

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO GONÇALO MONIZ

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA PROTEÍNA
TRANSLOCADORA (TSPO) NA INFECÇÃO POR
Leishmania spp.**

KERCIA PINHEIRO CRUZ

Salvador – Bahia

2018

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO GONÇALO MONIZ

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA PROTEÍNA TRANSLOCADORA (TSPO)
NA INFECÇÃO POR *Leishmania* spp.**

KERCIA PINHEIRO CRUZ

Orientadora: Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras

Co-Orientadora: Dra. Juliana Perrone Bezerra De Menezes Fullam

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para obtenção do grau de Mestre.

Salvador - Bahia

2018

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

C957a Cruz, Kercia Pinheiro
Avaliação do papel da proteína translocadora (TSPO) na infecção por
Leishmania spp. / Kercia Pinheiro Cruz. - 2018.
81 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras, [Laboratório de
Interação Parasito-Hospedeiro e Epidemiologia](#)

Dissertação (Mestrado de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa)
Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2018.

1. TSPO. 2. *Leishmania*. 3. Macrófago. 4. Infecção. I. Título.

CDU 616.993.161

" AVALIAÇÃO DO PAPEL DA PROTEÍNA TRANSLOCADORA (TSPO) NA INFECÇÃO POR
LEISHMANIA SPP."

KERCIA PINHEIRO CRUZ

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

Valeria de Matos Borgés

Dra. Valeria de Matos Borgés
Pesquisadora
FIOCRUZ

Fábio Rocha Formiga

Dr. Fábio Rocha Formiga
Pesquisador
FIOCRUZ

Theolis Costa Barbosa Bessa

Dra. Theolis Barbosa Bessa
Pesquisadora
FIOCRUZ

Aos meus pais, Vera e Ednalvo, pelo amor incondicional, apoio,
companheirismo e por me incentivar a ir cada vez
mais longe. Eu amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

À todas as forças da natureza que me guiam, me protegem e permitem que eu trilhe o bom caminho;

Ao Instituto Gonçalo Moniz (FIOCRUZ), ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento da pesquisa, pela oportunidade do desenvolvimento deste trabalho e pela estrutura oferecida;

À Dra. Patrícia Veras, minha orientadora, pela oportunidade de trabalhar na equipe e por todos os ensinamentos científicos partilhados, contribuindo para a formação da profissional que eu sou hoje;

À Dra. Juliana Perrone, minha co-orientadora, pela paciência e suporte oferecido, e por me acompanhar de perto neste trabalho, estando sempre disponível para ajudar e discutir resultados;

À Beatriz Dias, pela amizade, pela parceria diária desde a iniciação científica e pela contribuição indispensável no desenvolvimento deste trabalho;

Ao Dr. Carlos Eduardo Guedes, pela disponibilidade em ajudar neste trabalho, mesmo que à distância, por ter acreditado no meu potencial desde a iniciação científica, pela amizade e por todos os ensinamentos pessoais e profissionais partilhados;

À todas as gerações da eterna família LPBI, dos estudantes de iniciação científica aos pós-doutorandos que passaram pelo laboratório, pela amizade, apoio, contribuição com o conhecimento e momentos de descontração, tornando essa rotina mais leve e feliz a cada dia;

Às amigas que fiz desde o início do mestrado: Jéssica Mirella, Rosidete Bastos, Fernanda Regis, Débora Leal, Helena Leal, Ana Rafaela Moura, Roberta Mota e Letícia Simões, com quem eu pude compartilhar experiências, frustrações e felicidades. Juntas somos mais fortes!

À toda a equipe da microscopia e citometria, em especial à Marcio Santos e Arlene Lessa pela relação de amizade, além da profissional, e por ajudar sempre tão prestativamente;

À Biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Anna, do Instituto Gonçalo Moniz, pelo acervo e estrutura disponibilizados e à Ana Maria Fiscina, pela correção do manuscrito;

À minha mãe, Vera, pelo amor incomparável, amizade, companheirismo, dedicação, e por ouvir meus desabafos, estresses e preocupações diariamente, sendo o meu porto seguro sempre que eu preciso;

Ao meu pai, Ednalvo, pelo amor e dedicação, por se fazer tão presente, ainda com a distância, e por sempre se sacrificar tanto para que eu consiga atingir meus objetivos e queira ir cada vez mais longe;

Ao meu namorado, Rafael, pelo apoio e companheirismo, e por sempre me reabastecer de energia e coragem nos momentos mais preocupantes, não me deixando desanimar;

À minha família e aos meus amigos, por acompanhar e compartilhar esse turbilhão de emoções e surpresas que a vida nos reserva, pelos momentos de descontração e descanso e por entender a minha ausência e atrasos em alguns encontros.

CRUZ, Kercia Pinheiro. Avaliação do papel da Proteína Translocadora (TSPO) na infecção por *Leishmania* spp. 81 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Estudos anteriores realizados em nosso laboratório demonstraram que macrófagos de camundongos CBA controlam a infecção por *L. major*, mas são permissivos à infecção por *L. amazonensis*. Utilizando uma abordagem proteômica, foram identificadas proteínas diferentemente expressas por esses macrófagos frente à infecção por essas espécies de *Leishmania*, entre elas a Proteína Translocadora (TSPO), positivamente modulada em macrófagos infectados por *L. major* em comparação aos infectados por *L. amazonensis*. A TSPO encontra-se localizada, principalmente, na membrana mitocondrial externa e participa de diversas funções como o transporte de colesterol, proliferação celular, apoptose e resposta imune. **OBJETIVO:** O presente estudo objetivou avaliar a participação da TSPO sobre o curso da infecção de macrófagos derivados de medula óssea (BMMΦ) por *L. amazonensis* ou *L. major*. A nossa hipótese foi que a TSPO está associada ao controle da infecção BMMΦ por *L. major*. **MATERIAL E MÉTODO:** Inicialmente, realizamos a validação da expressão da TSPO por *western blot*. Posteriormente, após promover o silenciamento ou superexpressão da TSPO em BMMΦ, investigamos o papel desta proteína no curso da infecção por *Leishmania* analisando, em diferentes tempos, o percentual de infecção, a carga parasitária e a viabilidade intracelular. **RESULTADOS:** Por meio da validação por *western blot*, confirmamos os dados da proteômica, que há aumento em 49% da expressão da TSPO em BMMΦ infectados por *L. major* em comparação com a infecção por *L. amazonensis* (Teste *t* de Student, **p* < 0,05). Quando comparadas com as células BMMΦ-controle, BMMΦ-TSPOdown apresentaram um aumento não significativo de 11% no percentual de infecção por *L. amazonensis* nos tempos de 12h de infecção e de 12h seguidas de adicionais 48h de incubação, e de 20% e 17% na infecção por *L. major* nos tempos de 12h de infecção e de 12h de infecção seguidas de adicionais 48h de incubação, respectivamente. As células BMMΦ-TSPO apresentaram uma diminuição não significativa de 11% e 22% no percentual de infecção por *L. amazonensis* após 6h de infecção e 12h de infecção seguida de adicionais 48h de incubação, respectivamente, e de 15% quando infectadas por *L. major* após 12h de infecção seguidas de 24h de incubação, quando comparadas com as células BMMΦ-Vazio. Adicionalmente, demonstramos que a superexpressão da TSPO em BMMΦ levou à diminuição de cerca de 63% na viabilidade intracelular de *L. major*, mas não causou efeito sobre a viabilidade de *L. amazonensis*. **CONCLUSÃO:** Em conjunto, nossos dados indicam que a TSPO tem efeitos distintos no curso da infecção de BMMΦ por essas espécies de *Leishmania*, pois o aumento da expressão da TSPO tem efeito negativo na sobrevivência intracelular de *L. major* mas não afeta a sobrevivência de *L. amazonensis*. Estudos adicionais serão realizados para avaliar a produção de citocinas pró-inflamatórias e moléculas leishmanicidas nas células com expressão modulada da TSPO e infectadas por *L. amazonensis* ou *L. major*, objetivando investigar a relação da produção dessas moléculas e o papel da TSPO no curso da infecção.

Palavras-chave: TSPO, *Leishmania*, macrófago, BMMΦ, infecção.

CRUZ, Kercia Pinheiro. Evaluation of the role of Translocator Protein (TSPO) in *Leishmania* infection. 81 f. il. Dissertation (Master in Biotechnology in Health and Investigative Medicine). Oswaldo Cruz Foundation, Institute Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Previous studies performed in our laboratory showed that CBA mouse macrophages control *L. major* infection but are permissive to *L. amazonensis* infection. Using a proteomic analysis, we identified differentiated expression of some proteins by these macrophages in response to these species infection, including Translocator Protein (TSPO), positively modulated in macrophages infected with *L. major* compared to those infected by *L. amazonensis*. TSPO is mainly located in the outer mitochondrial membrane and participates in several functions such as the transport of cholesterol, cell proliferation, apoptosis and immune response. **OBJECTIVE:** In the present study, the objective was to evaluate the involvement of TSPO in the course of infection of macrophages derived from bone marrow (BMM Φ) by *L. amazonensis* or *L. major*. Our hypothesis was that TSPO is associated with the control of infection of BMM Φ by *L. major*. **MATERIAL AND METHOD:** Initially, we performed the validation of TSPO expression by western blot. Subsequently, promoting the silencing or overexpression of TSPO in BMM Φ , we evaluated the role of this protein in the course of *Leishmania* infection by analysis of the percentage of infected macrophages, parasite load and intracellular parasite viability. **RESULTS:** Western blot validation confirmed the proteomic study, that there is an increased 49% of TSPO expression in *L. major*-infected BMM Φ s compared to *L. amazonensis* infection (Student's *t*-test, $p < 0.05$). When compared to BMM Φ -control cells, BMM Φ -TSPOdown showed a non-significant increase of 11% in the percentage of infection by *L. amazonensis* at 12h infection times and 12h followed by additional 48h incubation, and 20% and 17% in *L. major* infection at times of 12h infection and 12h infection followed by an additional 48h of incubation, respectively. BMM Φ -TSPO cells showed a non-significant decrease of 11% and 22% in the percentage of *L. amazonensis* infection after 6h of infection and 12h of infection followed by an additional 48h of incubation, respectively, and of 15% when infected by *L. major* after 12h of infection followed by 24h of incubation, when compared with BMM Φ -Empty cells. In addition, we demonstrated that the overexpression of TSPO in BMM Φ caused an expressive decrease of about 63% in the intracellular viability of *L. major*, but did not have effect on the viability of *L. amazonensis*. **CONCLUSION:** Taken together, our data indicate that TSPO has distinct effects on the course of BMM Φ infection by these two species of *Leishmania*, since increased TSPO expression has a negative effect on the intracellular survival of *L. major* but not on the survival of *L. amazonensis*. Additional studies will be performed to evaluate the production of proinflammatory cytokines and leishmanicidal molecules in cells with modulated expression of TSPO and infected by *L. amazonensis* or *L. major*, in order to investigate the relation of the production of these molecules and the role of TSPO in the course of infection.

Keywords: TSPO, *Leishmania*, macrophage, BMM Φ , infection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Diagrama esquemático do ciclo de vida da <i>Leishmania</i> | 19 |
| Figura 2 – Estrutura tridimensional da TSPO e sua localização mitocondrial | 29 |
| Figura 3 – Validação da expressão da TSPO em BMM Φ | 48 |
| Figura 4 – <i>Western blot</i> da expressão da TSPO em BMM Φ | 49 |
| Figura 5 – Expressão da TSPO em BMM Φ infectados por <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i> | 50 |
| Figura 6 – Silenciamento da TSPO em BMM Φ | 52 |
| Figura 7 – Quantificação da expressão de mRNA da TSPO em células BMM Φ silenciadas | 53 |
| Figura 8 – Efeito do silenciamento da TSPO sobre o curso da infecção de BMM Φ por <i>Leishmania</i> spp. | 55 |
| Figura 9 – Superexpressão da TSPO em BMM Φ | 57 |
| Figura 10 – Quantificação da superexpressão da TSPO em BMM Φ | 59 |
| Figura 11 – Efeito da superexpressão da TSPO sobre o curso da infecção de BMM Φ por <i>Leishmania</i> spp. | 61 |
| Figura 12 – Efeito da superexpressão da TSPO em BMM Φ sobre a viabilidade intracelular de <i>Leishmania</i> spp. | 62 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Nomenclatura das células submetidas à modulação gênica e os plasmídeos utilizados | 35 |
| Tabela 2: Cepas de <i>Leishmania</i> spp. utilizadas nos experimentos | 37 |
| Tabela 3: Sequências dos siRNA utilizados nos experimentos de silenciamento da TSPO | 41 |
| Tabela 4: Sequências dos primers utilizados nos experimentos de qPCR | 42 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------------------|---|
| ANT | Transportador de nucleotídeos adenina |
| B.O.D | Demanda Bioquímica de Oxigênio |
| BMMΦ | Macrófagos derivados de medula óssea |
| BMMΦ-controle | Macrófagos derivados de medula óssea transfectados com o siRNA_Control |
| BMMΦ-TSPO | Macrófagos derivados de medula óssea superexpressando a TSPO |
| BMMΦ-TSPOdown | Macrófagos derivados de medula óssea com expressão da TSPO diminuída |
| BMMΦ-Vazio | Macrófagos derivados de medula óssea transfectados com o plasmídeo pcDNA6.2 |
| C6 | Célula de linhagem de glioma de rato |
| CEUA | Comitê de Ética no Uso de Animais |
| CO ₂ | Gás carbônico |
| DAPI | Marcador fluorescente que se liga à molécula de DNA (4',6 – diamidino diamidino-2- fenil-indol) |
| DMEM | Meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco |
| EDTA | <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i> |
| GM-CSF | Fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrogênio |
| HEPES | Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanossulfônico |
| HIV | Vírus da imunodeficiência humana |
| HSP90 | Proteína de choque térmico 90 |
| HT-29 | Células de linhagem de carcinoma humano |
| IBP | Proteína ligante de isoquinolina |
| IFN-γ | Interferon-gama |
| IL | Interleucina |
| L929 | Célula de linhagem fibroblástica |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| MA-10 | Célula de linhagem derivadas das células de Leydig |
| MCP-1 | Quimiocina atratora de macrófagos |
| MDA-MB-231 | Linhagem celular de câncer de mama agressivo |
| MPTP | Poros de transição e permeabilidade mitocondrial |
| NH ₄ Cl | Cloreto de amônio |
| NO | Óxido nítrico |

| | |
|-----------------------------|---|
| O ₂ ⁻ | Íon superóxido |
| OMS | Organização mundial da Saúde |
| Opti-MEM | Meio DMEM modificado |
| PBR | Receptor Benzodiazepínico Periférico |
| PBS | Tampão Fosfato Salina |
| PBST | Tampão fosfato salina com Tween 20 |
| pcDNA6.2 | Plasmídeo controle da transfecção |
| pcDNA6.2-TSPO | Plasmídeo de transfecção que contém a sequência codificante para a TSPO |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| PK 11195 | Ligante da TSPO |
| qPCR | PCR em tempo real (quantitativa) |
| RIPA | Tampão de lise celular |
| Ro5-4864 | Ligante da TSPO |
| RPMI 1640 | Meio de cultura celular do Roswell Park Memorial Institute |
| SBF | Soro Bovino Fetal |
| SDS-PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio |
| siRNA | RNA de interferência |
| siRNA_Controle | RNA de interferência utilizado como controle |
| siRNA_TSPO | RNA de interferência da sequência de mRNA da TSPO |
| TGF-β | Fator de transformação do crescimento beta |
| Th | Células T auxiliaadoras |
| THP-1 | Linhagem celular de monócito humano |
| TNF | Fator de necrose tumoral |
| TSPO | Proteína Translocadora |
| VDAC | Canal aniônico dependente de voltagem |

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|---|----|
| 1. | INTRODUÇÃO / JUSTIFICATIVA | 14 |
| 2. | REVISÃO DE LITERATURA | 18 |
| 2.1 | LEISHMANIOSE | 18 |
| 2.2 | INTERAÇÃO <i>LEISHMANIA</i> X CÉLULA HOSPEDEIRA | 21 |
| 2.3 | TRATAMENTOS ATUAIS | 24 |
| 2.4 | MODELO CBA | 25 |
| 2.5 | A PROTEÍNA TRANSLOCADORA (TSPO) | 27 |
| 3. | HIPÓTESE | 33 |
| 4. | OBJETIVOS | 34 |
| 4.1 | GERAL | 34 |
| 4.2 | ESPECÍFICOS | 34 |
| 5. | MATERIAL E MÉTODOS | 35 |
| 5.1 | PLASMÍDEOS OU SIRNA UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA TSPO | 35 |
| 5.2 | CULTURA DE CÉLULAS L929 E COLETA DE SOBRENADANTE ENRIQUECIDO COM GM-CSF | 35 |
| 5.3 | OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA (BMM Φ) | 36 |
| 5.4 | CULTURA DE <i>LEISHMANIA</i> SPP. | 37 |
| 5.5 | VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DA TSPO EM BMM Φ | 38 |
| 5.6 | <i>WESTERN BLOT</i> DE BMM Φ INFECTADOS POR <i>LEISHMANIA</i> SPP. | 39 |
| 5.7 | ANÁLISE DAS IMAGENS | 39 |
| 5.8 | SILENCIAMENTO DA TSPO EM BMM Φ | 40 |
| 5.9 | PCR EM TEMPO REAL (QPCR) DAS CÉLULAS BMM Φ -CONTROLE E BMM Φ -TSPODOWN | 41 |
| 5.10 | TRANSFEÇÃO DE BMM Φ COM OS PLASMÍDEOS PCDNA6.2 OU PCDNA6.2-TSPO | 42 |
| 5.11 | IMUNOMARCAÇÃO DAS CÉLULAS BMM Φ -TSPO E BMM Φ - VAZIO | 43 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 5.12 | ANÁLISE DAS IMAGENS | 44 |
| 5.13 | INFECÇÃO DE BMMΦ COM EXPRESSÃO MODULADA DA TSPO POR <i>LEISHMANIA</i> SPP. | 45 |
| 5.14 | VIABILIDADE INTRACELULAR DE <i>LEISHMANIA</i> SPP. EM BMMΦ | 46 |
| 5.15 | ANÁLISE DOS DADOS | 47 |
| 6. | RESULTADOS | 48 |
| 6.1 | VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DA TSPO EM BMMΦ | 48 |
| 6.2 | SILENCIAMENTO DA TSPO EM BMMΦ | 51 |
| 6.3 | EFEITO DO SILENCIAMENTO DA TSPO SOBRE O CURSO DA INFECÇÃO DE BMMΦ INFECTADOS POR <i>L. AMAZONENSIS</i> OU <i>L.</i> <i>MAJOR</i> | 54 |
| 6.4 | SUPEREXPRESSÃO DE TSPO EM BMMΦ | 56 |
| 6.5 | EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DA TSPO SOBRE O CURSO DA INFECÇÃO DE BMMΦ POR <i>L. AMAZONENSIS</i> OU <i>L. MAJOR</i> | 60 |
| 6.6 | EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DA TSPO SOBRE A VIABILIDADE INTRACELULAR DE <i>LEISHMANIA</i> spp. | 62 |
| 7. | DISCUSSÃO | 64 |
| 8. | CONCLUSÃO | 70 |
| 9. | PERSPECTIVAS | 71 |
| 10. | REFERÊNCIAS | 72 |

1. INTRODUÇÃO / JUSTIFICATIVA

A leishmaniose é considerada uma doença tropical negligenciada, que atinge cerca de 12 milhões de pessoas ao redor do mundo e está distribuída em 98 países, acometendo principalmente países da África, Ásia e América. Além disso, estima-se que haja cerca de 350 milhões de pessoas em situação de risco. Nesse contexto, o Brasil recebe destaque devido ao crescente número de casos ao longo dos anos, sendo um dos seis países que concentram mais de 90% dos casos (AKHOUNDI et al., 2016; WHO, 2017). O número de casos notificados da leishmaniose tegumentar no Brasil vem aumentando desde a década de 80, sendo a região Norte a que concentrou maior quantidade de notificação dos casos em 2014 (BRASIL, 2017).

As leishmanioses são causadas por tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*, sendo que as espécies *L. major*, *L. tropica*, *L. donovani* e *L. infantum* (syn *chagasi*) ocorrem no velho mundo e *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* ocorrem no novo mundo (VAN ASSCHE et al., 2011). A infecção ocorre quando fêmeas de flebotomíneos infectadas realizam o repasto sanguíneo em hospedeiros vertebrados e regurgitam formas promastigotas infectivas do parasito. Esses parasitos são então fagocitados por células do sistema imune, como células dendríticas, neutrófilos e macrófagos, sendo estes últimos as principais células hospedeiras. Dentro dos macrófagos, a *Leishmania* na forma promastigota se transforma na forma amastigota e se replica no ambiente ácido dos vacúolos parasitóforos, podendo romper estas células e infectar novas. Quando novas fêmeas de flebotomíneos realizam repasto sanguíneo em hospedeiros vertebrados infectados, formas amastigotas desse parasito são ingeridas e se transformam novamente em formas promastigotas no intestino do inseto vetor, dando continuidade ao ciclo (KAYE; SCOTT, 2011; VAN ASSCHE et al., 2011; SINGH; KUMAR; SINGH, 2012; VERAS; DE MENEZES, 2016).

A resposta imune à infecção por *Leishmania* spp. depende tanto da espécie do parasito quanto do *background* genético do hospedeiro vertebrado, que apresenta respostas variadas à infecção, com produção de citocinas por células T *helper* (RODRIGUES et al., 2016). Na década de 80, foi observado que camundongos BALB/c são susceptíveis à infecção por *L. major*, apresentando

uma resposta marcada pela inativação dos macrófagos por citocinas como IL-4, IL-10 e TGF- β . (MOSMANN; COFFMAN, 1989; AGUILAR-TORRENTERA; CARLIER, 2001). Por outro lado, camundongos C57BL/6 infectados por essa mesma espécie de *Leishmania* ativam células T que secretam citocinas, como IFN- γ e TNF, que podem ativar os macrófagos de maneira a produzir moléculas com poder leishmanicida, a exemplo do óxido nítrico (NO) (LIEW; WEI; PROUDFOOT, 1997). Entretanto, hoje sabe-se que a resposta imunológica não é polarizada e que este modelo se trata mais de um paradoxo do que um paradigma. Afonso e Scott (1993) demonstraram que a susceptibilidade de camundongos C57BL/10 à infecção por *L. amazonensis* é devida a uma fraca resposta do tipo Th1 e não exclusivamente pela presença da resposta do tipo Th2. Ademais, além das células Th1 e Th2, foi demonstrado que células Th regulatórias (Treg) são capazes de modular a resposta imunológica do hospedeiro a partir da produção de IL-10, que limita a resposta pró-inflamatória e estabelece um balanço na infecção, diminuindo o risco da ocorrência danos ao hospedeiro (SACKS; SHER, 2002; ALEXANDER; BRYSON, 2005; NYLEN; SACKS, 2007).

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório demonstraram que macrófagos de camundongos CBA respondem de maneira distinta quando são infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* (GOMES et al., 2003). Na infecção por *L. major*, estes macrófagos conseguem conter a proliferação do parasito, ao passo que permanecem permissivos à infecção por *L. amazonensis*. Esse dado sugere que, em contato com diferentes espécies de *Leishmania*, a célula hospedeira produz fatores específicos, que desempenham papéis importantes na determinação do curso da infecção (GOMES et al., 2003). Em busca de identificar estes fatores, Menezes e colaboradores (2013) utilizaram uma abordagem proteômica, que revelou a presença de 162 proteínas diferentemente expressas pelos macrófagos peritoneais inflamatórios em resposta à infecção por *L. amazonensis* ou *L. major*, dentre elas a Proteína Translocadora (TSPO, do inglês, *Translocator protein*), que apresentou maior número de peptídeos em macrófagos infectados por *L. major* em comparação àqueles infectados por *L. amazonensis*. Confirmando esse achado, em uma análise proteômica de macrófagos derivados de medula óssea (BMM Φ) infectados por cada uma dessas espécies de *Leishmania* também foi mostrado que na infecção por *L.*

major ocorre um aumento na expressão da TSPO (DE MENEZES, 2018 – dados não publicados).

A TSPO, anteriormente conhecida como Receptor Benzodiazepínico Periférico (PBR), é uma proteína constitutiva e altamente conservada evolutivamente, tendo sido identificada em quase todo o reino animal (PAPADOPOULOS et al., 2006; VEENMAN, 2007). Ela encontra-se localizada, principalmente, na membrana mitocondrial externa e tem como principal função, da qual o seu nome é derivado, o transporte de colesterol para a membrana mitocondrial interna, onde ocorre a síntese de esteroides. Além de exercer sua principal função, a TSPO também participa de outras funções celulares, a exemplo da permeabilidade mitocondrial, proliferação celular, apoptose e resposta imune (VEENMAN, 2007; RUPPRECHT et al., 2010). Em razão de ser conhecida por participar da modulação da resposta imune reduzindo o nível da produção de citocinas como IL-1 β , IL-17 e IFN em diferentes modelos de doenças, e no controle de infecções por parasitos, TSPO foi escolhida como objeto deste estudo.

Dzierszynski e colaboradores (2002) demonstraram que a modulação da TSPO pelo ligante fluorazepam foi capaz de inibir o crescimento intracelular de *Toxoplasma gondii*. Além disso, foi demonstrado que este mesmo ligante e também o PK 11195 levam à diminuição da taxa de crescimento de *Plasmodium falciparum*. Adicionalmente, Bouyer e colaboradores (2011) observaram os mesmos resultados no crescimento de *P. falciparum* utilizando os ligantes da TSPO PK 11195 e Ro5-4864. Ademais, a TSPO participa da modulação da produção de citocinas em diversos modelos de doenças, como em encefalomielite autoimune experimental, onde foi demonstrada a diminuição da produção de IL-1 β , IL-17 e IFN (DAUGHERTY et al., 2013) e doenças do sistema nervoso, como Alzheimer, esclerose múltipla e depressão, onde ocorre a diminuição da produção de IL-1 β e IL-18 (LEE et al., 2016).

Além disso, a modulação da TSPO pelo ligante antagonista etifoxina foi capaz de alterar a resposta imunoinflamatória em um modelo de encefalomielite (DAUGHERTY et al., 2013). O tratamento de encefalomielite autoimune experimental com este ligante específico da TSPO promoveu a diminuição dos sintomas clínicos após a alteração do tipo de resposta imunoinflamatória, em razão da diminuição da produção das citocinas IL-1, IFN- γ e IL-17 quando

comparado ao grupo tratado apenas com o diluente, atenuando a gravidade da doença. Mukbel e colaboradores (2007) demonstraram que a morte de amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* requer a atividade de NO e O₂⁻. Guedes e colaboradores (2018) demonstraram que o tratamento de macrófagos de camundongos CBA infectados por *L. amazonensis* com o ligante da TSPO, PK11195, ocasionou um aumento de aproximadamente 30% na produção de O₂⁻ intracelular em comparação com o grupo não tratado, mas não causou alteração na produção de NO entre os dois grupos.

Hipotetizamos que a maior abundância de TSPO em macrófagos de CBA infectados por *L. major*, em comparação aqueles infectados por *L. amazonensis*, estaria associada aos mecanismos de controle da infecção por *Leishmania*, por meio do aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e de moléculas leishmanicidas. Em contrapartida, em macrófagos infectados por *L. amazonensis*, que observamos menor abundância de peptídeos da TSPO, não haveria a produção ou haveria menor produção desta molécula, contribuindo para maior sobrevivência deste parasito e persistência dessa infecção.

Dessa forma, o nosso estudo se apresenta como inovador, sendo o primeiro a avaliar o papel da TSPO na resposta à infecção por *Leishmania*, promovendo a modulação da expressão dessa proteína nas células hospedeiras. Conhecer alvos moleculares no hospedeiro que podem ser modulados é importante para o melhor entendimento do estabelecimento da infecção e para estudos sobre possíveis tratamentos que atuem na modulação da molécula alvo em estudo. Apesar de existir diversos trabalhos na literatura que correlacionam o papel da TSPO na modulação da resposta inflamatória em diferentes modelos de doenças e no controle da infecção contra algumas espécies de parasitos, não existe na literatura trabalhos que avaliem o papel da TSPO na infecção por *Leishmania*. Assim, no presente estudo avaliamos o papel desempenhado pela TSPO no controle da infecção por *Leishmania* por meio da modulação gênica desta proteína em BMMΦ. Após a modulação positiva ou negativa da TSPO, nós infectamos estes macrófagos por *L. amazonensis* ou *L. major* e avaliamos carga parasitária, percentual de infecção e viabilidade intracelular.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEISHMANIOSE

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada que está distribuída em 98 países ao redor do mundo, atingindo, principalmente, Ásia, África e as Américas, onde o Brasil destaca-se por apresentar um número crescente de casos (VAN ASSCHE et al., 2011; DE MENEZES, 2016; WHO, 2017). Segundo a Organização Mundial de Saúde (2017), as leishmanioses têm uma incidência anual de 700 mil a 1 milhão de novos casos, podendo levar à morte entre 20 e 30 mil pessoas anualmente. Além disso, estima-se que haja cerca de 350 milhões de pessoas em situação de risco no mundo, sendo que mais de 90% dos casos estão concentrados em seis dos 98 países acometidos pela doença, incluindo o Brasil (AKHOUNDI et al., 2016; WHO, 2017). Dados do Ministério da Saúde (2017) mostram que, no Brasil, as regiões Norte e Nordeste concentram 75% dos casos de leishmaniose tegumentar (LT), sendo crescente no país inteiro o número de casos notificados desde 1980, com uma incidência média anual de 25.763 novos casos entre 1995 e 2014. Dentre os estados do Nordeste, a Bahia concentra o segundo maior número de casos de LT, tendo registrado quase dois mil novos casos da doença apenas no ano de 2014 (BRASIL, 2017). Em conjunto, esses dados colocam a leishmaniose no Brasil como um grave problema de saúde pública.

As leishmanioses são causadas por parasitos tripanossomatídeos do gênero *Leishmania* com 53 espécies descritas até o momento, das quais 31 são conhecidas por infectar mamíferos e destas, 20 espécies infectam seres humanos (AKHOUNDI et al., 2016). As principais espécies de *Leishmania* causadoras de doença são a *L. major*, *L. tropica*, *L. donovani* e *L. infantum* no velho mundo e *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* no novo mundo (VAN ASSCHE et al., 2011). Estes parasitos possuem duas formas heteroxênicas no seu ciclo de vida, passando por dois hospedeiros: um hospedeiro invertebrado hematófago e um hospedeiro vertebrado mamífero, como roedores, marsupiais, canídeos e seres humanos (KAYE; SCOTT, 2011; VAN ASSCHE et al., 2011; AKHOUNDI et al., 2016).

O ciclo de vida (Figura 1) se inicia quando fêmeas de flebotomíneos infectadas, ao realizar o repasto sanguíneo, inoculam formas promastigotas flageladas de *Leishmania* na derme dos hospedeiros vertebrados. Neste hospedeiro, esses parasitos são fagocitados por células dendríticas da pele, neutrófilos e, principalmente, macrófagos, que são as principais células hospedeiras. Após a internalização por macrófagos, as formas promastigotas residem em fagossomos que, após a fusão com lisossomos e endossomos, sofrem uma série de modificações moleculares e morfológicas nos chamados vacúolos parasitóforos e transformam-se na forma de amastigota. Esta forma é, na maioria das vezes, resistente à acidez dos vacúolos parasitóforos, onde conseguem se multiplicar, podendo vir a romper o macrófago e infectar outras células. O ciclo continua quando uma nova fêmea de flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado e ingere formas amastigotas desses parasitos. Dentro do aparelho digestório do inseto vetor, as formas amastigotas sofrem modificações, transformando-se novamente em promastigotas, que migram para a porção mais anterior do trato digestório do vetor flebotomíneo e podem ser transmitidas para outro hospedeiro vertebrado em um próximo repasto sanguíneo (KAYE; SCOTT, 2011; VAN ASSCHE et al., 2011; SINGH; KUMAR; SINGH, 2012; VERAS; DE MENEZES, 2016).

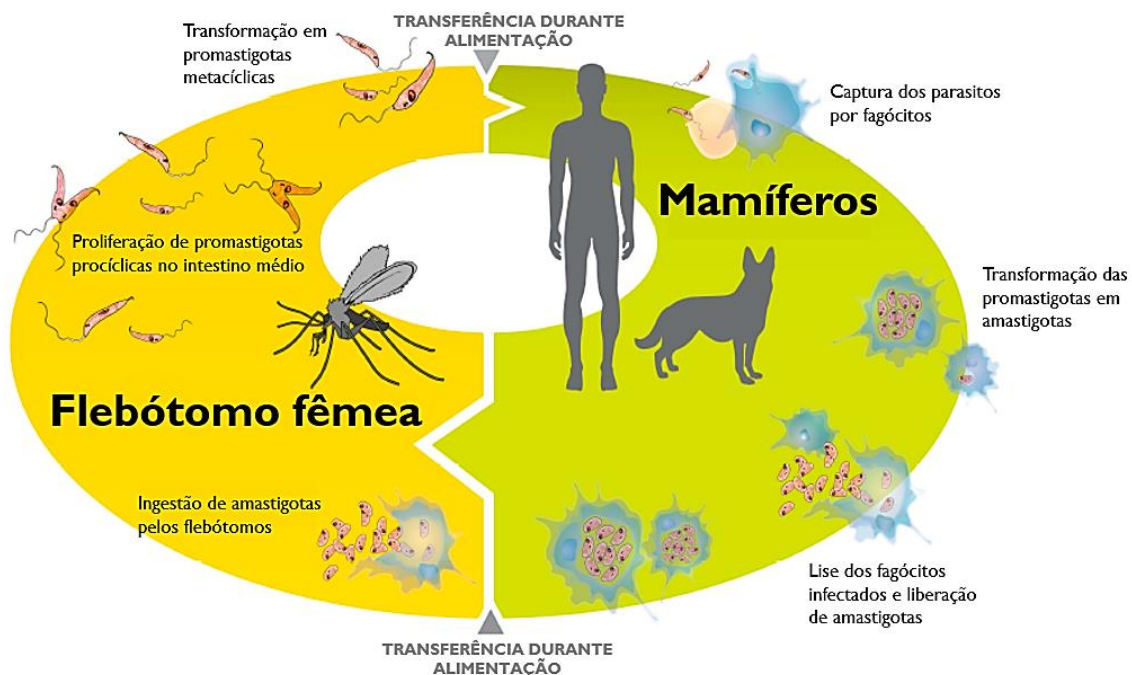


Figura 1 - Diagrama esquemático do ciclo de vida da *Leishmania* (Adaptado de VERAS & DE MENEZES, 2016).

Atualmente, são documentadas 30 espécies de insetos flebotomíneos capazes de transmitir os parasitos do gênero *Leishmania* aos hospedeiros vertebrados (KUMAR; ENGWERDA, 2014; SRIVASTAVA et al., 2016). Apenas as fêmeas destes insetos são hematófagas, cujo desenvolvimento dos óvulos depende do sangue que é obtido durante o repasto sanguíneo. Esses insetos são considerados os agentes transmissores da doença, pois ao realizar o repasto sanguíneo transmitem ou infectam-se por *Leishmania* (WHO, 2016). Segundo a Organização Mundial da saúde (OMS, 2017), esses vetores têm ampla distribuição, dificultando seu controle. Após a fecundação, os ovos são depositados em tocas de roedores, cascas de árvores, rachaduras em paredes das casas, abrigos de animais e lixo doméstico, onde as larvas podem encontrar matéria orgânica em abundância, calor e umidade necessários para o seu crescimento e desenvolvimento (WHO, 2016). Os flebotomíneos são encontrados ao redor do mundo nas regiões intertropicais e temperadas e possuem hábito noturno de alimentação, geralmente à noite. O processo de ocupação desordenada nas periferias, as precárias condições de saneamento, entre outras mudanças ambientais causadas pela urbanização, interferem na ecologia e no comportamento dos vetores flebotomíneos, causando o aumento do número de espécimes na região dos peridomicílios e, conseqüentemente, o aumento da transmissão das leishmanioses nas grandes cidades (BRADLEY; ALTIZER, 2007; CASARIL et al., 2014).

As formas clínicas da doença são cutânea, mucocutânea ou visceral. A forma cutânea é a forma mais comum, leva ao aparecimento de lesões na pele de forma localizada ou espalhadas pelo corpo (leishmaniose cutânea difusa) e geralmente não é fatal. No novo mundo, esta forma clínica é causada principalmente pelas espécies *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* e no velho mundo pode ser causada pela *L. major* e *L. tropica*. Já a forma mucocutânea da doença é caracterizada pelo aparecimento de lesões nas mucosas devido à ocorrência de metástase a partir das lesões da pele para tecidos da mucosa via disseminação linfática ou hematogênica, acometendo, principalmente, as vias aéreas como boca e nariz. Esta forma clínica é encontrada quando os hospedeiros são infectados por parasitos das espécies *L. braziliensis*, *L. panamensis* ou *L. guyanensis*. Já a forma visceral da doença é caracterizada pelo alto parasitismo em órgãos internos, como baço, fígado e

medula óssea, levando à perda de peso, febre e anemia. Esse quadro clínico ocorre quando o hospedeiro é infectado pelas espécies *L. donovani* e *L. infantum* no velho mundo ou por *L. infantum* no Novo Mundo, que pode se desenvolver forma sistêmica, fatal em até 95% dos casos sem tratamento (KAYE; SCOTT, 2011; VAN ASSCHE et al., 2011; KUMAR; ENGWERDA, 2014; AKHOUNDI et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2016; WHO, 2016).

Dentre os principais fatores de risco que contribuem para a infecção por *Leishmania* destacam-se: pobreza, desnutrição, mudanças ambientais e alterações climáticas - todos envolvidos na baixa de imunidade das populações ou na adaptação do vetor a novos ambientes urbanos (WHO, 2016). Além disso, os relatos de co-infecção de leishmaniose e HIV têm sido cada vez mais frequentes, causando preocupação na população e no meio científico, sendo um dos fatores que contribuem para a busca de melhores tratamentos e vacinas, já que os fatores de risco das duas doenças são bastante similares e essas doenças coexistem em muitas regiões. A imunossupressão causada pelo vírus HIV leva o hospedeiro a desenvolver uma resposta imunológica ineficiente contra o parasita, não conseguindo assim controlar a infecção e intensificando os sintomas clássicos como febre e anemia (ZIJLSTRA, 2014).

2.2 INTERAÇÃO *LEISHMANIA* X CÉLULA HOSPEDEIRA

As diferentes formas clínicas da leishmaniose variam de acordo com a espécie do parasito e com o sistema imune do hospedeiro, podendo um mesmo organismo causar diferentes espectros da doença, variando de manifestação subclínica até lesões auto curáveis ou a forma crônica disseminada da doença. Essa relação é determinante no estabelecimento da infecção, sobrevivência e persistência do parasito dentro das células hospedeiras (KAYE e SCOTT, 2011; DE MENEZES et al., 2016). Após a inoculação das formas promastigotas de *Leishmania* na derme do hospedeiro vertebrado, esses parasitos são internalizados por fagócitos profissionais do sistema imune que exercem diferentes papéis durante a infecção, como os neutrófilos, células dendríticas e macrófagos (KAYE e SCOTT, 2011; LIU e UZONNA, 2012; DUQUE e

DESCOTEAUX, 2015). Os neutrófilos são considerados as principais células hospedeiras iniciais na infecção por *Leishmania*. Estas fagocitam promastigotas rapidamente após a inoculação pelos flebótomos, podendo funcionar como “Cavalo de Tróia” na infecção por *L. major in vitro*, uma vez que sofrem apoptose e são fagocitados posteriormente pelos macrófagos, permitindo a entrada destes parasitos nestas células sem ativar a sua defesa antimicrobiana inata (LASKAY et al., 2003; PETERS et al., 2008, DE MENEZES et al., 2016). As células dendríticas podem contribuir para a manutenção da infecção, uma vez que são permissivas à infecção e induzem o recrutamento de monócitos, ou podem atuar como células apresentadoras de antígenos, liberando também a citocina próinflamatória IL-12 (DE TREZ et al., 2009). Entretanto, apesar de os parasitos de *Leishmania* infectarem diferentes células, os macrófagos são as principais células hospedeiras destes parasitos. Nos macrófagos, a *Leishmania* se diferencia para forma amastigota, podendo sobreviver a longo prazo, escapar do sistema imune do hospedeiro, obter nutrientes e se replicar. (KAYE e SCOTT, 2011; DUQUE e DESCOTEAUX, 2015; DE MENEZES et al., 2016).

Os macrófagos podem adquirir formas promastigotas de *Leishmania* a partir da fagocitose de neutrófilos infectados em processo de apoptose ou ativamente, fagocitando formas livres do parasito (LASKAY et al., 2003; DE MENEZES et al., 2016). A membrana formadora das protrusões dos macrófagos que originarão os fagossomos durante a fagocitose das formas promastigotas de *Leishmania* pode ser originada dos endossomos, lisossomos e retículo endoplasmático, contribuindo assim para a formação do vacúolo parasitóforo que abrigará o parasito (GAGNON et al., 2002; VINET et al., 2009; FORESTIER et al., 2011; LIU e UZONNA, 2012). Após a fagocitose de *Leishmania* pelos macrófagos, os fagossomos contendo esses parasitas sofrem um processo chamado “maturação”, onde fundem-se com os lisossomos, fornecendo características ácidas a esse compartimento (KAYE e SCOTT, 2011; LIU e UZONNA, 2012). Parasitos do gênero *Leishmania* conseguem inibir este processo ou sobreviver neste ambiente ácido, podendo multiplicar-se e infectar novas células (KAYE e SCOTT, 2011).

Os macrófagos podem ser atraídos ao sítio de infecção através da percepção de quimioatratantes, como MCP-1, e neste local podem ser ativados pelos compostos microbianos presentes e/ou por citocinas como IFN- γ (DUQUE

e DESCOTEAUX, 2015). Dentro destas células, os parasitos de *Leishmania* conseguem sobreviver no vacúolo parasitóforo graças à alguns mecanismos utilizados para “driblar” a atividade antimicrobiana deste hospedeiro. Esses mecanismos incluem: (1) a degradação, pela protease da *Leishmania*, GP63, das proteínas que medeiam o tráfico de vesículas, interrompendo a apresentação cruzada de antígenos e a secreção de citocinas próinflamatórias em alguns modelos; (2) sinalização para produção de hepcidina, hormônio que impede o efluxo do ferro e bloqueio da ferroportina, aumentando a concentração de ferro intracelular que pode ser usado para sua sobrevivência; (3) metilação de regiões do genoma do hospedeiro cruciais para produção de moléculas antimicrobianas, desativando essas funções; entre outros (DUQUE & DESCOTEAUX, 2015).

Além dos mecanismos que a *Leishmania* utiliza para evasão do sistema imune, o perfil imunológico do hospedeiro interfere fortemente no perfil de resistência ou susceptibilidade à infecção. No geral, o perfil de ativação dos macrófagos pode ser dividido em dois grandes grupos: a ativação clássica, Th1, e a ativação alternativa, Th2 (LIU e UZONNA, 2012). A ativação clássica é mediada por citocinas próinflamatórias, como TNF, IL-1 e IFN- γ , e estimula a produção de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), essencial para a produção de uma importante molécula leishmanicida, o óxido nítrico (NO) (LIEW et al., 1990; LIU e UZONNA, 2012). A ativação alternativa é mediada por citocinas anti-inflamatórias que inibem o *boom* respiratório e favorecem a sobrevivência de algumas espécies de *Leishmania* dentro dos macrófagos, como IL-4, IL-13, TGF- β e IL-10, descrita como inibidora da ativação clássica (GORDON, 2003; LIU e UZONNA, 2012). O equilíbrio entre os dois tipos de ativação dos macrófagos leva ao controle da infecção e o desequilíbrio determina a taxa de sobrevivência dos parasitos dentro dos macrófagos (LIU e UZONNA, 2012; MENEZES et al., 2015). Assim, uma melhor compreensão da interação parasito vs célula hospedeira em modelos animais e/ou humanos pode fornecer dados para o desenvolvimento de vacinas amplamente aplicáveis, drogas para tratamento e intervenções imunoterapêuticas (KAYE e SCOTT, 2011; DUQUE e DESCOTEAUX, 2015; MENEZES et al., 2015).

2.3 TRATAMENTOS ATUAIS

Uma vez infectados, os hospedeiros vertebrados não conseguem obter uma cura parasitológica. As formas de controle da doença são, portanto, a erradicação do vetor flebotomíneos por meio de borrifação de inseticidas, a eliminação de reservatórios com a eutanásia dos cães soropositivos e o tratamento quimioterápico dos casos humanos (BRASIL, 2006).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2016) as leishmanioses são doenças tratáveis e curáveis. Uma das principais estratégias atuais para controle das leishmanioses é a quimioterapia. Entretanto, as quimioterapias em uso têm uma baixa eficácia em sua maioria, devido à via de administração ser, por muitas vezes, invasiva e/ou a ocorrência de efeitos secundários graves, podendo não eliminar completamente os parasitas nos indivíduos infectados, além de culminar no surgimento de insucessos terapêuticos e, em última instância, no surgimento de casos de resistência (DE MENEZES et al., 2015). Dentre os fatores que ocasionam a baixa aderência ao tratamento por parte dos pacientes estão: o atraso quanto à disponibilidade de medicamentos produzidos em pesquisas mais recentes, falta de registro nacional e/ou fornecimento descontínuo desses medicamentos em países que possuem um sistema de saúde precário, principalmente, em países mais pobres, como o leste da África e a América do Sul, onde relatam-se a ocorrência de frequentes epidemias, principalmente da forma visceral (WHO, 2016).

Após o diagnóstico parasitológico ou sorológico da leishmaniose, o tratamento indicado para cada paciente vai depender de muitos fatores, que incluem a forma clínica da doença, patologias concomitantes, localização geográfica do paciente e espécie do parasito causador da doença (WHO, 2016).

As drogas de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes, como Pentostam e Glucantime. Esses medicamentos, além de requererem tempo prolongado de utilização, que pode levar ao abandono do tratamento, causam diversos efeitos colaterais graves devido a sua acumulação nos tecidos, como dores abdominais, artralgia, cardiotoxicidade, pancreatite e nefrotoxicidade (PALUMBO, 2009; 2010; OLIVEIRA et al., 2011; DE MENEZES et al., 2015). Dentre as drogas alternativas que podem ser utilizadas no tratamento das leishmanioses, podemos citar a anfotericina B, a pentamidina, a paramomicina

e a miltefosina. Entretanto, assim como as drogas de primeira escolha, essas drogas alternativas também apresentam limitações como a via de administração, muitas vezes invasiva, e efeitos secundários graves. (PALUMBO, 2008; RYBNIKER et al., 2010; WORTMANN et al., 2010; ALAVI-NAINI; FAZAELI; O'DEMPSEY, 2012; DORLO et al., 2012; DE MENEZES et al., 2015).

Com base nesse panorama e a partir dos estudos que elucidam a interação parasita vs hospedeiro, observa-se a necessidade da busca por novos alvos no parasito ou na célula hospedeira, que possam ser modulados para, no futuro, direcionar estudos no desenvolvimento de novos fármacos (DE MENEZES et al., 2015).

2.4 MODELO CBA

Lemos de Souza e colaboradores (2000) demonstraram, em estudos anteriormente realizados em nosso laboratório, que camundongos CBA apresentam diferentes perfis de resposta imunológica e histopatológica quando infectados por *L. amazonensis* ou *L. major*. Os autores observaram que, quando infectados por *L. major*, esses camundongos conseguem controlar a infecção, ao passo que se mostram susceptíveis à infecção por *L. amazonensis*. Foi demonstrado que, na infecção *in vivo*, quando esses camundongos foram infectados por *L. amazonensis*, houve aumento progressivo da lesão na pata devido ao aumento da carga parasitária, além de padrões de necrose e ulceração, enquanto que, na infecção por *L. major*, o tamanho da lesão manteve-se praticamente constante ao longo de dez semanas. Além disso, os autores demonstraram que, na infecção por *L. major* foi observada uma alta produção de interferon-gama (IFN- γ), o que conferiu ao hospedeiro proteção contra infecção (tipo de resposta Th-1), ao passo que, na infecção por *L. amazonensis*, foi detectada altos níveis de citocinas que conferem um perfil de susceptibilidade à infecção, como a interleucina-4 (IL-4) e IL-10. Os autores sugeriram que nesse contexto, IL-10 provavelmente apresentou uma atividade ambígua já que essa citocina pode favorecer o tipo de resposta Th-2 em um contexto de susceptibilidade enquanto que, por outro lado, pode modular uma resposta do

tipo Th-1 em um modelo de resistência. Esses resultados utilizando camundongos CBA, uma linhagem isogênica, demonstraram o papel importante da espécie do parasito *Leishmania* em induzir o tipo de resposta imune celular que é desencadeada num hospedeiro com o mesmo *background* genético (LEMOS DE SOUZA et al., 2000).

Posteriormente, também em estudos realizados em nosso laboratório, Gomes e colaboradores (2003) demonstraram que os macrófagos de camundongo CBA foram capazes de controlar a infecção por *L. major*, mas não por *L. amazonensis*. O estudo mostrou que *L. major* ativa respostas celulares no hospedeiro que levam ao controle da infecção, enquanto *L. amazonensis* não ativa suficientemente tais fatores. Foi demonstrado que macrófagos infectados por *L. amazonensis* produziram metade da quantidade de H₂O₂ observada na infecção por *L. major*. Isso indica que, desde o primeiro contato do parasito com as células hospedeiras, essas células produzem diferentes fatores que tem papel crucial no curso da infecção.

Com o objetivo de identificar fatores que poderiam ter papel fundamental na diferença do curso da infecção de macrófagos de CBA por *L. amazonensis* ou por *L. major*, Menezes e colaboradores (2013) compararam a expressão proteica nos macrófagos peritoneais de CBA infectados por cada uma dessas espécies de *Leishmania*. Utilizando uma abordagem proteômica, peptídeos desses extratos foram caracterizados e identificados, sendo um total de 1352 proteínas identificadas como expressas em macrófagos infectados e não infectados. Destas proteínas, 162 estavam diferentemente expressas entre as duas infecções, sendo 40 proteínas preferencialmente expressas em macrófagos infectados por *L. amazonensis* e 122 naqueles infectados por *L. major*. Quinze destas proteínas mostraram grande diferença na expressão entre as duas infecções, sendo 4 com maior abundância em macrófagos infectados por *L. amazonensis* e 11 com menor abundância. Dentre as proteínas com maior abundância na infecção por *L. major* em comparação com *L. amazonensis*, foi identificado o receptor benzodiazepínico periférico (do inglês *Peripheral Benzodiazepine Receptor* - PBR), que, mais recentemente, passou a ser denominado de proteína translocadora (do inglês *translocator protein* - TSPO). Similarmente, na análise proteômica de BMMΦ de camundongos CBA, onde também se observa dicotomia na resposta à infecção por *L. amazonensis* ou *L.*

major, foi demonstrado que a TSPO está modulada positivamente na infecção por *L. major* em comparação com a infecção por *L. amazonensis*, o que reforça a ideia da sua participação no controle da infecção por *Leishmania*.

Como demonstrado por De Menezes (2010 – Tese de Doutorado), assim como os macrófagos peritoneais inflamatórios (GOMES et al., 2003), BMM Φ também respondem de maneira distinta à infecção por *L. amazonensis* ou *L. major*, sendo que, nestas últimas células, as diferenças em relação à expressão proteica já são detectáveis por análise proteômica após de 6h de infecção, enquanto que, nos macrófagos peritoneais inflamatórios, essa diferença é observada somente a partir de 12h de infecção. Neste mesmo trabalho foi demonstrado que, além de um tempo menor necessário para observar diferença na expressão proteica na infecção por essas espécies de *Leishmania*, foram identificadas duas vezes mais proteínas, em comparação com o estudo utilizando macrófagos peritoneais inflamatórios. Assim, no presente estudo, decidimos utilizar BMM Φ por apresentar vantagens em relação aos macrófagos peritoneais inflamatórios: o processo de obtenção dessas células é simples, o rendimento do número de células é maior, a cultura dessas células primárias de animais isogênicos é mais homogênea e não são pré-estimuladas, podem ser geneticamente moduladas com base em protocolos descritos na literatura (STACEY; SWEET; HUME, 1996; WEISCHENFELDT; PORSE, 2008; SCHUG et al., 2010; BALA et al., 2011).

2.5 A PROTEÍNA TRANSLOCADORA (TSPO)

A TSPO (Figura 2) foi descrita pela primeira vez em 1997, sendo anteriormente conhecida como receptor benzodiazepínico periférico (PBR) por apresentar grande afinidade a ligantes benzodiazepínicos no sistema nervoso periférico (PAPADOPOULOS et al., 2006; VEENMAN; PAPADOPOULOS; GAVISH, 2007; CAMPANELLA; TURKHEIMER, 2015; SELVARAJ; STOCCO, 2015). Esta proteína é amplamente utilizada como marcador de alvos terapêuticos para doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson, que podem ser monitoradas com ligantes em exames de imagem por contraste

(PAPADOPOULOS et al., 2006; RUPPRECHT et al., 2010; JAREMKO et al., 2015). Dentro das células, esta proteína desempenha três principais funções: (1) ligação ao colesterol e o seu transporte para dentro da mitocôndria para a síntese de esteroides e sais biliares, (2) importação de proteínas (contribuindo para a biossíntese da membrana) e (3) ligação e transporte da porfirina, que está envolvida na síntese de heme. Entretanto, esta proteína também participa de outras vias intracelulares, como: apoptose, proliferação celular, respiração celular, regulação da função mitocondrial e imunomodulação (PAPADOPOULOS et al., 2006; VEENMAN, 2007; RUPPRECHT et al., 2010). Devido às múltiplas funções descritas para o PBR após a sua descrição, essa proteína recebeu diferentes nomes como “sítio de ligação do PK11195”, “receptor benzodiazepínico mitocondrial” e “proteína ligante de isoquinolina”, que mais refletiam suas propriedades e não a sua função principal. Em 2006, Papadopoulos e colaboradores propuseram a mudança do nome PBR para TSPO (proteína translocadora, do inglês *translocator protein*), devido aos recentes achados sobre a sua estrutura e função molecular (PAPADOPOULOS et al., 2006). Assim, convencionou-se chamar de PBR todo o complexo multimérico de 140-200kDa formado pelas proteínas: canal aniônico dependente de voltagem (VDAC – 32kDa), transportador de nucleotídeos adenina (ANT – 30kDa) e a proteína ligante de isoquinolina (IPB – 18kDa), e como TSPO apenas a proteína de 18kDa (169 aminoácidos) que faz parte deste complexo. (PAPADOPOULOS et al., 2006; VEENMAN; PAPADOPOULOS; GAVISH, 2007; AUSTIN et al., 2013).

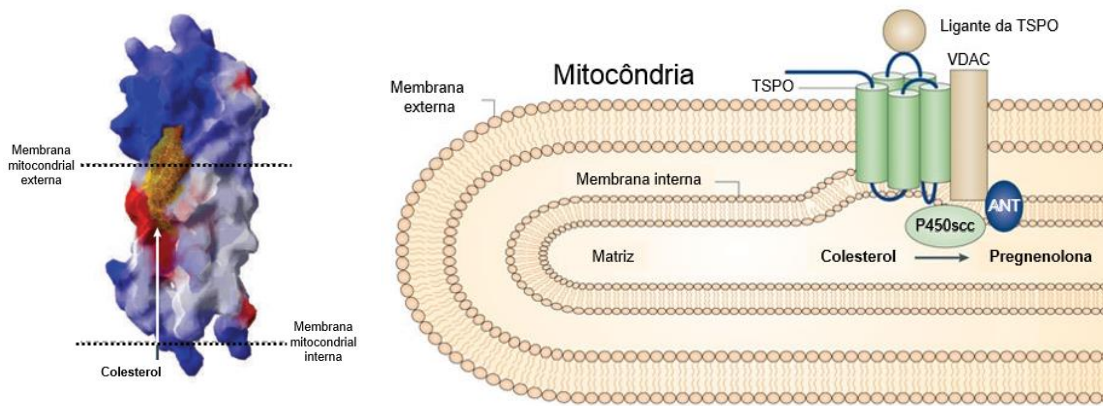


Figura 2 – Estrutura tridimensional da TSPO e sua localização mitocondrial (Adaptado de RUPPRECHT et al., 2010).

O gene da TSPO, encontrado no cromossomo 22q13.31, é altamente conservado evolutivamente, sendo encontrado em quase todo o reino animal, como insetos, moluscos, peixes, anfíbios, aves e mamíferos, exceto répteis, além de ser encontrado também em bactérias (exceto *Escherichia coli*), fungos (como *Saccharomyces cerevisiae*) e algumas espécies vegetais como *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum* e *Ginkgo biloba* (PAPADOPOULOS et al., 2006; VEENMAN; PAPADOPOULOS; GAVISH, 2007; AUSTIN et al., 2013; JAREMKO et al., 2015). Este gene desempenha funções fundamentais para a sobrevivência dos organismos, pois o *knockout* deste gene resulta em um fenótipo letal em embriões (RUPPRECHT et al., 2010). Em procaríotos, esta proteína encontra-se localizada na membrana celular, enquanto que, em eucariotos, está localizada principalmente na interface entre as membranas mitocondriais interna e externa, estando em contato com o citosol. Ela é formada por cinco domínios transmembrana em α -hélice, que são encontrados ligados ao poro de transição e permeabilidade mitocondrial (MPTP). Entretanto, já foi descrita a localização intracelular da TSPO na região perinuclear, membrana plasmática e outras organelas membranosas como lisossomos e peroxissomos, o que está de acordo com as diferentes funções por ela desempenhadas (PAPADOPOULOS et al., 2006; VEENMAN; PAPADOPOULOS; GAVISH, 2007; RUPPRECHT et al., 2010; AUSTIN et al., 2013; JAREMKO et al., 2015). Além disso, é uma proteína constitutivamente expressa em todas as células dos organismos, incluindo nas células do sistema nervoso central como micróglia e

astrócitos reativos. Foi descrito que a TSPO também apresenta níveis elevados nos tecidos que sintetizam esteroides, possuindo alta afinidade a drogas ligantes, não só benzodiazepínicos, como também por derivados de isoquinolina e derivados de piridazinoindol, a ligantes endógenos como o colesterol, porfirinas, endozepínico e proteínas como o PRAX-1 e a PAP-7 (PAPADOPOULOS et al., 2006; AUSTIN et al., 2013; JAREMKO et al., 2015).

Devido ao seu envolvimento em diversas funções celulares e doenças neurológicas, além de alguns tipos de câncer, muitos pesquisadores tem utilizado a TSPO como um biomarcador, demonstrando também que esta proteína pode ser um potencial alvo terapêutico (AUSTIN et al., 2013; CAMPANELLA; TURKHEIMER, 2015; LI et al., 2015; PAPADOPOULOS et al., 2015; SELVARAJ; STOCCO, 2015). Daugherty e colaboradores (2013) demonstraram que o ligante específico da TSPO, etifoxina, foi capaz de diminuir a produção de IL-1, IFN- γ e IL-17 quando comparado ao grupo tratado com o diluente da droga em um modelo de encefalomielite autoimune experimental. O ligante etifoxina foi capaz de levar ao controle da doença com a diminuição dos sintomas, por meio da alteração do tipo de resposta imunoinflamatória. Em outro trabalho realizado por nosso grupo (Guedes, 2018) foi demonstrado que o tratamento de macrófagos de camundongos CBA infectados por *L. amazonensis* com o PK11195 (ligante da TSPO) foi capaz de diminuir a carga parasitária e o percentual de macrófagos infectados, de uma maneira dose e tempo-dependentes, sendo significativa a partir de 50 μ M no tempo de 48h após o início do tratamento. Guedes e colaboradores também demonstraram que, apesar desse ligante ter modulado negativamente a produção da quimiocina atratora de macrófagos (MCP-1), ele causou o aumento da produção intracelular de O₂⁻ pelos macrófagos infectados (BRANDONISIO et al., 2002; GUEDES et al., 2018). Esses dados indicam que, apesar de causar modulação negativa da resposta imune, PK11195 ocasiona a morte da *Leishmania* intracelular por mecanismos possivelmente associados à ação de moléculas leishmanicidas.

Dzierszinski e colaboradores (DZIERSZINSKI et al., 2002) demonstraram que a modulação da TSPO pelos ligantes flurazepam e PK 11195 leva à diminuição do crescimento de outro protozoário, *Plasmodium falciparum*, tanto incubando essas drogas separadamente ou em combinação com drogas comumente utilizadas no tratamento da malária, como a cloroquina. O

flurazepam causou maiores danos nos parasitas intracelulares, observando-se a desorganização do retículo endoplasmático e, mais tardiamente, a completa degeneração destes parasitos. Adicionalmente, ambas as drogas foram capazes de diminuir a proliferação de um outro protozoário *in vitro*, *Toxoplasma gondii*, e de uma cepa de *P. falciparum* resistente à cloroquina, apontando sua utilização para casos de resistência na utilização deste tratamento para a malária. Adicionalmente, Bouyer e colaboradores (BOUYER et al., 2011) demonstraram os mesmos resultados promissores para *P. falciparum*. Esses autores mostraram que os ligantes da TSPO diazepam, PK11195 e Ro5-4864 bloqueiam o crescimento intraeritrócito destes parasitos, apontando a TSPO como um dos alvos em aplicações farmacológicas no tratamento antimalárico.

Apesar de participar do controle da infecção em várias espécies de parasitos, Lee e colaboradores (LEE et al., 2016) demonstraram que, utilizando o ligante Ro5-4864 em monócitos, macrófagos THP-1 e macrófagos derivados de medula, ocorre uma diminuição da produção das citocinas IL1- β e IL-18. Além disso, observou-se também a diminuição da produção do superóxido mitocondrial que está envolvido na ativação do inflamossoma, suprimindo assim a sua ativação. Quando acumulado, o inflamossoma, causa inflamações desordenadas como Alzheimer, esclerose múltipla e encefalite experimental autoimune. Assim, estes autores apontaram para um efeito anti-inflamatório de ligantes da TSPO em modelos de doenças do sistema nervoso.

Ainda não é definido claramente se os ligantes de TSPO tem ação inibitória ou ativadora da TSPO. Issop e colaboradores (ISSOP et al., 2016) apontam para um efeito próinflamatório da TSPO em células de carcinoma de cólon humano HT-29, que sabidamente superexpressam a TSPO. Na mucosa de cólon de indivíduos com câncer foi observada uma desregulação da resposta imune, alta reação inflamatória e produção de citocinas próinflamatórias como TNF e IL-8. Nesse estudo, o PK11195 causou uma redução da produção de IL-8 e de espécies reativas de oxigênio por células HT-29 tratadas com TNF e PK11195, apontando para uma ação antagonista deste ligante da TSPO em células cancerígenas não somente na produção citocinas, como também em relação à produção de espécies reativas de oxigênio (ISSOP et al., 2016).

Assim, apesar de alguns trabalhos mostrarem que há uma diminuição da produção de citocinas próinflamatórias quando se usa ligantes agonistas da

TSPO, observa-se em outros trabalhos que ocorre também a produção de moléculas com poder microbidas, que causam diminuição da carga parasitária em células infectadas por diferentes patógenos (DZIERSZINSKI et al., 2002; BOUYER et al., 2011; ISSOP et al., 2016; LEE et al., 2016). Isso indica que a modulação da TSPO pode causar um balanço entre as respostas pró-inflamatória e anti-inflamatória, que pode ser eficaz no controle da infecção, sem causar danos ao tecido do hospedeiro, como necrose, podendo direcionar um bom tratamento para a leishmaniose tegumentar (PETERSEN et al., 2012). Além disso, a utilização de ligantes para avaliar o efeito de uma determinada proteína sobre a infecção pode fornecer dados extrapolados sobre a atividade da proteína. Dessa forma, a modulação da expressão gênica fornece dados mais conclusivos sobre o papel da proteína na infecção.

Dessa forma, com base nos dados presentes na literatura e nos estudos de proteômica anteriormente descritos (MENEZES et al., 2013), no presente estudo objetivamos avaliar o papel da TSPO no controle da infecção de macrófagos por *L. major*. Inicialmente, modulamos a expressão desta proteína em macrófagos derivados de medula óssea de CBA (BMMΦ) e avaliamos o efeito do silenciamento e da superexpressão sobre o curso da infecção por *L. amazonensis* ou *L. major*.

3. HIPÓTESE

A nossa hipótese é que a TSPO está associada ao controle da infecção de macrófagos derivados de medula óssea (BMMΦ) por *Leishmania major*.

4. OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar o papel da TSPO no controle da infecção de macrófagos derivados de medula óssea (BMM Φ) por *Leishmania major*.

4.2 ESPECÍFICOS

- a) Validar a expressão da TSPO em BMM Φ infectados por *Leishmania* spp.
- b) Investigar o efeito da modulação gênica da TSPO no curso da infecção de BMM Φ por *Leishmania* spp.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 PLASMÍDEOS OU SIRNA UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA TSPO

Para os ensaios de modulação da expressão da TSPO em macrófagos derivados de medula óssea (BMM Φ) foram utilizados diferentes plasmídeos ou RNA de interferência (siRNA). Segue abaixo a nomenclatura das células geneticamente modificadas com os respectivos plasmídeos ou siRNA utilizados nos ensaios descritos ao longo da metodologia:

Tabela 1: Nomenclatura das células submetidas à modulação gênica e os plasmídeos utilizados

| Nomenclatura utilizada | Plasmídeo ou siRNA utilizado |
|------------------------|------------------------------|
| BMM Φ -TSPO | pcDNA6.2-TSPO |
| BMM Φ -Vazio | pcDNA6.2 |
| BMM Φ -controle | siRNA_Controle |
| BMM Φ -TSPOdown | siRNA_TSPO |

5.2 CULTURA DE CÉLULAS L929 E COLETA DE SOBRENADANTE ENRIQUECIDO COM GM-CSF

Células de linhagem fibroblástica L929 foram descongeladas, expandidas e, posteriormente, cultivadas em garrafas de cultura de 75cm² contendo meio RPMI completo [RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (Gibco) – SBF -, 1% de glutamina (Sigma), 1% de ciprofloxacino, 5% de

bicarbonato de sódio (Sigma) e 2% de HEPES (Sigma)] em estufa a 37 °C, com 5% de CO₂ e 95% de umidade, até que obtivessem confluência completa. Essas células foram então incubadas com 4mL de Tripsina-EDTA a 0,05% (Gibco) durante 5 minutos, para que se soltassem do assoalho da garrafa de cultura e, então, foram recuperadas e centrifugadas a 300Xg, 10 min, 4 °C. Posteriormente, essas células foram ressuspensas e plaqueadas na concentração de 5x10⁵ em garrafas de 75cm² com 20 mL de meio RPMI completo por 7 dias.

As células L929 foram cultivadas por sete dias até atingirem a confluência completa em garrafas de cultura, liberando no seu sobrenadante o fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) como produto do metabolismo das células. Esse sobrenadante enriquecido em GM-CSF foi então coletado, centrifugado a 300Xg, 10 min, 4 °C para remoção de células L929 em suspensão no sobrenadante, filtrado em sistema de filtração de 0,22 µm e mantido aliquoteado a -20 °C.

5.3 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA (BMMΦ)

Os BMMΦ foram obtidos a partir de camundongos de linhagem CBA oriundos do biotério do Instituto Gonçalo Moniz, sendo manipulados de acordo com as diretrizes aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) deste Instituto (protocolo CEUA 008/2016). Para isto, os animais foram eutanasiados por inalação de substância anestésica (Isoflurano) e mergulhados em álcool 70% para assepsia. Posteriormente, esses camundongos tiveram a tibia e o fêmur removidos para extração dos BMMΦ. Para a extração, inicialmente, os ossos devidamente limpos tiveram as articulações externas e internas removidas, expondo então a medula óssea. A medula foi retirada com jatos de meio RPMI completo suplementado com 30% de sobrenadante de L929 enriquecido com GM-CSF utilizando agulha de insulina (26 G x 1/2”) e seringa de 10 mL. Posteriormente, a medula foi centrifugada a 300 Xg, 10 min, 4 °C, ressuspensa com 1 mL de meio RPMI completo contendo 30% de sobrenadante

de L929 e, após a retirada dos fragmentos menores de ossos restantes, as células foram cultivadas em placas de Petri bacteriológica (divididas em 3 placas por animal) com 10 mL de meio RPMI contendo 30% de sobrenadante de L929 por placa em estufa a 37 °C, com 5% de CO₂ e 95% de umidade. No dia seguinte, o sobrenadante das culturas foi colocado em novas placas, descartando os macrófagos residentes aderidos nas placas utilizadas inicialmente. Após adicionais dois dias, foram adicionados mais 5mL de meio RPMI completo contendo 30% de sobrenadante de L929, para reestimular as células à diferenciação. Completados 7 dias da extração, obtivemos então os macrófagos derivados de medula óssea.

5.4 CULTURA DE *LEISHMANIA* SPP.

Para o cultivo de formas promastigotas de *Leishmania*, estes parasitos foram mantidos em cultura axênica em 5 mL de meio Schneider completo [*Schneider's Insect Medium* (Sigma-Aldrich), 50 µg/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich) e 10% de soro bovino fetal (Gibco®)] em estufa B.O.D. a 24 °C. O crescimento dos parasitos foi acompanhado diariamente por contagem em microscópio ótico utilizando câmaras de Neubauer para, ao atingirem a fase estacionária (aproximadamente 10⁸ parasitos por mL), serem utilizados nos experimentos ou repicados em novas culturas. Para os experimentos de infecção, foram utilizadas as seguintes cepas de *Leishmania*:

Tabela 2: Cepas de *Leishmania* spp. utilizadas nos experimentos

| Espécie | Cepa |
|-------------------------------|------------------|
| <i>Leishmania amazonensis</i> | MHOM/Br88/Ba-125 |
| <i>Leishmania major</i> | MHOM/RI/-/WR-173 |

Para utilização das cepas de *Leishmania* nos experimentos de infecção, após atingirem a fase estacionária, a cultura axênica foi coletada e centrifugada três vezes a 1875 Xg, 10 min, 4 °C, em solução de soro fisiológico 0,9 %, para a remoção do meio Schneider completo. Durante os experimentos de infecção, as células infectadas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ e 95% de umidade, sendo que, para as células infectadas com *L. amazonensis* a temperatura utilizada foi de 35 °C e, para as infectadas com *L. major*, a temperatura utilizada foi de 37 °C.

5.5 VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DA TSPO EM BMMΦ

Após a obtenção de BMMΦ diferenciados, estas células foram incubadas por 5 min com solução PBS 1x (do inglês *Phosphate Buffered Saline*) com EDTA na concentração final de 1 mM, permitindo que elas se soltassem do assoalho das placas de Petri. Essas células foram então recuperadas, centrifugadas a 300Xg, 10 min, 4 °C, ressuspensas e reincubadas em placas de 6 poços na concentração de 5x10⁶ células por poço com 2mL de meio DMEM completo [DMEM *high glucose* (Gibco) suplementado com 22,8mM de HEPES (Sigma), 27mM de bicarbonato de sódio (Sigma), 10% de soro fetal bovino (Gibco), 2mM de Glutamina (Sigma) e 10µg/mL de ciprofloxacino] em estufa a 37 °C, com 5% de CO₂ e 95% de umidade. No dia seguinte, após a aderência aos poços, estas células foram infectadas por promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. major* em fase estacionária de crescimento na proporção de 10:1 e, após 6h ou 12h de infecção, os poços foram lavados para retirada de parasitos não internalizados. Então, as células foram reincubadas por adicionais 6h ou 12h de infecção e, após esses tempos, os poços foram lavados e as células foram removidas com 1 mL de solução de soro fisiológico 0,9% gelada por poço, centrifugadas a 300 Xg, 10 min, 4 °C e, posteriormente, incubadas por 30 min com tampão de lise celular RIPA [1 M Tris HCl pH 8; 1 M NaCl; Nonidet P40 substitute (Sigma, St Louis, MO, USA); Sodium Dodecyl sulfato 10% (Riedel-de-Haen, Seelge, GER); DOC 5%; Água milli-Q e Inibidor de proteases (ROCHE)] para obtenção de extrato proteico. Como controle, células não infectadas foram incubadas e

submetidas à extração proteica nos mesmos tempos utilizados para as células infectadas. Após a obtenção dos extratos, eles foram quantificados no NanoDrop (Thermo) e mantidos congelados a -20 °C até a sua avaliação por *Western Blot*.

5.6 WESTERN BLOT DE BMMΦ INFECTADOS POR *LEISHMANIA* SPP.

Após a obtenção dos extratos proteicos dos BMMΦ infectados ou não por *Leishmania* em diferentes tempos, esses extratos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) por 45 min a 200 V e 100 mA na concentração de 100 µg de proteína por amostra. Uma vez realizada a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose utilizando o sistema de transferência Trans-Blot Turbo™ (Bio-rad) por 30 minutos a 25 V e 1 A. A membrana foi, então, incubada por 1 h na solução de bloqueio com PBS 1x e 5% de leite desnatado (Molico) e, posteriormente, incubadas com os anticorpos primários anti-actina (1:5000) (Sigma) ou anti-TSPO (1,5:1000) (Everest) em solução PBS 1x com 3% de leite *overnight* a 4 °C sob leve agitação. No dia seguinte, a membrana foi incubada com os anticorpos secundários anti-cabra para o TSPO e anti-camundongo para a actina, ambos conjugados à peroxidase. A revelação foi realizada por detecção de quimiluminescência utilizando o aparelho *ImageQuant LAS 4000* (Life Sciences).

5.7 ANÁLISE DAS IMAGENS

Após a obtenção das imagens do *western blot* no aparelho *ImageQuant LAS 4000* (Life Sciences), essas foram analisadas através do *software Fiji-ImageJ*. Para isso, inicialmente, a marcação correspondente a cada banda teve o contorno delimitado manualmente e foi mensurada a densidade ótica, que corresponde a intensidade da marcação de cada banda individualmente. Posteriormente, utilizando o *software Excel 2013*, foi realizada a normalização das bandas, calculando-se o valor da relação entre a banda correspondente à

marcação da TSPO e a banda correspondente à marcação da actina de cada uma das amostras. A expressão da TSPO em macrófagos não infectados foi considerada como 100% em todos os experimentos e, a variação da expressão entre os macrófagos infectados com as duas espécies de *Leishmania* foi comparada com este valor. Por fim, foi calculada a relação entre o valor da expressão da TSPO nas amostras com infecção e a expressão da TSPO nas células não infectadas. A expressão da TSPO foi considerada como 100% nas células não infectadas e a variação da sua expressão nas células infectadas foi calculada comparando-se com o valor padrão do controle. Esses valores foram analisados através do programa GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software Inc) para a construção de gráficos.

5.8 SILENCIAMENTO DA TSPO EM BMMΦ

Após a obtenção como acima descrito, os BMMΦ foram incubados por 5 min em PBS 1x contendo EDTA na concentração final de 1 mM a 37 °C, removidas por jatos com este mesmo meio de incubação, centrifugadas a 300 Xg, 10 min, 4 °C e, finalmente, ressuspensas em 1 mL de meio DMEM completo. Essas células foram então contadas em microscópio ótico utilizando câmaras de Neubauer e plaqueadas em placas de 6 poços na concentração de 2×10^5 células por poço em 2mL de meio DMEM completo em estufa a 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. Para os experimentos de infecção, BMMΦ foram plaqueados, na mesma concentração como acima descrito, em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro circulares com 1 mL de meio DMEM completo. Após 24 h, misturou-se 190 µL de meio Opti-MEM (Gibco) com 6 µL de Oligofectamine (Invitrogen) e esta solução foi incubada por 10 min à temperatura ambiente. Após esse tempo, foi adicionado a essa mistura 150nM de siRNA_TSPO_1 (Ambion), siRNA_TSPO_2 (Ambion) ou de siRNA_Controle (Ambion) e incubou-se por mais 10 min à temperatura ambiente. As referências dos siRNA utilizados nesta etapa são mostradas na tabela 3. Paralelamente, após 24 h, as células foram lavadas duas vezes com solução de soro fisiológico 0,9% e incubadas com 800 µL de meio Opti-MEM. Por fim, os 196 µL da solução contendo siRNA_TSPO_1

ou siRNA_TSPO_2 foram adicionados em seus respectivos poços. Em seguida, as células foram reincubadas por adicionais 6h em estufa a 37 °C, com 5% de CO₂ e 95% de umidade. Decorridas as 6 h de incubação, o meio de silenciamento contendo os siRNA foi retirado dos poços, substituído por 2 mL de meio DMEM completo e as células foram reincubadas por adicionais 24 h, 48 h ou 72 h em estufa a 37 °C, conforme as etapas seguintes. Ao final do processo, obtivemos BMMΦ com a expressão da TSPO diminuída (BMMΦ-TSPOdown) e as células incubadas com o siRNA controle (BMMΦ-controle). Para verificar se o processo de silenciamento influencia a expressão da TSPO, BMMΦ não submetidos ao silenciamento foram incubados nas mesmas condições das células submetidas ao silenciamento e utilizados como controles negativos.

Tabela 3: Sequências dos siRNA utilizados nos experimentos de silenciamento da TSPO

| Nomenclatura | Catálogo | ID |
|----------------|----------|---------|
| siRNA_TSPO_1 | 4390818 | s63142 |
| siRNA_TSPO_2 | 4390818 | s232444 |
| siRNA_Controle | AM4611 | - |

5.9 PCR EM TEMPO REAL (QPCR) DAS CÉLULAS BMMΦ-CONTROLE E BMMΦ-TSPODOWN

Após o silenciamento de BMMΦ com siRNA_TSPO_1, siRNA_TSPO_2 ou siRNA_controle, a triplicata de cada grupo silenciado teve o seu RNA total extraído em um *pool*, utilizando o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). Esse RNA foi, inicialmente, quantificado no NanoDrop (Thermo) e submetido à linearização utilizando 1 µg do RNA total com a enzima Oligo dT (Invitrogen) no termociclador

(Eppendorf) a 70 °C por 10 min. Em seguida, a partir desse RNA foi sintetizada a fita de DNA complementar (cDNA) dessas amostras, utilizando as enzimas RNase OUT (Invitrogen) e RT (do inglês, *Reverse Transcriptase*) (Invitrogen) no mesmo termociclador a 42 °C por 2 h.

A partir do cDNA formado foi realizada a qPCR das amostras. Para isso, 5 µL de cada amostra contendo 10 ng de cada cDNA foi incubado com 10 µL de solução, em triplicata em placas de 96 poços específicas para qPCR, contendo primers específicos (IDT) descritos na tabela 4 e a sonda SYBR green (Applied Biosystems). Como controle positivo, foram utilizados primers para a sequência do GAPDH (do inglês, *Glyceraldehyde 3-Phosphate dehydrogenase*). A análise foi feita a partir da observação da amplificação das cadeias duplas de DNA, acompanhadas em tempo real através do aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). A partir do Ct médio de cada triplicata, foi realizado o cálculo da diferença de expressão de mRNA da TSPO entre os grupos, através da fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando o *software* GraphPad Prism.

Tabela 4: Sequências dos primers utilizados nos experimentos de qPCR

| Primer | Sequência |
|---------------------------|---|
| siRNA_TSPO <i>foward</i> | 5' – GGG AGG TTT CAC AGA GGA CGC TAT G – 3' |
| siRNA_TSPO <i>reverse</i> | 5' – GCC GGG CAC CAA AGA AGA TG – 3' |
| GAPDH <i>foward</i> | 5' – CGA CTT CAA CAG CAA CTC CAC TC – 3' |
| GAPDH <i>reverse</i> | 5' – CAC CCT GTT GCT GTA GCC GTA TTC – 3' |

5.10 TRANSFEÇÃO DE BMMΦ COM OS PLASMÍDEOS PCDNA6.2 OU PCDNA6.2-TSPO

Os BMM Φ foram transfectados com o plasmídeo pcDNA6.2 (vazio) ou com o plasmídeo pcDNA6.2-TSPO utilizando o Nucleofector™ Technology 2b (Lonza), de acordo com o protocolo do fabricante. Para isso, após a obtenção de BMM Φ diferenciados, essas células foram incubadas com PBS 1x contendo EDTA na concentração final de 1 mM por 5 min a 37 °C. Posteriormente, estas células foram removidas por jatos com este mesmo meio de incubação e então centrifugadas a 300 Xg, 10 min, 4 °C. Então, estas células foram ressuspensas em solução de soro fisiológico 0,9%, contadas em microscópio ótico utilizando câmaras de Neubauer e centrifugadas novamente a 200 Xg, 10 min, temperatura ambiente, em tubos eppendorfs de 0,6 mL numa concentração de 10⁶ células por tubo. Após esta etapa, os BMM Φ foram ressuspensos em meio para nucleofecção fornecido pelo kit, incubadas com 4 μ g dos plasmídeos pcDNA6.2 ou pcDNA6.2-TSPO e submetidas ao protocolo de nucleofecção para macrófagos de camundongo da Lonza. Por fim, essas células foram recuperadas e então plaqueadas em meio DMEM completo em estufa a 37 °C, com 5% de CO₂ e 95% de umidade, de acordo com os procedimentos a serem realizados em seguida. Ao final do processo, obtivemos as células superexpressando a TSPO (BMM Φ -TSPO) e as células controle (BMM Φ -Vazio).

5.11 IMUNOMARCAÇÃO DAS CÉLULAS BMM Φ -TSPO E BMM Φ -VAZIO

Após a nucleofecção, as células BMM Φ -TSPO e BMM Φ -Vazio foram submetidas à imunomarcção, para a confirmação da superexpressão da TSPO. Para isso, estas células foram recuperadas e plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro circulares na concentração aproximada de 10⁵ célula por poço, em 1 mL de meio DMEM completo em estufa a 37 °C, com 5% de CO₂ e 95% de umidade, onde permaneceram incubadas por 24 h ou 48 h. Após esses tempos, estas células foram fixadas com paraformaldeído 4% e então submetidas ao processo de imunomarcção. Para isso, inicialmente essas células foram submetidas à três lavagens de 5 min com PBS 1x e incubadas com

1 mL de NH_4Cl 50 mM por 15min, para evitar a ocorrência de *background* na marcação. Posteriormente, essas células foram novamente lavadas com PBS 1x para retirada da solução de NH_4Cl e incubadas por 30 min com a solução detergente PBS 1x contendo 2% de Tween 20, permitindo a permeabilização das células. Então, as células foram submetidas a três lavagens com PBS 1x contendo 0,1% de Tween 20, incubadas por 40 min com PBST 0,1% contendo 10% de soro de camundongo inativado (Abcam, ab7486) e 0,1% de gelatina de peixes de águas frias (Sigma-Aldrich), permitindo o bloqueio de ligações inespecíficas com os anticorpos e, posteriormente, incubadas *overnight* (16h – 18h) sob leve agitação a 4 °C com o anticorpo primário anti-TSPO (Everest) na diluição de 1:50 em PBST 0,1% contendo 0,1% de gelatina de peixe. Em seguida, as células foram novamente lavadas três vezes com PBST 0,1% e então incubadas com anticorpo secundário anti-cabra (1:100) conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 594. Como controle negativo, algumas lamínulas foram incubadas com IgG de cabra na mesma concentração utilizada para o anticorpo primário e, posteriormente, incubadas com o anticorpo secundário. Então, essas células foram lavadas três vezes com PBST 0,1% seguido de mais três lavagens com PBS 1x e, por fim, as lamínulas foram montadas com 10 μL do meio de montagem Prolong Gold com DAPI (Thermo) e observadas em microscópio de fluorescência confocal Leica SP8, em campos aleatórios, sob o aumento de 200x.

5.12 ANÁLISE DAS IMAGENS

As imagens obtidas no microscópio de fluorescência confocal Leica SP8 apresentaram as células com o núcleo corado com DAPI em azul e as moléculas de TSPO, marcadas com o anticorpo anti-TSPO, em vermelho. Essas imagens foram analisadas através do *software* Fiji-ImageJ, onde avaliou-se a intensidade de fluorescência da marcação com o anticorpo anti-TSPO de trinta células em cada grupo. Inicialmente, essas imagens foram convertidas em padrão preto e branco, com a mesma intensidade de brilho para todas as imagens avaliadas. Posteriormente, cada célula foi individualmente delimitada manualmente através

do seu contorno e foram mensurados pelo *software* parâmetros como área total da célula e intensidade da marcação. O resultado do nível de expressão da TSPO foi obtido através do cálculo da intensidade de fluorescência, de acordo com a fórmula: $CTCF = IntDen - (\text{Área} \times \text{Média de fluorescência das áreas do background})$, onde CTCF representa a fluorescência celular total corrigida e IntDen é a intensidade de fluorescência. Como as nossas imagens apresentaram as mensurações das áreas de *background* sempre nulas, o nível de expressão foi verificado simplesmente através do parâmetro IntDen. Após a obtenção deste parâmetro das trinta células de cada grupo, os valores foram analisados através do programa GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software Inc).

5.13 INFECÇÃO DE BMMΦ COM EXPRESSÃO MODULADA DA TSPO POR *LEISHMANIA* SPP.

Após a confirmação da modulação da expressão da TSPO em BMMΦ, essas células foram distribuídas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro circulares na concentração aproximada de 2×10^5 células por poço em 1mL de meio DMEM completo. Posteriormente, as células BMMΦ-TSPOdown e BMMΦ-controle foram infectadas por promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. major* na proporção de 10:1. Após 12h de infecção foi realizada a fixação das células do primeiro grupo com paraformaldeído 4% e os outros grupos tiveram os poços lavados com solução de soro fisiológico 0,9% para a remoção de *Leishmania* não internalizada. Essas células foram então reincubadas por adicionais 12h ou 36 h de infecção em estufa a 37 °C, com 5% CO₂ e 95% de umidade e, após esses tempos, as lamínulas contendo as células infectadas foram também fixadas com paraformaldeído 4%. Para as células BMMΦ-TSPO e BMMΦ-Vazio os mesmos procedimentos foram realizados, com os mesmos tempos de infecção avaliados, além de um grupo adicional que foi fixado após as primeiras 6h de infecção.

Após serem fixadas, essas lamínulas foram montadas com 10 µL do meio de montagem Prolong Gold com DAPI (Thermo) e observadas em microscópio de fluorescência Olympus-BX51, em campos aleatórios, sob o aumento de

1000x, sendo avaliados os parâmetros de carga parasitária e percentual de infecção. Para cada lamínula foram contadas, no mínimo, 200 células. Para o parâmetro de percentual de infecção as células BMMΦ-Vazio foram consideradas como apresentando 100% de infecção e as células BMMΦ-TSPO infectadas foram comparadas àquelas primeiras, analisando-se a relação entre esses percentuais. Para o parâmetro de carga parasitária, foi analisado o valor absoluto do número de *Leishmania* por macrófago.

5.14 VIABILIDADE INTRACELULAR DE *LEISHMANIA* SPP. EM BMMΦ

Após a obtenção das células BMMΦ-TSPO e BMMΦ-Vazio, elas foram distribuídas em placas de 24 poços na concentração de $1,6 \times 10^5$ células por poço em 1 mL de meio DMEM completo e mantidas por 24h em estufa a 37 °C, 5% CO₂ e 95% de umidade. Então, estas células foram infectadas por promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. major* em fase estacionária de crescimento na proporção de 10:1 e incubadas por 12 h em condições similares às anteriormente descritas, sendo utilizadas a temperatura de 35 °C para a infecção por *L. amazonensis* e de 37 °C para a infecção por *L. major*. Após esse tempo, os poços foram lavados duas vezes com solução de soro fisiológico 0,9% para a remoção de parasitos não internalizados e o meio de incubação foi substituído por meio Schneider completo. Estas células foram então incubadas em estufa B.O.D. a 24 °C por cinco dias, permitindo o rompimento das células infectadas, a liberação das formas amastigotas de *Leishmania* e a sua transformação na forma promastigota. Por fim, a viabilidade intracelular destes parasitos foi avaliada através da observação em microscópio ótico, por contagem do número de promastigotas viáveis de *Leishmania* por poço em câmaras de Neubauer, sob aumento de 20x.

5.15 ANÁLISES DOS DADOS

Para todos os experimentos foi realizada, inicialmente, uma análise da distribuição dos dados, avaliando a normalidade destes utilizando os testes de Kolmogorov-Smirnov, D'Agostino and Pearson omnibus e Shapiro-Wilk. Os dados são apresentados com gráficos em pontos, sendo a média utilizada como representativa, no caso de distribuição normal dos dados, ou a mediana, no caso de distribuição não gaussiana. Para os grupos que apresentavam distribuição normal dos dados foi realizado o teste t de Student, comparando-se as médias de dois grupos entre si, e, para os grupos que não apresentaram distribuição normal, foi aplicado o teste de Mann-Whitney. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significante quando o valor de $p < 0,05$. Para a construção dos gráficos a partir dos dados obtidos e para as análises estatísticas, foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software Inc).

6. RESULTADOS

6.1 VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DA TSPO EM BMMΦ

Com o objetivo de validar a maior expressão da TSPO em macrófagos infectados por *L. major* em comparação aos macrófagos infectados por *L. amazonensis*, foram realizados quatro experimentos independentes de infecção e *western blot*, ilustrados na Figura 3.

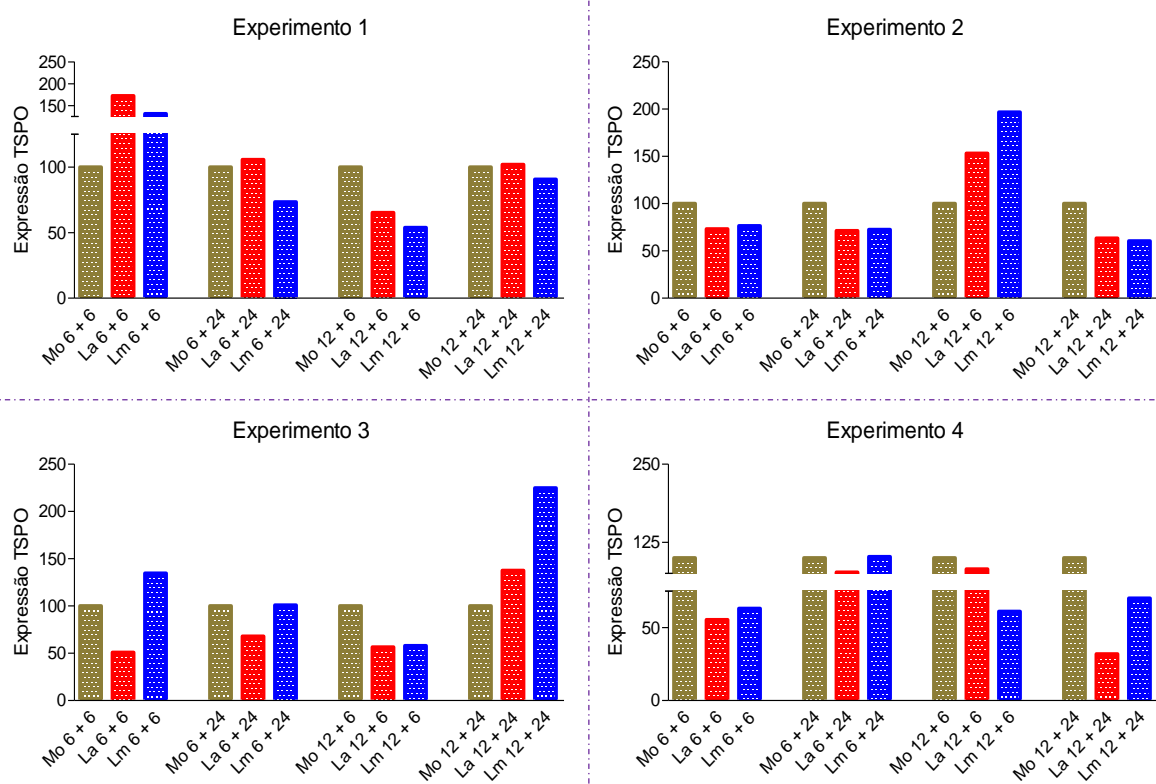


Figura 3 – Validação da expressão da TSPO em BMMΦ. Macrófagos derivados de medula óssea foram infectados ou não por *L. amazonensis* ou *L. major* por 6h ou 12h e, após a lavagem, reincubados por adicionais 6h ou 24h. Após esses tempos, essas células tiveram seus extratos proteicos extraídos para avaliação da expressão da TSPO por *western blot*, utilizando os anticorpos anti-actina (1:5000) e anti-TSPO (1,5:1000). Os resultados foram analisados utilizando o *software* Fiji-ImageJ por meio da quantificação da densidade ótica das bandas.

Podemos observar que houve uma grande variação nos níveis de expressão da TSPO nos quatro tempos avaliados. A TSPO apresentou aumento da expressão em macrófagos infectados por *L. major* em comparação com

macrófagos infectados por *L. amazonensis* nos tempos de 6h de infecção com adicionais 24h de incubação e de 12h de infecção com adicionais 24h de incubação. Para confirmação deste resultado, dois experimentos adicionais foram realizados considerando apenas esses dois tempos. Na Figura 4 é possível observar a imagem representativa do resultado da marcação da TSPO por *western blot* nestes dois tempos avaliados.

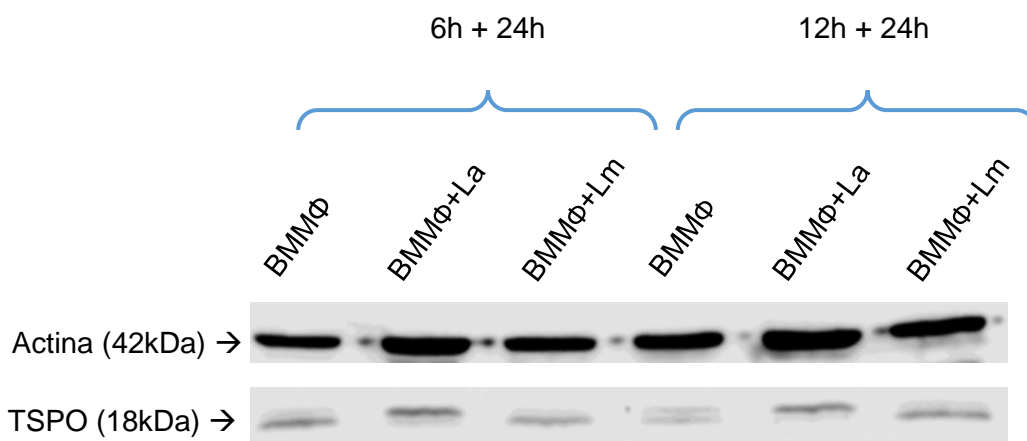


Figura 4 – Western blot da expressão da TSPO em BMMφ. Macrófagos derivados de medula óssea foram infectados ou não por *L. amazonensis* ou *L. major* por 6h ou 12h e, após a lavagem, reincubados por adicionais 24h. Após esses tempos, essas células tiveram seus extratos proteicos extraídos para avaliação da expressão da TSPO por western blot, utilizando os anticorpos anti-actina (1:5000) e anti-TSPO (1,5:1000).

A variação geral da expressão da TSPO nesses dois tempos avaliados em todos os seis experimentos realizados é mostrada na Figura 5. Para observar a variação da expressão da TSPO entre os macrófagos infectados por *L. amazonensis* ou por *L. major* entre os experimentos, cada um dos seis experimentos realizados em separado é representado no gráfico por um mesmo símbolo.

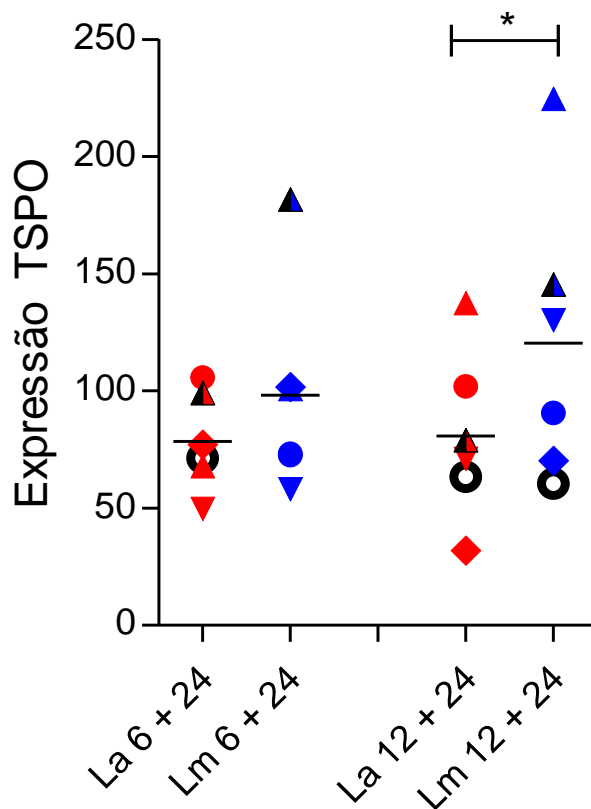


Figura 5 – Expressão da TSPO em BMMΦ infectados por *L. amazonensis* ou *L. major*. Macrófagos derivados de medula óssea foram infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* por 6h ou 12h e, após a lavagem, reincubados por adicionais 24h. Posteriormente, essas células tiveram seus extratos proteicos extraídos para determinação da expressão da TSPO por *western blot*, utilizando anticorpos específicos. Cada ponto representa a quantificação da densidade ótica de um experimento de seis realizados de forma independente. Teste *t* de Student * $p < 0,05$.

A expressão da TSPO em macrófagos não infectados foi considerada como 100% em todos os experimentos, tendo as seguintes médias de expressão: La 6h+24h: 78,51%; Lm 6h+24h: 98,13%; La 12h+24h: 80,82%; Lm 12h+24h: 120,32%. De acordo com os resultados obtidos podemos observar que apenas no tempo de 12h de infecção com adicionais 24h de incubação ocorre uma diferença estatisticamente significante da expressão da TSPO entre os macrófagos infectados com as diferentes espécies de *Leishmania* avaliadas, sendo maior naqueles infectados por *L. major* em comparação com os infectados *L. amazonensis*. A expressão da TSPO em BMMΦ infectados por *L. major* foi 49% maior que a expressão desta proteína em BMMΦ infectados por *L. amazonensis*.

6.2 SILENCIAMENTO DA TSPO EM BMM Φ

Inicialmente, foi determinado a sequência de siRNA que causava inibição mais intensa da expressão da TSPO nas células silenciadas e a amplificação do gene da TSPO por qPCR pode ser observada na Figura 6.

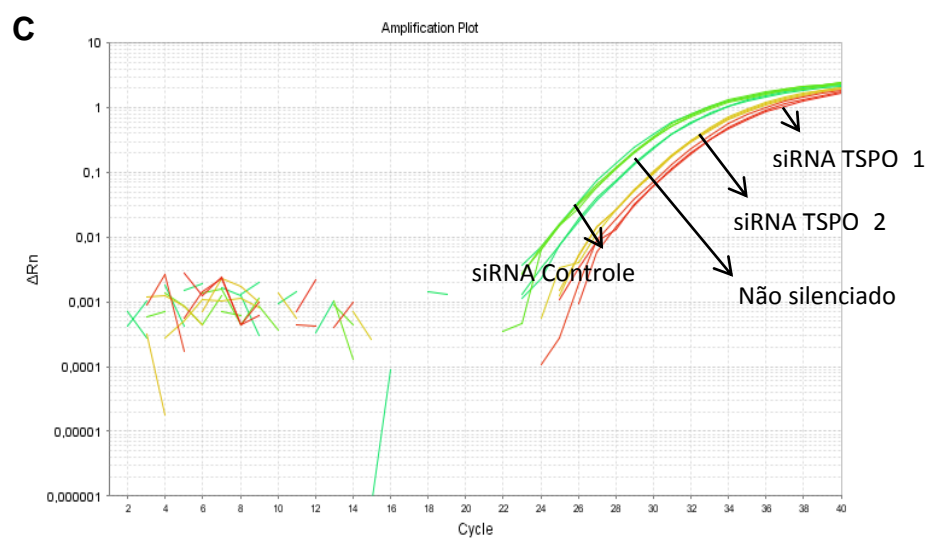
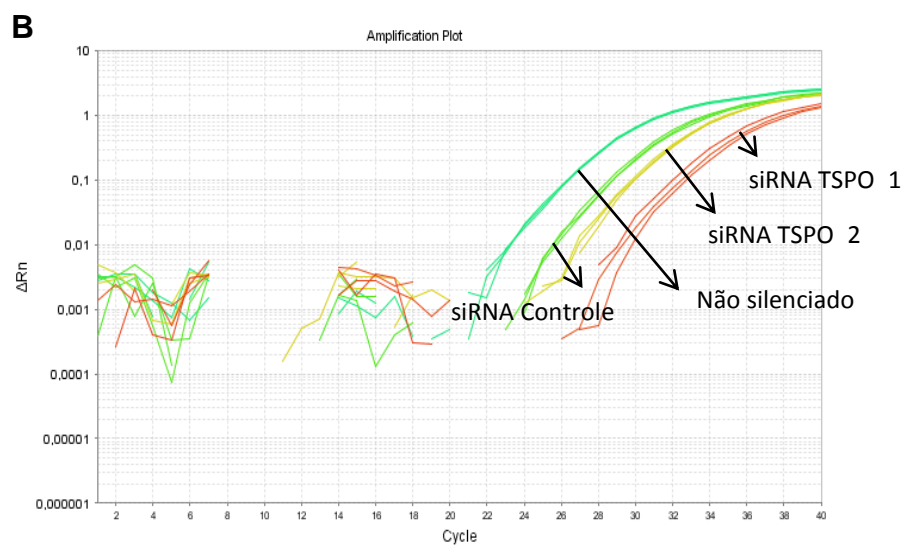
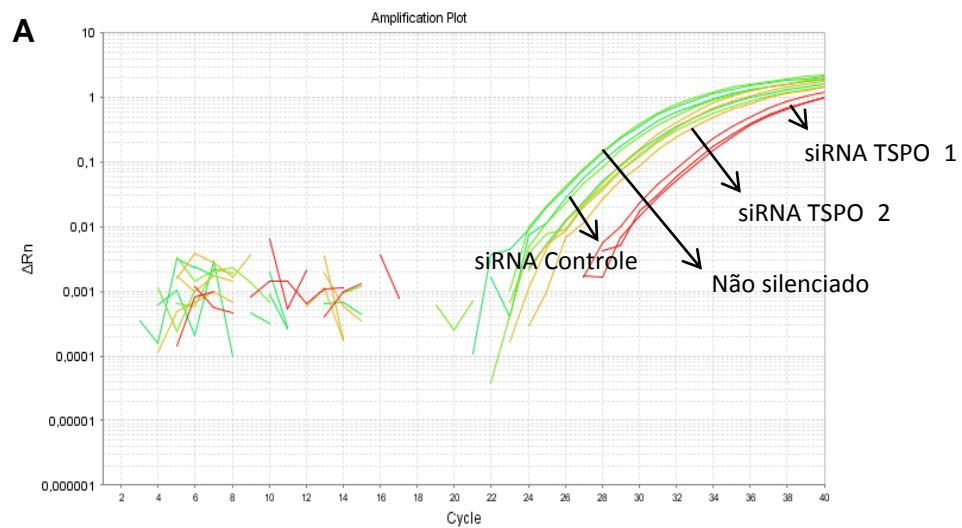


Figura 6 – Silenciamento da TSPO em BMMΦ. BMMΦ foram submetidos ou não ao silenciamento utilizando as sequências siRNA_TSPO_1, siRNA_TSPO_2 e siRNA_Control, seguindo protocolo descrito em Material e Métodos. A amplificação do gene da TSPO é ilustrada, após os tempos de 24 h (A), 48 h (B) ou 72 h (C) do silenciamento.

Observa-se uma menor amplificação de cDNA da TSPO nas células silenciadas com as sequências siRNA_TSPO_1 e siRNA_TSPO_2, quando comparada com a amplificação nas células BMMΦ e BMMΦ-controle, o que indica o sucesso do processo de silenciamento nestas células, com as duas sequências de siRNA testadas. Além disso, a amplificação da TSPO nas células silenciadas com o siRNA_TSPO_1 correu em ciclos mais tardios da qPCR, quando comparada com as células silenciadas com o siRNA_TSPO_2, o que mostra que o siRNA_TSPO_1 diminui mais intensamente a expressão de mRNA para a TSPO, quando comparada ao siRNA_TSPO_2. A análise de expressão da TSPO das células silenciadas pelos siRNA_TSPO_1 e siRNA_TSPO_2, em comparação com siRNA_Control é mostrada na Figura 7.

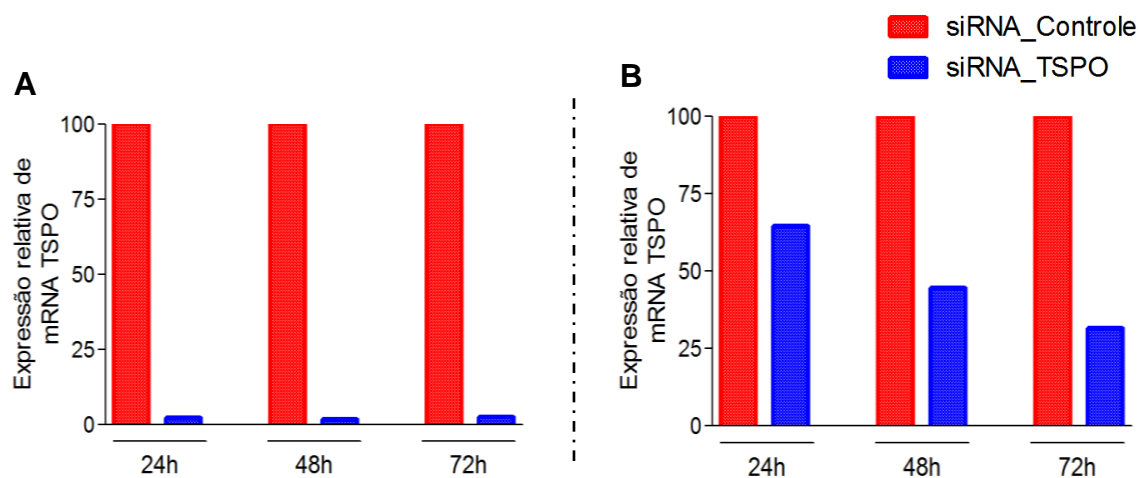


Figura 7 – Quantificação da expressão de mRNA da TSPO em células BMMΦ silenciadas. BMMΦ foram submetidos ao silenciamento utilizando as sequências siRNA_TSPO_1 (A), siRNA_TSPO_2 (B) e siRNA_Control e, após os tempos de 24 h, 48 h ou 72 h tiveram o seu RNA total extraído e analisado por qPCR. A partir dos gráficos de amplificação obtidos foi realizada a quantificação da expressão de mRNA da TSPO utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

As células silenciadas com a sequência siRNA_TSPO_1 apresentaram uma diminuição da expressão do gene da TSPO de aproximadamente 98%, nos três tempos avaliados, enquanto que para a sequência siRNA_TSPO_2 houve diminuição da expressão da TSPO de 35%, 55% e 68% nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h, respectivamente. Como a siRNA_TSPO_1 causou inibição mais intensa

da expressão do gene da TSPO, ela foi selecionada para ser utilizada nos experimentos de avaliação do papel da TSPO no curso da infecção.

6.3 EFEITO DO SILENCIAMENTO DA TSPO SOBRE O CURSO DA INFECÇÃO DE BMMΦ INFECTADOS POR *L. AMAZONENSIS* OU *L. MAJOR*

O papel da TSPO na infecção por *Leishmania* sp. também foi avaliado em células que tiveram o gene da TSPO silenciado como descrito acima, por meio do percentual de infecção e carga parasitária. O resultado é mostrado na Figura 8, onde cada ponto representa um experimento de dois realizados de forma independente.

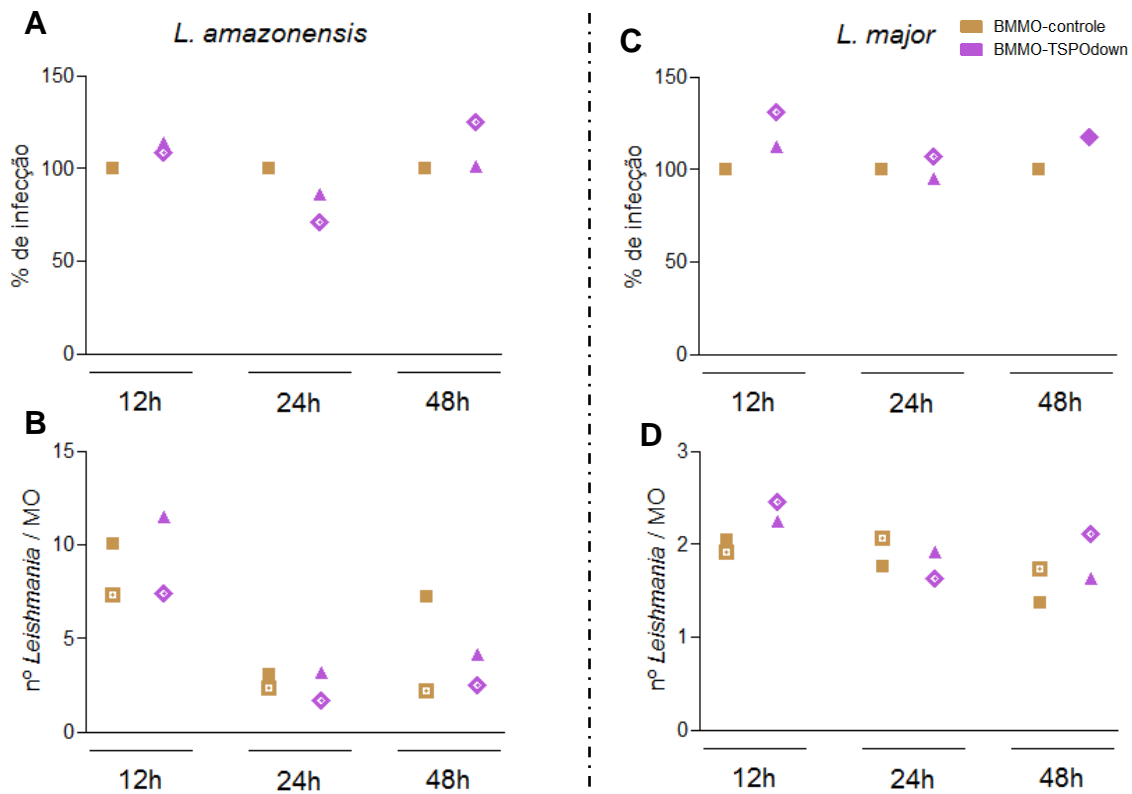


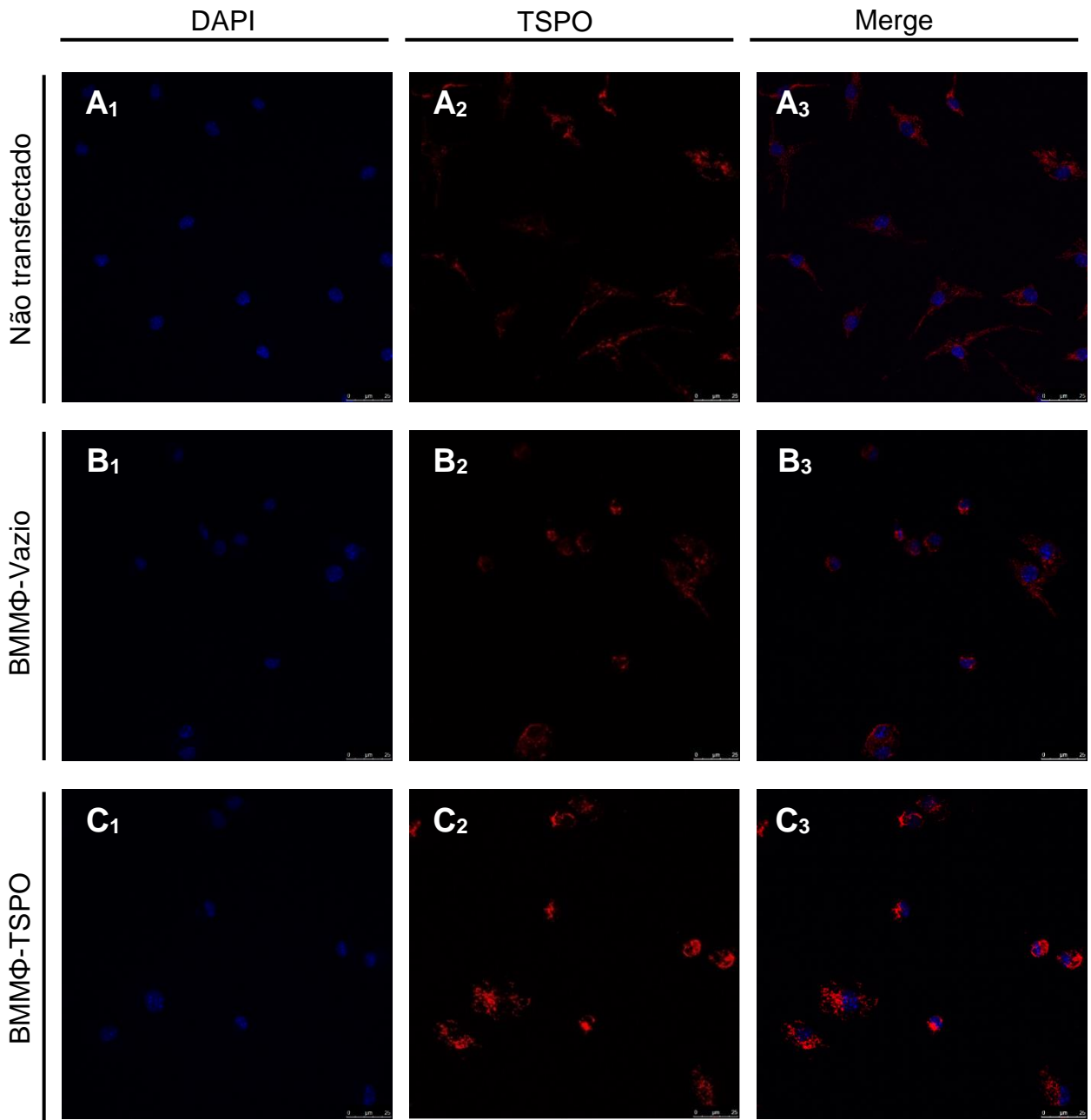
Figura 8 – Efeito Do silenciamento da TSP0 sobre o curso da infecção de BMMΦ por *Leishmania* spp.. BMMΦ-control e BMMΦ-TSP0down foram infectados por *L. amazonensis* (A e B) ou *L. major* (C e D) na proporção de 10:1. Após 12h foi realizada a fixação do primeiro grupo e a lavagem dos outros grupos para remoção de parasitos não internalizados. Após adicionais 24h ou 48h essas células foram também fixadas e as lamínulas foram montadas com Vectashield com DAPI. As células infectadas foram observadas em microscópio de fluorescência sob aumento de 1000x, sendo analisados a carga parasitária e o percentual de infecção de cada grupo. Em cada lamínula foram contadas, no mínimo, 200 células. Cada ponto representa um experimento de dois realizados de forma independente.

O percentual de infecção nas células BMMΦ-TSP0down é representado pela diferença em relação ao controle, considerado como 100% de infecção, correspondendo a uma média de: La 12h: 111,10%; La 24h: 79,41%; La 48h: 110,49%; Lm 12h: 120,87%; Lm 24h: 100,94%; Lm 48h: 117,76%. A carga parasitária é representada pelo número absoluto de *Leishmania* por macrófago. De acordo com o resultado obtido, não se observa uma diferença expressiva no percentual de infecção nem no número de *Leishmania* por macrófago entre as células BMMΦ-TSP0down e BMMΦ-control. Porém, houve um aumento não significativo no percentual de infecção nas células BMMΦ-TSP0down infectadas por *L. amazonensis* e por *L. major* após 12h de infecção (Figura 8A) e após 12h de infecção seguidas de adicionais 48h de incubação (Figura 8C). Nas células BMMΦ-TSP0down infectadas por *L. amazonensis* há um aumento no percentual

de infecção de aproximadamente 11% após 12h de infecção e após 12h de infecção seguidas de adicionais 36h de incubação, quando com paradas com a infecção nas células BMM Φ -controle. Já para as células BMM Φ -TSPOdown infectadas por *L. major*, o aumento no percentual de infecção observado foi de 20% e 17% nos tempos de 12h e 12h+36h, respectivamente, quando comparadas às células BMM Φ -controle.

6.4 SUPEREXPRESSÃO DE TSPO EM BMM Φ

Com o intuito de se obter células superexpressando a TSPO, BMM Φ foram transfectados e imunomarcados. A marcação da TSPO nas células não transfectadas, nas células superexpressando a TSPO (BMM Φ -TSPO) e nas células controle (BMM Φ -Vazio) estão ilustradas na Figura 9 e o resultado da quantificação da intensidade de fluorescência na Figura 10.



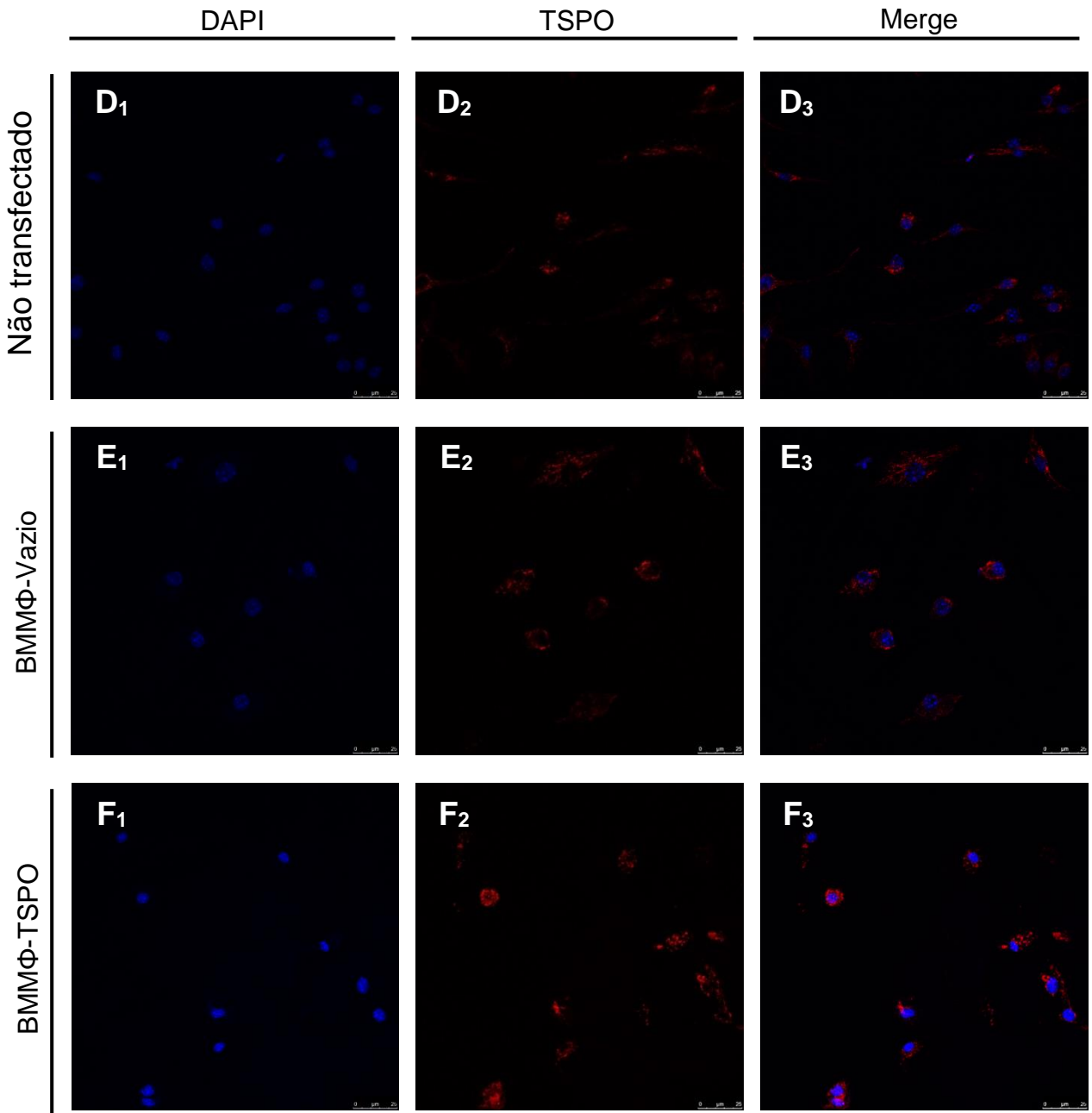


Figura 9 – Superexpressão da TSPO em BMMΦ. Macrófagos derivados de medula óssea foram transfectados ou não (A e D) com os plasmídeos pcDNA6.2 (B e E) ou pcDNA6.2-TSPO (C e F) e plaqueadas em placas de 24 poços por 24h (A-C) ou 48h (D-F). Posteriormente, estas células foram fixadas com PFA 4% e imunomarcadas com o anticorpo anti-TSPO (Everest) na diluição de 1:50 (vermelho). Então, estas células tiveram o núcleo corado com DAPI (azul) e observadas em microscópio confocal sob a magnitude de 200x.

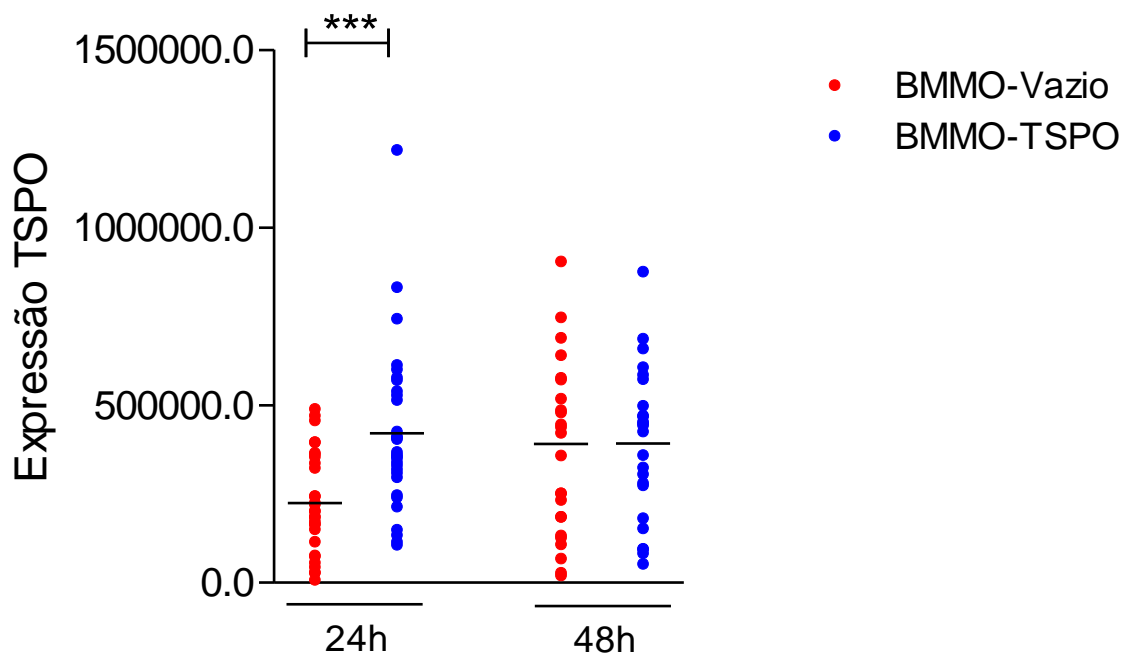


Figura 10 – Quantificação da superexpressão da TSPO em BMMΦ. Macrófagos derivados de medula óssea foram transfectados com os plasmídeos pcDNA6.2 ou pcDNA6.2-TSPO, e, após 24h ou 48h foram fixadas com PFA 4%. Posteriormente, foram imunomarcadas com o anticorpo anti-TSPO e montadas em lâminas com o corante de núcleo DAPI. Teste *t* de Student ** $p < 0,0005$.

Essas células tiveram o seu nível de expressão da TSPO estimado através da quantificação da fluorescência de trinta células, tendo as seguintes médias de expressão: BMMΦ-Vazio 24h: 224910; BMMΦ-TSPO 24h: 420835; BMMΦ-Vazio 48h: 369537; BMMΦ-TSPO 48h: 391605. No tempo de 24h após a transfecção, observou-se um aumento estatisticamente significativo da expressão da TSPO nas células transfectadas com o plasmídeo contendo o inserto desta proteína, em comparação com as células transfectadas com o plasmídeo controle (Teste *t* de Student * $p < 0,0005$). Observa-se que o nível da expressão da TSPO nas células BMMΦ-TSPO estava aumentado em cerca de

2 vezes, quando comparado à expressão dessa proteína nas células BMM Φ -Vazio. Já no tempo de 48h após a transfecção, não foi observada diferença da expressão da TSPO entre as células BMM Φ -TSPO e controle (BMM Φ -Vazio).

6.5 EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DA TSPO SOBRE O CURSO DA INFECÇÃO DE BMM Φ POR *L. AMAZONENSIS* OU *L. MAJOR*

O papel da TSPO na infecção de BMM Φ transfectados e infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* foi analisado através do percentual de infecção e carga parasitária, mostrados na Figura 11.

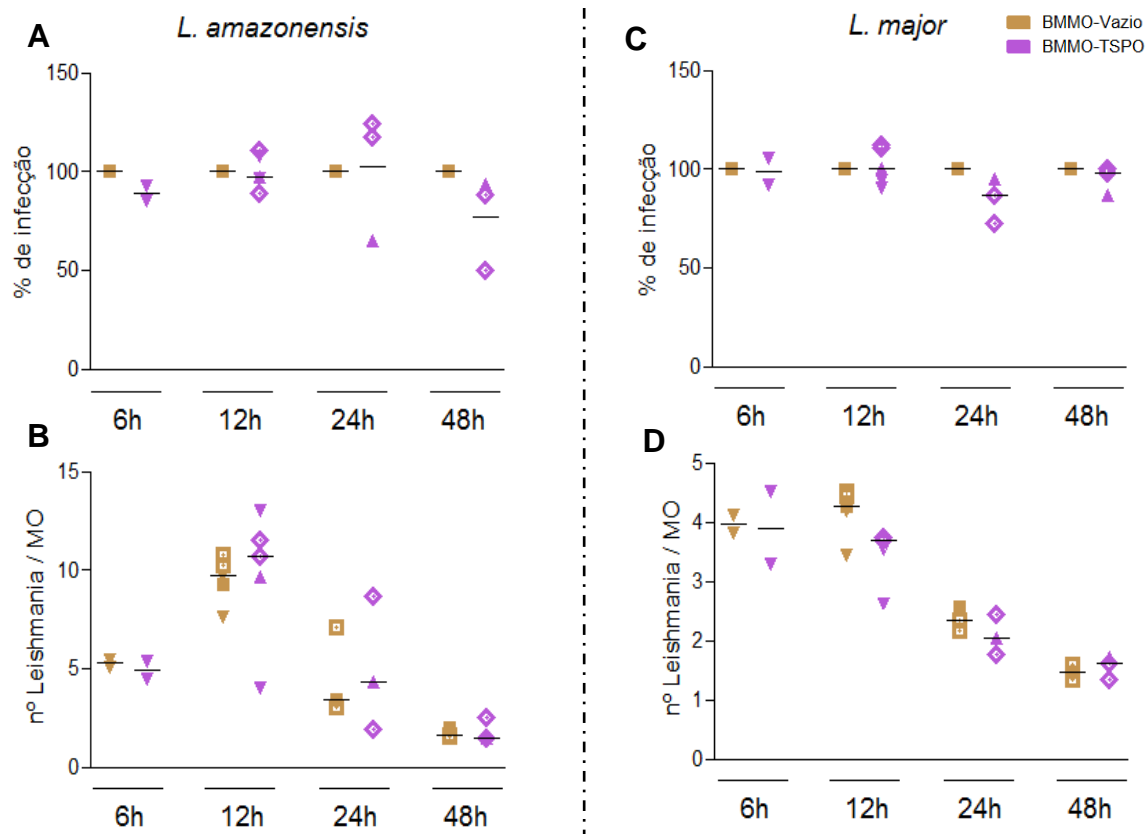


Figura 11 – Efeito da superexpressão da TSP0 sobre o curso da infecção de BMMΦ por *Leishmania* spp.. BMMΦ-Vazio e BMMΦ-TSPO foram plaqueados em placas de 24 poços e infectados por *L. amazonensis* (A e B) ou *L. major* (C e D) na proporção de 10:1. Após 6h de infecção foi fixado o primeiro grupo e, após mais 6h, foi realizada a lavagem dos outros grupos para remoção de parasitos não internalizados e a fixação do tempo de 12h de infecção. Depois de adicionais 24h ou 48h essas células foram também fixadas e as lamínulas foram montadas com Vectashield com DAPI. As células infectadas foram observadas em microscópio de fluorescência sob aumento de 1000x, sendo analisados a carga parasitária e o percentual de infecção de cada grupo. Em cada lamínula foram contabilizadas, no mínimo, 200 células. Os símbolos representam cada experimento realizado de forma independente.

O percentual de infecção nas células BMMΦ-TSPO é representado pela diferença em relação ao controle, considerado como 100% de infecção, correspondendo a uma média de: La 6h: 89%; La 12h: 99,99%; La 24h: 101,08%; La 48h: 98,42%; Lm 6h: 99,21%; Lm 12h: 101,47%; Lm 24h: 85,93%; Lm 48h: 98,55%. A carga parasitária é representada pelo número absoluto de *Leishmania* por macrófago. Como demonstrado no resultado acima, não foi possível observar uma diferença acentuada no percentual de infecção nem no número de *Leishmania* por macrófago em células BMMΦ-TSPO em comparação às células controle (BMMΦ-Vazio). Entretanto, ocorreu uma diminuição não significativa no percentual de infecção nas células BMMΦ-TSPO infectadas por *L. amazonensis* após 6h de infecção e após 12h de infecção seguidas de adicionais 48h de incubação (Figura 11A) e nas células BMMΦ-TSPO infectadas por *L. major* após

24h de infecção (Figura 11C), sendo de 11%, 22% e 15%, respectivamente, quando comparadas com as células BMMΦ-Vazio.

6.6 EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DA TSPO SOBRE A VIABILIDADE INTRACELULAR DE *LEISHMANIA* SPP.

Como parâmetro adicional para determinar o papel da TSPO no curso da infecção, avaliamos a viabilidade intracelular de *L. amazonensis* ou *L. major* em BMMΦ superexpressando a TSPO (Figura 12).

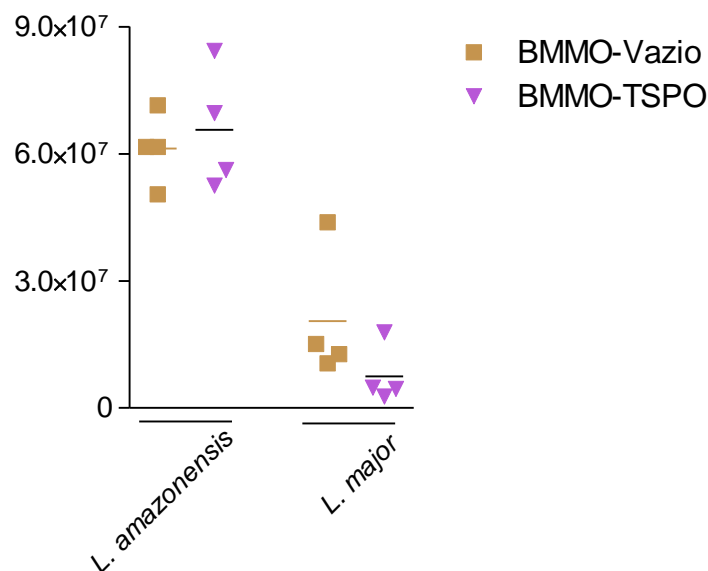


Figura 12 – Efeito da superexpressão da TSPO em BMMΦ sobre a viabilidade intracelular de *Leishmania* spp.. BMMΦ-TSPO e BMMΦ-Vazio foram infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* (B) na proporção de 10:1. Após 12h de infecção foi realizada a lavagem dos poços para a remoção de parasitos não internalizados e a adição de meio Schneider completo. Após 5 dias, a viabilidade dos parasitos intracelulares foi avaliada a partir da contagem de formas promastigotas em microscópio óptico, utilizando câmaras de Neubauer, sob aumento de 20x. Os resultados são demonstrados com as medianas correspondentes a um experimento realizado em quadruplicata.

A Figura 12 ilustra que a superexpressão da TSPO em BMMΦ não alterou a viabilidade intracelular de *L. amazonensis*. No entanto, em células BMMΦ-TSPO infectadas por *L. major*, houve uma redução expressiva de aproximadamente 63% na viabilidade intracelular destes parasitos, quando comparada com as células BMMΦ-Vazio. Esses achados indicam que, apesar,

da TSPO, aparentemente, não ter papel na infecção de BMM Φ (percentual de macrófagos infectados, número de Leishmania por macrófago e viabilidade intracelular) por *L. amazonensis*, sua superexpressão modula negativamente a viabilidade intracelular de *L. major*.

7. DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliado o papel da TSPO sobre o curso da infecção de BMM Φ por *L. amazonensis* ou *L. major*, utilizando a modulação gênica desta proteína, avaliando os parâmetros de carga parasitária, percentual de infecção e viabilidade intracelular destes parasitos.

Inicialmente, foi demonstrado utilizando *western blot* que a expressão da TSPO em BMM Φ infectados por *L. major* foi, em média, 49% maior do que a expressão desta proteína em BMM Φ infectados por *L. amazonensis*. Nossos resultados estão de acordo com Menezes e colaboradores (2013) que, em um estudo de análise proteômica, demonstraram que macrófagos peritoneais de camundongos CBA mostraram uma expressão maior da TSPO em macrófagos infectados por *L. major*, comparada com a expressão em macrófagos infectados por *L. amazonensis*. No presente estudo, os macrófagos foram infectados por 12h com cada uma das espécies de *Leishmania* e reincubados por mais 6h ou 24h. Anteriormente, nossa equipe observou que, no tempo de 12h de infecção seguido de lavagem dos parasitos não internalizados, e adicionais 6h de incubação foram identificados sete vezes mais peptídeos da TSPO na infecção por *L. major*, quando comparados com a expressão desta proteína durante a infecção por *L. amazonensis* e, no tempo de 12h de infecção e adicionais 24h de incubação, foram encontrados quatro vezes mais peptídeos em macrófagos infectados por *L. major*. Em nossos resultados, a diferença de expressão avaliada por *western blot* foi identificada como estatisticamente significativa apenas no tempo de 12h de infecção, seguida de adicionais 24h de incubação. Essa diferença observada no nosso estudo pode ser devido à diferença da sensibilidade entre as técnicas utilizadas pois, enquanto a análise por proteômica fornece uma avaliação mais ampla do sistema celular (amplo espectro das proteínas presentes, refletindo o estado geral da célula), a análise por *western blot* fornece dados mais específicos sobre o alvo que se pretende estudar, devido à avaliação por meio da detecção com anticorpos específicos (MANN, 2008). Dessa forma, a análise por *western blot* é muitas vezes utilizada para validar dados provenientes de uma análise proteômica. Kirana e colaboradores (2012), por exemplo, utilizaram a técnica de *western blot* (além de imunohistoquímica e *microarrays*) para validar a expressão da proteína

Catepsina D em amostras de pacientes com câncer colo-retal, a partir de uma análise proteômica prévia que indicou ser esta proteína um possível biomarcador (KIRANA et al., 2012). Similarmente, McDonough e colaboradores (2002) utilizaram a técnica de *western blot* em paralelo à análise proteômica de biópsias de pacientes com doenças miocárdicas, com o intuito de melhorar a caracterização do perfil proteico desses pacientes ao longo do tempo e mesmo após cirurgia cardíaca (MCDONOUGH; NEVEROVA; VAN EYK, 2002). Dessa forma, podemos concluir que a análise por *western blot* realizada no nosso estudo, validou a expressão da TSPO indicada na análise proteômica previamente realizada em nosso grupo.

Posteriormente, obtivemos macrófagos com expressão modulada da TSPO por meio de silenciamento ou transfecção e avaliamos o efeito dessa modulação sobre o curso da infecção por *L. amazonensis* ou por *L. major*. No presente estudo foi obtido uma diminuição da expressão da TSPO em 98% nas células submetidas ao silenciamento com o siRNA_TSPO, quando comparadas com as células silenciadas com o siRNA_controle. É bem consolidado na literatura que as proteínas mitocondriais apresentam um tempo de meia vida longo, permanecendo íntegras por um longo período (HILL; WYSE; ANDERSON, 2008). No geral, apenas quando a célula como um todo sofre estresse oxidativo, ocorre uma reciclagem das mitocôndrias, que são então encaminhadas para a via autofágica. Só então ocorre a renovação das proteínas mitocondriais, quando novas mitocôndrias são sintetizadas (LEE; GIORDANO; ZHANG, 2012). Isso significa que a diminuição de mRNA observada por meio de qPCR não indica, necessariamente, que o silenciamento do gene levou à diminuição da expressão da proteína TSPO ativa nas mitocôndrias. Outros trabalhos demonstram, entretanto, que a diminuição da expressão do gene da TSPO em outros modelos celulares leva a modificações em determinadas características do metabolismo dessas células. Em 2007, Li e colaboradores demonstraram que, com uma diminuição de apenas 50% no nível de mRNA para a TSPO em células MDA-MB-231 (linhagem celular de câncer de mama agressivo) por meio de transfecção com siRNA, foi possível observar uma diminuição na velocidade do ciclo celular e na taxa de proliferação destas células, sugerindo que a modulação negativa da TSPO por ligantes antagonistas pode ser utilizada para o tratamento de câncer (LI et al., 2007). Em outro estudo,

a transfecção com plasmídeo *knockout* levou a diminuição da expressão da TSPO em 50% em células MA-10 (células de linhagem derivadas das células de Leydig), no entanto não causou efeito sobre a proliferação destas células, ao passo que diminuiu efetivamente o nível de produção de hormônios esteroides (KELLY-HERSHKOVITZ et al., 1998). Esses dados indicam que o silenciamento da TSPO pode ter diferentes efeitos, dependendo do tipo de célula que está sendo modulada e do tipo de resposta que está sendo analisada. Assim, mesmo obtendo 98% de diminuição da expressão do gene da TSPO, no nosso modelo celular, esse silenciamento não foi eficiente na alteração do percentual de macrófagos infectados por *Leishmania* spp. e no número de *Leishmania* por macrófago infectado.

Entretanto, no presente trabalho, observamos que ocorre um aumento não significativo do percentual de macrófagos infectados nas células que tem a expressão da TSPO diminuída. Foi observado que, na infecção de BMM Φ -TSPOdown por *L. amazonensis* ocorre um aumento de cerca de 11% no percentual de infecção, quando comparado com as células BMM Φ -controle nos tempos de 12h de infecção e de 12h de infecção seguida de mais 48h de incubação, enquanto que na infecção por *L. major* esse aumento foi de 20% e 17% nos tempos de 12h de infecção e de 12h de infecção com adicionais 48h de incubação, respectivamente. A estabilidade da expressão das proteínas mitocondriais ao longo da vida das células pode ser uma justificativa da ausência de uma diferença marcante no curso da infecção em células BMM Φ -TSPOdown quando comparada à infecção em células BMM Φ -controle. Porém, apesar de não observarmos um efeito intenso do silenciamento da TSPO sobre a carga parasitária e o percentual de infecção, essa modulação pode ainda ter efeito sobre a viabilidade intracelular desses parasitos. Assim, experimentos adicionais precisam ser conduzidos para testar essa hipótese.

Com relação às células superexpressando a TSPO, não observamos uma diferença acentuada entre o percentual de BMM Φ -TSPO infectados, quando comparado com o percentual de infecção em BMM Φ -Vazio. Observamos, entretanto, que houve uma diminuição de 11% e 22% no percentual de BMM Φ -TSPO infectados por *L. amazonensis* nos tempos de 6h de infecção e de 12h de infecção seguida de mais 48h de incubação, respectivamente, e de 15% no percentual de macrófagos infectados por *L. major* após 12h de infecção e

adicionais 24h de incubação. Isso mostra que há uma diminuição não significativa desse percentual de infecção quando as células superexpressam a TSPO, em relação às células que não superexpressam essa molécula. É descrito na literatura que a TSPO participa da via apoptótica (VEENMAN, 2007; VEENMAN; SHANDALOV; GAVISH, 2008; RUPPRECHT et al., 2010; VEENMAN; GAVISH, 2012). No nosso trabalho, obtivemos um aumento da expressão da TSPO em cerca de 2 vezes nas células transfectadas com o plasmídeo contendo o inserto da proteína de interesse, em comparação com as células transfectadas com o plasmídeo controle. Este aumento observado pode não ter sido suficiente para causar um efeito sobre o controle no percentual de macrófagos infectados e número de *Leishmania* por macrófago. Entretanto, mesmo não avaliando o índice de células em apoptose no nosso estudo, um aumento exacerbado da expressão desta molécula pode estar induzindo os macrófagos infectados à apoptose e, subsequentemente, promover um controle mais efetivo da infecção por *Leishmania*.

Apesar de não termos visto efeito da superexpressão da TSPO sobre o percentual de infecção e carga parasitária no presente estudo, é descrito na literatura que a superexpressão da TSPO tem efeitos sobre outras funções ligadas ao metabolismo celular. Rechichi e colaboradores (2008) demonstraram que a superexpressão da TSPO em células C6 (células de glioma de ratos) ocasionou o aumento no potencial de proliferação, motilidade e capacidade de transmigração dessas células, além de inibir o crescimento celular induzido por contato (RECHICHI et al., 2008). Similarmente, Zhang e colaboradores (2016) demonstraram em modelo *in vivo* que a superexpressão da TSPO induzida na área do hipocampo de camundongos por meio de injeção com vetores lentivirais levou ao controle da neuroinflamação causada por lipopolissacarídeos (LPS), sendo possível observar uma melhoria na deficiência cognitiva causada pelo LPS (ZHANG et al., 2016). Adicionalmente, foi demonstrado por Li e colaboradores (2017), que a superexpressão da TSPO no hipocampo de camundongos gerou efeitos comportamentais ansiolíticos e antidepressivos significativos (LI et al., 2017). Em conjunto, esses resultados demonstram que, apesar de se observar efeito *in vitro* e *in vivo* da superexpressão da TSPO em outros trabalhos, no presente estudo, a superexpressão em BMM Φ -TSPO (duas

vezes aumentada) não foi eficiente na redução do percentual de macrófagos infectados e número de *Leishmania* por macrófago.

Apesar de não termos observado diferença significativa no percentual de infecção e na carga parasitária entre os macrófagos com expressão aumentada da TSPO e as células controle, quando infectadas por *L. amazonensis* ou por *L. major*, mostramos que as células BMM Φ -TSPO apresentaram uma diminuição média de 63% na viabilidade intracelular de *L. major*. Diversos trabalhos demonstraram que a atividade de modulação gênica por ligantes específicos por meio de determinação da viabilidade intracelular de patógenos se configura em um importante parâmetro a ser analisado quando se avalia curso de infecção. Petersen e colaboradores (2012) demonstraram que o composto 17-AAG, ligante da proteína HSP90, leva à diminuição da viabilidade intracelular de *L. amazonensis* (PETERSEN et al., 2012). Similarmente, Guedes e colaboradores (2018) demonstraram que, utilizando um ligante da TSPO, PK11195, foi possível observar a diminuição da viabilidade intracelular desta mesma espécie de *Leishmania*. Ambos os trabalhos mostraram ser a avaliação da viabilidade intracelular um parâmetro complementar fundamental à carga parasitária e ao percentual de infecção para avaliação da infecção por patógenos intracelulares. Entretanto, a viabilidade/sobrevivência intracelular, por si só, constitui um parâmetro que pode ser considerado como conclusivo para avaliação de efeitos de modulação ou de ligantes sobre a infecção por diferentes parasitos. Oddo e colaboradores (1998), por exemplo, demonstraram que a indução de apoptose em macrófagos humanos infectados por *Mycobacterium tuberculosis* utilizando um ligante do receptor Fas (FasL) ou por indução de TNF- α , leva à diminuição da viabilidade intracelular dessas bactérias (ODDO et al., 1998). Similarmente, Mattos e colaboradores (2014) demonstraram a importância do colesterol do hospedeiro sobre a infecção por *M. leprae* em macrófagos provenientes de biópsias humanas, por meio da avaliação da viabilidade intracelular (MATTOS et al., 2014).

Em conjunto, os achados desse estudo indicam que TSPO tem papel distinto na infecção de BMM Φ infectados por *L. major* ou *L. amazonensis*, já que a modulação genética positiva da TSPO tem um papel no controle da infecção por *L. major* e não por *L. amazonensis*. Adicionalmente, gostaríamos de enfatizar que será fundamental determinar a produção de citocinas e moléculas

microbidas por BMM Φ com expressão modulada da TSPO e infectados por cada uma das espécies de *Leishmania* estudadas, com o intuito de compreender se essas moléculas contribuem para o papel exercido pela TSPO no controle da infecção por *L. major*.

8. CONCLUSÃO

A TSPO tem efeito distinto sobre o curso da infecção de BMM Φ pelas duas espécies de *Leishmania* testadas, pois o aumento da expressão da TSPO tem efeito negativo sobre a sobrevivência intracelular de *L. major*, mas não no controle da infecção *L. amazonensis*.

Estudos adicionais precisam ser conduzidos para consolidar essa conclusão por meio da avaliação da viabilidade intracelular das duas espécies de *Leishmania* em BMM Φ infectados com modulação genética negativa da expressão de TSPO e por meio da investigação da possível participação de citocinas e moléculas microbidas no controle da infecção por *L. major* pela modulação da TSPO em macrófagos murinos.

9. PERSPECTIVAS

- a) Avaliar a produção de citocinas e moléculas leishmanicidas em BMM Φ com expressão modulada da TSPO e infectados por *Leishmania* spp..

10. REFERÊNCIAS

AGUILAR-TORRENTERA, F.; CARLIER, Y. Immunological factors governing resistance and susceptibility of mice to *Leishmania major* infection. **Rev. Latinoam. Microbiol.**, v. 43, n. 3, p. 135-142, 2001.

AKHOUNDI, M. et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.

ALAVI-NAINI, R.; FAZAELI, A.; O'DEMPSEY, T. Topical treatment modalities for old world cutaneous leishmaniasis: A review. **Prague Med. Rep.**, v. 113, n. 2, p. 105-118, 2012.

ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h)1/th2 and *Leishmania*: Paradox rather than paradigm. **Immunol. Lett.**, v. 99, n. 1, p. 17-23, 2005.

ASSREUY, J. et al. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. **Eur. J. Immunol.**, v. 24, n. 3, p. 672-676, 1994.

AUSTIN, C. J. et al. The translocator protein (TSPO): A novel target for cancer chemotherapy. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 45, n. 7, p. 1212-1216, 2013.

BALA, S. et al. Up-regulation of microRNA-155 in macrophages contributes to increased tumor necrosis factor {alpha} (tnf{alpha}) production via increased mrna half-life in alcoholic liver disease. **J. Biol. Chem.**, v. 286, n. 2, p. 1436-1444, 2011.

BALESTIERI, F. M. P. et al. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. **Microbes Infect.**, v. 4, n. 1, p. 23-29, 2002.

BOGDAN, C. et al. Cytokine interactions in experimental cutaneous leishmaniasis. Interleukin 4 synergizes with interferon-gamma to activate murine macrophages for killing of *Leishmania major* amastigotes. **Eur. J. Immunol.**, v. 21, n. 2, p. 327-333, 1991.

BOUYER, G. et al. Erythrocyte peripheral type benzodiazepine receptor/voltage-dependent anion channels are upregulated by plasmodium falciparum. **Blood**, v. 118, n. 8, p. 2305-2312, 2011.

BRADLEY, C. A.; ALTIZER, S. Urbanization and the ecology of wildlife diseases. **Trends Ecol. Evol.**, v. 22, n. 2, p. 95-102, 2007.

BRANDONISIO, O. et al. Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha induce nitric oxide release and enhance parasite killing in *Leishmania infantum*-infected human macrophages. **Clin. Exp. Med.**, v. 2, n. 3, p. 125-129, 2002.

BRASIL. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. p. 120.

CAMPANELLA, M.; TURKHEIMER, F. E. TSPO: Functions and applications of a mitochondrial stress response pathway. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 43, n. 4, p. 593-594, 2015.

CASARIL, A. E. et al. Spatiotemporal analysis of sandfly fauna (diptera: Psychodidae) in an endemic area of visceral leishmaniasis at pantanal, central south america. **Parasit Vectors**, v. 7, n. 364, p. 1-12, 2014.

DAUGHERTY, D. J. et al. A TSPO ligand is protective in a mouse model of multiple sclerosis. **EMBO Mol. Med.**, v. 5, n. 6, p. 891-903, 2013.

De TREZ, C. et al. iNOS-Producing Inflammatory Dendritic Cells Constitute the Major Infected Cell Type during the Chronic *Leishmania major* Infection Phase of C57BL/6 Resistant Mice. **Plos Pathogens**, v. 5, n. 6, p. 494-506, 2009.

DE MENEZES, J. P.; SARAIVA, E. M.; ROCHA-AZEVEDO, B. The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. **Parasit Vectors**, v. 9, n. 1, p. 264, 2016.

DE MENEZES, J. P. et al. Advances in development of new treatment for leishmaniasis. **Biomed. Res. Int.**, v. 2015, p. 815-823, 2015.

DORLO, T. P.; BALASEGARAM, M. BEIJNEN, J. H. DE VRIES, P. J. Miltefosine: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 67, n. 11, p. 2576-2597, 2012.

DUQUE, A.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* survival in the macrophage: where the ends justify the means. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 26, p. 32-40, 2015.

DZIERSZINSKI, F. et al. Ligands of the peripheral benzodiazepine receptor are potent inhibitors of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 10, p. 3197-3207, 2002.

FORESTIER, C. L. et al. Imaging Host Cell-*Leishmania* Interaction Dynamics Implicates Parasite Motility, Lysosome Recruitment, and Host Cell Wounding in the Infection Process. **Cell Host & Microbe**, v. 4, n. 4, p. 319-330, 2011.

GAGNON, E. et al. Endoplasmic Reticulum-Mediated Phagocytosis Is a Mechanism of Entry into Macrophages. **Cell**, v. 110, n. 1, p. 119-131, 2002.

GIUDICE, A. et al. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in tegumentary leishmaniasis. **BMC Infect. Dis.**, v. 7, n., p. 7, 2007.

GOMES, I. N. et al. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. **Microbes Infect.**, v. 5, n. 4, p. 251-260, 2003.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 23-35, 2003.

GUEDES, C. E. S. et al. In vitro evaluation of antileishmanial activity and toxicity of PK11195. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2018.

HILL, R. W.; WYSE, G. A.; ANDERSON, M. **Fisiologia Animal**. Ed. Artmed, 2 ed. p. 73, 2012.

ISSOP, L. et al. Translocator protein-mediated stabilization of mitochondrial architecture during inflammation stress in colonic cells. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0152919, 2016.

JAREMKO, M. et al. Structure of the mammalian TSPO/PBR protein. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 43, n. 4, p. 566-571, 2015.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 9, n. 8, p. 604-615, 2011.

KELLY-HERSHKOVITZ, E. et al. Effects of peripheral-type benzodiazepine receptor antisense knockout on ma-10 Leydig cell proliferation and steroidogenesis. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 10, p. 5478-5483, 1998.

KIRANA, C. et al. Cathepsin d expression in colorectal cancer: From proteomic discovery through validation using western blotting, immunohistochemistry, and tissue microarrays. **Int. J. Proteomics**, v. 2012, n., p. 245819, 2012.

KUMAR, R.; ENGWERDA, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. **Clin. Transl. Immunology**, v. 3, n. 3, p. e13, 2014.

LASKAY, T.; Van ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends Microbiol.**, v. 11, n. 5, p. 210-214, 2003.

LEE, J.; GIORDANO, S.; ZHANG, J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: Cross-talk and redox signalling. **Biochem. J.**, v. 441, n. 2, p. 523-540, 2012.

LEE, J. W. et al. A translocator protein 18 kDa ligand, ro5-4864, inhibits ATP-induced NLRP3 inflammasome activation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 474, n. 3, p. 587-593, 2016.

LEMOS DE SOUZA, V. et al. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. **Microbes Infect.**, v. 2, n. 15, p. 1807-1815, 2000.

LI, F. et al. Evolving understanding of translocator protein 18 kDa (TSPO). **Pharmacol. Res.**, v. 99, p. 404-409, 2015.

LI, L. et al. Overexpression of the 18 kDa translocator protein (TSPO) in the hippocampal dentate gyrus produced anxiolytic and antidepressant-like behavioural effects. **Neuropharmacology**, v. 125, n., p. 117-128, 2017.

LI, W. et al. Peripheral-type benzodiazepine receptor overexpression and knockdown in human breast cancer cells indicate its prominent role in tumor cell proliferation. **Biochem. Pharmacol.**, v. 73, n. 4, p. 491-503, 2007.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumor necrosis factor- α synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **J. Immunol.**, v. 145, n. 12, p. 4306-4310, 1990.

LIEW, F. Y. et al. et al. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. **Eur. J. Immunol.**, v. 21, n. 12, p. 3009-3014, 1991.

LIEW, F. Y. et al. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **J. Immunol.**, v. 144, n. 12, p. 4794-4797, 1990.

LIEW, F. Y.; WEI, X. Q.; PROUDFOOT, L. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. **Philos, Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 352, n. 1359, p. 1311-1315, 1997.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Front. Cell Infect. Microbiol.**, v. 2, n. 83, p. 1-8, 2012.

MANN, M. Can Proteomics Retire the Western Blot? **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 8, p. 3065, 2008.

MATTOS, K. A. et al. *Mycobacterium leprae* intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: A potential target for new drugs for leprosy treatment. **Cell Microbiol.**, v. 16, n. 6, p. 797-815, 2014.

MCDONOUGH, J. L.; NEVEROVA, I.; VAN EYK, J. E. Proteomic analysis of human biopsy samples by single two-dimensional electrophoresis: Coomassie, silver, mass spectrometry, and western blotting. **Proteomics**, v. 2, n. 8, p. 978-987, 2002.

MENEZES, J. P. et al. Proteomic analysis reveals differentially expressed proteins in macrophages infected with *Leishmania amazonensis* or *Leishmania major*. **Microbes Infect.**, v. 15, n. 8-9, p. 579-591, 2013.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. Th1 and th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 145-173, 1989.

MUKBEL, R. M. et al. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 76, n. 4, p. 669-675, 2007.

NYLEN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends Immunol.**, v. 28, n. 9, p. 378-384, 2007.

ODDO, M. et al. Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Immunol.**, v. 160, n. 11, p. 5448-5454, 1998.

OLIVEIRA, L. F. et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the new world. **Acta Trop.**, v. 118, n. 2, p. 87-96, 2011.

PALUMBO, E. Current treatment for cutaneous leishmaniasis: A review. **Am. J. Ther.**, v. 16, n. 2, p. 178-182, 2009.

_____. Oral miltefosine treatment in children with visceral leishmaniasis: A brief review. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 12, n. 1, p. 2-4, 2008.

_____. Treatment strategies for mucocutaneous leishmaniasis. **J. Glob. Infect. Dis.**, v. 2, n. 2, p. 147-150, 2010.

PAPADOPOULOS, V. et al. Translocator protein-mediated pharmacology of cholesterol transport and steroidogenesis. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 408, n., p. 90-98, 2015.

PAPADOPOULOS, V. et al. Translocator protein (18kda): New nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 27, n. 8, p. 402-409, 2006.

PETERS, N. C. et al. In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. **Science**, v. 321, n. 15, p. 970-974, 2008.

PETERSEN, A. L. et al. 17-AAG kills intracellular *Leishmania amazonensis* while reducing inflammatory responses in infected macrophages. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e49496, 2012.

RECHICHI, M. et al. TSPO over-expression increases motility, transmigration and proliferation properties of c6 rat glioma cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1782, n. 2, p. 118-125, 2008.

RODRIGUES, V. et al. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. **Parasit Vectors**, v. 9, n., p. 118, 2016.

RUPPRECHT, R. et al. Translocator protein (18 kda) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 9, n. 12, p. 971-988, 2010.

RYBNIKER, J. et al. Treatment of visceral leishmaniasis with intravenous pentamidine and oral fluconazole in an HIV-positive patient with chronic renal failure--a case report and brief review of the literature. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 14, n. 6, p. e522-525, 2010.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nat. Immunol.**, v. 3, n. 11, p. 1041-1047, 2002.

SCHUG, T. T. et al. Myeloid deletion of SIRT1 induces inflammatory signaling in response to environmental stress. **Mol. Cell Biol.**, v. 30, n. 19, p. 4712-4721, 2010.

SELVARAJ, V.; STOCCO, D. M. The changing landscape in translocator protein (TSPO) function. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 26, n. 7, p. 341-348, 2015.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 485-497, 2012.

SRIVASTAVA, S. et al. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. **Parasit Vectors**, v. 9, n. 1, p. 277, 2016.

STACEY, K. J.; SWEET, M. J.; HUME, D. A. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. **J. Immunol.**, v. 157, n. 5, p. 2116-2122, 1996.

VAN ASSCHE, T. et al. *Leishmania*-macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 51, n. 2, p. 337-351, 2011.

VEENMAN, L.; PAPADOPOULOS, V.; GAVISH, M. Channel-like functions of the 18-kda translocator protein (TSPO): Regulation of apoptosis and steroidogenesis as part of the host-defense response. **Curr. Pharm. Des.**, v. 13, n. 23, p. 2385-2405, 2007.

VEENMAN, L.; GAVISH, M. The role of 18 kda mitochondrial translocator protein (TSPO) in programmed cell death, and effects of steroids on TSPO expression. **Curr. Mol. Med.**, v. 12, n. 4, p. 398-412, 2012.

VEENMAN, L.; PAPADOPOULOS, V.; GAVISH, M. Channel-like functions of the 18-kDa translocator protein (TSPO): Regulation of apoptosis and steroidogenesis as part of the host-defense response. **Curr. Pharm. Des.**, v. 13, n. 23, p. 2385-2405, 2007.

VEENMAN, L.; SHANDALOV, Y.; GAVISH, M. VDAC activation by the 18 kDa translocator protein (TSPO), implications for apoptosis. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 40, n. 3, p. 199-205, 2008.

VERAS, P. S. T.; DE MENEZES, J. P. B. Using proteomics to understand how *Leishmania* parasites survive inside the host and establish infection. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 17, n. 8, p., 2016.

VINET, A. F. et al. The *Leishmania donovani* Lipophosphoglycan Excludes the Vesicular Proton-ATPase from Phagosomes by Impairing the Recruitment of Synaptotagmin V. **Plos Pathogens**, v. 5, n. 10, p. 628-641, 2009.

WEISCHENFELDT, J.; PORSE, B. Bone marrow-derived macrophages (BMMO): Isolation and applications. **CSH Protoc.**, v. 2008, n., p. pdb prot5080, 2008.

WHO. **Leishmaniasis**. Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em 08 dez. 2017.

WORTMANN, G. et al. Liposomal amphotericin b for treatment of cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 83, n. 5, p. 1028-1033, 2010.

ZHANG, H. et al. Over-expression of TSPO in the hippocampal CA1 area alleviates cognitive dysfunction caused by lipopolysaccharide in mice. **Brain Res.**, v. 1646, n., p. 402-409, 2016.

ZIJLSTRA, E. E. Pkd1 and other dermal lesions in HIV co-infected patients with leishmaniasis: Review of clinical presentation in relation to immune responses. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 11, p. e3258, 2014.

