

# **C4bBP – DEFINIÇÃO E PROTOCOLOS PRÁTICOS NO ÂMBITO DA PESQUISA CIENTÍFICA**

1ª Edição

Adalberto Alves Pereira Filho



**AMPLLA**  
EDITORA

# **C4bBP – DEFINIÇÃO E PROTOCOLOS PRÁTICOS NO ÂMBITO DA PESQUISA CIENTÍFICA**

1ª Edição

Adalberto Alves Pereira Filho



**AMPLLA**  
EDITORA



**2023 - Editora Ampla**

**Copyright da Edição** © Editora Ampla

**Copyright do Texto** © Os autores

**Editor Chefe:** Leonardo Pereira Tavares

**Design da Capa:** Editora Ampla

**Diagramação:** Juliana Ferreira

**Revisão:** Os autores

**C4bBP – Definição e protocolos práticos no âmbito da pesquisa científica** está licenciado sob CC BY 4.0.



Esta licença exige que as reutilizações deem crédito aos criadores. Ele permite que os reutilizadores distribuam, remixem, adaptem e construam o material em qualquer meio ou formato, mesmo para fins comerciais.

O conteúdo da obra e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, não representando a posição oficial da Editora Ampla. É permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores. Todos os direitos para esta edição foram cedidos à Editora Ampla.

**ISBN:** 978-65-5381-152-2

**DOI:** 10.51859/ampla.cdp522.1123-0

**Editora Ampla**

Campina Grande – PB – Brasil

[contato@amplaeditora.com.br](mailto:contato@amplaeditora.com.br)

[www.amplaeditora.com.br](http://www.amplaeditora.com.br)



2023

# CONSELHO EDITORIAL

Alexander Josef Sá Tobias da Costa – Universidade do Estado do Rio de Janeiro  
Andréa Cátia Leal Badaró – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Andréia Monique Lermen – Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Antoniele Silvana de Melo Souza – Universidade Estadual do Ceará  
Aryane de Azevedo Pinheiro – Universidade Federal do Ceará  
Bergson Rodrigo Siqueira de Melo – Universidade Estadual do Ceará  
Bruna Beatriz da Rocha – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais  
Bruno Ferreira – Universidade Federal da Bahia  
Caio Augusto Martins Aires – Universidade Federal Rural do Semi-Árido  
Caio César Costa Santos – Universidade Federal de Sergipe  
Carina Alexandra Rondini – Universidade Estadual Paulista  
Carla Caroline Alves Carvalho – Universidade Federal de Campina Grande  
Carlos Augusto Trojaner – Prefeitura de Venâncio Aires  
Carolina Carbonell Demori – Universidade Federal de Pelotas  
Cícero Batista do Nascimento Filho – Universidade Federal do Ceará  
Clécio Danilo Dias da Silva – Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Dandara Scarlet Sousa Gomes Bacelar – Universidade Federal do Piauí  
Daniela de Freitas Lima – Universidade Federal de Campina Grande  
Darlei Gutierrez Dantas Bernardo Oliveira – Universidade Estadual da Paraíba  
Denilson Paulo Souza dos Santos – Universidade Estadual Paulista  
Denise Barguil Nepomuceno – Universidade Federal de Minas Gerais  
Dinara das Graças Carvalho Costa – Universidade Estadual da Paraíba  
Diogo Lopes de Oliveira – Universidade Federal de Campina Grande  
Dylan Ávila Alves – Instituto Federal Goiano  
Edson Lourenço da Silva – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí  
Elane da Silva Barbosa – Universidade Estadual do Ceará  
Érica Rios de Carvalho – Universidade Católica do Salvador  
Fernanda Beatriz Pereira Cavalcanti – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Fredson Pereira da Silva – Universidade Estadual do Ceará  
Gabriel Gomes de Oliveira – Universidade Estadual de Campinas  
Gilberto de Melo Junior – Instituto Federal do Pará  
Givanildo de Oliveira Santos – Instituto Brasileiro de Educação e Cultura  
Higor Costa de Brito – Universidade Federal de Campina Grande  
Hugo José Coelho Corrêa de Azevedo – Fundação Oswaldo Cruz  
Isabel Fontgalland – Universidade Federal de Campina Grande  
Isane Vera Karsburg – Universidade do Estado de Mato Grosso  
Israel Gondres Torné – Universidade do Estado do Amazonas  
Ivo Batista Conde – Universidade Estadual do Ceará  
Jaqueline Rocha Borges dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Jessica Wanderley Souza do Nascimento – Instituto de Especialização do Amazonas  
João Henriques de Sousa Júnior – Universidade Federal de Santa Catarina  
João Manoel Da Silva – Universidade Federal de Alagoas  
João Vitor Andrade – Universidade de São Paulo  
Joilson Silva de Sousa – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
José Cândido Rodrigues Neto – Universidade Estadual da Paraíba  
Jose Henrique de Lacerda Furtado – Instituto Federal do Rio de Janeiro  
Josenita Luiz da Silva – Faculdade Frassinetti do Recife  
Josiney Farias de Araújo – Universidade Federal do Pará  
Karina de Araújo Dias – SME/Prefeitura Municipal de Florianópolis  
Katia Fernanda Alves Moreira – Universidade Federal de Rondônia  
Laís Portugal Rios da Costa Pereira – Universidade Federal de São Carlos  
Laíze Lantyer Luz – Universidade Católica do Salvador  
Lindon Johnson Pontes Portela – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Lisiane Silva das Neves – Universidade Federal do Rio Grande  
Lucas Araújo Ferreira – Universidade Federal do Pará

Lucas Capita Quarto – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Lúcia Magnólia Albuquerque Soares de Camargo – Unifacisa Centro Universitário  
Luciana de Jesus Botelho Sodré dos Santos – Universidade Estadual do Maranhão  
Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas  
Luiza Catarina Sobreira de Souza – Faculdade de Ciências Humanas do Sertão Central  
Manoel Mariano Neto da Silva – Universidade Federal de Campina Grande  
Marcelo Alves Pereira Eufrazio – Centro Universitário Unifacisa  
Marcelo Williams Oliveira de Souza – Universidade Federal do Pará  
Marcos Pereira dos Santos – Faculdade Rachel de Queiroz  
Marcus Vinicius Peralva Santos – Universidade Federal da Bahia  
Maria Carolina da Silva Costa – Universidade Federal do Piauí  
Maria José de Holanda Leite – Universidade Federal de Alagoas  
Marina Magalhães de Moraes – Universidade Federal do Amazonas  
Mário César de Oliveira – Universidade Federal de Uberlândia  
Michele Antunes – Universidade Feevale  
Michele Aparecida Cerqueira Rodrigues – Logos University International  
Milena Roberta Freire da Silva – Universidade Federal de Pernambuco  
Nadja Maria Mourão – Universidade do Estado de Minas Gerais  
Natan Galves Santana – Universidade Paranaense  
Nathalia Bezerra da Silva Ferreira – Universidade do Estado do Rio Grande do Norte  
Neide Kazue Sakugawa Shinohara – Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Neudson Johnson Martinho – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso  
Patrícia Appelt – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Paula Milena Melo Casais – Universidade Federal da Bahia  
Paulo Henrique Matos de Jesus – Universidade Federal do Maranhão  
Rafael Rodrigues Gomides – Faculdade de Quatro Marcos  
Reângela Cíntia Rodrigues de Oliveira Lima – Universidade Federal do Ceará  
Rebeca Freitas Ivanicska – Universidade Federal de Lavras  
Renan Gustavo Pacheco Soares – Autarquia do Ensino Superior de Garanhuns  
Renan Monteiro do Nascimento – Universidade de Brasília  
Ricardo Leoni Gonçalves Bastos – Universidade Federal do Ceará  
Rodrigo da Rosa Pereira – Universidade Federal do Rio Grande  
Rubia Katia Azevedo Montenegro – Universidade Estadual Vale do Acaraú  
Sabryna Brito Oliveira – Universidade Federal de Minas Gerais  
Samuel Miranda Mattos – Universidade Estadual do Ceará  
Selma Maria da Silva Andrade – Universidade Norte do Paraná  
Shirley Santos Nascimento – Universidade Estadual Do Sudoeste Da Bahia  
Silvana Carloto Andres – Universidade Federal de Santa Maria  
Silvio de Almeida Junior – Universidade de Franca  
Tatiana Pascholette R. Bachur – Universidade Estadual do Ceará | Centro Universitário Christus  
Telma Regina Stroparo – Universidade Estadual do Centro-Oeste  
Thayla Amorim Santino – Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Thiago Sebastião Reis Contarato – Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Tiago Silveira Machado – Universidade de Pernambuco  
Virgínia Maia de Araújo Oliveira – Instituto Federal da Paraíba  
Virginia Tomaz Machado – Faculdade Santa Maria de Cajazeiras  
Walmir Fernandes Pereira – Miami University of Science and Technology  
Wanessa Dunga de Assis – Universidade Federal de Campina Grande  
Wellington Alves Silva – Universidade Estadual de Roraima  
William Roslindo Paranhos – Universidade Federal de Santa Catarina  
Yáscara Maia Araújo de Brito – Universidade Federal de Campina Grande  
Yasmin da Silva Santos – Fundação Oswaldo Cruz  
Yuciara Barbosa Costa Ferreira – Universidade Federal de Campina Grande



2023 - Editora Ampla

Copyright da Edição © Editora Ampla

Copyright do Texto © Os autores

Editor Chefe: Leonardo Pereira Tavares

Design da Capa: Editora Ampla

Diagramação: Juliana Ferreira

Revisão: Os autores

**Catálogo na publicação**  
**Elaborada por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166**

P436c

Pereira Filho, Adalberto Alves

C4bBP – Definição e protocolos práticos no âmbito da pesquisa científica /  
Adalberto Alves Pereira Filho. – Campina Grande/PB: Ampla, 2023.

Livro em PDF

ISBN 978-65-5381-152-2

DOI 10.51859/ampla.cdp522.1123-0

1. Pesquisa científica. I. Pereira Filho, Adalberto Alves. II. Título.

CDD 001.42

Índice para catálogo sistemático

I. Pesquisa científica

**Editora Ampla**  
Campina Grande – PB – Brasil  
contato@amplaeditora.com.br  
www.amplaeditora.com.br



## **AGRADECIMENTO**

Ao prof Dr. Nelder Gontijo que permitiu adquirir conhecimento sobre o sistema complemento ao longo da trajetória universitária.

# APRESENTAÇÃO

O sistema complemento (SC) é um componente essencial do sistema de defesa imunológica dos vertebrados, e sua atividade pode ser altamente prejudicial para microrganismos e parasitas. É conhecido que diversos patógenos e artrópodes hematófagos possuem diferentes mecanismos para escapar do ataque do complemento de seus hospedeiros. Entre esses mecanismos, destaca-se a interação com reguladores do complemento do próprio hospedeiro. O mais estudado desses reguladores é o fator H, que desempenha um papel importante na redução da atividade da C3 convertase na via alternativa do complemento. Outro regulador relevante é a proteína ligadora de C4b (C4BP), que atua de maneira semelhante ao fator H, mas nas vias clássica e de lectina do complemento.

O C4bBP funciona de duas maneiras principais: inativação de C4b e proteção contra ataque do complemento. Na inativação de C4b, o C4bBP forma um complexo estável que degrada o C4b, impedindo a continuidade da cascata e evitando resposta imune descontrolada. Na proteção contra ataque do complemento, o C4bBP liga-se ao C4b opsonizado, tornando as células menos suscetíveis ao ataque do sistema complemento, evitando danos colaterais a células próprias.

Os patógenos podem se ligar a essas proteínas do SC presente no hospedeiro de forma a sobreviver e se replicar no ambiente do hospedeiro. Compreender esses mecanismos é importante para desenvolver estratégias terapêuticas e vacinas eficazes contra esses patógenos e preservar a integridade do sistema imunológico. Quando os patógenos evadem o complemento, podem causar infecções crônicas ou graves, destacando a importância de desvendar esses mecanismos para a saúde humana. Neste e-book será elucidado sobre o C4bBP e apresentando protocolos práticos de forma detalhada com base em trabalhos já publicados e experiências práticas de anos pelo presente autor.



# SUMÁRIO

1. O QUE É A MOLÉCULA C4B-BINDING PROTEIN (C4BBP) E COMO PATÓGENOS PODEM UTILIZAR PARA SE EVADIR DO SISTEMA COMPLEMENTO? .....	9
2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1 – AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE C4BP EM PROMASTIGOTA <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> QUANDO EXPOSTA AO SORO HUMANO NORMAL (SHN) .....	10
3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2 – AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE C4BP EM PROMASTIGOTA <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> QUANDO EXPOSTA AO SORO HUMANO INATIVADO (SHI) A 56°C POR 30 MIN .....	12
4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 3 – AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE C4BP PURIFICADO EM PROMASTIGOTAS DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> (FASE ESTACIONÁRIA).....	15
5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 4 – AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE C4BP EM AMASTIGOTA <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> QUANDO EXPOSTA AO SORO HUMANO NORMAL (SHN) .....	17
6. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 5 – AVALIAÇÃO POR WESTERN BLOT DO EFEITO DO C4BP LIGADO À SUPERFÍCIE DE <i>LEISHMANIA</i> NA INATIVAÇÃO DE C4B .....	18
7. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 6 – AVALIAÇÃO DAS FORMAS DE DEPOSIÇÃO DE C4 NA SUPERFÍCIE DE PROMASTIGOTAS DE <i>L. INFANTUM</i> (PP75) NA PRESENÇA DE SHN E SORO HUMANO INATIVADO .....	21
8. GRUPOS (COLOCADOS EM CADA CANALETA DO GEL):.....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	27

## 1. O QUE É A MOLÉCULA C4b-BINDING PROTEIN (C4bBP) E COMO PATÓGENOS PODEM UTILIZAR PARA SE EVADIR DO SISTEMA COMPLEMENTO?

A molécula C4b-binding protein (C4bBP) é uma proteína do soro sanguíneo, também conhecida como proteína ligadora de C4b (C4BP). Ela desempenha um papel essencial no sistema complemento, que faz parte do sistema imunológico e é responsável por reconhecer e destruir patógenos, bem como desempenhar funções em processos inflamatórios e de defesa do organismo contra infecções (MOHLIN & BLOM 2014; ERMET & BLOM 2016).

O C4bBP interage com o fragmento C4b (resultante da quebra de C4). Essa interação é importante para o controle e regulação da atividade do complemento, evitando reações inflamatórias excessivas e danos a células e tecidos saudáveis do próprio organismo (ERMERT & BLOM 2016).

O C4bBP funciona de duas maneiras principais: 1 – Inativação de C4b: O C4bBP se liga ao C4b, formando um complexo estável, e essa interação facilita a degradação enzimática do C4b em um fragmento inativo. Isso evita que o C4b continue ativando a cascata de complemento, ajudando a prevenir uma resposta imune descontrolada e inflamação excessiva. 2 – Proteção contra ataque do complemento: O C4bBP também se liga ao C4b opsonizado, que é a marcação de patógenos ou outras células pelo fragmento C4b para sinalizar ao sistema imunológico que elas devem ser destruídas (MOHLIN & BLOM 2014).

Alguns patógenos têm desenvolvido estratégias para manipular ou evadir a resposta do sistema complemento, e o C4b-binding protein (C4bBP) pode ser explorado por esses patógenos para escapar do ataque do sistema complemento. Existem algumas maneiras pelas quais os patógenos podem utilizar o C4bBP para esse propósito: Captação do C4bBP: Alguns patógenos têm a capacidade de se ligar ao C4bBP, "sequestrando-o" e desviando-o de sua função reguladora normal. Ao fazer isso, esses patógenos conseguem evitar que o C4bBP inative o C4b opsonizado ou que regule a cascata de complemento, permitindo que continuem a crescer e se espalhar sem serem alvo do sistema imunológico (Pereira-Filho et al. 2023).

A seguir serão descritos protocolos práticos e altamente descritos usando como modelo o parasita *Leishmania*. Contudo esses protocolos são passíveis de serem utilizados em qualquer patógeno de forma a fazer pequenas modificações.

## 2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1 – AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE C4BP EM PROMASTIGOTA *LEISHMANIA INFANTUM* QUANDO EXPOSTA AO SORO HUMANO NORMAL (SHN) (ADAPTADO DE PEREIRA-FILHO ET. AL. 2023)

### Grupos:

*Leishmania* (PP75) + Soro Humano Normal (Células incubadas com SHN 1:20 = 5% em PBS pH 7,4)

*Leishmania* (PP75) + PBS (Células incubadas no diluente PBS pH 7,4) = Grupo controle

**Observações:** Usar *Leishmania infantum* cepa PP75 fase estacionária. Usar *pool* de soro humano normal. Os experimentos serão realizados com oito replicatas biológicas, sendo cada uma com uma triplicata técnica (3 poços). Poços sensibilizados apenas com o tampão carbonato/bicarbonato ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  15mM,  $\text{NaHCO}_3$  35mM, pH 9.6) serão utilizados com o branco e esse valor será descontado dos demais grupos após a leitura.

**PMSF:** Concentração estoque 200mM, diluído em Metanol e estocado a  $-20^\circ\text{C}$ . Concentração de uso = 2 mM. Classe: inibidor de serino-protease.

**E64:** Concentração estoque 1mM, diluído em água destilada e estocado a  $-20^\circ\text{C}$ . Concentração de uso = 10  $\mu\text{M}$ . Classe: inibidor de cisteíno-protease.

**EDTA:** Concentração estoque 200mM, diluído em água destilada e estocado a  $-20^\circ\text{C}$ . Concentração de uso = 1,5 mM. Classe: inibidor de metalo-protease.

### Protocolo:

**Passo 1:** Uma cultura de promastigotas de *L. infantum* (PP75) em fase estacionária da curva de crescimento será submetida à contagem de células. Para isso 100  $\mu\text{L}$  dessa cultura será retirada para diluir em 900  $\mu\text{L}$  de isoton (10,5 g de ácido cítrico, 7 g de cloreto de sódio, 15 mL de formol P.A 40 % em 1 L de água destilada). Após contagem deverá ser pego um volume da cultura cujo número de células no microtubo será final de  $1 \times 10^8$  células. As promastigotas serão lavadas duas vezes por centrifugação (3000g/4°C/10min) com 200  $\mu\text{L}$  de tampão PBS pH 7,4 gelado. Após a última lavagem o sedimento de células será ressuspendido num volume de 1000  $\mu\text{L}$  de tampão PBS. A concentração de células nessa suspensão será final de  $1 \times 10^8$  células/mL;

**Passo 2:** Em seguida, 100  $\mu\text{L}$  (quantidade de  $10^7$  parasitos) desta suspensão de células serão transferidos para 2 microtubos (100  $\mu\text{L}$  por tubo). Os tubos serão novamente centrifugados (3000g/4°C/10min) e o tampão PBS descartado, permanecendo apenas os parasitos no fundo do tubo. Em 3 desses 4 microtubos serão acrescentados 500  $\mu\text{L}$  de solução de SHN a 5% diluído em PBS pH 7,4 (**475  $\mu\text{L}$  de PBS + 25  $\mu\text{L}$  de SHN**). O 4º tubo funcionará

como controle negativo (aos parasitos serão acrescentados 500 µL de PBS, sem SHN). Todos os 4 microtubos devem ser agitados suavemente e incubados a 37°C durante 10 minutos;

- **Passo 3:** Após a incubação, cada microtubo será lavado três vezes por centrifugação (3000g/4°C/10min) com solução 200 µL de tampão PBS pH 7,4 gelada. Após a última lavagem os tubos irão ser ressuspensos em 1 mL de tampão bicarbonato/carbonato NaHCO<sub>3</sub> (35mM) /Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (15mM) pH9,6, contendo inibidores de protease na concentração final de (PMSF 2 mM, EDTA 1,5 mM e E64 10 µM). Os tubos serão submetidos à contagem. Retirar um volume correspondente a 2x10<sup>6</sup> células e transferir para outro tubo e completar com volume final de tampão bicarbonato/carbonato até 1 mL, assim a concentração final será 2x10<sup>6</sup> células/mL.
- **Passo 4:** Em seguida, volumes de 100 µL (2x10<sup>5</sup> parasitos) serão transferidos para poços de uma placa de 96 poços (em triplicata) e incubados “overnight” à 37 °C de forma à placa secar para posterior avaliação da ligação dos componentes C4BP à membrana das promastigotas de *L. infantum* por meio de ELISA.
- **Passo 5:** Bloquear a placa com 200 µL **de leite em pó 5%** (2,5 g de leite desnatado em 50 mL de PBS-Tween-20 0,1%) por 30 minutos em temperatura ambiente com agitação; **(ATENÇÃO: Não lavar o bloqueio)**;
- **Passo 6:** Após o bloqueio adicionar 50 µL dos respectivos anticorpos para os fatores pesquisados na placa: anticorpo monoclonal anti-C4bp (QUIDEL®: A215, USA) diluído na concentração de 1:10.000 diluído em PBS e incubar por 30 minutos em temperatura ambiente com agitação;
- **Passo 7:** Em cada poço lavar utilizando 200 µL de PBS-Tween20 0,1% por cinco minutos sob agitação. por três vezes por 5 minutos com agitação constante.
- **Passo 8:** Adicionar 50 µL do anticorpo secundário conjugado com peroxidase anti-Mouse IgG (Abcam®: ab97023, USA), diluído na concentração de 1:5.000 em PBS (50 µL por poço);

- **Passo 9:** Em cada poço lavar utilizando 200 µL de PBS-Tween-20 0,1% por 5 minutos, sob agitação
- **Passo 10:** Em cada poço serão adicionados 200 µL de solução contendo (citrato de sódio 50 mM, pH 5,5, 0,075% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 1 mg/mL de o-fenileno-diamina (OPD) (Sigma, código P9029), e a placa será incubada a 37°C/10min. Esta reação será parada após 10 minutos pela adição de 100 µL de solução de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1M. Para a leitura, a placa será transferida para um leitor de micro-placas para obtenção do valor da absorbância no **comprimento de onda de 492nm** (Tô colocando esse valor e não de 450nm por conta do uso do ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)).

### 3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2 – AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE C4BP EM PROMASTIGOTA *LEISHMANIA INFANTUM* QUANDO EXPOSTA AO SORO HUMANO INATIVADO (SHI) A 56°C POR 30 MIN (ADAPTADO DE PEREIRA-FILHO 2023)

#### Grupos:

*Leishmania* (PP75) + Soro Humano inativado (Células incubadas com SH inativado 1:20 = 5% em PBS pH 7,4)

*Leishmania* (PP75) + PBS (Células incubadas no diluente) = Grupo controle

**Observações:** Usar *Leishmania infantum* cepa PP75 fase estacionária. Usar *pool* de soro humano que deverá ser inativado a 56°C por 30 min. Os experimentos serão realizados com oito replicatas biológicas, sendo cada uma com uma triplicata técnica (3 poços). ). Poços sensibilizados apenas com o tampão carbonato/bicarbonato (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15mM, NaHCO<sub>3</sub> 35mM, pH 9.6) serão utilizados com o branco e esse valor foi descontado dos demais grupos após a leitura.

**PMSF:** Concentração estoque 200mM, diluído em Metanol e estocado a – 20°C. Concentração de uso = 2 mM. Classe: inibidor de serino-protease.

**E64:** Concentração estoque 1mM, diluído em água destilada e estocado a – 20°C. Concentração de uso = 10 µM. Classe: inibidor de cisteíno-protease.

**EDTA:** Concentração estoque 200mM, diluído em água destilada e estocado a – 20°C. Concentração de uso = 1,5 mM. Classe: inibidor de metalo-protease.

## Protocolo:

- **Passo 1:** Uma cultura de promastigotas de *L. infantum* (PP75) em fase estacionária da curva de crescimento será submetida à contagem de células. Para isso 100 µL dessa cultura será retirada para diluir em 900 µL de isotom (10,5 g de ácido cítrico, 7 g de cloreto de sódio, 15 mL de formol em 1 L de água destilada). Após contagem deverá ser pego um volume da cultura cuja concentração da suspensão de células no microtubo será final de  $1 \times 10^8$  células/mL. As promastigotas serão lavadas duas vezes por centrifugação (3000g/4°C/10min) com solução 200 µL tampão PBS pH 7,4 gelada. Após a última lavagem o sedimento de células será ressuspensionado num volume de 1000 µL de tampão PBS cuja concentração da suspensão de células final no microtubo será final de  $1 \times 10^8$  células/mL.
- **Passo 2:** Em seguida, 100 µL (quantidade de  $10^7$  parasitos) desta suspensão de células serão transferidos para 4 microtubos cada. Os tubos serão novamente centrifugados (3000g/4°C/10min) e o tampão PBS descartado, permanecendo apenas os parasitos no fundo do tubo. Em 3 desses 4 microtubos serão acrescentados 500 µL de solução de Soro Humano Inativado (SHi) a 5% diluído em tampão PBS pH 7,4 (475 µL + 25 µL de SHi). O 4º tubo funcionará como controle negativo, e assim, os parasitos serão acrescentados apenas de 500 µL de PBS, sem SHi. Todos os 4 microtubos devem ser agitados suavemente e incubados a 37 °C durante 10 minutos.
- **Passo 3:** Após a incubação, cada microtubo será lavado três vezes por centrifugação (3000g/4°C/10min) com solução 200 µL de tampão PBS pH 7,4 gelada. Após a última lavagem os tubos irão ser ressuspensionados em 1 mL de tampão bicarbonato/carbonato  $\text{NaHCO}_3$  (35mM) /  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (15mM) pH9,6, contendo inibidores de protease na concentração final de (PMSF 2 mM, EDTA 1,5 mM e E64 10 µM). Os tubos serão submetidos à contagem. Retirar um volume correspondente a  $2 \times 10^6$  células e transferir para outro tubo e completar com volume final de tampão bicarbonato/carbonato até 1 mL, assim a concentração final será  $2 \times 10^6$  células/mL.
- **Passo 4:** Em seguida, volumes de 100 µL ( $2 \times 10^5$  parasitos) serão transferidos para poços de uma placa de 96 poços (em triplicata) e incubados “overnight” à 37 °C de forma à placa secar para posterior avaliação da ligação dos componentes C4BP à membrana das promastigotas de *L. infantum* por meio de ELISA.

- **Passo 5:** Bloquear a placa com 200  $\mu\text{L}$  de **leite em pó 5%** (2,5 g de leite desnatado em 50 mL de PBS-Tween-20 0,1%) por 30 minutos em temperatura ambiente com agitação; **(ATENÇÃO: Não lavar o bloqueio)**;
- **Passo 6:** Após o bloqueio adicionar 50  $\mu\text{L}$  dos respectivos anticorpos para os fatores pesquisados na placa: anticorpo monoclonal anti-C4bp (QUIDEL®: A215, USA) diluído na concentração de 1:10.000 diluído em PBS e incubar por 30 minutos em temperatura ambiente com agitação;
- **Passo 7:** Em cada poço lavar utilizando 200  $\mu\text{L}$  de PBS-Tween20 0,1% por cinco minutos sob agitação. por três vezes por 5 minutos com agitação constante.
- **Passo 8:** Adicionar 50  $\mu\text{L}$  do anticorpo secundário conjugado com peroxidase anti-Mouse IgG (Abcam®: ab97023, USA), diluído na concentração de 1:5.000 em PBS (50  $\mu\text{L}$  por poço);
- **Passo 9:** Em cada poço lavar utilizando 200  $\mu\text{L}$  de PBS-Tween-20 0,1% por 5 minutos, sob agitação por 3 vezes;
- **Passo 10:** Em cada poço serão adicionados 200  $\mu\text{L}$  de solução contendo (citrato de sódio 50 mM, pH 5,5, 0,075% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 1 mg/mL de o-fenileno-diamina (OPD) (Sigma, código P9029), e a placa será incubada a  $37^\circ\text{C}/10\text{min}$ . Esta reação será parada após 10 minutos pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de solução de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 1M. Para a leitura, a placa será transferida para um leitor de micro-placas para obtenção do valor da absorbância no **comprimento de onda de 492nm** (Tô colocando esse valor e não de 450nm por conta do uso do ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )).

#### 4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 3 – AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE C4BP PURIFICADO EM PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA INFANTUM* (FASE ESTACIONÁRIA) (ADAPTADO DE PEREIRA-FILHO ET AL. 2023)

##### Grupos:

*Leishmania infantum* (PP75) na fase estacionária + Fator H purificado (Células incubadas com Fator H purificado em concentração equivalente à do soro em diluição 1:20 = 5% em PBS pH 7,4)

*Leishmania infantum* (PP75) + PBS (Células incubadas no diluente)

**Observações:** Usar *Leishmania infantum* cepa PP75 fase estacionária.

A concentração de C4BP no plasma humano pode variar amplamente desde 200 até 250 µg/ml, dependendo de fatores genéticos e ambientais (Esparza-Gordillo et al. 2004; Rodriguez de Córdoba & Jorge 2008). **Dessa forma nós estamos considerando que a concentração de C4BP no SHN seja em torno de = 250 µg/mL.**

**A Concentração de C4BP Comptech = 1mg/ml ou 1000 µg /mL. Dessa forma, para se ter a concentração de C4bBP igual a do SHN 5%, vou pegar 6,5 µL de C4BP e acrescentar por tubo contendo 500 µL com as *Leishmania* lavadas (ver abaixo os detalhes no passo 2).**

- **Passo1:** Em um microtubo, serão adicionados 1000 µL de cultura de *L. infantum* (PP75) em fase estacionária da curva de crescimento. As promastigotas serão lavadas duas vezes por centrifugação (3000g/4°C/10min) e ressuspensas em solução tampão PBS pH 7,4. Após a última lavagem as células serão ressuspensas em 500 µL do mesmo tampão. Em seguida, será retirada uma alíquota de 50µL da suspensão de células para realizar a contagem em câmara hemocitométrica. Após a contagem, a concentração da suspensão de células será ajustada adicionando-se solução tampão PBS até a concentração final de  $1 \times 10^8$  células/mL.
- **Passo 2:** Em seguida, 100 µL (quantidade de  $1 \times 10^7$  parasitos) será distribuído para três tubos separadamente. Os tubos serão novamente centrifugados (3000g/4°C/10min) e o tampão PBS pH 7,4 descartado, permanecendo apenas os parasitos no fundo do tubo. Em 3 desses 4 microtubos serão acrescentados 500 µL de solução de Fator C4BP diluído em tampão PBS pH 7,4 (493,5 µL + 6,5 µL de fator C4BP 1 mg/mL (Comptech: A109). O 4º tubo funcionará como controle negativo, e assim, os parasitos serão acrescentados



apenas de 500 µL de PBS, sem Fator H. Todos os 4 microtubos devem ser agitados suavemente e incubados a 37 °C durante 10 minutos. O tubo será incubado a 37 °C durante 10 minutos sob agitação. Após incubação, o tubo será lavado 3 vezes com 200 µL de tampão PBS pH 7,4, por centrifugação (3000g/4°C/10min), para lavagem do fator C4BP não ligado.

- **Passo 3:** Após a última lavagem os tubos irão ser ressuspensos em 1 mL de tampão bicarbonato/carbonato NaHCO<sub>3</sub> (35mM) /Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (15mM) pH9,6, contendo inibidores de protease na concentração final de (PMSF 2 mM, EDTA 1,5 mM e E64 10 µM). Retirar um volume de 200 microlitros (correspondente a 2x10<sup>6</sup> células) e transferir para outro tubo e completar com volume final de tampão bicarbonato/carbonato até 1 mL, assim a concentração final será 2x10<sup>6</sup> células/mL.
- **Passo 4:** Em seguida, volumes de 100 µL (2x10<sup>5</sup> parasitos) serão transferidos para poços de uma placa de 96 poços (em triplicata) e incubados “overnight” à 37 °C de forma à placa secar para posterior avaliação da ligação dos componentes C4BP à membrana das promastigotas de *L. infantum* por meio de ELISA.
- **Passo 5:** Bloquear a placa com 200 µL **de leite em pó 5%** (2,5 g de leite desnatado em 50 mL de PBS-Tween-20 0,1%) por 30 minutos em temperatura ambiente com agitação; **(ATENÇÃO: Não lavar o bloqueio);**
- **Passo 6:** Após o bloqueio adicionar 50 µL dos respectivos anticorpos para os fatores pesquisados na placa: anticorpo monoclonal anti-C4bp (QUIDEL®: A215, USA) diluído na concentração de 1:10.000 diluído em PBS e incubar por 30 minutos em temperatura ambiente com agitação;
- **Passo 7:** Em cada poço lavar utilizando 200 µL de PBS-Tween20 0,1% por cinco minutos sob agitação.por três vezes por 5 minutos com agitação constante.
- **Passo 8:** Adicionar 50 µL do anticorpo secundário conjugado com peroxidase anti-Mouse IgG (Abcam®: ab97023, USA), diluído na concentração de 1:5.000 em PBS (50 µL por poço);

- **Passo 9:** Em cada poço lavar utilizando 200 µL de PBS-Tween-20 0,1% por 5 minutos, sob agitação por 3 vezes;
- **Passo 10:** Em cada poço serão adicionados 200 µL de solução contendo (citrato de sódio 50 mM, pH 5,5, 0,075% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 1 mg/mL de o-fenileno-diamina (OPD) (Sigma, código P9029), e a placa será incubada a 37°C/10min. Esta reação será parada após 10 minutos pela adição de 100 µL de solução de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1M. Para a leitura, a placa será transferida para um leitor de micro-placas para obtenção do valor da absorbância no **comprimento de onda de 492nm** (Tô colocando esse valor e não de 450nm por conta do uso do ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)).

## 5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 4 – AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE C4BP EM AMASTIGOTA *LEISHMANIA INFANTUM* QUANDO EXPOSTA AO SORO HUMANO NORMAL (SHN) (ADAPTADO DE PEREIRA-FILHO ET AL. 2023)

**Observações:** Usar *amastigota like* de *Leishmania infantum* cepa PP75. Usar *pool* de soro humano normal.

O protocolo para a resposta desse protocolo será realizado de acordo com o protocolo da Pergunta 1 (P1), porém utilizando *amastigota like*.

### Grupos:

Amastigotas like de *Leishmania* (PP75) + Soro Humano Normal (Células incubadas com SHN 1:20 = 5%)

Amastigotas like de *Leishmania* (PP75) + PBS (Células incubadas no diluente) = Grupo controle

**Para a conversão de promastigota em amastigota utilizaremos o protocolo de Balanco et al 1998.** Dessa forma, promastigotas serão cultivados em meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 1% de solução de vitaminas BME (Sigma-Aldrich®: B6891) e 2% de urina humana estéril filtrada em filtro 0,45 micrometros. Os parasitos serão acondicionados em frascos estéreis, e mantidos a uma temperatura de 23±1°C em estufa B.O.D. Culturas de amastigotas axênicas serão iniciados a partir de promastigotas em fase estacionária, que serão incubadas em uma concentração de 5x 10<sup>6</sup> células / mL em meio 199 contendo 20% de soro bovino fetal e 25 mg / mL de hemina a 37 ° C. A dinâmica de transformação de amastigota será avaliada mediante observação da morfologia do parasita.

## 6. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 5 – AVALIAÇÃO POR WESTERN BLOT DO EFEITO DO C4BP LIGADO À SUPERFÍCIE DE *LEISHMANIA* NA INATIVAÇÃO DE C4B (ADAPTADO DE PEREIRA-FILHO ET. AL. 2023)

Grupos (Colocados em cada canaleta do gel):

- 1 - C4;
  - 2 - C4b;
  - 3 - *Leishmania* incubada previamente com C4BP+ C4b;
  - 4 - *Leishmania* incubada previamente com PBS + C4b + FI
  - 5 - *Leishmania* incubada previamente com C4BP + C4b + FI
  - 6 - *Leishmania* incubada previamente com SHN 5%
  - 7 - *Leishmania* incubada previamente com SHN + C4b + FI
  - 8 - Padrão de Peso Molecular
- **Passo 1:** Uma cultura de promastigotas de *L. infantum* (PP75) em fase estacionária da curva de crescimento será submetida à contagem de células. Para isso 100 µL dessa cultura será retirada para diluir em 900 µL de isoton (10,5 g de ácido cítrico, 7 g de cloreto de sódio, 15 mL de formol P.A 40 % em 1 L de água destilada). Após contagem deverá ser pego um volume da cultura cujo número de células no microtubo será final de  $4 \times 10^8$ /mL. As promastigotas serão lavadas duas vezes por centrifugação (3000g/4°C/10min) com 200 µL de tampão PBS pH 7,4 gelado. Após a última lavagem o sedimento de células será ressuspensionado num volume de 1000 µL de tampão PBS, permanecendo na concentração  $4 \times 10^8$ /mL.  
Colocar 100 µL (quantidade de  $4 \times 10^7$  células) em três tubos cada.
    - **Tubo A (promastigotas somente com PBS).** Ao volume presente no tubo A COMPLETAR com tampão PBS até completar um total de 900 µL. Agitar o tubo e incubar por 5 minutos a 37 °C sob agitação. Teremos  $4 \times 10^7$  células em 100 µL (ou  $4 \times 10^7$  células/mL). Manter em banho de gelo até o uso.
    - **Tubo B (promastigotas tratadas só com fator C4BP puro).** Ao volume presente no tubo C acrescentar 12,5 µL de solução estoque contendo 12,5 µg de C4BP (1mg/ml) e completar o volume com PBS para 1000 µL. Incubar por 10 minutos a 37 °C sob agitação. Lavar 3 vezes com 500 µL de PBS (3000g/4°C/10 min) e após a última lavagem ressuspender as células em

1000  $\mu\text{L}$  de PBS. Teremos  $4 \times 10^7$  células em 100  $\mu\text{L}$  (ou  $4 \times 10^7$  células/mL). Manter em banho de gelo até o uso.

- **Tubo C (promastigotas tratadas SHN 5%).** Serão acrescentados 500  $\mu\text{L}$  de solução de SHN a 5% diluído em PBS pH 7,4 (475  $\mu\text{L}$  de PBS + 25  $\mu\text{L}$  de SHN). Incubar por 10 minutos a 37 °C sob agitação. Lavar 3 vezes com 500  $\mu\text{L}$  de PBS (3000g/4°C/10 min) e após a última lavagem ressuspender as células em 1000  $\mu\text{L}$  de PBS. Teremos  $4 \times 10^7$  células em 100  $\mu\text{L}$  (ou  $4 \times 10^7$  células/mL). Manter em banho de gelo até o uso.

Enumerar os tubos e colocar as quantidades de componentes do complemento e de *Leishmania* conforme indicações abaixo:

#### **Tubo 1**

28  $\mu\text{L}$  de PBS

2  $\mu\text{L}$  de C4 estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

Volume final = 30  $\mu\text{L}$ .

Incubar por 1 hora a 37 °C.

#### **Tubo 2**

28  $\mu\text{L}$  de PBS

2  $\mu\text{L}$  de C4b estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

Volume final = 30  $\mu\text{L}$ .

Incubar por 1 hora a 37 °C.

#### **Tubo 3**

20  $\mu\text{L}$  da suspensão de *Leishmania* **tubo B (Leish + C4BP)**

8  $\mu\text{L}$  de PBS

2  $\mu\text{L}$  de C4b estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

Volume final = 30  $\mu\text{L}$ .

Incubar por 1 hora a 37 °C.

#### **Tubo 4**

20  $\mu\text{L}$  da suspensão de *Leishmania* do **tubo A (Leish + PBS)**

7  $\mu\text{L}$  de PBS

2  $\mu\text{L}$  de C4b estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

1  $\mu\text{L}$  de fator I estoque (1 mg/mL)

Volume final = 30  $\mu\text{L}$ .

Incubar por 1 hora a 37 °C.

#### **Tubo 5**

20  $\mu\text{L}$  da suspensão de *Leishmania* **tubo B (Leish + C4BP)**

7  $\mu\text{L}$  de PBS

2  $\mu\text{L}$  de C4b estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

1  $\mu\text{L}$  de fator I da solução estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

Volume final = 30  $\mu\text{L}$ .

Incubar por 1 hora a 37 °C.

#### **Tubo 6**

20  $\mu\text{L}$  da suspensão de *Leishmania* **tubo C (Leish + SHN)**

10  $\mu\text{L}$  de PBS

Volume final = 30  $\mu\text{L}$ .

Incubar por 1 hora a 37 °C.

#### **Tubo 7**

20  $\mu\text{L}$  da suspensão de *Leishmania* **tubo C (Leish + SHN)**

7  $\mu\text{L}$  de PBS

2  $\mu\text{L}$  de C4b estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

1  $\mu\text{L}$  de fator I da solução estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

Volume final = 30  $\mu\text{L}$ .

Incubar por 1 hora a 37 °C.

#### **Tubo 8**

10  $\mu\text{L}$  de Padrão de Peso Molecular da Bio-Rad (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards #1610374)

- **Passo 2:** Depois disso, foram adicionadas às amostras nos tubos tampão da amostra redutor, e os tubos serão fervidos por 5 min. Os tubos serão submetidos a um *spen* (1 min a 3000g) e 15  $\mu\text{L}$  do sobrenadante será submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (Laemmli, 1970). O procedimento será interrompido quando o peso molecular de 25kD do padrão da Bio-Rad (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards

#1610374) alcançar a base do gel. As proteínas no gel serão transferidas para uma membrana de nitrocelulose durante duas horas a 100 V.

- **Passo 3:** Após esse passo, a membrana será bloqueada durante por 2 horas com uma solução de PBS contendo 0,1% de Tween 20 e 10% de leite em pó desnatado sob agitação constante. Após o bloqueio, a membrana será lavada três vezes por cinco minutos com PBS/Tween 20 0,1%.
- **Passo 4:** As bandas serão reveladas utilizando o anticorpo policlonal C4 (Comp Tech: A205) diluído 1:3000 em PBS/Tween 20 0,1% e incubado à temperatura ambiente durante duas horas sob agitação constante, seguido de um novo ciclo de lavagens (três vezes por cinco minutos com PBS/Tween 20 0,1%).
- **Passo 5:** O anticorpo secundário usado será o conjugado com peroxidase anti-IgG de cabra (abcam:ab6741) diluído 1:5000 em PBS e incubado à temperatura ambiente durante duas horas sob agitação constante, seguido de um novo ciclo de lavagens (lavagens (três vezes por cinco minutos com PBS).
- **Passo 6:** A revelação das bandas será realizada utilizando o kit de substrato DAB peroxidase (Vector Laboratories) e as imagens obtidas no Alpha DigiDoc™.

## 7. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 6 – AVALIAÇÃO DAS FORMAS DE DEPOSIÇÃO DE C4 NA SUPERFÍCIE DE PROMASTIGOTAS DE *L. INFANTUM* (PP75) NA PRESENÇA DE SHN E SORO HUMANO INATIVADO (ADAPTADO DE PEREIRA-FILHO 2023)

**Grupos (Colocados em cada canaleta do gel):**

1 - C4;

2 - C4b;

3- C4BP + C4b + FI

4 - *Leishmania* incubada previamente com Soro Inativado 5%

5 - *Leishmania* incubada previamente com SHN 5%

6 - *Leishmania* incubada previamente com PBS

7 - Padrão de Peso Molecular

- **Passo 1:** Uma cultura de promastigotas de *L. infantum* (PP75) em fase estacionária da curva de crescimento será submetida à contagem de células. Para isso 100 µL dessa cultura será retirada para diluir em 900 µL de isoton (10,5 g de ácido cítrico, 7 g de cloreto de sódio, 15 mL de formol P.A 40 % em 1 L de água destilada). Após contagem deverá ser pego um volume da cultura cujo número de células no microtubo será final de  $4 \times 10^8$ /mL. As promastigotas serão lavadas duas vezes por centrifugação (3000g/4°C/10min) com 200 µL de tampão PBS pH 7,4 gelado. Após a última lavagem o sedimento de células será ressuscitado num volume de 1000 µL de tampão PBS, permanecendo na concentração  $4 \times 10^8$ /mL.

Colocar 100 µL (quantidade de  $4 \times 10^7$  células) em três tubos cada.

- **Tubo A (promastigotas somente com PBS).** Ao volume presente no tubo A COMPLETAR com tampão PBS até completar um total de 900 µL. Agitar o tubo e incubar por 5 minutos a 37 °C sob agitação. Teremos  $4 \times 10^7$  células em 100 µL (ou  $4 \times 10^7$  células/mL). Manter em banho de gelo até o uso.

- **Tubo B (promastigotas tratadas com Soro Inativado 5%).** Serão acrescentados 500 µL de solução de Soro Humano inativado (56°C por 40 min) a 5% diluído em PBS ph 7,4 (475 µL de PBS + 25 µL de SHN). Incubar por 10 minutos a 37 °C sob agitação. Lavar 3 vezes com 500 µL de PBS (3000g/4°C/10 min) e após a última lavagem ressuscitar as células em 1000 µL de PBS. Teremos  $4 \times 10^7$  células em 100 µL (ou  $4 \times 10^7$  células/mL). Manter em banho de gelo até o uso.

- **Tubo C (promastigotas tratadas SHN 5%).** Serão acrescentados 500 µL de solução de SHN a 5% diluído em PBS ph 7,4 (475 µL de PBS + 25 µL de SHN). Incubar por 10 minutos a 37 °C sob agitação. Lavar 3 vezes com 500 µL de PBS (3000g/4°C/10 min) e após a última lavagem ressuscitar as células em 1000 µL de PBS. Teremos  $4 \times 10^7$  células em 100 µL (ou  $4 \times 10^7$  células/mL). Manter em banho de gelo até o uso.

Enumerar os tubos e colocar as quantidades de componentes do complemento e de *Leishmania* conforme indicações abaixo:

### **Tubo 1**

28 µL de PBS

2 µL de C4 estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

Volume final = 30 µL.

Incubar por 1 hora a 37 °C.

### **Tubo 2**

28  $\mu$ L de PBS

2  $\mu$ L de C4b estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

Volume final = 30  $\mu$ L.

Incubar por 1 hora a 37 °C.

### **Tubo 3**

25  $\mu$ L de PBS

2  $\mu$ L de C4b estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

1  $\mu$ L de fator I estoque (1 mg/mL)

2  $\mu$ L de fator C4BP estoque (1 mg/mL)

Volume final = 30  $\mu$ L.

Incubar por 1 hora a 37 °C.

### **Tubo 4**

20  $\mu$ L da suspensão de *Leishmania* do **tubo B (Leish + Soro humano inativado)**

10  $\mu$ L de PBS

Volume final = 30  $\mu$ L.

Incubar por 1 hora a 37 °C.

### **Tubo 5**

20  $\mu$ L da suspensão de *Leishmania* **tubo B (Leish + SHN)**

10  $\mu$ L de PBS

Volume final = 30  $\mu$ L.

Incubar por 1 hora a 37 °C.

### **Tubo 6**

20  $\mu$ L da suspensão de *Leishmania* **tubo C (Leish + PBS)**

10  $\mu$ L de PBS

Volume final = 30  $\mu$ L.

Incubar por 1 hora a 37 °C.



## **Tubo 7**

10 µL de Padrão de Peso Molecular da Bio-Rad (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards #1610374)

- **Passo 2:** Depois disso, foram adicionadas às amostras nos tubos tampão da amostra redutor, e os tubos serão fervidos por 5 min. Os tubos serão submetidos a um *spin* (1 min a 3000g) e 15 µL do sobrenadante será submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (Laemmli, 1970). O procedimento será interrompido quando o peso molecular de 25kD do padrão da Bio-Rad (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards #1610374) alcançar a base do gel. As proteínas no gel serão transferidas para uma membrana de nitrocelulose durante duas horas a 100 V.
- **Passo 3:** Após esse passo, a membrana será bloqueada durante por 2 horas com uma solução de PBS contendo 0,1% de Tween 20 e 10% de leite em pó desnatado sob agitação constante. Após o bloqueio, a membrana será lavada três vezes por cinco minutos com PBS/Tween 20 0,1%.
- **Passo 4:** As bandas serão reveladas utilizando o anticorpo policlonal C4 (Comp Tech: A213) diluído 1:3000 em PBS/Tween 20 0,1% e incubado à temperatura ambiente durante duas horas sob agitação constante, seguido de um novo ciclo de lavagens (três vezes por cinco minutos com PBS/Tween 20 0,1%).
- **Passo 5:** O anticorpo secundário usado será o conjugado com peroxidase anti-IgG de cabra (abcam:ab6741) diluído 1:5000 em PBS e incubado à temperatura ambiente durante duas horas sob agitação constante, seguido de um novo ciclo de lavagens (lavagens (três vezes por cinco minutos com PBS).
- **Passo 6:** A revelação das bandas será realizada utilizando o kit de substrato DAB peroxidase (Vector Laboratories) e as imagens obtidas no Alpha DigiDoc™.

## 8. AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO DE C3B NA SUPERFÍCIE DE *LEISHMANIA* PELA GP63 (ADAPTADO DE PEREIRA-FILHO ET. AL. 2023)

Contextualização: Existe na superfície de *Leishmania* a gp63, uma metalopeptidase abundante na superfície de *Leishmania*, e que contribui para uma infinidade de funções bem estabelecidas na interação deste parasito com o hospedeiro mamífero. Entre essas funções destaca-se a clivagem de C3b em iC3b. Dessa forma, iremos avaliar a capacidade dessa clivagem, além de verificarmos a capacidade da 1,10-Phenantroline (inibidor de metalo-protease) em impedir essa clivagem. Dessa forma, ao constataremos esse impedimento da gp63, poderemos utilizar essa metodologia para verificar o real efeito do Fator H captado pela *Leishmania* na clivagem de C3b em iC3b, sem qualquer interferência da gp63.

### Grupos (Colocados em cada canaleta do gel):

- 1 - C4
- 2 - C4b;
- 3 - *Leishmania* lavada com PBS + C4b;
- 4 - (*Leishmania* tratada com 1,10-Phenantroline) + C4b;
- 5 - (*Leishmania* tratada com E64) + C4b;
- 6 - (*Leishmania* tratada com PMSF) + C4b;
- 7 - (*Leishmania* tratada com EDTA) + C4b;
- 8 - Padrão de Peso Molecular

Foi utilizada a orto-Fenantrolina (inibidor de metaloproteases) oriunda de uma solução estoque de 200 mM em metanol que fica estocada a - 20 °C.

- **Passo 1:** Uma cultura de promastigotas de *L. infantum* (PP75) em fase estacionária da curva de crescimento foi submetida à contagem de células. Para isso 100 µL dessa cultura foi retirada para diluir em 900 µL de isotom (10,5 g de ácido cítrico, 7 g de cloreto de sódio, 15 mL de formol P.A 40 % em 1 L de água destilada). Após contagem foi pego um volume da cultura cujo número de células no microtubo será final de  $4 \times 10^8$ /mL. As promastigotas foram lavadas duas vezes por centrifugação (3000g/4°C/10min) com 200 µL de tampão PBS pH 7,4 gelado. Após a última lavagem o sedimento de células foi ressuspendido num volume de 1000 µL de tampão PBS, permanecendo na concentração  $4 \times 10^8$ /mL.

Foi colocado 100 µL (quantidade de  $4 \times 10^7$  células) em dois tubos cada.

- **Tubo A (promastigotas somente com PBS).** Ao volume presente no tubo A COMPLETAR com tampão PBS até completar um total de 900  $\mu\text{L}$ . Agitou o tubo e incubar por 30 minutos a 37 °C sob agitação. Teremos  $4 \times 10^7$  células em 100  $\mu\text{L}$  (ou  $4 \times 10^7$  células/mL). Manter em banho de gelo até o uso.

- **Tubo B (promastigotas tratadas com orto-fenantrolina).** Ao volume presente no tubo B completou com tampão PBS até completar um total de 980  $\mu\text{L}$  e adicionar 20 microlitros de orto-fenantrolina estoque (200 mM em metanol); a concentração final de orto-fenantrolina será de 2 mM. Agitou o tubo e incubar por 30 minutos a 37 °C sob agitação. Por último lavou essas células três vezes com 500  $\mu\text{L}$  de PBS (3000g/4°C/10 min). Após a última lavagem ressuspendeu as células em 100  $\mu\text{L}$  de PBS. Teremos  $4 \times 10^7$  células em 100  $\mu\text{L}$  (ou  $4 \times 10^7$  células/mL). Manter em banho de gelo até o uso.

Enumerar os tubos e colocar as quantidades de componentes do complemento e de *Leishmania* conforme indicações abaixo:

#### **Tubo 1**

28  $\mu\text{L}$  de PBS

2  $\mu\text{L}$  de C3 estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

Volume final = 30  $\mu\text{L}$ .

Incubar por 1 hora a 37 °C.

#### **Tubo 2**

28  $\mu\text{L}$  de PBS

2  $\mu\text{L}$  de C3b estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

Volume final = 30  $\mu\text{L}$ .

Incubar por 1 hora a 37 °C.

#### **Tubo 3**

28  $\mu\text{L}$  de PBS

2  $\mu\text{L}$  de iC3b estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

Volume final = 30  $\mu\text{L}$ .

Incubar por 1 hora a 37 °C.

#### **Tubo 4**

20  $\mu\text{L}$  da suspensão de *Leishmania* do **tubo A (Leish + PBS)**

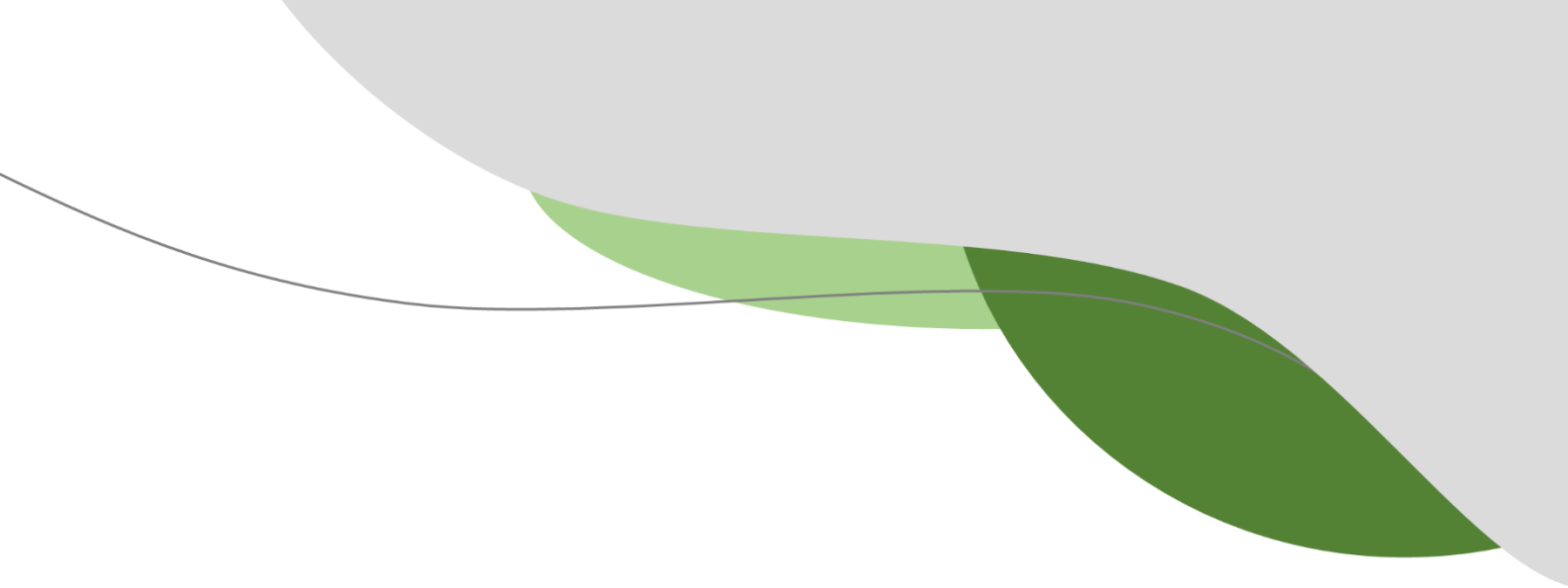
8 µL de PBS  
2 µL de C3b estoque (sol. estoque 1 mg/mL)  
Volume final = 30 µL.  
Incubar por 1 hora a 37 °C.

#### **Tubo 5**

20 µL da suspensão de *Leishmania* do **tubo B (Leish + Orto)**  
8 µL de PBS  
2 µL de C3b estoque (sol. estoque 1 mg/mL)  
Volume final = 30 µL.  
Incubar por 1 hora a 37 °C.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- BALANCO, J.M.F. et al. S.C.,1998. Axenic cultivation and partial characterization of *Leishmania braziliensis* amastigote-like stages. *Parasitol* 116, 103–113.
- PEREIRA-FILHO, ADALBERTO ALVES; et al. Evasion of the complement system by *Leishmania* through the uptake of C4bBP, a complement regulatory protein, and probably by the action of GP63 on C4b molecules deposited on parasite surface. *ACTA TROPICA*, v. 242, p. 106908, 2023.
- DE MELO LARA, LUISA ; et al .Adaptations to haematophagy: Investigations on how male and female *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) deal with human complement activation after a blood meal. *INSECT BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY JCR*, v. 139, p. 103650, 2021.
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- PEREIRA-FILHO, ADALBERTO ALVES; et al. The gut anti-complement activity of *Aedes aegypti*: Investigating new ways to control the major human arboviruses vector in the Americas. *INSECT BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY JCR*, v. 120, p. 103338, 2020.
- ERMERT D, BLOM AM. C4b-binding protein: The good, the bad and the deadly. Novel functions of an old friend. *Immunol Lett.* 2016; 169:82-92. Doi: 10.1016/j.imlet.2015.11.014.
- MOHLIN FC, BLOM AM. Purification and functional characterization of C4b-binding protein (C4BR) *Methods Mol*



9 786553 811522

