

FATOR H – DEFINIÇÃO E PROCEDIMENTOS PRÁTICOS NO CONTEXTO DA PESQUISA CIENTÍFICA

1^a Edição

Adalberto Alves Pereira Filho

FATOR H – DEFINIÇÃO E PROCEDIMENTOS PRÁTICOS NO CONTEXTO DA PESQUISA CIENTÍFICA

1^a Edição

Adalberto Alves Pereira Filho



AMPLLA
EDITORAS



2023 - Editora Amplia

Copyright da Edição © Editora Amplia

Copyright do Texto © Os autores

Editor Chefe: Leonardo Pereira Tavares

Design da Capa: Editora Amplia

Diagramação: Juliana Ferreira

Revisão: Os autores

Fator H – definição e procedimentos práticos no contexto 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 Amplia. 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 Amplia.

ISBN: 978-65-5381-154-6

DOI: 10.51859/amplia.fhd546.1123-0

Editora Amplia

Campina Grande – PB – Brasil

contato@ampliaeditora.com.br

www.ampliaeditora.com.br



2023

CONSELHO EDITORIAL

Alexander Josef Sá Tobias da Costa – Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Andréa Cábia 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
Jaqueleine 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 Eufrasio – 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 Cézar 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
Sabrynna 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 Paschoalette 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 Amplia
Copyright da Edição © Editora Amplia
Copyright do Texto © Os autores
Editor Chefe: Leonardo Pereira Tavares
Design da Capa: Editora Amplia
Diagramação: Juliana Ferreira
Revisão: Os autores

Catalogação na publicação
Elaborada por Bibliotecária Janaina Ramos - CRB-8/9166

P436f

Pereira Filho, Adalberto Alves

Fator H – definição e procedimentos práticos no contexto da pesquisa científica
/ Adalberto Alves Pereira Filho. – Campina Grande/PB: Amplia, 2023.

Livro em PDF

ISBN 978-65-5381-154-6
DOI 10.51859/amplia.fhd546.1123-0

1. Genética molecular humana. 2. Fator H. 3. Pesquisa científica. I. Pereira Filho, Adalberto Alves. II. Título.

CDD 611.01816

Índice para catálogo sistemático

I. Genética molecular humana

Editora Amplia
Campina Grande – PB – Brasil
 contato@ampliaeditora.com.br
 www.ampliaeditora.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 inato dos vertebrados, e sua atividade pode ser altamente prejudicial para vírus, bactérias e parasitas. É conhecido que diversos patógenos e/ou até mesmo 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, os chamados “*molecules self*”.

Esse sucesso de patógenos em escapar do sistema do complemento foi capaz graças o desenvolvimento de receptores capazes de captar o fator H do plasma de seus hospedeiros podendo ocorrer com as bactérias até mesmo parasitas. O fator H, que é uma Glicoproteína que participa da regulação da ativação do complemento podendo:

- a) Competir com o fator B (FB) para ligação em C3b, impedindo a geração de C3bBb;
- b) Promover o decaimento dos complexos C3bBb já formados, através da dissociação de Bb da C3 convertase;
- c) Atuar como co-fator do fator I (FI), que por sua vez cliva a cadeia alfa de C3b transformando-o em C3b inativo (iC3b)

Neste e-book será elucidado sobre o Fator H 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 DE FATOR H E COMO PATÓGENOS PODEM UTILIZAR PARA SE EVADIR DO SISTEMA COMPLEMENTO?	9
2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1 – AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE C3B, FATOR H E MAC EM PROMASTIGOTA <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> QUANDO EXPOSTA AO SORO HUMANO NORMAL (SHN).....	9
3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2 – AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE C3B, FATOR H E MAC EM PROMASTIGOTA DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> QUANDO EXPOSTA AO SORO HUMANO INATIVADO (SHI) A 56ºC POR 30 MIN.....	12
4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 3 – AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE FATOR H PURIFICADO EM PROMASTIGOTAS DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> (FASE ESTACIONÁRIA).....	15
5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 4 – AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE C3B, FATOR H E MAC EM AMASTIGOTA <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> QUANDO EXPOSTA AO SORO HUMANO NORMAL (SHN)	17
6. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 5 – AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO DE C3B NA SUPERFÍCIE DE <i>LEISHMANIA</i> PELA GP63	18
7. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 6 – AVALIAÇÃO POR WESTERN BLOT DO EFEITO DO FATOR H LIGADO À SUPERFÍCIE DE <i>LEISHMANIA</i> NA INATIVAÇÃO DE C3B	22
8. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 6 – AVALIAÇÃO DAS FORMAS DE DEPOSIÇÃO DE C3 NA SUPERFÍCIE DE PROMASTIGOTAS DE <i>L. INFANTUM</i> NA PRESENÇA DE SHN E SORO HUMANO INATIVADO.....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1. O QUE É A MOLÉCULA DE FATOR H E COMO PATÓGENOS PODEM UTILIZAR PARA SE EVADIR DO SISTEMA COMPLEMENTO?

O FH funciona como um co-fator para que o Fator I (uma protease plasmática) inative o C3b. Dessa forma, o FH pode associar-se com as células do hospedeiro através do reconhecimento de marcadores celulares com o ácido siálico de superfícies celulares e, desta forma, regular negativamente o SC. Além do fator H, o C4bp, CR1 e o DAF (os dois últimos ligados à membrana) aceleram o decaimento das C3 e C5 convertases (Medjeral-Thomas et al. 2016).

Alguns patógenos obtiveram sucesso em escapar do sistema do complemento desenvolvendo receptores capazes de captar o fator H do plasma de seus hospedeiros. Uma vez presente na superfície do patógeno, o fator H promove a inativação do complemento pelo fator I e assim o patógeno fica protegido da lise mediada pelo complemento. Isto é o que ocorre com as bactérias do gênero *Borrelia* (Gea et al. 2012), *Neisseria* (Clarck et al. 2021), *Treponema* (Miller et al. 2011) com protozoários do gênero *Plasmodium* (Kennedy et al. 2016), *Toxoplasma* (Sikorski et al. 2020) e *Leishmania* (Pereira-Filho et al. 2021) em trabalhos já publicados em revistas científicas especializadas no assunto.

De forma interessante, pesquisadores na área publicaram *papers* demonstrando que esta atividade foi encontrada em fêmeas de gêneros de mosquito *Anopheles*, *Culex* e *Aedes* possivelmente para minimizar o dano intestinal do inseto após o repasto sanguíneo (Khattab et al. 2015; Pereira-Filho et al. 2020; de Melo et al. 2021). Isso sugere que a captação de fator H por fêmeas de artrópodes hematófagos vetores de patógenos para humanos poderia ser uma estratégia conservada, sendo selecionada durante a evolução para proteger estes artrópodes contra o dano causado pela ativação do complemento durante o repasto sanguíneo.

Logo abaixo serão delineados procedimentos práticos e amplamente descritos tomando como referência o parasita *Leishmania*. No entanto, esses procedimentos podem ser aplicados em qualquer patógeno com algumas adaptações a serem feitas.

2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1 – AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE C3b, FATOR H E MAC EM PROMASTIGOTA *LEISHMANIA INFANTUM* QUANDO EXPOSTA AO SORO HUMANO NORMAL (SHN) (ADAPTADO DE PEREIRA-FILHO ET AL. 2021)

Grupos:

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

- *Leishmania* + 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 (Na_2CO_3 15mM, 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 200 mM, diluído em Metanol e estocado a - 20°C. Concentração de uso = 2 mM. Classe: inibidor de serino-protease.

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

EDTA: Concentração estoque 200 mM, 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 *Leishmania infantum* 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 1×10^8 células. 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. A concentração de células nessa suspensão será final de 1×10^8 células/mL;
- **Passo 2:** Em seguida, 100 μL (quantidade de 10^7 parasitos) desta suspensão de células serão transferidos para 4 microtubos (100 μL 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 μL de solução de SHN a 5% diluído em PBS pH 7,4 (**475 μL de PBS + 25 μL 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/4ºC/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 NaHCO₃ (35mM) /Na₂CO₃ (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 2x10⁶ células e transferir para outro tubo e completar com volume final de tampão bicarbonato/carbonato até 1 mL, assim a concentração final será 2x10⁶ células/mL.
- **Passo 4:** Em seguida, volumes de 100 µL (2x10⁵ parasitos) serão transferidos para poços de uma placa de 96 poços (em triplicata) e incubados “overnight” à 37 ºC de forma à placa secar para posterior avaliação da ligação dos componentes C3b, Fator H e MAC 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: Anti-Fator H (CompTech: A237) produzido em cabra (Concentração 1:1.000); Anti-SC5b-9 (CompTech: A227) produzido em coelho (Concentração 1:4.000) e anti-C3c (Sigma: C6025) produzido em coelho (Concentração 1:2.000) diluídos separadamente em solução de leite em pó 5% (2,5 g de leite desnatado em 50 mL em PBS-Tween20 0,1%) e incubar por 30 minutos em temperatura ambiente com agitação;
- **Passo 7:** Em cada poço lavar utilizando 200 µL de solução de leite em pó 5% (2,5 g de leite desnatado em 50 mL em PBS-Tween-20 0,1%) por três vezes por 5 minutos com agitação constante.
- **Passo 8:** Adicionar 50 µL do anticorpo secundário anti cabra (abcam:ab6741) (Concentração 1: 15.000) para os poços correspondentes de fator H, e adicionar 50 µL do anticorpo secundário anti coelho (abcam: ab6721) (Concentração 1: 1.000) para os poços correspondentes ao fator C3c e Anti-SC5b-9, diluídos em solução de leite em pó

- 5% (2,5 g de leite desnatado em 50 mL em PBS-Tween-20 0,1%) e incubar por 30 minutos em temperatura ambiente com agitação;
- **Passo 9:** Em cada poço lavar utilizando 200 μ L de PBS-Tween-20 0,1% por 5 minutos, sob agitação (Dessa vez NÃO usar a lavagem com leite);

- **Passo 10:** Em cada poço serão adicionados 200 μ L de solução contendo (citrato de sódio 50 mM, pH 5,5, 0,075% de H₂O₂ e 1 mg/mL de o-fenileno-diamina (OPD) (Sigma, código P9029), a placa será então incubada a 37°C por exatamente 10min. Esta reação será bloqueada após 10 minutos pela adição de 100 μ L de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 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** (ATENÇÃO: Considerar esse valor e não de 450 nm por conta do uso do ácido sulfúrico (H₂SO₄).

3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2 – AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE C3b, FATOR H E MAC EM PROMASTIGOTA DE *LEISHMANIA INFANTUM* QUANDO EXPOSTA AO SORO HUMANO INATIVADO (SHI) A 56°C POR 30 MIN (ADAPTADO DE PEREIRA-FILHO ET AL. 2021)

Grupos:

- Leishmania + Soro Humano inativado (Células incubadas com SH inativado 1:20 = 5% em PBS pH 7,4)
- Leishmania + 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 (Na₂CO₃ 15mM, NaHCO₃ 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 μ M. 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* 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 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 1×10^8 células/mL. As promastigotas serão lavadas duas vezes por centrifugação (3000g/4ºC/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 1×10^8 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/4ºC/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 37ºC durante 10 minutos.
- **Passo 3:** Após a incubação, cada microtubo será lavado três vezes por centrifugação (3000g/4ºC/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 NaHCO₃ (35mM) /Na₂CO₃ (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 2×10^6 células e transferir para outro tubo e completar com volume final de tampão bicarbonato/carbonato até 1 mL, assim a concentração final será 2×10^6 células/mL.
- **Passo 4:** Em seguida, volumes de 100 µL (2×10^5 parasitos) serão transferidos para poços de uma placa de 96 poços (em triplicata) e incubados “overnight” à 37 ºC de forma

à placa secar para posterior avaliação da ligação dos componentes C3b, Fator H e MAC 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: Anti-Fator H (CompTech: A237) produzido em cabra (Concentração 1:1.000); Anti-SC5b-9 (CompTech: A227) produzido em coelho (Concentração 1:4.000) e anti-C3c (Sigma: C6025) produzido em coelho (Concentração 1:2.000) diluídos separadamente em solução de leite em pó 5% (2,5 g de leite desnatado em 50 mL em PBS-Tween20 0,1%) e incubar por 30 minutos em temperatura ambiente com agitação;
- **Passo 7:** Em cada poço lavar utilizando 200 µL de solução de leite em pó 5% (2,5 g de leite desnatado em 50 mL em PBS-Tween-20 0,1%) por três vezes por 5 minutos com agitação constante.
- **Passo 8:** Adicionar 50 µL do anticorpo secundário anti cabra (abcam:ab6741) (Concentração 1: 15.000) para os poços correspondentes de fator H, e adicionar 50 µL do anticorpo secundário anti coelho (abcam: ab6721) (Concentração 1: 1.000) para os poços correspondentes ao fator C3c e Anti-SC5b-9, diluídos em solução de leite em pó 5% (2,5 g de leite desnatado em 50 mL em PBS-Tween-20 0,1%) e incubar por 30 minutos em temperatura ambiente com agitação;
- **Passo 9:** Em cada poço lavar utilizando 200 µL de PBS-Tween-20 0,1% por 5 minutos, sob agitação (Dessa vez NÃO usar a lavagem com leite);
- **Passo 10:** Em cada poço serão adicionados 200 µL de solução contendo (citrato de sódio 50 mM, pH 5,5, 0,075% de H₂O₂ e 1 mg/mL de o-fenileno-diamina (OPD) (Sigma, código P9029), a placa será então incubada a 37°C por exatamente 10min. Esta reação será bloqueada após 10 minutos pela adição de 100 µL de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 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** (ATENÇÃO: Considerar esse valor e não de 450 nm por conta do uso do ácido sulfúrico (H_2SO_4)).

4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 3 – AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE FATOR H PURIFICADO EM PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA INFANTUM* (FASE ESTACIONÁRIA) (ADAPTADO DE PEREIRA-FILHO ET AL. 2021)

Grupos:

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

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

- A concentração de Fator H no plasma humano pode variar amplamente desde 116 até 562 μ g/ml, dependendo de fatores genéticos e ambientais (Esparza-Gordillo et al. 2004; Rodriguez de Córdoba & Jorge 2008). **Dessa forma nós estamos considerando que a média da concentração de FH no SHN seja em torno de = 250 μ g /mL.**
- **A Concentração de Fator H Comptech = 1mg/ml ou 1000 μ L /mL. Dessa forma, para eu ter a concentração de fator H igual a do SHN 5%, vou pegar 1,25 μ L de FH e acrescentar por tubo contendo 100 μ L com as *Leishmania* lavadas (ver abaixo os detalhes no passo 2).**
- **Passo 1:** Em um microtubo, serão adicionados 1000 μ L de cultura de *L. infantum* 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 μ L do mesmo tampão. Em seguida, será retirada uma alíquota de 50 μ L 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 1×10^8 células/mL.
- **Passo 2:** Em seguida, 100 μ L (quantidade de 1×10^7 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 μ L de solução de Fator H diluído em tampão PBS pH 7,4 (493,75 μ L + 6,25 μ L de fator H 1 mg/mL (Comptech: A137)). O 4º tubo funcionará como controle negativo, e assim, os parasitos serão acrescentados apenas de 500 μ L 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 μ L de tampão PBS pH 7,4, por centrifugação (3000g/4°C/10min), para lavagem do fator H não ligado.

- **Passo 3:** Após a última lavagem os tubos irão ser ressuspensos em 1 mL de tampão bicarbonato/carbonato NaHCO₃ (35mM) /Na₂CO₃ (15mM) pH9,6, contendo inibidores de protease na concentração final de (PMSF 2 mM, EDTA 1,5 mM e E64 10 μ M). Retirar um volume correspondente a 2x10⁶ células e transferir para outro tubo e completar com volume final de tampão bicarbonato/carbonato até 1 mL, assim a concentração final será 2x10⁶ células/mL.
- **Passo 4:** Em seguida, volumes de 100 μ L (2x10⁵ parasitos) serão transferidos para poços de uma placa de 96 poços (em triplicata) e incubados “overnight” a 37 °C para posterior avaliação do Fator H à membrana das promastigotas de *L. infantum* por meio de ELISA. A placa deverá ser incubada a 37°C em câmara úmida overnight;
- **Passo 5:** Bloquear a placa com 200 μ L de leite em pó 5% (2,5 g de leite desnatado em 50 mL em 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 μ L dos respectivos anticorpos para os fatores pesquisados na placa: Anti-Fator H (CompTech: A237) produzido em cabra (Concentração 1:1.000); diluídos separadamente em solução de leite em pó 5% (2,5 g de leite desnatado em 50 mL em PBS-Tween-20 0,1%) e incubar por 30 minutos em temperatura ambiente com agitação;
- **Passo 7:** Lavar os poços três vezes por 5 minutos com agitação com a solução de leite em pó 5% (2,5 g de leite desnatado em 50 mL em PBS-Tween-20 0,1%);

- **Passo 8:** Adicionar 50 μ L do anticorpo secundário anti cabra (abcam:ab6741) (Concentração 1: 10.000 para os poços correspondentes de fator H, diluído em solução de leite em pó 5% (2,5 g de leite desnatado em 50 mL em PBS-Tween-20 0,1%)) e incubar por 30 minutos em temperatura ambiente com agitação;
- **Passo 9:** Lavar os poços três vezes com 200 microlitros de PBS-Tween-20 0,1% por 5 minutos, sob agitação (Dessa vez NÃO usar a lavagem com leite);
- **Passo 10:** Em cada poço serão adicionados 200 μ L de solução contendo (citrato de sódio 50 mM, pH 5,5, 0,075% de H_2O_2 e 1 mg/mL de o-fenileno-diamina (OPD) (Sigma, código P9029), e a placa será incubada a 37°C/10min. Esta reação será bloqueada após 10 minutos pela adição de 100 μ L de solução de ácido sulfúrico (H_2SO_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 (H_2SO_4)).

5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 4 – AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE C3b, FATOR H E MAC EM AMASTIGOTA *LEISHMANIA INFANTUM* QUANDO EXPOSTA AO SORO HUMANO NORMAL (SHN) (ADAPTADO DE PEREIRA-FILHO ET AL. 2021)

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

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

Grupos:

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

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

Para a conversão de promastigota em amastigota utilizaremos o protocolo de Freitas et al 2012. Dessa forma, promastigotas serão cultivados em meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 UI/mL de penicilina, 100 μ g/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 $23\pm1^{\circ}\text{C}$ 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 5×10^6 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 DA INATIVAÇÃO DE C3b NA SUPERFÍCIE DE LEISHMANIA PELA GP63 (ADAPTADO DE PEREIRA-FILHO ET AL. 2021)

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 constatarmos 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 – C3**
- 2 – C3b;**
- 3 – iC3b;**
- 4 – *Leishmania* lavada com PBS + SHN;**
- 5 – (*Leishmania* tratada com 1,10-Phenantroline) + SHN;**
- 6 – 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* 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 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 foi pego um volume da cultura cujo número de células no microtubo será final de $4 \times 10^8/\text{mL}$. As

promastigotas foram lavadas duas vezes por centrifugação (3000g/4ºC/10min) com 200 μ L de tampão PBS pH 7,4 gelado. Após a última lavagem o sedimento de células foi ressuspensido num volume de 1000 μ L de tampão PBS, permanecendo na concentração 4×10^8 /mL.

Foi colocado 100 μ L (quantidade de 4×10^7 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 μ L. Agitou o tubo e incubar por 30 minutos a 37 ºC sob agitação. Teremos 4×10^7 células em 100 μ L (ou 4×10^7 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 μ 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 ºC sob agitação. Por último lavou essas células três vezes com 500 μ L de PBS (3000g/4ºC/10 min). Após a última lavagem ressuspendeu as células em 100 μ L de PBS. Teremos 4×10^7 células em 100 μ L (ou 4×10^7 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 μ L de PBS

2 μ L de C3 estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

Volume final = 30 μ L.

Incubar por 1 hora a 37 ºC.

Tubo 2

28 μ L de PBS

2 μ L de C3b estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

Volume final = 30 μ L.

Incubar por 1 hora a 37 ºC.

Tubo 3

28 μ L de PBS

2 μ L de iC3b estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

Volume final = 30 μ L.

Incubar por 1 hora a 37 °C.

Tubo 4

20 µL 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.

Tubo 6

20 µL da suspensão de *Leishmania* **tubo C (Leish + FH)**

7 µL de PBS

2 µL de C3b estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

1 µL de fator I da solução estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

Volume final = 30 µL.

Incubar por 1 hora a 37 °C.

Tubo 7

25 µL de PBS

2 µL de C3b estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

1 µL de fator I estoque (1 mg/mL)

2 µL de fator H estoque (1 mg/mL)

Volume final = 30 µL.

Incubar por 1 hora a 37 °C.

Tubo 8

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 *spreen* (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) alcançou 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 C3 (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™.

7. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 6 – AVALIAÇÃO POR WESTERN BLOT DO EFEITO DO FATOR H LIGADO À SUPERFÍCIE DE *LEISHMANIA* NA INATIVAÇÃO DE C3b (ADAPTADO DE PEREIRA-FILHO ET AL. 2021)

Grupos (Colocados em cada canaleta do gel):

1 – C3;

2 – C3b;

3 – iC3b;

4 – Leishmania incubada previamente com FH + C3b

5 – Leishmania incubada previamente com PBS + C3b + FI

6 – Leishmania incubada previamente com FH + C3b + FI

7 – Leishmania incubada previamente com SHN 5%

8 – Leishmania incubada previamente com SHN + C3b + FI

9 – Padrão de Peso Molecular

- **Passo 1:** Uma cultura de promastigotas de *L. infantum* 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 4×10^8 /mL. As promastigotas serão lavadas duas vezes por centrifugação (3000g/4ºC/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 4×10^8 /mL.

Colocar 100 µL (quantidade de 4×10^7 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 ºC sob agitação. Teremos 4×10^7 células em 100 µL (ou 4×10^7 células/mL). Manter em banho de gelo até o uso.

- **Tubo B (promastigotas tratadas só com fator H puro).** Ao volume presente no tubo C acrescentar 12,5 µL de solução estoque de fator H contendo 12,5 µg de fator H (1mg/ml) e completar o volume com PBS para 1000 µL. Incubar por 10 minutos a 37 ºC sob agitação. Lavar 3 vezes com 500 µL de PBS (3000g/4ºC/10 min) e após a última lavagem ressuspender as

células em 1000 μ L de PBS. Teremos 4×10^7 células em 100 μ L (ou 4×10^7 células/mL). Manter em banho de gelo até o uso.

- Tubo C (promastigotas tratadas SHN 5%). Serão acrescentados 500 μ L de solução de SHN a 5% diluído em PBS ph 7,4 (475 μ L de PBS + 25 μ L de SHN). Incubar por 10 minutos a 37 °C sob agitação. Lavar 3 vezes com 500 μ L de PBS (3000g/4°C/10 min) e após a última lavagem ressuspender as células em 1000 μ L de PBS. Teremos 4×10^7 células em 100 μ L (ou 4×10^7 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 μ L de PBS

2 μ L de C3 estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

Volume final = 30 μ L.

Incubar por 1 hora a 37 °C.

Tubo 2

28 μ L de PBS

2 μ L de C3b estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

Volume final = 30 μ L.

Incubar por 1 hora a 37 °C.

Tubo 3

28 μ L de PBS

2 μ L de iC3b estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

Volume final = 30 μ L.

Incubar por 1 hora a 37 °C.

Tubo 4

20 μ L da suspensão de *Leishmania* **tubo B (Leish + FH)**

8 μ L de PBS

2 μ L de C3b estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

Volume final = 30 μ L.

Incubar por 1 hora a 37 °C.

Tubo 5

20 µL da suspensão de *Leishmania* do **tubo A (Leish + PBS)**

7 µL de PBS

2 µL de C3b estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

1 µL de fator I estoque (1 mg/mL)

Volume final = 30 µL.

Incubar por 1 hora a 37 °C.

Tubo 6

20 µL da suspensão de *Leishmania* **tubo B (Leish + FH)**

7 µL de PBS

2 µL de C3b estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

1 µL de fator I da solução estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

Volume final = 30 µL.

Incubar por 1 hora a 37 °C.

Tubo 7

20 µL da suspensão de *Leishmania* **tubo C (Leish + SHN)**

10 µL de PBS

Volume final = 30 µL.

Incubar por 1 hora a 37 °C.

Tubo 8

20 µL da suspensão de *Leishmania* **tubo C (Leish + SHN)**

7 µL de PBS

2 µL de C3b estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

1 µL de fator I da solução estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

Volume final = 30 µL.

Incubar por 1 hora a 37 °C.

Tubo 9

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 *speen* (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) alcançou 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 C3 (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. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 6 – AVALIAÇÃO DAS FORMAS DE DEPOSIÇÃO DE C3 NA SUPERFÍCIE DE PROMASTIGOTAS DE *L. INFANTUM* NA PRESENÇA DE SHN E SORO HUMANO INATIVADO (ADAPTADO DE PEREIRA-FILHO ET AL. 2021)

Grupos (Colocados em cada canaleta do gel):

- 1 – C3;**
- 2 – C3b;**
- 3 – iC3b;**
- 4 – FH + C3b + FI**

5 – Leishmania incubada previamente com Soro Inativado 5%

6 – Leishmania incubada previamente com SHN 5%

7 – Leishmania incubada previamente com PBS

8 – Padrão de Peso Molecular

- **Passo 1:** Uma cultura de promastigotas de *L. infantum* 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 4×10^8 /mL. As promastigotas serão lavadas duas vezes por centrifugação (3000g/4ºC/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 4×10^8 /mL.

Colocar 100 µL (quantidade de 4×10^7 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 ºC sob agitação. Teremos 4×10^7 células em 100 µL (ou 4×10^7 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 (56ºC 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 ºC sob agitação. Lavar 3 vezes com 500 µL de PBS (3000g/4ºC/10 min) e após a última lavagem ressuspender as células em 1000 µL de PBS. Teremos 4×10^7 células em 100 µL (ou 4×10^7 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 ºC sob agitação. Lavar 3 vezes com 500 µL de PBS (3000g/4ºC/10 min) e após a última lavagem ressuspender as células em 1000 µL de PBS. Teremos 4×10^7 células em 100 µL (ou 4×10^7 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 a seguir:

Tubo 1

28 µL de PBS

2 µL de C3 estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

Volume final = 30 µL.

Incubar por 1 hora a 37 °C.

Tubo 2

28 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 3

28 µL de PBS

2 µL de iC3b estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

Volume final = 30 µL.

Incubar por 1 hora a 37 °C.

Tubo 4

25 µL de PBS

2 µL de C3b estoque (sol. estoque 1 mg/mL)

1 µL de fator I estoque (1 mg/mL)

2 µL de fator H 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 + Sinat)**

10 µL de PBS

Volume final = 30 µL.

Incubar por 1 hora a 37 °C.

Tubo 6

20 μ L da suspensão de *Leishmania* **tubo B (Leish + SHN)**

10 μ L de PBS

Volume final = 30 μ L.

Incubar por 1 hora a 37 °C.

Tubo 7

20 μ L da suspensão de *Leishmania* **tubo C (Leish + PBS)**

10 μ L de PBS

Volume final = 30 μ L.

Incubar por 1 hora a 37 °C.

Tubo 8

10 μ 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 *spreen* (1 min a 3000g) e 15 μ 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) alcançou 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 C3 (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™.

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.
- CLARK SA, GRAY S, FINN A, BORROW R. Colistin Sensitivity and Factor H-Binding Protein Expression among Commensal *Neisseria* Species [published online ahead of print, 2021 Jun 16]. mSphere. 2021;6(3):e0017521. doi:10.1128/mSphere.00175-21
- 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.
- GECA A, MAZUREK U, MUC-WIERZGOŃ M, et al. Znaczenie czynnika H w patogenezie zakażenia krętkami Borrelia [The role of complement factor H in the pathogenesis of *Borrelia* infection]. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2012;66:501-506. Published 2012 Jul 20. doi:10.5604/17322693.1004077
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680–685.
- MEDJERAL-THOMAS N, PICKERING MC. The complement factor H-related proteins. Immunol Rev. 2016;274(1):191-201. doi:10.1111/imr.12477
- PEREIRA-FILHO AA, NASCIMENTO AAS, SAAB NAA, et al. Evasion of the complement system by *Leishmania* through the uptake of factor H, a complement regulatory protein. Acta Trop. 2021;224:106152. doi:10.1016/j.actatropica.2021.106152
- 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
- SIKORSKI PM, COMMODOARO AG, GRIGG ME. *Toxoplasma gondii* Recruits Factor H and C4b-Binding Protein to Mediate Resistance to Serum Killing and Promote Parasite

Persistence in vivo. *Front Immunol.* 2020;10:3105. Published 2020 Jan 17. doi:10.3389/fimmu.2019.03105

KHATTAB A, BARROSO M, MIETTINEN T, MERI S. Anopheles midgut epithelium evades human complement activity by capturing factor H from the blood meal. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(2):e0003513. Published 2015 Feb 13. doi:10.1371/journal.pntd.0003513

KENNEDY AT, SCHMIDT CQ, THOMPSON JK, et al. Recruitment of Factor H as a Novel Complement Evasion Strategy for Blood-Stage *Plasmodium falciparum* Infection. *J Immunol.* 2016;196(3):1239-1248. doi:10.4049/jimmunol.1501581



9 786553 811546

