeiros mecanismos de defesa do organismo que se torna ativado é o sistema complemento.

Os resultados aqui obtidos demonstraram que as formas promastigotas da *L. braziliensis* ligam tanto a MBL purificada como a MBL do plasma humano e que esta ligação ocorre especificamente através do carboidrato manose. A ligação específica da MBL a carboidratos presentes na superfície da *L. braziliensis* foi observada através de ensaios de inibição utilizando-se manana, que é o polissacarídeo da manose, o qual é formado por unidades repetitivas do monossacarídeo a uma distância de 45 Å e com arranjo estrutural que permite a ligação da MBL (Sheriff, Chang et al. 1994). A prévia utilização de manana inibiu completamente a adesão da MBL a superfície do parasita. As unidades

repetitivas de manose no polissacarídeo levaram ao bloqueio dos sítios de reconhecimento de carboidratos da MBL, impedindo a ligação destes com carboidratos do parasita, indicando, portanto que a ligação MBL-*L. braziliensis* é mediada pela manose. A MBL purificada foi utilizada na concentração de 6 e 1 µg/ml, que está dentro dos limites padrões de concentração da MBL encontrada no soro humano (Thiel, Holmskov et al. 1992; Luty, Kun et al. 1998).

Observou-se também que a MBL presente no SHN também foi capaz de ligar-se aos parasitas, indicando desta maneira que este evento pode ocorrer durante a infecção *in vivo* pela *L. braziliensis*. O SHN utilizado nos experimentos foi oriundo de indivíduos que não possuíam história de leishmaniose e com imunofluorescência indireta negativa para *Leishmania*. Além disso, antes que os SHN fossem utilizados, estes foram pré-adsorvidos com formas promastigotas da *L. braziliensis* a 4°C, a fim de eliminar a presença de anticorpos naturais ou cross-reativos com *L. braziliensis*, excluindo assim uma possível participação de anticorpos no processo de ligação da MBL ao parasita.

Os resultados demonstraram que a ligação da MBL a *L. braziliensis* foi mais intensa na maioria dos parasitas na base do flagelo, uma área da membrana plasmática que é o principal local de exocitose, o qual contém uma alta concentração de antígenos de superfície (Pimenta, Saraiva et al. 1991; Stierhof, Schwarz et al. 1991).

A ligação da MBL sobre o flagelo e superfície da *L. braziliensis*, em padrão granular e irregular observada através de imunofluorescência pode ser devida a multivalência da MBL, já que o complexo MBL-MASP consiste de aproximadamente 18 subunidades de CRD. Como as *Leishmanias* possuem na sua superfície celular estruturas glicolípídicas como as lipofosfoglicanas (LPG) (McConville and Blackwell 1991), que

apresentam grande quantidade de manose, e para que a ligação da MBL ocorra é necessário que as unidades de manose estejam a uma distância de 45 Å e com arranjo estrutural adequado, isto só ocorreria em sítios específicos na superfície do parasita que poderia levar a um agrupamento das moléculas de MBL.

Estudos anteriores com outras espécies de *Leishmania* demonstraram que a MBL reconhece componentes do principal glicoconjugado celular do parasita. Green et al., demonstraram que a MBL reconhece estruturas contendo alta concentração de manose como os lipofosfoglicanas (LPG) nas formas promastigotas da *L. major* e *L. mexicana*. Esses autores demonstraram desta maneira que a MBL possui o potencial de opsonizar o principal estágio infectante destes parasitas, e forneceram evidências de ativação do complemento independente da presença de anticorpos pelas promastigotas (Green, Feizi et al. 1994). Outro estudo realizado com a cercária e o verme adulto de *Schistosoma mansoni* demonstrou que a MBL é capaz de se ligar a esses dois estágios de desenvolvimento deste parasita (Klabunde, Berger et al. 2000). Nesse trabalho também se demonstrou que a MBL em associação com as serina proteases MASP1 e MASP2, é capaz de ativar o sistema complemento através da via das lectinas, utilizando-se soro humano deficiente de C1. De maneira similar Gruden-Movsesijan et al. investigando vários estágios do parasita nematóide *Trichinella spirallis*, demonstrou que a MBL é capaz de ligar-se tanto a estruturas de superfície, como internas em todos os estágios de desenvolvimento do parasita. Os autores também demonstraram que a MBL pode ativar o complemento pela via das lectinas, apontando-a como um mecanismo imune inato de defesa contra este parasita (Gruden-Movsesijan, Petrovic et al. 2003).

A ativação do complemento é um mecanismo essencial no processo de estabelecimento das leishmanioses, e pode ser iniciado também pela deposição do

complexo MBL-MASP a formas infectivas da *L. braziliensis*. Os resultados do presente trabalho sugerem que a MBL pode participar de maneira ativa durante o processo de instalação da leishmaniose mucocutânea, representando um mecanismo de ativação do complemento independente de anticorpo. Como as formas promastigotas da *L. braziliensis* podem ativar o complemento pela via clássica e/ou alternativa, aqui demonstrado, a atividade da via das lectinas representaria um mecanismo adicional de ativação de complemento que culminaria com o aumento da fagocitose e conseqüentemente favoreceria o estabelecimento da doença.

O envolvimento da MBL na ativação do complemento na superfície das promastigotas da *L. braziliensis* é consistente com os seguintes relatos da literatura:

- (1) o provável glicoconjugado (LPG) ligante para a MBL, também é o receptor dos componentes de C3 na superfície do parasita (Puentes, Sacks et al. 1988);
- (2) a ativação do complemento pelo parasita é independente de anticorpo (Mosser and Edelson 1987) e
- (3) que a ativação do complemento ocorre através das via alternativa, clássica (Puentes, Sacks et al. 1988).

Já é reconhecido que a MBL por si só pode promover a opsonização e fagocitose de microorganismos, podendo intensificar a sua interiorização nas células fagocíticas (Kuhlman, Joiner et al. 1989). A *Leishmania* é um patógeno intracelular, logo a fagocitose é essencial para o estabelecimento da doença. A MBL tem sido considerada uma molécula candidata no envolvimento da progressão de doenças causadas por parasitas intracelulares (Garred, Harboe et al. 1994; Green, Feizi et al. 1994).

A ligação da MBL à superfície da *L. braziliensis* pode ser fisiopatologicamente importante na interação entre as formas promastigotas e os macrófagos que é a principal célula envolvida no processo de estabelecimento da doença. A ligação da MBL pode aumentar a ativação do complemento e deposição de C3b e C3bi na superfície do parasita e assim incrementar a adesão e interiorização desses aos macrófagos via os receptores CR1 e CR3. Esta parece ser a principal via de ataque das formas virulentas (metacíclicas), que é a principal forma das promastigotas introduzidas na pele do hospedeiro durante a picada do inseto transmissor (Da Silva, Hall et al. 1989; Mosser, Springer et al. 1992). Acredita-se que a fagocitose via esses receptores evita a ativação dos macrófagos e seu efeito microbicida, facilitando assim a sobrevivência intracelular do parasita (Wright and Silverstein 1983; Da Silva, Hall et al. 1989). Nos resultados deste trabalho observa-se que, a ligação da MBL aos parasitas não induz ou altera a lise mediada pelo complemento, é provável que a deposição da MBL na superfície das promastigotas de *L. braziliensis* favoreça a sua opsonização e fagocitose e conseqüentemente o seu escape da lise pelo complemento.

A ligação da MBL ao microorganismo pode também aumentar a sua fagocitose através da interação direta do domínio de colectina e de CR1 (Ghiran, Barbashov et al. 2000; Turner 2003) nas células mononucleares fagocíticas. Isto foi demonstrado em estudos com a *Salmonella montevideo* que expressa grande quantidade de lipopolissacarídeos ricos em manose e é rapidamente fagocitada quando opsonizada por MBL na ausência de complemento sérico (Kuhlman, Joiner et al. 1989). Assim, a ligação da MBL a *L. braziliensis* pode acrescentar um mecanismo adicional de interação das promastigotas com as células fagocíticas, levando a um aumento da fagocitose dos parasitas.

Foi demonstrado recentemente (Santos, Costa et al. 2001), que a MBL pode modular as funções de células infectadas com *L. chagasi in vitro* e que, *in vivo*, as concentrações de MBL circulante estão diretamente relacionadas com o desenvolvimento de leishmaniose visceral causada por *L. chagasi*. Os autores demonstraram que os macrófagos infectados com parasitas previamente opsonizados com MBL eram capazes de produzir altas concentrações de fator de necrose tumoral alfa e de interleucina 6, demonstrando assim que a MBL exerce uma função moduladora da secreção de citocinas pró-inflamatórias nos macrófagos infectados. Por outro lado, Laufs et al. demonstraram que a MBL não participa do processo de interiorização da *L. major* por neutrófilos (Laufs, Muller et al. 2002).

A MBL está presente no plasma humano e atua como proteína de fase aguda, que pode aumentar 1,5 a 3,0 vezes em uma infecção aguda (Thiel, Holmskov et al. 1992). Demonstrou-se recentemente que a MBL pode ter um papel proinflamatório ativo em diferentes doenças crônicas. Altas concentrações séricas de MBL em pacientes com doença reumática cardíaca crônica podem causar indesejável ativação do complemento contribuindo para a patogênese da doença (Schafranski, Stier et al. 2004). Este efeito proinflamatório poderia também ser considerado no curso da leishmaniose mucocutânea causada pela *L. braziliensis*, pois esta doença possui como característica longos períodos de latência, e causas ainda desconhecidas determinam o aparecimento tardio das lesões mucocutâneas. Portanto, como descrito na leishmaniose visceral, a MBL poderia exercer uma ação pró-inflamatória nesta segunda etapa da leishmaniose mucocutânea, a qual possui característica de evolução rápida levando a lesões graves e deformantes e até óbito.

O estágio intracelular (amastigota) das *Leishmanias* possui camada fina de glicocalix devido a diminuição das LPGs (McConville and Blackwell 1991; Bahr, Stierhof

et al. 1993) e da glicoproteína de superfície gp63 (Schneider, Rosat et al. 1992; Bahr, Stierhof et al. 1993). Entretanto, glicoproteínas de baixo peso molecular como o fosfolípido-glicoinositol (GIPLs) são expressas na superfície das formas amastigotas (McConville and Blackwell 1991; Schneider, Rosat et al. 1993). Embora existam diferenças espécie específicas no perfil de GIPL das amastigotas, o principal GIPL característico das espécies contem resíduos de manose que são reconhecidos pela MBL (McConville and Blackwell 1991; Schneider, Rosat et al. 1993). Estas observações indicam que as formas amastigotas podem também ser opsonizadas pela MBL quando estas são liberadas pela ruptura dos macrófagos e são expostas transitoriamente aos componentes do soro. Existem evidências de que na presença de soro, formas amastigotas da *L. donovani* e *L. major* invadem macrófagos via receptores do complemento CR3 e receptores para colectinas (Blackwell, Ezekowitz et al. 1985; Guy and Belosevic 1993).

A deposição de C4, C1q e C3 na superfície das promastigotas após interação com 9,0 % de SHN, indica ativação da via clássica. A remoção de cálcio pelo EGTA inibiu a deposição de C4 e C1q, mas não de C3 demonstrando que o magnésio é necessário neste processo, enquanto o cálcio não, sugerindo assim ativação da via alternativa. Desta forma demonstrou-se que tanto a via clássica como a via alternativa são ativadas pelas formas promastigotas da *L. braziliensis*. Diversos estudos têm demonstrado que espécies de *Leishmanias* podem ativar o complemento por diferentes vias. Mosser et al. demonstraram que formas promastigotas de *L. donovani* induzem ativação da via clássica (Mosser, Burke et al. 1986). Por outro lado, Noronha et al., demonstraram que formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis* são capazes de ativar o complemento pela via alternativa (Noronha, Nunes et al. 1998).

Neste trabalho demonstrou-se que as formas promastigotas da *L. braziliensis* podem ativar o sistema complemento utilizando as três vias alternativa, clássica e das lectinas. Desta maneira o processo de interação dos parasitas com o SHN envolve provavelmente uma complexa inter-relação entre as três vias de ativação do complemento.

Nossos resultados demonstraram que o SHN é capaz de lesar formas promastigotas da *L. braziliensis*, que esta lise se deve à ação do sistema complemento e que este processo está diretamente relacionado com a concentração de SHN. Noronha et al. estudando algumas espécies de *Leishmanias* causadoras da leishmaniose tegumentar americana no Novo Mundo, observaram que espécies como a *L. mexicana* e *L. amazonensis* são resistentes ao complemento durante a sua fase estacionária de crescimento, e que por outro lado as espécies *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. braziliensis* são sensíveis ao complemento durante todo o período de crescimento (Noronha, Nunes et al. 1998). Esses dados estão de acordo com os obtidos neste trabalho, que comprovaram a lise causada pelo complemento através de motilidade, incorporação do corante trypan blue e capacidade de crescimento em cultura. Portanto, essas evidências levam a hipótese de que *in vivo* as promastigotas da *L. braziliensis* devem utilizar-se de mecanismos de escape para evitar a formação do complexo lítico de membrana do complemento e destruição dos parasitas, levando conseqüentemente ao estabelecimento da doença.

Vários mecanismos de escape da *Leishmania* à ação lítica do complemento têm sido descritos. Dentre eles, destaca-se a rápida fagocitose das formas promastigotas por macrófagos que pelo tempo insuficiente evitaria a completa ação lesiva do sistema complemento (Jokiranta, Jokipii et al. 1995). Outro mecanismo descrito sugere que durante a passagem da forma não infectiva para a infectiva, os glicolipídeos de superfície sofrem alterações estruturais, que levam ao bloqueio da inserção de C5b-9 na membrana do

parasita (Puentes, Da Silva et al. 1990). Ainda, enzimas presentes na superfície dos parasitas promovem a fosforilação de componentes do sistema complemento como C3, C5 e C9 levando a sua inativação e, conseqüentemente inibindo a ativação das vias clássica e alternativa (Hermoso, Fishelson et al. 1991). Por outro lado, Mosser e Edelson demonstraram que a deposição de C3 é responsável pela entrada na célula fagocítica e sobrevivência da *L. major* (Mosser and Edelson 1987).

As afirmações acima descritas demonstram que as *leishmanias* interagem de uma maneira bastante complexa com o sistema imunológico do hospedeiro incluindo etapas ainda não bem definidas e que necessitam ser elucidadas.

Os resultados deste trabalho demonstraram que a interação das formas promastigotas da *L. braziliensis* com o SHN, levou a varias alterações na superfície do parasita, as quais concordam com a sentença de que nos primeiros instantes após a introdução do parasita no hospedeiro ocorre uma complexa interação deste com componentes do soro, e que com habilidade o parasita utiliza todo este mecanismo para instalar-se no hospedeiro.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo conduziram às seguintes conclusões:

1. A MBL humana purificada bem como a plasmática têm a habilidade de se ligar a estruturas de superfície das formas promastigotas da *L. braziliensis*.
2. A ligação da MBL humana a *L. braziliensis* ocorre através da manose presente na superfície no parasita.
3. A ligação da MBL humana a *L. braziliensis* não altera o efeito lítico do complemento sobre os parasitas.
4. As formas promastigotas da *L. braziliensis* ativam as vias alternativa e clássica do sistema complemento.
5. O soro humano normal é capaz de lisar formas promastigotas da *L. braziliensis* através da via alternativa do complemento.

Finalmente, os resultados deste estudo fornecem evidências de um mecanismo de ativação do complemento independente de anticorpos, e que as vias da MBL, alternativa e clássica podem ter um papel considerável na primeira linha de defesa contra a *L. braziliensis*.

Referências Bibliográficas

- Abbas, A. K. L., A.H.; Pober, J.S. (1997). The complement system. Cellular and molecular immunology. A. K. L. Abbas, A.H.; Pober, J.S. Philadelphia, Saunders: 313-338.
- Alan, R. and B. Ezekowitz (1991). "Ante-antibody immunity." Curr Biol **1**(1): 60-2.
- Bahr, V., Y. D. Stierhof, et al. (1993). "Expression of lipophosphoglycan, high-molecular weight phosphoglycan and glycoprotein 63 in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*." Mol Biochem Parasitol **58**(1): 107-21.
- Bing, D. H. A., C.A. (1995). Complement in health and disease. Diagnostic Immunopathology. R. B. B. Colvin, A.K.; McCluskey, R.T. New York, Raven Press: 85-94.
- Blackwell, J. M., R. A. Ezekowitz, et al. (1985). "Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum." J Exp Med **162**(1): 324-31.
- Bowdre, J. H., J. L. Campbell, et al. (1981). "American mucocutaneous leishmaniasis. Culture of a *Leishmania* species from peripheral blood leukocytes." Am J Clin Pathol **75**(3): 435-8.
- Brittingham, A., C. J. Morrison, et al. (1995). "Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis." J Immunol **155**(6): 3102-11.
- Cavalcante, R. R., M. H. Pereira, et al. (2003). "Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects." Parasitology **127**(Pt 1): 87-93.
- Coutinho, S. G., M. P. Oliveira, et al. (1996). "T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure." Exp Parasitol **84**(2): 144-55.
- Da Silva, R. P., B. F. Hall, et al. (1989). "CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania* major metacyclic promastigotes to human macrophages." J Immunol **143**(2): 617-22.
- Dahl, M. R., Thiel, S., Willis, A.C., Vorup-Jensen, T., Christensen, T., Petersen, S.V., Jensenius, J.C. (2000). "Mannan-binding lectin associated serine protease 3 (MASP-3)-a new component of the lectin pathway of complement activation." Immunopharmacology **49**: 79.
- Davies, E. J., N. Snowden, et al. (1995). "Mannose-binding protein gene polymorphism in systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **38**(1): 110-4.

- Davies, E. J., L. S. Teh, et al. (1997). "A dysfunctional allele of the mannose binding protein gene associates with systemic lupus erythematosus in a Spanish population." J Rheumatol **24**(3): 485-8.
- Delves, P. J. R., I.M. (1992). Complement, post-C3 (lytic) pathway. Roitt, I.M.; Delves, P.J. Encyclopedia of Immunology. I. M. D. Roitt, P.J. London, Academic press: 385-387.
- Drickamer, K. (1992). "Engineering galactose-binding activity into a C-type mannose-binding protein." Nature **360**(6400): 183-6.
- Ember, J. A. J., M.A.; Hugli, T.E. (1998). Characterization of complement anaphylatoxins and their biological responses. Volanakis, J.E.; Frank, M.M. The human complement system in health and disease. J. E. F. Volanakis, M.M. New York, Marcel Dekker: 241-284.
- Franke, E. D., P. B. McGreevy, et al. (1985). "Growth cycle-dependent generation of complement-resistant *Leishmania* promastigotes." J Immunol **134**(4): 2713-8.
- Furtado, T., Vieira, J.B.F. (1982). "Geografia da leishmaniose tegumentar americana no Brasil." An Bras Dermatol **57**: 135-140.
- Garred, P., M. Harboe, et al. (1994). "Dual role of mannan-binding protein in infections: another case of heterosis?" Eur J Immunogenet **21**(2): 125-31.
- Garred, P., H. O. Madsen, et al. (1997). "Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin." Lancet **349**(9047): 236-40.
- Garred, P., H. O. Madsen, et al. (2000). "Two edged role of mannose binding lectin in rheumatoid arthritis: a cross sectional study." J Rheumatol **27**(1): 26-34.
- Ghiran, I., S. F. Barbashov, et al. (2000). "Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin." J Exp Med **192**(12): 1797-808.
- Glovsky, M. M. (1994). Applications of complement determinations in human disease. Annals of Allergy, Palatine. **72**: 477-790.
- Graudal, N. A., C. Homann, et al. (1998). "Mannan binding lectin in rheumatoid arthritis. A longitudinal study." J Rheumatol **25**(4): 629-35.
- Graudal, N. A., H. O. Madsen, et al. (2000). "The association of variant mannose-binding lectin genotypes with radiographic outcome in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **43**(3): 515-21.

- Green, P. J., T. Feizi, et al. (1994). "Recognition of the major cell surface glycoconjugates of *Leishmania* parasites by the human serum mannan-binding protein." Mol Biochem Parasitol **66**(2): 319-28.
- Gruden-Movsesijan, A., M. Petrovic, et al. (2003). "Interaction of mannan-binding lectin with *Trichinella spiralis* glycoproteins, a possible innate immune mechanism." Parasite Immunol **25**(11-12): 545-52.
- Guy, R. A. and M. Belosevic (1993). "Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages." Infect Immun **61**(4): 1553-8.
- Hermoso, T., Z. Fishelson, et al. (1991). "Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system." Embo J **10**(13): 4061-7.
- Holmskov, U., R. Malhotra, et al. (1994). "Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system." Immunol Today **15**(2): 67-74.
- Iobst, S. T. and K. Drickamer (1994). "Binding of sugar ligands to Ca(2+)-dependent animal lectins. II. Generation of high-affinity galactose binding by site-directed mutagenesis." J Biol Chem **269**(22): 15512-9.
- Ip, W. K., Y. L. Lau, et al. (2000). "Mannose-binding lectin and rheumatoid arthritis in southern Chinese." Arthritis Rheum **43**(8): 1679-87.
- Jack, D. L., R. C. Read, et al. (2001). "Mannose-binding lectin regulates the inflammatory response of human professional phagocytes to *Neisseria meningitidis* serogroup B." J Infect Dis **184**(9): 1152-62.
- James, K. (1997). Mechanisms of the nonspecific immune response. Clinical Immunology. Principles and laboratory diagnosis. C. Sheehan. Philadelphia, Lippincott: 33-53.
- Jokiranta, T. S., L. Jokipii, et al. (1995). "Complement resistance of parasites." Scand J Immunol **42**(1): 9-20.
- Killick-Kendrick, R. (1990). "The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host." Ann. Parasitol. Hum. Comp. (Suppl. 1) **65**: 37-42.
- Kirschfink, M. (1997). "Controlling the complement system in inflammation." Immunopharmacology **38**(1-2): 51-62.
- Klabunde, J., J. Berger, et al. (2000). "*Schistosoma mansoni*: adhesion of mannan-binding lectin to surface glycoproteins of cercariae and adult worms." Exp Parasitol **95**(4): 231-9.
- Klickstein, L. B., S. F. Barbashov, et al. (1997). "Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a receptor for C1q." Immunity **7**(3): 345-55.

- Koch, A., M. Melbye, et al. (2001). "Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood." Jama **285**(10): 1316-21.
- Kuhlman, M., K. Joiner, et al. (1989). "The human mannose-binding protein functions as an opsonin." J Exp Med **169**(5): 1733-45.
- Lachmann, P. J. (1992). Complement, alternative pathway. Encyclopedia of Immunology. I. M. D. Roitt, P.J. London, Academic Press: 371-372.
- Lainson, R. (1983). "The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology." Trans R Soc Trop Med Hyg **77**(5): 569-96.
- Lainson, R. S., J.J. (1987). Evolution, classification and geographical distribution. The leishmanioses in biology and medicine. K.-K. Peters W., K. London, Academic Press. **1**: 1-118.
- Lau, Y. L., C. S. Lau, et al. (1996). "Mannose-binding protein in Chinese patients with systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **39**(4): 706-8.
- Laufs, H., K. Muller, et al. (2002). "Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors." Infect Immun **70**(2): 826-35.
- Lu, J. H., S. Thiel, et al. (1990). "Binding of the pentamer/hexamer forms of mannan-binding protein to zymosan activates the proenzyme C1r2C1s2 complex, of the classical pathway of complement, without involvement of C1q." J Immunol **144**(6): 2287-94.
- Luty, A. J., J. F. Kun, et al. (1998). "Mannose-binding lectin plasma levels and gene polymorphisms in *Plasmodium falciparum* malaria." J Infect Dis **178**(4): 1221-4.
- Maas, J., A. M. de Roda Husman, et al. (1998). "Presence of the variant mannose-binding lectin alleles associated with slower progression to AIDS. Amsterdam Cohort Study." Aids **12**(17): 2275-80.
- Malhotra, R., S. Thiel, et al. (1990). "Human leukocyte C1q receptor binds other soluble proteins with collagen domains." J Exp Med **172**(3): 955-9.
- Marzochi, M. C. A. (1992). "Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares." J Bras Med **63**: 82-104.
- Marzochi, M. C. A., Schuback, A.O., Marzochi, K.B.F. (2002). Leishmaniose Tegumentar Americana. Parasitologia humana e seus fundamentos gerais. B. C. Cinerman, S. São Paulo, Editora Atheneu: 39-64.

- Matsushita, M. and T. Fujita (1992). "Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease." J Exp Med **176**(6): 1497-502.
- Matsushita, M., M. Hijikata, et al. (1998). "Hepatitis C virus infection and mutations of mannose-binding lectin gene MBL." Arch Virol **143**(4): 645-51.
- Matsushita, M., M. Hijikata, et al. (1998). "Association of mannose-binding lectin gene haplotype LXPA and LYPB with interferon-resistant hepatitis C virus infection in Japanese patients." J Hepatol **29**(5): 695-700.
- McConville, M. J. and J. M. Blackwell (1991). "Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids." J Biol Chem **266**(23): 15170-9.
- Messias-Reason, I. J., S. Y. Hayashi, et al. (2002). "Complement activation in infective endocarditis: correlation with extracardiac manifestations and prognosis." Clin Exp Immunol **127**(2): 310-5.
- Mevorach, D., J. O. Mascarenhas, et al. (1998). "Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages." J Exp Med **188**(12): 2313-20.
- Molyneux, D. H., Killick-Kendrick, R. (1987). Morphology, ultrastructure and life cycles. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. W. Peters, Killick-Kendrick, R. London, Academic Press. **1**: 121-176.
- Mosser, D. M., S. K. Burke, et al. (1986). "Leishmania species: mechanisms of complement activation by five strains of promastigotes." Exp Parasitol **62**(3): 394-404.
- Mosser, D. M. and P. J. Edelson (1984). "Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages." J Immunol **132**(3): 1501-5.
- Mosser, D. M. and P. J. Edelson (1987). "The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*." Nature **327**(6120): 329-31.
- Mosser, D. M., T. A. Springer, et al. (1992). "Leishmania promastigotes require opsonic complement to bind to the human leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18)." J Cell Biol **116**(2): 511-20.
- Neth, O., D. L. Jack, et al. (2000). "Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition." Infect Immun **68**(2): 688-93.

- Nordahl, E. A., V. Rydengard, et al. (2004). "Activation of the complement system generates antibacterial peptides." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(48): 16879-84.
- Noronha, F. S., A. C. Nunes, et al. (1998). "Differential sensitivity of New World *Leishmania* spp. promastigotes to complement-mediated lysis: correlation with the expression of three parasite polypeptides." Acta Trop **69**(1): 17-29.
- Ogden, C. A., A. deCathelineau, et al. (2001). "C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells." J Exp Med **194**(6): 781-95.
- Pearson, R. D. and R. T. Steigbigel (1980). "Mechanism of lethal effect of human serum upon *Leishmania donovani*." J Immunol **125**(5): 2195-201.
- Pessôa, S. B., Barreto, M.P. (1948). *Leishmaniose tegumentar americana*. Ministerio da Educação e Saúde. Rio de Janeiro, Serviço de Documentação.: 527.
- Pimenta, P. F., E. M. Saraiva, et al. (1991). "The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*." Exp Parasitol **72**(2): 191-204.
- Pinto-da-Silva, L. H., M. Camurate, et al. (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.
- Porcel, J. M. V., D. (1993). *El sistema complemento: una fascinante cascata biológica*. Medicina Clínica. Barcelona. **100**: 428-435.
- Prodinger, W. H. e. a. (1999). *Complement*. Fundamental Immunology. W. Paul. Philadelphia, Lippincott-Raven: 967-995.
- Puentes, S. M., R. P. Da Silva, et al. (1990). "Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9." J Immunol **145**(12): 4311-6.
- Puentes, S. M., D. L. Sacks, et al. (1988). "Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan." J Exp Med **167**(3): 887-902.
- Reid, K. B. M. (1998). C1q and mannose-binding lectin. The human complement system in health and disease. J. E. F. Volanakis, M.M. New York, Marcel Dekker: 33-48.
- Roitt, I.; Brostoff, J. M., D. (1996). *Complement*. Immunology. I. M. B. Roitt, J.; Male, D. London, Mosby: 13.1-13.17.

- Ross, G. D. (1992). Complement receptors. Encyclopedia of Immunology. I. M. D. Roitt, P.J. London, Academic Press: 388-391.
- Rother, K. O. R., U. (1992). Complement deficiencies. Encyclopedia of Immunology. I. M. D. Roitt, P.J. London, Academic Press: 378-380.
- Sampaio, R. N. R., Rocha R.A.A., Marsden, P.D. et al. (1980). "Leishmaniose tegumentar americana. Casuística do Hospital Escola da Unb." An Bras Dermatol **55**: 69-76.
- Samuelson, J., Von Lichtnberg, F. (1994). Doenças infecciosas. Patologia Estrutural e Funcional. S. L. S. Cotran R.S.; Kumar V.; Robbins, F.J. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan: 338.
- Santos, I. K., C. H. Costa, et al. (2001). "Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis." Infect Immun **69**(8): 5212-5.
- Sastry, K., G. A. Herman, et al. (1989). "The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10." J Exp Med **170**(4): 1175-89.
- Schafranski, M. D., A. Stier, et al. (2004). "Significantly increased levels of mannose-binding lectin (MBL) in rheumatic heart disease: a beneficial role for MBL deficiency." Clin Exp Immunol **138**(3): 521-5.
- Schneider, P., J. P. Rosat, et al. (1992). "Leishmania major: differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages." Exp Parasitol **75**(2): 196-206.
- Schneider, P., J. P. Rosat, et al. (1993). "Characterization of glycoinositol phospholipids in the amastigote stage of the protozoan parasite Leishmania major." Biochem J **295** (Pt 2): 555-64.
- Shaw, P. K., L. T. Quigg, et al. (1976). "Autochthonous dermal leishmaniasis in Texas." Am J Trop Med Hyg **25**(6): 788-96.
- Sheriff, S., C. Y. Chang, et al. (1994). "Human mannose-binding protein carbohydrate recognition domain trimerizes through a triple alpha-helical coiled-coil." Nat Struct Biol **1**(11): 789-94.
- Sim, R. B. (1992). Complement, classical pathway. Encyclopedia of Immunology. I. M. D. Roitt, P. J. London, Academic Press: 373-377.
- Stierhof, Y. D., H. Schwarz, et al. (1991). "Monoclonal antibodies to Leishmania mexicana promastigote antigens. II. Cellular localization of antigens in promastigotes and infected macrophages." J Cell Sci **99** (Pt 1): 181-6.

- Stover, C. M., S. Thiel, et al. (1999). "Two constituents of the initiation complex of the mannan-binding lectin activation pathway of complement are encoded by a single structural gene." J Immunol **162**(6): 3481-90.
- Sullivan, K. E., C. Wooten, et al. (1996). "Mannose-binding protein genetic polymorphisms in black patients with systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **39**(12): 2046-51.
- Summerfield, J. A., M. Sumiya, et al. (1997). "Association of mutations in mannan binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series." Bmj **314**(7089): 1229-32.
- Super, M., S. Thiel, et al. (1989). "Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation." Lancet **2**(8674): 1236-9.
- Takahashi, M., Y. Endo, et al. (1999). "A truncated form of mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-2 expressed by alternative polyadenylation is a component of the lectin complement pathway." Int Immunol **11**(5): 859-63.
- Taylor, M. E., P. M. Brickell, et al. (1989). "Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannan-binding protein." Biochem J **262**(3): 763-71.
- Tenner, A. J., S. L. Robinson, et al. (1995). "Mannose binding protein (MBP) enhances mononuclear phagocyte function via a receptor that contains the 126,000 M(r) component of the C1q receptor." Immunity **3**(4): 485-93.
- Thiel, S., U. Holmskov, et al. (1992). "The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during an acute phase response." Clin Exp Immunol **90**(1): 31-5.
- Thiel, S., T. Vorup-Jensen, et al. (1997). "A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement." Nature **386**(6624): 506-10.
- Turner, M. W. (1996). "Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system." Immunol Today **17**(11): 532-40.
- Turner, M. W. (2003). "The role of mannan-binding lectin in health and disease." Mol Immunol **40**(7): 423-9.
- Volanakis, J. E. (1998). Overview of the complement system. The human complement system in health and disease. J. E. F. Volanakis, M. M. New York, Marcel Dekker: 9-32.
- Walport, M. J. (2001). "Complement. First of two parts." N Engl J Med **344**(14): 1058-66.
- Walport, M. J. (2001). "Complement. Second of two parts." N Engl J Med **344**(15): 1140-4.

- Walton, B. C., L. V. Chinel, et al. (1973). "Onset of espundia after many years of occult infection with *Leishmania braziliensis*." Am J Trop Med Hyg **22**(6): 696-8.
- Weis, W. I. and K. Drickamer (1994). "Trimeric structure of a C-type mannose-binding protein." Structure **2**(12): 1227-40.
- Weis, W. I., K. Drickamer, et al. (1992). "Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide." Nature **360**(6400): 127-34.
- Wilson, M. E. and R. D. Pearson (1986). "Evidence that *Leishmania donovani* utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism." J Immunol **136**(12): 4681-8.
- Wilson, M. E. and R. D. Pearson (1988). "Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes." Infect Immun **56**(2): 363-9.
- Wright, S. D. and S. C. Silverstein (1983). "Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes." J Exp Med **158**(6): 2016-23.
- Yokota, Y., T. Arai, et al. (1995). "Oligomeric structures required for complement activation of serum mannan-binding proteins." J Biochem (Tokyo) **117**(2): 414-9.