

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

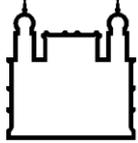
**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**THAÍS MARTINS PEREIRA**

Papel das proteínas ABCG1, ABCG4, HMGCoA redutase e ORP1L na  
homeostasia de colesterol em *Leishmania* spp

Rio de Janeiro

2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

THAÍS MARTINS PEREIRA

Papel das proteínas ABCG1, ABCG4, HMGCoA redutase e ORP1L na  
homeostasia de colesterol em *Leishmania* spp

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte  
dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em  
Ciências, área de concentração: Biologia Celular e  
Molecular.

**Orientador:** Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos

RIO DE JANEIRO

2018

Martins Pereira, Thaís.

Papel das proteínas ABCG1, ABCG4, HMGCoA redutase e ORP1L na homeostasia de colesterol em *Leishmania* spp / Thaís Martins Pereira. - Rio de Janeiro, 2018.

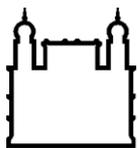
112f f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientador: Eduardo Caio Torres dos Santos.

Bibliografia: f. 87-96

1. *Leishmania* spp. 2. Colesterol. 3. Biossíntese de esteróis. 4. Transportadores. 5. Lipídeos. I. Título.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

AUTORA: THAÍS MARTINS PEREIRA

Papel das proteínas ABCG1, ABCG4, HMGCoA redutase e ORP1L na homeostasia de colesterol em *Leishmania* spp

ORIENTADOR: Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos

Aprovada em: 10/10/2018

EXAMINADORES:

- Dra. Patricia Cuervo Escobar- Presidente  
Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ
- Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva  
Faculdade de Ciências Médicas, UERJ
- Dr. Rubens Lima do Monte Neto  
Centro de Pesquisa René Rachou, FIOCRUZ

SUPLENTE:

- Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto-revisor (IOC, FIOCRUZ)
- Dra. Flávia Lima Ribeiro Gomes (IOC, FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 10 de outubro de 2018

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, sob a orientação do Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos, com doutorado sanduiche na School of Medicine, Indiana University/Purdue University, Indianapolis, Indianapolis – Estados Unidos da América, sob a supervisão da Dra. Stacey Gilk.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico essa tese a minha avó, Neyde de Oliveira Martins, e aos meus pais, Edna das Graças Martins Pereira e Jorge Luiz Peixoto Pereira.

## AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais que foram incríveis ao longo desta caminhada, sempre me apoiando e acreditando que eu poderia superar todas as dificuldades encontradas. A vocês todo o meu agradecimento e amor.
- À minha avó Neyde que é minha inspiração e minha fé.
- Ao meu tio Edson que sempre acreditou e me incentivou nas decisões tomadas.
- Ao meu orientador Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos, por ter aberto as portas do laboratório para mim, por ter depositado confiança na realização do trabalho, por ter sido sempre receptivo a conversas e discussões. Sou muito grata pela orientação e amizade desenvolvida nesses 4 anos.
- Ao Dr. Valter Viana de Andrade-Neto que sempre esteve disposto a me ajudar em tudo na tese, desde a parte de bancada até as discussões científicas. Ao Dr. Edézio Cunha-Júnior por toda ajuda durante esses quatro anos.
- Ao MSc. Marcio Mantuano pelas ajudas nas discussões, por ter ido inúmeras vezes ao citômetro comigo mesmo com situações que dificultaram a sua presença. Muito obrigada!
- Às Dras. Marilene Marcuzzo e Leonor Leon por terem sido sempre uma grande fonte de inspiração e aos demais membros do Laboratório.
- À Dra. Elisa Cupolillo e Camila Braga que me ajudaram com a caracterização das espécies de *Leishmania* trabalhadas.
- Ao Dr. Vinicius Cotta de Almeida e à MSc. Raquel Martins pelo uso do microscópio confocal.
- Às Plataformas de Sequenciamento de DNA e Citometria de Fluxo do IOC-FIOCRUZ/RJ.
- À Dra. Stacey Gilk por ter me recebido no seu laboratório, ter acreditado na proposta sem medir esforços para que eu atingisse o meu objetivo, por estar sempre disposta a conversas e sempre preocupada em como melhorar os resultados. À pós-doc do laboratório, Tatiana Clemente, e ao seu marido, Leonardo Augusto, por terem me recebido tão bem e me acolhido neste período. Muito obrigada!
- Aos meus amigos Gabrielle Barcellos, Elisa Pereira, Yago Emiliano, Job Domingos e Juliana Pacheco por terem tornado os meus dias sempre mais divertidos e leves. Passamos por muita coisa juntos: risadas, cafés, ansiedades, lágrimas e conselhos. Obrigada, amigos!
- A Deus por me dar a oportunidade de vivenciar o doutorado, pela força nos momentos de dificuldade e me permitir chegar ao final do 4º ano de doutorado.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes” Martin Luther King

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### **Papel das proteínas ABCG1, ABCG4, HMGC<sub>o</sub>A redutase e ORP1L na homeostasia de colesterol em *Leishmania* spp**

#### **RESUMO**

#### **TESE DE DOUTORADO**

**Thaís Martins Pereira**

Na biossíntese de colesterol em células de mamíferos, a HMGC<sub>o</sub>A redutase é a enzima limitante da velocidade de síntese. Os tripanossomatídeos têm a sua própria maquinaria para a síntese de esteróis, sintetizando esteróis com esqueleto ergostano. No entanto, uma alta porcentagem de colesterol exógeno é encontrada em *Leishmania* spp. O transporte de colesterol e outros esteróis em sua forma livre ainda não está bem descrito nesses parasitos, estando as proteínas ABCG1 e ABCG4 relacionadas com o transporte de colesterol e fosfolipídeos em mamíferos. O genoma de *Leishmania* spp. tem 42 genes da família ABC, mas suas funções ainda estão sendo elucidadas. Em relação à célula hospedeira, a ORP1L é uma proteína presente nos endossomas tardios que interage com o retículo endoplasmático quando a célula apresenta baixos níveis de colesterol. Além disso, a ORP1L já foi identificada no vacúolo parasitóforo de *Coxiella burnetii*, que é semelhante ao de *Leishmania* spp. Neste trabalho visamos compreender o papel de algumas enzimas e transportadores na homeostase de esteróis de *Leishmania* spp. Para estudar o papel da HMGC<sub>o</sub>A redutase, da ABCG1 e da ABCG4, foram produzidas cepas de *Leishmania* spp. superexpressando esses genes. As promastigotas ABCG1<sup>high</sup> e o HMGC<sub>o</sub>A<sup>high</sup> apresentaram significativa resistência ao cetoconazol, inibidor da biossíntese de ergosterol (5 vezes e 4 vezes, respectivamente). Após os testes de suscetibilidade, investigamos a infectividade de cada cepa e observamos que a superexpressão dos genes ABCG1 e 4, levaram a redução na infectividade do parasito. Em relação à atividade anti-mastigota, HMGC<sub>o</sub>A<sup>high</sup> foi resistente ao cetoconazol e à terbinafina; entretanto, ABCG1<sup>high</sup> e ABCG4<sup>high</sup> foram sensíveis à terbinafina. Em seguida avaliamos o perfil de esteróis dos parasitos após o tratamento com terbinafina e cetoconazol em meio completo; as cepas ABCG4<sup>high</sup> e HMGC<sub>o</sub>A<sup>high</sup> não captaram colesterol exógeno com o tratamento, entretanto a ABCG1<sup>high</sup> captou colesterol do meio de forma dose dependente. O perfil de esteróis em meio deslipídado com oferta ou não de colesterol solúvel não apresentou diferença para a cepa HMGC<sub>o</sub>A<sup>high</sup>, mas a cepa ABCG4<sup>high</sup> incorporou menos colesterol solúvel que o controle. Depois disso, avaliamos a captação de NBD-colesterol por citometria de fluxo, em estresse nutricional (privação de esteróis no meio de cultura). As cepas HMGC<sub>o</sub>A<sup>high</sup> e ABCG4<sup>high</sup> aumentaram a captação de colesterol até 4 h após a incubação; entretanto, a ABCG1<sup>high</sup> fez efluxo do colesterol. Para estudar a ORP1L, transfectamos células HeLa e Raw com ORP1L-GFP e detectamos sua presença no vacúolo parasitóforo por fluorescência. Em conjunto, esses resultados mostram que a enzima HMGC<sub>o</sub>A redutase e os transportadores ABCG1 e ABCG4 desempenham um papel na homeostasia de esteróis e que ORP1L está presente no vacúolo parasitóforo de *Leishmania amazonensis*.

Palavras-chave: *Leishmania* spp., colesterol, biossíntese de esteróis, transportadores, lipídeos.

# INSTITUTO OSWALDO CRUZ

## The role of ABCG1, ABCG4, HMGC<sub>o</sub>A reductase and ORP1L in sterol homeostasis of *Leishmania* spp

### ABSTRACT

### DOCTORAL THESIS

**Thaís Martins Pereira**

In the biosynthesis of cholesterol in mammalian cells, HMGC<sub>o</sub>A reductase is the rate-limiting enzyme of synthesis. Trypanosomatids have their own machinery for the synthesis of sterols, synthesizing sterols with ergostane skeleton. However, a high percentage of exogenous cholesterol is found in *Leishmania* spp. The transport of cholesterol and other sterols in their free form is still not well described in these parasites, with ABCG1 and ABCG4 proteins being related to the transport of cholesterol and phospholipids in mammals. The genome of *Leishmania* spp. has 42 genes from the ABC family, but their functions are still being elucidated. Regarding the host cell, ORP1L is a protein present in late endosomes that interacts with the endoplasmic reticulum when the cell has low levels of cholesterol. In addition, ORP1L has already been identified in the parasitic vacuole of *Coxiella burnetii*, which is similar to *Leishmania* spp. In this work we aim to understand the role of some enzymes and transporters in the sterol homeostasis of *Leishmania* spp. To study the role of HMGC<sub>o</sub>A reductase, ABCG1 and ABCG4, *Leishmania* spp. strains were produced by overexpressing these genes. The ABCG1<sup>high</sup> promastigotes and HMGC<sub>o</sub>A<sup>high</sup> showed significant resistance to ketoconazole, inhibitor of ergosterol biosynthesis (5-fold and 4-fold, respectively). After the susceptibility tests, we investigated the infectivity of each strain and observed that the overexpression of the ABCG1 and 4 genes led to a reduction in infectivity of the parasite. Regarding anti-mastigote activity, HMGC<sub>o</sub>A<sup>high</sup> was resistant to ketoconazole and terbinafine; however, ABCG1<sup>high</sup> and ABCG4<sup>high</sup> were sensitive to terbinafine. We then evaluated the sterol profile of the parasites after treatment with terbinafine and ketoconazole in complete medium; the ABCG4<sup>high</sup> and HMGC<sub>o</sub>A<sup>high</sup> strains did not capture exogenous cholesterol with the treatment, whereas ABCG1<sup>high</sup> captured cholesterol from the medium in a dose-dependent manner. The profile of sterols in a delipidated medium with or without soluble cholesterol showed no difference for the HMGC<sub>o</sub>A<sup>high</sup> strain, but the ABCG4<sup>high</sup> strain incorporated less soluble cholesterol than the control. After that, we evaluated the uptake of NBD-cholesterol by flow cytometry in nutritional stress (deprivation of sterols in the culture medium). The HMGC<sub>o</sub>A<sup>high</sup> and ABCG4<sup>high</sup> strains increased cholesterol uptake up to 4h after incubation; however, ABCG1<sup>high</sup> has made cholesterol outflow. To study ORP1L, we transfected HeLa and Raw cells with ORP1L-GFP and detected their presence in the parasitoid vacuole by fluorescence. Taken together, these results show that the enzyme HMGC<sub>o</sub>A reductase and the ABCG1 and ABCG4 transporters play a role in the sterol homeostasis and that ORP1L is present in the vacuole parasitophorous of *Leishmania amazonensis*.

Key words: *Leishmania* spp., cholesterol, sterol biosynthesis, transporters, lipids.

### SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>1</b>
1.1	Epidemiologia das Leishmanioses	2
1.2	<i>Leishmania</i> spp.	3
1.3	Ciclo biológico	4
1.4	Formas clínicas	5
1.5	Tratamento	7
1.6	Os esteróis como alvo farmacológico	9
1.7	Via da biossíntese de esteróis	10
1.8	Relação parasito-hospedeiro	13
1.8.1	Transportadores ABC em <i>Leishmania</i> spp.	14
1.8.2	Regulação de colesterol da célula hospedeira por <i>Leishmania</i> spp.	16
1.8.3	Transporte de colesterol pela ORP1L	17
<b>2</b>	<b>Hipótese</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>Objetivos</b>	<b>22</b>
3.1	Objetivo geral	23
3.2	Objetivos específicos	23
<b>4</b>	<b>Materiais e Métodos</b>	<b>24</b>
4.1	Parasitas	25
4.2	Macrófagos e células de linhagem	25
4.3	Superexpressão em <i>Leishmanias</i> pp.	26
4.4	Sequenciamento dos genes ABCG1, ABCG4 e HMGC <sub>o</sub> A redutase	27
4.5	Avaliação da expressão gênica por qPCR	28
4.6	Curva de crescimento dos parasitos	28
4.7	Atividade antipromastigota	28
4.8	Atividade antiamastigota	29
4.9	Extração de lipídeos	29
4.10	Deslipidação de soro fetal bovino	30
4.11	Análise de lipídeos neutros por cromatografia em camada fina	30
4.12	Captação de NBD-colesterol	31
4.13	Transfecção e infecção em células de linhagem	31
4.13.1	Análise por imunofluorescência	31
4.13.2	Microscopia confocal	32
4.14	Análise estatística	32

<b>5</b>	<b>Resultados</b>	<b>34</b>
5.1	Obtenção de parasitos superexpressando os genes de interesse	35
5.1.1	Clonagem, superexpressão e confirmação	35
5.1.2	Avaliação da expressão gênica por qPCR	40
5.1.3	Curva de crescimento dos parasitos transfectados e selvagens	42
5.1.4	Avaliação do perfil lipídico após a superexpressão	43
5.2	O papel da HMGCoA redutase na regulação da homeostasia do parasito	44
5.2.1	Avaliação da sensibilidade a fármacos	44
5.2.2	Avaliação do perfil de esteróis após o tratamento com inibidores da via de biossíntese de esteróis	49
5.2.3	Avaliação do perfil de esteróis em meio deslipidado	50
5.2.4	Avaliação da captação de esteróis exógenos	52
5.2.5	Expressão relativa de outras enzimas da via de biossíntese de esteróis	53
5.3	O papel da LaABCG4 na regulação do colesterol exógeno do parasito	54
5.3.1	Avaliação da sensibilidade a fármacos	55
5.3.2	Avaliação do perfil de esteróis de LaABCG4 <sup>high</sup> após o tratamento com inibidores da via de biossíntese de esteróis	59
5.3.3	Avaliação da captação de esteróis exógenos	60
5.4	O papel da LmABCG1 na regulação do colesterol exógeno do parasito	62
5.4.1	Avaliação da sensibilidade a fármacos	63
5.4.2	Avaliação do perfil de esteróis após tratamento com inibidores da via de biossíntese de esteróis	67
5.4.3	Avaliação da captação de esteróis exógenos	69
5.5	Localização da ORP1L no vacúolo parasitóforo de <i>Leishmania</i> spp.	71
<b>6</b>	<b>Discussão</b>	<b>76</b>
<b>7</b>	<b>Conclusões</b>	<b>84</b>
<b>8</b>	<b>Referências bibliográficas</b>	<b>86</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Distribuição global da leishmaniose tegumentar	2
Figura 1.2	Distribuição global da leishmaniose visceral	3
Figura 1.3	Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> spp	4
Figura 1.4	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp	5
Figura 1.5	Estruturas químicas do colesterol e ergosterol	11
Figura 1.6	Via de biossíntese de esteróis em <i>Leishmania</i> spp. e <i>T. cruzi</i>	12
Figura 1.7	Estrutura dos transportadores ABC	15
Figura 1.8	Diagrama de domínios da ORP1L	18
Figura 1.9	Mudança conformacional da ORP1L	19
Figura 2.1	Organograma da tese	21
Figura 5.1	Amplificação e clonagem do gene HMGC <sub>o</sub> A redutase	35
Figura 5.2	Amplificação e clonagem do gene ABCG4	36
Figura 5.3	Amplificação e clonagem do gene ABCG1	37
Figura 5.4	Sequenciamento da HMGC <sub>o</sub> A redutase	38
Figura 5.5	Sequenciamento do transportador ABCG4	39
Figura 5.6	Sequenciamento do transportador ABCG1	40
Figura 5.7	Análise da expressão gênica das cepas transfectadas	41
Figura 5.8	Curva de crescimento das cepas transfectadas com LaABCG4 <sup>high</sup> , LaHMGC <sub>o</sub> A <sup>high</sup> , LaPSP e LaWT	42
Figura 5.9	Curva de crescimento das cepas transfectadas com LmABCG1 <sup>high</sup> , LmPSP e LmWT	42
Figura 5.10	Perfil de esteróis das cepas transfectadas sem tratamento	44
Figura 5.11	Confirmação da resistência ao antibiótico de seleção G418	45
Figura 5.12	Sensibilidade de promastigotas LaHMG <sup>high</sup> a fármacos leishmanicida	46
Figura 5.13	Índice de infecção da cepa LaHMG <sup>high</sup>	47
Figura 5.14	Porcentagem de inibição de amastigotas intracelulares da cepa LaHMGC <sub>o</sub> A <sup>high</sup> tratadas com fármacos leishmanicidas	48
Figura 5.15	Perfil de esteróis da cepa LaHMG <sup>high</sup> tratadas com cetoconazol e terbinafina	50
Figura 5.16	Análise de lipídeos neutros de LaHMG <sup>high</sup> por marcação com Bodipy	51
Figura 5.17	Análise do conteúdo de colesterol e ergosterol da LaHMG <sup>high</sup> incubadas ou não com colesterol solúvel	52
Figura 5.18	Captação de NBD-colesterol por LaHMG <sup>high</sup>	53
Figura 5.19	Análise da expressão gênica da C14 desmetilase e C24 metiltransferase em LaHMG <sup>high</sup>	54
Figura 5.20	Confirmação da resistência ao antibiótico de seleção G418	55
Figura 5.21	Sensibilidade da cepa LaABCG4 <sup>high</sup> a fármacos com atividade leishmanicida	56

Figura 5.22	Índice de infectividade da cepa LaABCG4 <sup>high</sup>	57
Figura 5.23	Porcentagem de inibição de amastigotas intracelulares da cepa LaABCG4 <sup>high</sup> tratadas com fármacos com atividade leishmanicida	58
Figura 5.24	Perfil de esteróis da cepa LaABCG4 <sup>high</sup> tratadas com cetoconazol e terbinafina	60
Figura 5.25	Análise do conteúdo de colesterol e ergosterol de LaABCG4 <sup>high</sup> incubadas ou não com colesterol solúvel por TLC	61
Figura 5.26	Captação de NBD-colesterol por LaABCG4 <sup>high</sup>	62
Figura 5.27	Confirmação da resistência ao antibiótico de seleção G418	63
Figura 5.28	Sensibilidade de LmABCG1 <sup>high</sup> a fármacos leishmanicidas	64
Figura 5.29	Índice de infectividade da cepa LmABCG1 <sup>high</sup>	65
Figura 5.30	Porcentagem de inibição de amastigotas intracelulares da cepa da cepa LmABCG1 <sup>high</sup> tratadas com fármacos leishmanicida	66
Figura 5.31	Perfil de esteróis da cepa LmABCG1 <sup>high</sup> tratadas com cetoconazol	68
Figura 5.32	Perfil de esteróis da cepa LmABCG1 <sup>high</sup> tratadas com terbinafina	69
Figura 5.33	Captação de NBD-colesterol por LmABCG1 <sup>high</sup>	71
Figura 5.34	Localização de ORP1L no VP de <i>Leishmania amazonensis</i>	72
Figura 5.35	Localização de ORP1L no VP de <i>Leishmania amazonensis</i>	73
Figura 5.36	Localização de ORP1L no VP de <i>L.amazonensis</i>	74
Figura 5.37	Localização de ORP1L no VP de <i>L.amazonensis</i>	75

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 5.1	IC <sub>50</sub> de 72h da atividade antipromastigota em LaHMG <sup>high</sup>	47
Tabela 5.2	IC <sub>50</sub> de 72h da atividade antiamastigota em LaHMG <sup>high</sup>	48
Tabela 5.3	IC <sub>50</sub> de 72h da atividade antipromastigota em LaABCG4 <sup>high</sup>	57
Tabela 5.4	IC <sub>50</sub> de 72h da atividade antiamastigota em LaABCG4 <sup>high</sup>	59
Tabela 5.5	IC <sub>50</sub> de 72h da atividade antipromastigota em LmABCG1 <sup>high</sup>	65
Tabela 5.6	IC <sub>50</sub> de 72h da atividade antiamastigota em LmABCG1 <sup>high</sup>	67

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

a.a.	Aminoácido
ABC	<i>ATP-binding cassette</i> - cassete de ligação a ATP
Ank	Domínio de repetição de anquirina
ΔAnk	Deleção do domínio de repetição de anquirina
ATP	Trifosfato de adenosina
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNDi	<i>Drugs for Neglected Diseases initiative</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FFAT	<i>Two phenylalanines in an acid tract-motif</i>
GTP	Trifosfato de guanosina
GFP	Proteína fluorescente verde
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMGCoA redutase	Hidroximetilglutaril coenzima A redutase
IC <sub>50</sub>	Concentração que inibe 50% da atividade testada
LmABCG1 <sup>high</sup>	<i>L.major</i> superexpressando o gene da ABCG1
LaABCG4 <sup>high</sup>	<i>L.amazonensis</i> superexpressando o gene da ABCG4
LaHMG <sup>high</sup>	<i>L.amazonensis</i> superexpressando o gene da HMGCoA redutase
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LD	Leishmaniose difusa
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LM	Leishmaniose mucosa
LV	Leishmaniose visceral
LT	Leishmaniose tegumentar
MØ	Macrófago
NADPH	Fosfato de dinucleotídeos de nicotinamida e adenina reduzido
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORP1L	<i>Oxysterol-binding protein –related protein 1L</i>
OSBP	<i>Oxysterol-binding protein</i>
pb	Pares de base
PBS	Solução tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PKDL/LDPC	Leishmaniose dérmica pós-calazar

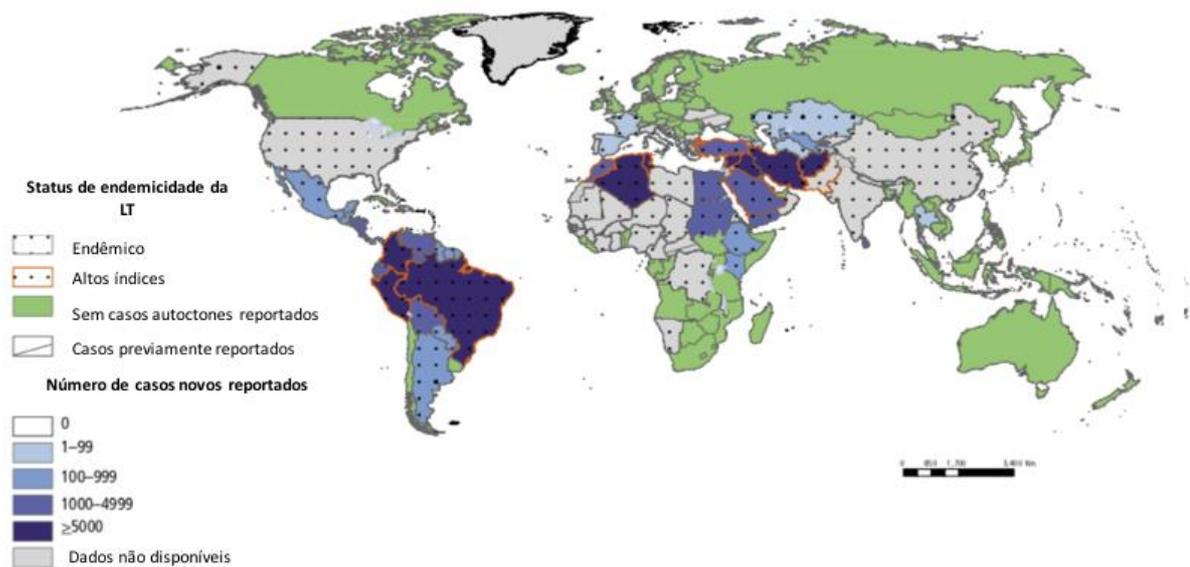
PSP	Plasmídeo PSP72 $\infty$ NEO $\infty$
qPCR	PCR quantitativo
Rab7	Proteína relacionada a Ras-Rab7
RE	Retículo endoplasmático
RILP	<i>Rab Interacting Lysosomal Protein</i>
RFP	Proteína fluorescente vermelha
RPMI	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	Soro fetal bovino
SFBd	Soro fetal bovino deslipidado
TLC	<i>Thin layer chromatography</i> - Cromatografia em camada fina
VAP	<i>Vesicle-associated membrane-protein</i>
VBE	Via de biossíntese de esteróis
VP	Vacúolo parasitóforo
V:V	Volume:volume
WT	<i>Wild type</i> - cepa selvagem
WHO	World Health Organization

# 1. Introdução

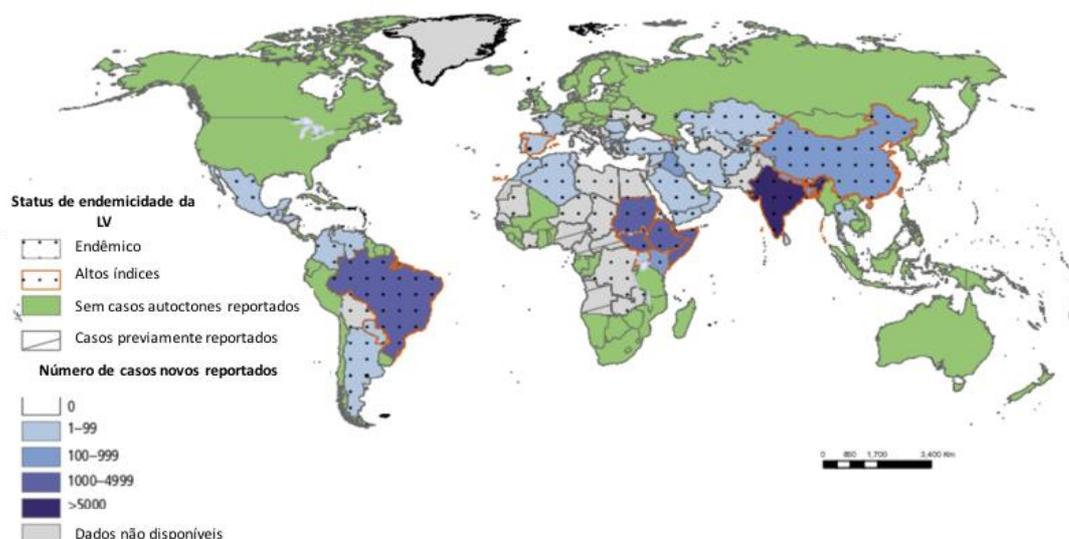
## 1.1 Epidemiologia das leishmanioses

As leishmanioses estão inseridas no grupo de doenças negligenciadas e atingem, em sua maioria, pessoas que tem baixo nível sócio-econômico, residem em países em desenvolvimento, regiões tropicais e viajantes que circulam por regiões endêmicas (CDC, 2018; DNDi, 2018). É uma doença amplamente distribuída, sendo endêmica de 98 países, onde cerca de 350 milhões de pessoas estão susceptíveis a infecção. A prevalência global é de 12 milhões de casos, com incidência anual de 0,2 a 0,4 milhão de casos de leishmaniose visceral e 0,7 a 1,2 milhão de casos de leishmaniose cutânea (Georgiadou et al.; 2015).

Embora a doença seja globalmente distribuída, os casos de leishmaniose tegumentar ocorrem predominantemente em 6 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e Síria (Fig.1.1). Dos casos de leishmaniose visceral, 90% ocorrem em 7 países: Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Brasil, Sudão e Sudão do Sul (Fig.1.2) (DNDi, 2017).



**Figura 1.1- Distribuição global da leishmaniose tegumentar** (Adaptado de WHO, 2017).



**Figura 1.2- Distribuição global da leishmaniose visceral** (Adaptado de WHO, 2017).

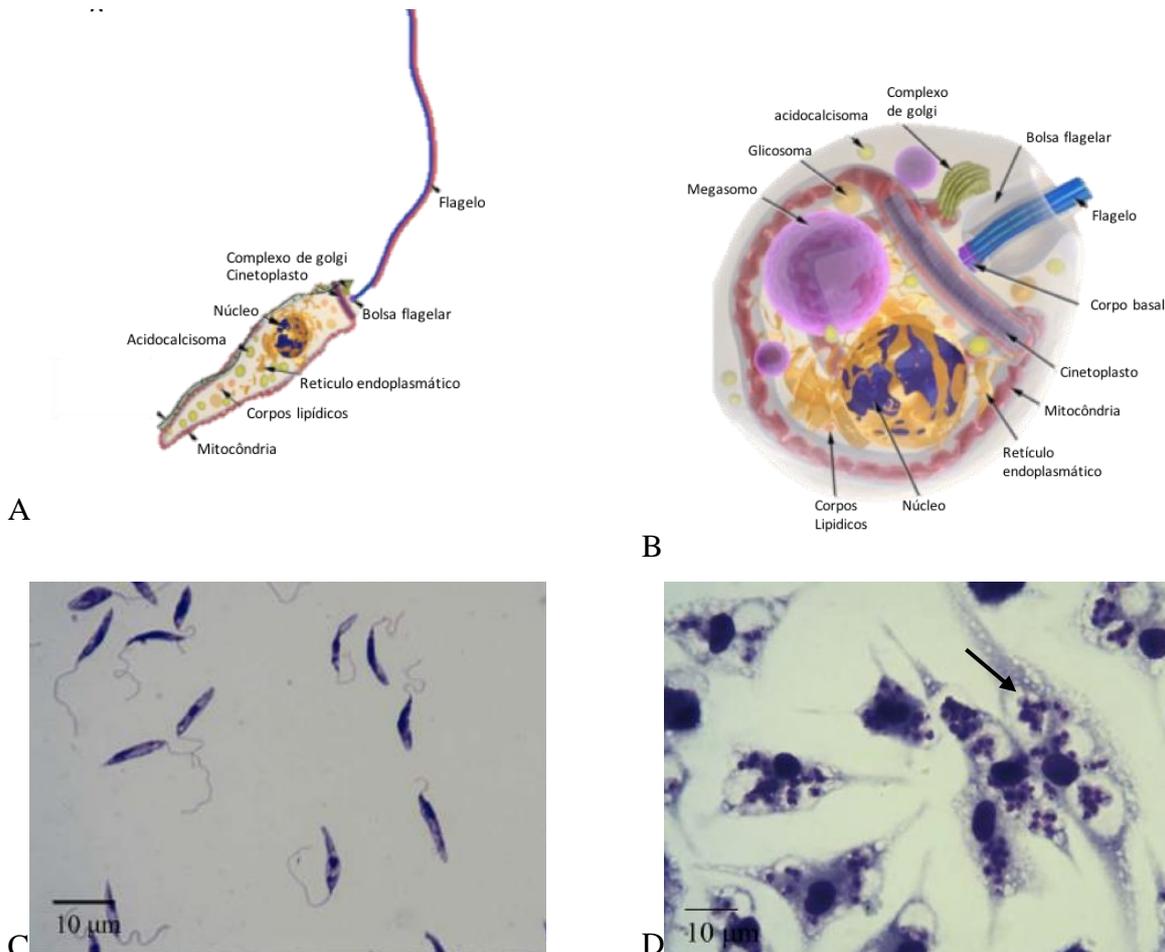
### 1.2 *Leishmania* spp.

Os parasitos do gênero *Leishmania* pertencem a classe kinetoplastida, que tem como característica principal a presença de minicírculos de DNA mitocondrial formando mini e maxi arranjos, denominado de cinetoplasto. Pertencem a família trypanosomatidae, que é constituída por dezena de gêneros de parasitos obrigatórios de animais e plantas, sendo apenas dois considerados de importância médica humana: *Trypanosoma* e *Leishmania* (Rey, 2008).

Atualmente são descritas mais de 20 espécies de *Leishmania*, que são transmitidas por mais de 30 espécies de flebotomíneos. Este gênero possui dois grandes sub-gêneros: *Leishmania* e *Viannia*, que são considerados patogênicos para o homem e que estão relacionadas com as formas clínicas da doença (Laison, 2010).

O parasito apresenta, predominantemente, dois estágios evolutivos: a forma amastigota e promastigota. A forma promastigota é encontrada no hospedeiro invertebrado, e se caracteriza pelo corpo alongado, possuindo uma bolsa flagelar na região anterior do corpo por onde sai o flagelo, núcleo oval e o cinetoplasto em forma de bastão. São formas extremamente móveis (comprimento de 15 a 23µm), capazes de formar grupos celulares nos processos de diferenciação, possuindo diversas formas de transição durante o processo de colonização e migração dentro do hospedeiro invertebrado. Já a forma amastigota é encontrada em células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado, tem formato elipsoide (comprimento de 3 a 6 µm), núcleo oval e grande, um flagelo rudimentar interiorizado na bolsa flagelar. Estas formas não possuem a mesma motilidade que as promastigotas, embora sejam capazes de se locomover de acordo com o tropismo de cada espécie (Teixeira et al., 2013; Sunte & Keith 2017). Ambas formas da *Leishmania* spp. se multiplicam por divisão binária, embora existam

alguns estudos apontando para reprodução sexual neste parasito (Kreutzer et al. 1994; Rougeron et al., 2017) (Fig. 1.3).



**Figura 1.3 -Formas evolutivas de *Leishmania* spp.** A- Ilustração da forma promastigota com as principais estruturas. B- Ilustração da forma amastigota com as principais estruturas. C- Formas promastigotas coradas com Giemsa. D- Macrófago infectado com as formas amastigotas corado com Giemsa. Seta- amastigota (A,B- Adaptado de Teixeira et al., 2013, C,D-Andrade-Neto, 2016)

### 1.3 Ciclo biológico

A leishmaniose é uma zoonose e o parasito é heteroxênico. Os hospedeiros invertebrados são diferentes espécies de flebotomíneos; os hospedeiros vertebrados podem ser uma grande variedade de animais como: roedores, canídeos, marsupiais e equinos. Alguns destes hospedeiros podem se tornar reservatórios da doença, como é o caso dos cães.

O ciclo se inicia no momento que o flebotomíneo faz o repasto sanguíneo em um hospedeiro que esteja infectado, ingerindo amastigotas que estão em células fagocíticas. No trato digestivo do inseto, estas formas se transformam em promastigotas procíclicas, multiplicando-se de forma logarítmica no intestino anterior e médio do inseto. As promastigotas sofrem diversas modificações bioquímicas e morfológicas, em processo denominado de

metaciclo, gerando promastigotas metacíclicas, forma infectante para o vertebrado. As formas metacíclicas migram para a probóscide do inseto e são regurgitadas para o hospedeiro vertebrado no momento do repasto sanguíneo. Uma vez que as formas infectantes estão no vertebrado, estas são fagocitadas por células do sistema fagocítico presente na derme. No momento da fagocitose ocorre a fusão de endossomos e lisossomos, formando o vacúolo parasitário (VP), dentro do qual promastigotas sofrem uma drástica mudança morfológica, diferenciando-se em amastigotas multiplicativas que acabam rompendo a célula após inúmeras etapas de divisão. Uma vez que a célula foi rompida, as formas amastigotas são fagocitadas por outros macrófagos, promovendo um processo inflamatório local ou sistêmico (Fig. 1.4). Após o estabelecimento da infecção e de acordo com a imunidade do hospedeiro, além do tropismo de cada espécie, ocorre o desdobramento da doença que após algumas semanas culmina em diferentes tipos de manifestações clínicas. (Stuart et al., 2008; Belkaid et al., 2000).

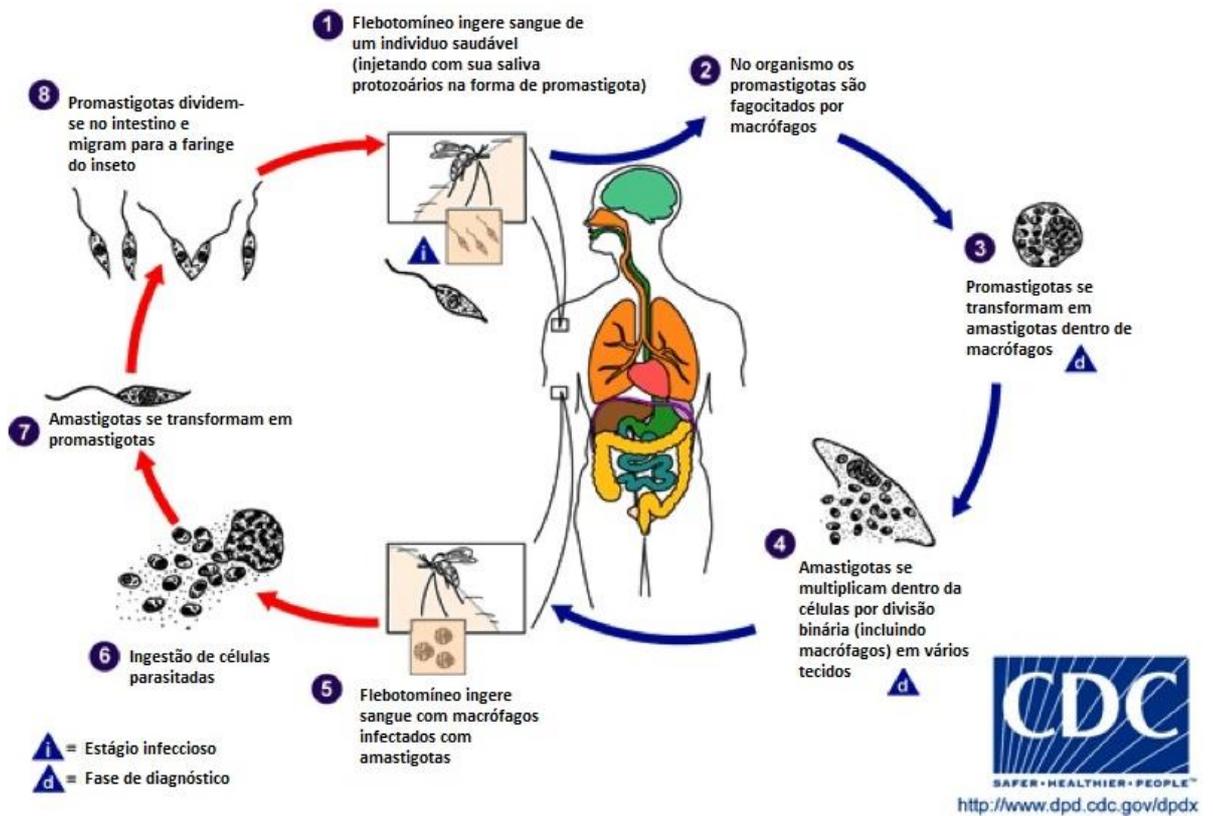


Figura 1.4. Ciclo de biológico de *Leishmania* spp (CDC, 2018).

## 1.4 Formas clínicas

As formas clínicas da doença podem ser divididas em dois grandes grupos: leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT). A LT ainda pode ser dividida em vários subtipos que estão associados a espécie do parasito e a resposta imunológica do hospedeiro (Pacer, 2014;

Ministério da Saúde 2017). Os principais subtipos de LT são: leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose disseminada, leishmaniose difusa e leishmaniose mucocutânea.

-Leishmaniose visceral ou Calazar (LV)→ Esta é considerada a forma mais grave da doença, atingindo vísceras do hospedeiro vertebrado como baço, fígado, medula óssea e tecidos linfoides (Neuber et al., 2008; Rey 2008). A manifestação da doença pode ocorrer de dois meses até um ano após o contato com a forma infecciosa do parasito. Os primeiros sintomas da doença são febre alta irregular ou remitente e diarreia. Em seguida aparecem os sintomas clássicos de esplenomegalia, que pode ser seguido por hepatomegalia. Esta forma quando não tratada pode levar a morte do paciente (Pace 2014). As principais espécies que causam este tipo de manifestação clínica são: *L. infantum* e *L. donovani*.

-Leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL)→ Esta forma de leishmaniose é considerada uma complicação da leishmaniose visceral que acomete geralmente crianças e jovens após alguns anos do tratamento. Controversamente, existem relatos na literatura apontando que esta possa ocorrer mesmo sem tratamento e sem histórico de leishmaniose visceral (Rey; 2008; Asford et. Al 2000; Desjeux et al.,2013). Esta forma é caracterizada por apresentar máculas eritematosas, pequenas úlceras, papilomas lembrando a lepra lepromatosa que estão, normalmente, localizadas na face, pescoço e tronco (Pace, 2014; Zijlstra, E et al., 2000).

-Leishmaniose cutânea localizada (LCL)→ Esta forma geralmente leva até 30 dias para que os primeiros sinais da lesão apareçam, que geralmente inicia no local da picada do inseto (Costa, 2011). As lesões são ulceradas, arredondadas, granulomatosas, com bordas bem definidas, produzem exsudato purulento, indolor e quando não tratadas podem apresentar cura clínica espontânea (Costa, 2011; Ministério da Saúde, 2017; Pace, 2014). As principais espécies que causam esse tipo de leishmaniose são: *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis* (Brito et al., 2012; Fraga et al., 2012).

-Leishmaniose disseminada (LD)→ Esta é a forma mais rara de leishmaniose, podendo ser identificada em torno de 2% de casos (Goto, 2010). Esta forma é caracterizada por múltiplas pápulas com aspecto acneiforme espalhadas pelo corpo do paciente, envolvendo geralmente a face e o tronco. A LD pode aparecer em até 24 h após o aparecimento da lesão cutânea, se caracterizando por uma disseminação do parasito por meio linfático ou hemático (Ministério da Saúde, 2017; Costa, 2011). As duas espécies das américas que estão associadas este tipo de forma clínica são: *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (Ministério da Saúde, 2017).

-Leishmaniose cutânea difusa (LCD)→ Esta forma é considerada rara, porém grave, se caracteriza pela anergia e deficiência de resposta imunológica específica contra antígenos de leishmania. Apresenta evolução lenta com placas não ulceradas e ausência de eficácia

terapêutica. (Ministério da Saúde, 2017). A espécie envolvida é *L. amazonensis* no continente americano; e no continente africano são: *L. tropica* e *L. aethiopica* (OMS, 2010; Ministério da Saúde, 2017).

-Leishmaniose mucocutânea (LM)→ Esta forma é particularmente importante na América do Sul devido ao grande número de casos relatados e a associação de espécies que ocorrem no território e provocam esta forma clínica. As lesões de mucosa são desfigurantes, causando total ou parcial destruição das mucosas da boca, nariz e garganta, além de alguns raros relatos de acometimento das mucosas genitais (Costa, 2011). Na maioria dos casos, ocorre por uma resposta imunológica exacerbada e da evolução crônica de lesões cutâneas. (Maretti et al., 2012; Neuber, 2008; Goto, 2010). No Brasil, a LM é causada principalmente por *L. braziliensis*, mas outras espécies já foram identificadas podendo desencadear a doença, como *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonenses*, *L. peruvia* e *L. major* (Fraga et al., 2012, Andrade-Neto, 2018).

## 1.5 Tratamento

O tratamento de referência para leishmaniose se mantém o mesmo desde a década de 1940, quando foi descoberto que derivados de antimônio pentavalente ( $Sb^{5+}$ ) teriam efeitos menos tóxicos e seriam mais solúveis e estáveis do que o antimônio trivalente ( $Sb^{3+}$ ), que era usado desde a descoberta de sua eficácia em 1912 por Gaspar Vianna (Goodwin, 1995; Sivakumar, 2004). A seguir, uma breve descrição dos tratamentos atualmente disponíveis para a leishmaniose.

- Antimoniais pentavalentes→ Os antimoniais pentavalentes são utilizados como fármacos de primeira linha no tratamento da leishmaniose. Atualmente existem duas formulações comerciais contendo  $Sb^{5+}$ : o antimoniato de N-metilglucamina (antimoniato de meglumina), que é disponibilizado no Brasil com o nome comercial Glucantime; e o estibogluconato de sódio, cujo nome comercial é Pentostam que não é comercializado no Brasil (Ministério da Saúde, 2017). O  $Sb^{5+}$  é conhecido como um pró-fármaco, pois é reduzido dentro do fagolisossomo da célula hospedeira em  $Sb^{3+}$ . (Ephos et al., 1998). Sabe-se que o antimônio inibe enzimas da via glicolítica e da oxidação de ácidos graxos em amastigotas, reduzindo assim a formação de ATP e GTP (Berman, 1988).

Os antimoniais só podem ser aplicados por via intramuscular ou intravenosa, o que os torna fármacos de difícil administração; além disso, já foi demonstrada uma série de efeitos colaterais como artralgia, mialgia, inapetência, cefaleia, febre, vômitos, tontura e edema no local de aplicação. Além de todos esses efeitos, ainda possuem alta cárdio-, nefro- e hepatotoxicidade que limitam o uso em pacientes cardiopatas, nefropatas, hepatopatas, pacientes imunodeprimidos, idosos e gestantes (Almeida et al., 2011; Gasser et al., 1994; Lyra et al., 2016; Oliveira et al., 2011). Outro grande problema do uso dos antimoniais é o crescente aumento de casos de resistência e falha terapêutica, principalmente em países como a Índia, Quênia e Sudão (Ponte-sucre et al., 2017).

- Anfotericina B → Este é o fármaco de segunda escolha para o tratamento da leishmaniose no Brasil. No país, é comercializado como desoxicolato sódico e em formulações lipídicas. O mecanismo de ação da anfotericina B se dá pela afinidade com o ergosterol, que é um esterol presente na membrana de tripanossomatídeos e fungos e ausente em células de mamíferos. Ao se ligar ao ergosterol, forma pequenos poros na membrana plasmática do parasito levando a perda do conteúdo intracelular e a ocasionando morte celular. Embora exista uma maior afinidade pelo ergosterol, a anfotericina B também se liga ao colesterol, o que leva a efeitos adversos no paciente. (Singh et al., 2004). Os efeitos colaterais mais comuns da anfotericina B incluem: náuseas, vômitos, febre, hipopotassemia, insuficiência renal, calafrio, flebite, anafilaxia, trombocitopenia anemia e alterações cardíacas. A alta nefrotoxicidade e o uso endovenoso impedem o uso fora do ambiente hospitalar, o que dificulta muito o tratamento. Visando minimizar esses efeitos colaterais, novas formulações lipídicas foram desenvolvidas como anfotericina B lipossomal (L-AmB - Ambisome), dispersão coloidal de anfotericina B (ABCD - Anfocil) e o complexo lipídico de anfotericina B (ABL - Abelcet). Embora essas formulações estejam se tornando fármacos de destaque para o tratamento, ainda são de alto custo, o que inviabiliza o tratamento da maioria das pessoas afetadas (Amato et al., 2007; Moura et al., 2011; Singh et al., 2009).
- Pentamidina → A pentamidina é uma poliamina sintética do grupo das diamidinas aromáticas, atualmente usada nos casos de resistência aos antimoniais e em alguns casos de LT e LV no Novo Mundo. A pentamidina provoca a morte do parasito por interferir na síntese de DNA, induzindo modificações na morfologia do cinetoplasto e fragmentação mitocondrial (Goto, 2010; David et al. 2009). Esse fármaco é comercializado como isetonato de pentamidina. Os efeitos colaterais são

hipoglicemia/hiperglicemia, dor no local da aplicação, dores de cabeça, hipotensão, síncope, náusea, vômitos, diarreia e cardiotoxicidade (Ministério da Saúde, 2017; Goto, 2010; Singh et al., 2004).

- Miltefosina → A descoberta da ação leishmanicida da miltefosina ocorreu na década de 1980 e desde então existe vários trabalhos mostrando a sua eficácia como fármaco para o tratamento das leishmanioses. Em 2002, iniciaram testes clínicos com o fármaco na Índia, onde hoje é licenciada. Esta droga também apresentou bons resultados na Colômbia e no Paquistão (Moura et al., 2011; Bermam, 2008). A miltefosina é uma fosfolipina administrada por via oral que tem como mecanismo de ação significativas mudanças no metabolismo do parasito, modulação de receptores de superfície, ativação de fosfolipase, proteína cinase C e culminando com indução de apoptose (Verma & Dey, 2004; Pandey et al., 2009, Berman, 2008). Entretanto, apresenta efeitos colaterais como náuseas, vômitos, enjoos e dores de cabeça. Além disso, em regiões como a Guatemala (prevalência de *L. braziliensis* e *L. mexicana*) a taxa de cura foi de apenas 53% (Soto et al., 2004). No Brasil, o tratamento com miltefosina não foi liberado para uso humano, embora alguns testes clínicos já tenham mostrado um percentual de cura de 75% (Machado et al., 2010). Entretanto, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento por meio de nota técnica liberou o uso do Milteforan<sup>TM</sup> para o tratamento de leishmaniose visceral em cães (Ministério da Agricultura, 2016).
- Paromomicina → Este fármaco é um aminoglicosídeo ativo por administração tópica, que inibe a síntese proteica e altera a fluidez e permeabilidade de membrana. Este fármaco também pode ser administrado por via parenteral, o que causa toxicidade renal e dano a um nervo craniano (Singh, 2004; Sundar, 2008).

### 1.6 Os esteróis como alvo farmacológico

Tendo em vista as falhas terapêuticas e os altos níveis de toxicidade dos medicamentos, a busca por novos fármacos ou o reposicionamento torna-se importante. Uma vez que já se sabe que os esteróis são importantes para manutenção e viabilidade celular, os esteróis tornam-se então um alvo farmacológico.

A atividade de inibidores da biossíntese do ergosterol em *Leishmania* spp. tem sido estudada por diversos grupos de pesquisa, uma vez que se tem mostrado evidências de que a

via da biossíntese de esteróis é um bom alvo para o tratamento da leishmaniose (Berman et al 1984, Andrade-Neto et al, 2018). Os microrganismos eucariotos desenvolveram estratégias próprias para atender suas necessidades de esteróis. Por exemplo, *Toxoplasma gondii* não sintetiza esteróis *de novo* e possui mecanismos sofisticados de apropriação de colesterol da célula hospedeira (Portugal et al., 2009). Já os fungos e os tripanossomatídeos *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* possuem uma maquinaria própria de síntese de esteróis, que difere da via dos mamíferos, produzindo esteróis com esqueleto ergostano (Berman et al., 1986). Surpreendentemente, outro tripanossomatídeo, o *T. brucei*, possui um comportamento dual em relação a utilização de esteróis. Quando está no inseto vetor ou é cultivado em sua forma procíclica, é capaz de prover todas suas necessidades com a síntese endógena de ergosterol. Porém, quando está na forma sanguínea, torna-se dependente da captação de colesterol exógeno, sugerindo que esses esteróis possuam funções complementares no parasito (Coppens et al., 1995). Nos tripanossomatídeos em geral, a captação de colesterol se dá, principalmente, através de um receptor de LDL, que é conservado em toda classe Kinetoplastea, incluindo *Leishmania* spp. e *T. cruzi*. Há ocorrência de um percentual expressivo de colesterol nas membranas desses parasitos, sendo em alguns casos é o esterol majoritário, sugerindo um papel biológico crucial para essa molécula (Bastin et al., 1996).

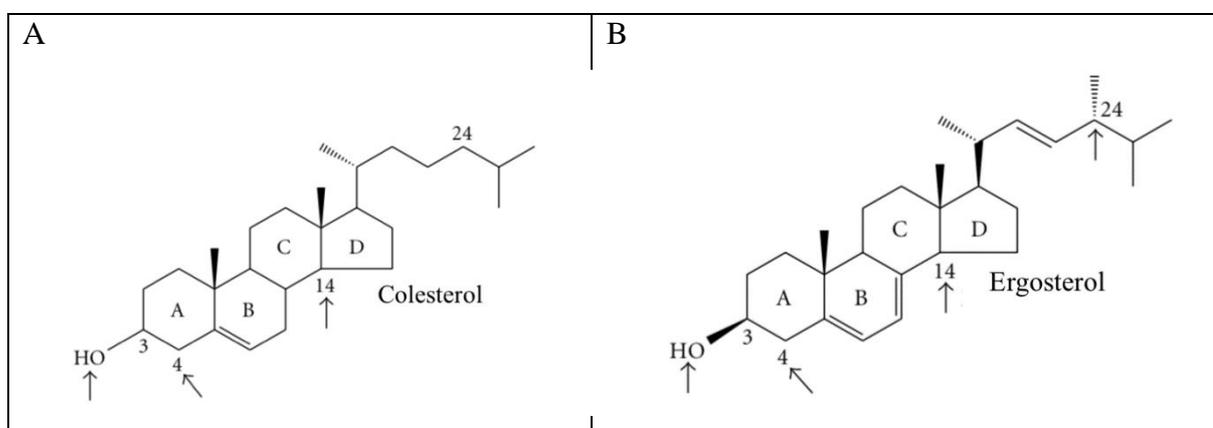
Considerando que a via de biossíntese de esteróis pode ser um bom alvo para o tratamento da leishmaniose, a classe de fármacos a mais estudada é a dos azóis. A grande vantagem dos azóis é que podem ser administrados por via oral e os efeitos colaterais são muito menores quando comparados com os fármacos de referência (Mitropoulos et al., 2010) e, embora ainda sejam necessários mais estudos, evidências mostram que o fluconazol, cetoconazol e itraconazol são bons candidatos para o tratamento. Entretanto, ainda não é seguro manter o tratamento apenas com os azóis (Galvão et al., 2017).

Dentro desta perspectiva, é necessário entender a biologia do parasito e de que forma ele poderia utilizar o colesterol do hospedeiro e modular a própria via de biossíntese de esteróis (VBE).

### 1.7 Via da biossíntese de esteróis (VBE)

Os esteróis constituem o grupo mais abundante de isoprenoides da natureza, constituindo células de eucariotos e procariotos. São componentes essenciais das membranas das células possuindo diversas funções para o crescimento e viabilidade celular, dentre as quais as principais se devem ao fato de serem responsáveis pela permeabilidade e fluidez da membrana (Buckner, 2009).

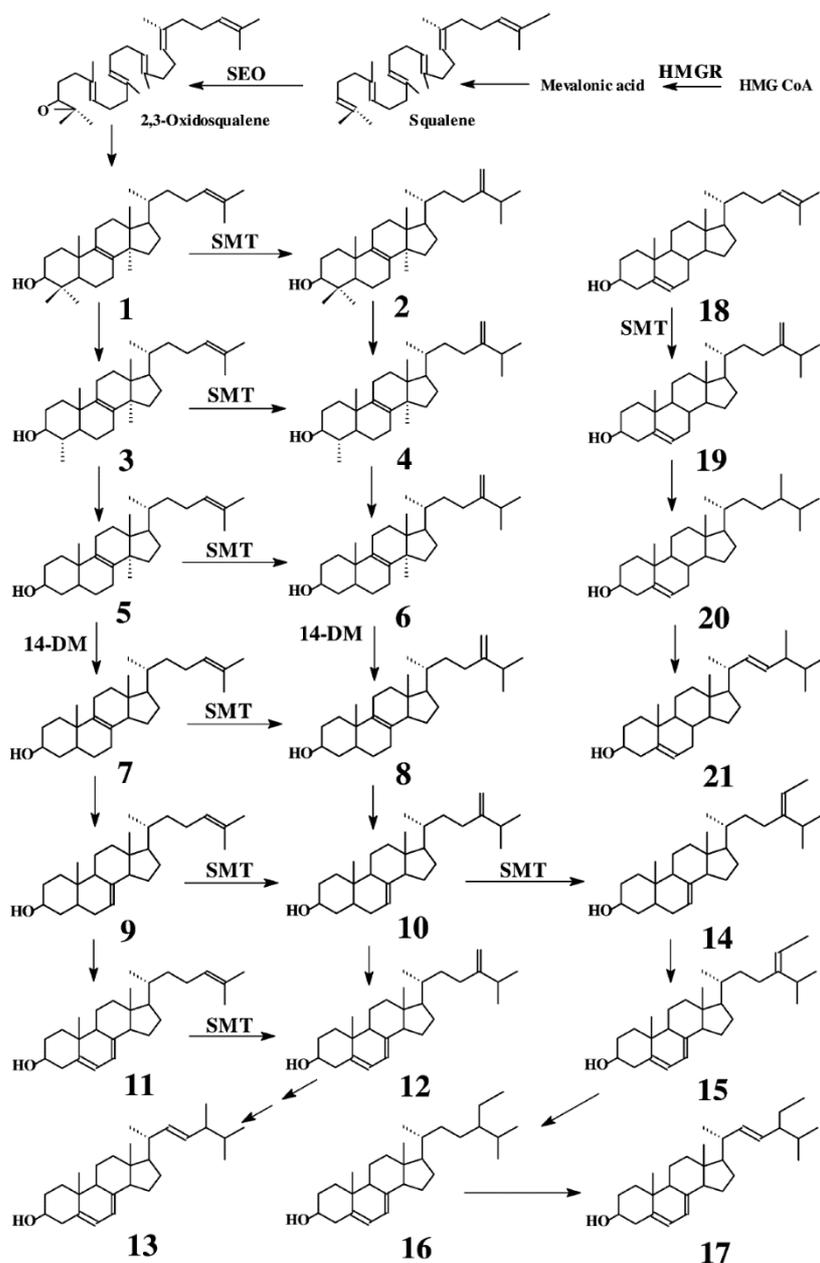
Esta via ocorre em uma série de organismos, possuindo o mesmo ponto de partida em todos os organismos com duas moléculas de acetil-CoA que condensam com outra acetilcoa, originando a HMGCoA, e a partir do zimosterol gerando produtos diferentes embora similares. A diferença entre a via de mamíferos e de tripanossomatídeos está relacionada com o produto final da via; os mamíferos produzem o colesterol, enquanto que os tripanossomatídeos e fungos produzem ergosterol. Estruturalmente, as duas moléculas apresentam semelhanças como os quatro anéis hidrocarbonados fundidos, sendo três deles com seis carbonos e um com cinco (ciclopentanoperidrofenantreno). Por outro lado, a diferença estrutural entre colesterol e ergosterol se deve ao fato dos tripanossomatídeos terem esteróis com esqueleto ergostano metilados no carbono 24 (Fig.1.5) (Almeida-Amaral et al., 2014; Souza & Rodrigues, 2009).



**Figura 1.5.** Estrutura química do (A) colesterol e (B) ergosterol (Adaptado de Souza & Rodrigues, 2009).

O conhecimento da via de biossíntese de esteróis dos tripanossomatídeos foi adquirido em sua maior parte em por estudos relacionados em fungos e só com a identificação do esqualeno, lanosterol, e dimetilzimosterol em *Leishmania* é que foi possível observar a sua semelhança e iniciar os estudos em *Leishmania* spp (Goad et al., 1984; Almeida-Amaral et al., 2014). A via pode ser dividida em quatro grandes estágios. A primeira é a formação do ácido mevalônico, que ocorre pela condensação de duas moléculas de acetil-CoA formando acetoacetil-CoA, que se une com uma terceira molécula de acetil-CoA. Esta reação forma a hidroximetilglutaril CoA (HMGCoA), que é reduzida pela HMGCoA redutase. Esta é uma enzima chave, tanto para mamíferos como para tripanossomatídeos, pois é responsável pelo principal ponto de regulação na via de isoprenoides. A segunda etapa é a conversão do ácido mevalônico em duas unidades de isopreno ativadas. A terceira, por sua vez, é a síntese do esqualeno. Finalmente, a quarta é onde ocorre a formação do núcleo ciclopentanoperidrofenantreno, pela ação de oxirredução dependente de NADPH-citocromo

P450 redutase, originando o primeiro esteroide da via: o lanosterol. A partir do zimosterol, a via modifica de acordo com o organismo (Fig. 1.6) (Almeida-Amaral et al., 2014).



**Figura 1.6: Via de biossíntese dos esteróis em *Leishmania* spp. e *T. cruzi*.** 1: Lanosterol (4,4,14 $\alpha$ -dimetilcolesta-8,24-dieno-3 $\beta$ -ol); 2: (24-metilenodesidrolanosterol); 3: Dimetilzimosterol (4 $\alpha$ ,14 $\alpha$ -dimetilcolesta-8,24-dieno-3 $\beta$ -ol); 4: obtusofoliol (4 $\alpha$ ,14 $\alpha$ -dimetilergosta-8,24 (24<sup>1</sup>)-dieno-3 $\beta$ -ol); 5: metilzimosterol (14 $\alpha$ -metilcolesta-8,24-dieno-3 $\beta$ -ol); 6: 4-desmetilesterol (14 $\alpha$ -metilergosta-8,24 (24<sup>1</sup>)-15 dieno-3 $\beta$ -ol); 7: zimosterol (colesta-8,24-dieno-3 $\beta$ -ol); 8: fecosterol (ergosta-8,24(24<sup>1</sup>)-dieno-3 $\beta$ -ol); 9: colest-7,24-dieno-3 $\beta$ -ol; 10: episterol (ergosta-7,24(24<sup>1</sup>)-dieno-3 $\beta$ -ol); 11: colest-5,7,24-dieno-3 $\beta$ -ol; 12: desidroepisterol (ergosta-5,7,24(24<sup>1</sup>)-trieno-3 $\beta$ -ol); 13: Ergosterol (ergosta-5,7,22-trieno-3 $\beta$ -ol); 14: estigma-7,24(24<sup>1</sup>)-dieno-3 $\beta$ -ol ou ergota-7-eno-3 $\beta$ -ol e 24-etilidinoolest-7-eno-3 $\beta$ -ol; 15: estigmasta-5,7,24(24<sup>1</sup>)-trieno-3 $\beta$ -ol; 16: estigmasta-5,7-dieno-3 $\beta$ -ol; 17: 7-desidroporiferasterol (estigma-5,7,22-trieno-3 $\beta$ -ol); 18: desmosterol (colesta-5,24-dieno-3 $\beta$ -ol); 19: ergosta-5,24(24<sup>1</sup>)-dieno-3 $\beta$ -ol; 20: ergosta-5-eno-3 $\beta$ -ol; 21: estigmasterol (ergosta-5,22-dieno-3 $\beta$ -ol). HMGR: 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A redutase; SEO: esqualeno 2,3 epoxidase; 14DM: C-14 desmetilase; SMT:  $\Delta^{24}$  esterol metiltransferase. (Andrade-Neto,2013)

Esta via parece ser de grande importância para os tripanossomatídeos, pois trabalhos mostram que o tratamento *in vitro* com os inibidores da via pode perturbar a viabilidade celular ou até mesmo levar o parasito a morte. Fármacos como estatinas que inibem a HMGCoA redutase (sinvastatina, lovastatina), alilaminas que inibem a esqualeno epoxidase (terbinafina), azóis que inibem a C14 desmetilase (cetoconazol, miconazol, itraconazol, fluconazol) e azasteróis, que inibem a C24 metil-transfetase, apresentam atividade tanto leishmanicida como tripanossomicida (Berman et al., 1984, Rodrigues et al., 2002, Buckner, 2008).

Em relação à atividade leishmanicida, sabe-se que a terbinafina, da classe das alilaminas, é um potente inibidor esqualeno epoxidase em *L. mexicana* que resulta em acúmulo do esqualeno, interferindo no crescimento do parasito (Robert et al., 2003, Souza & Rodrigues, 2009). Outra classe considerada de grande importância na atividade leishmanicida são os azóis, que possuem alta atividade na inibição da via, tanto nas formas promastigotas como amastigotas, gerando um acúmulo de esteróis metilados no carbono 14 (Singh et al., 2004, Souza & Rodrigues, 2009, Beach et al., 1988, Almeida-amaral et al., 2014, Haughan & Goad, 1991). Além disso, já foi mostrado que cepas de *Leishmania* tratadas com cetoconazol acumulam colesterol proveniente do meio (Beach et al., 1988). Em 2011, Andrade-Neto e colaboradores demonstraram que quando promastigotas de *L. amazonensis* são tratadas com esses inibidores aumentam de forma concentração-dependente a captação de LDL.

## 1.8 Relação parasito-hospedeiro

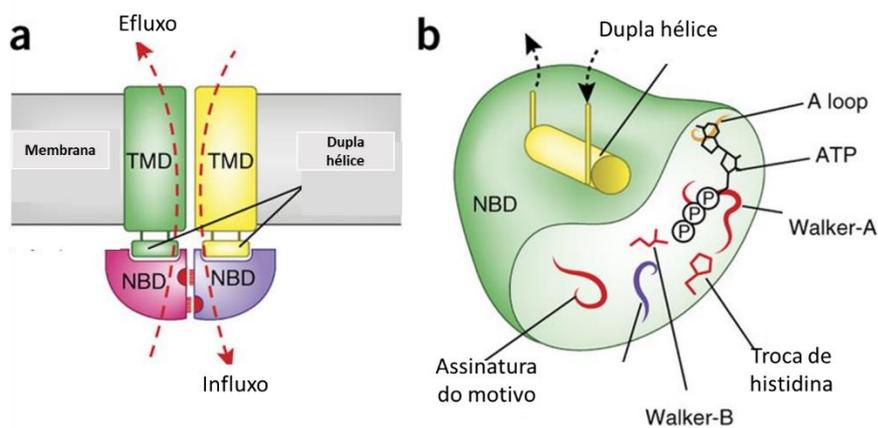
Um ponto ainda não esclarecido é como ocorre o transporte e distribuição intracelular de colesterol e outros esteróis em sua forma livre em *Leishmania* spp e como o colesterol entra no VP. Em mamíferos, proteínas ABC (*ATP-Binding Cassette*) estão envolvidas no transporte de fosfolípidos e colesterol como, por exemplo, as proteínas da subfamília ABCG e ABCA, que também são descritas em *Leishmania* spp (Leprohon et al, 2006). Curiosamente, o genoma de *Leishmania* spp. contém 42 genes ABC identificados, representando um número grande de subfamílias (de ABCA a ABCH). Por outro lado, macrófagos infectados por *Leishmania* spp. têm o metabolismo do colesterol alterado, mostrando aumento da expressão de enzimas da via, aumento de receptores de LDL e diminuição de transportadores ABC que fazem o efluxo de colesterol, levando então a um acúmulo de colesterol dentro do macrófago (Rabhi, I. et al., 2012, Fortea, J. et al., 2009).

### 1.8.1 Transportadores ABC em *Leishmania* spp.

Os transportadores da família ABC são um grupo de proteínas que dependem da hidrólise de ATP para manter suas funções, que estão associadas a: exportação de moléculas para o citoplasma, captação de nutrientes hidrofílicos, transporte de açúcares, lipídeos, proteção contra xenobióticos, dentre outras. Além disso, são proteínas que podem fazer os movimentos de transporte para ambos os lados, tanto para fora da célula como para dentro de organelas (Tarling et al., 2013, Holland & Blight, 1999, Saurin et al., 1999).

As proteínas ABC possuem uma região de cerca de 180 a.a. que contém três grandes e bem conservados motivos: Walker A, Walker B e o motivo C. O motivo C é o que confere a “assinatura” das proteínas ABC e está localizado entre os outros dois, conferindo a identidade dos grupos da família ABC e as diferenciando de outras proteínas dependentes de ATP. Os transportadores funcionais ABC contem dois domínios transmembranares, chamados de TMD, que consistem em seis  $\alpha$ -hélices que permitem a especificidade ao substrato de cada uma (Fig. 1.7) (Tarling et al., 2013)

Os transportadores ABC podem ser divididos em dois grandes grupos: transportadores completos ou transportadores incompletos. Os transportadores completos exigem que todos os seus TMD estejam ligados a um único polipeptídeo para ocorrer a hidrólise do ATP, gerando energia para o transporte do substrato. Já os transportadores incompletos precisam que apenas um TMD esteja ligado a um homodímero para ser um transportador funcional (Tarling et al., 2013).



**Figura 1.7. Estrutura dos transportadores ABC.** A- Arranjo dos domínios dos transportadores com a possibilidade de efluxo e influxo e a ligação de TMD e NBD. B-Esquema interno de NBD com as estruturas essenciais de assinatura do transportador, motivos Walker e a troca de histina que estabiliza o contato com o TMD (Adaptado de Locher, 2016)

Em 2013, Sauvage e colaboradores publicaram uma revisão mostrando que *Leishmania* spp. possuem 42 genes para proteínas ABC, sendo 10 genes para ABCA, 4 para ABCB, 8 ABCC, 3 para ABCD, 1 para ABCE, 3 para ABCF, 6 para ABCG, 3 para ABCH e ainda 4 para outros tipos. Cada subfamília tem uma especificidade de transporte, podendo ser exclusiva ou promiscua.

- ABCA→ Já foi demonstrado em *L. major* e *L. infantum* que as proteínas ABCA4 e ABCA8 estão associadas ao transporte de fosfolípidos e ao tráfego vesicular e que a sua superexpressão resultou em uma baixa infectividade (Sauvage et al., 2013). As proteínas ABCA1 e ABCA2 de *L. tropica* estão envolvidas no transporte de fosfolípidos (Araujo-Santos et al., 2005, Castanys-Munoz et al., 2007).
- ABCB→ Já foi mostrado em *L. mexicana* e *L. donovani* que as proteínas ABCB2 e ABCB4 estão associadas a mecanismos de resistência a fármacos, como por exemplo a pentamidina (Sauvage et al., 2013). Já a ABCB3 está associada ao metabolismo de heme e sugere-se que seja essencial para *L. major* (Martinez-Garcia et al., 2016).
- ABCC→ O segundo maior grupo de proteínas ABC em *Leishmania* spp., as proteínas ABCC3, ABCC4 e ABCC7 foram demonstradas por inúmeros estudos estarem envolvidas com resistência a fármacos em *L. tarentolae* e *L. mexicanae* a mecanismos de exocitose (Leprohon et al., 2009).
- ABCG→ A ABCG4 está localizada na membrana plasmática e bolsa flagelar do parasito e confere resistência a miltefosina e realiza transporte de fosfolípidos em *L. infantum* (Castanys-Munoz, 2007). ABCG6 está associada ao transporte de fosfolípidos (Castanys-Munoz, 2008). Em *L. major*, ABCG1 e ABCG2 estão relacionadas à autofagia e aos níveis de tiol na célula (Manzano et al., 2017). Além disso, já foi demonstrado que a ABCG2 também está relacionada ao transporte de fosfatidilserina (Campos-Salinas et al., 2013).
- ABCF→ Esta família é fortemente regulada em amastigotas de *Leishmania* spp. e a ABCF1 é ortóloga a proteína ABCF1 de humanos (Leprohon et al., 2006).

- ABCH → Estas proteínas ainda estão sendo melhor caracterizadas mas estão associadas a processos de resistência a fármacos como, por exemplo, a ABCH1 que está associada a resistência ao Sb<sup>3+</sup> em *L. infantum* (Leprohon et al., 2006).
- ABCI → As proteínas dessa família estão associadas ao efluxo de metais pesados e mecanismos de resistência a fármacos como pentostan e antimônio trivalente (Manzano et al., 2013)

### 1.8.2 Regulação de colesterol da célula hospedeira por *Leishmania* spp.

Já tem sido extensivamente demonstrado que a infecção por *Leishmania* spp. provoca alterações na homeostasia do colesterol do hospedeiro. Pacientes com leishmaniose visceral causada por *L. donovani* e *L. infantum* apresentam níveis reduzidos de colesterol no plasma, com baixos níveis de LDL e HDL. Além disso, quando se compara pacientes antes e depois do tratamento para LV, fica evidente que os níveis de colesterol são significativamente mais baixos em pacientes antes de receberem o tratamento (Ghoshi et al., 2011, Paswan et al., 2016; Leal et al., 2010, Gatto et al., 2013).

Estudos *in vitro* demonstram que macrófagos infectados com *Leishmania* spp. sofrem uma modulação nas vias de biossíntese de lipídeos, assim como diminuem a expressão de proteínas associadas ao efluxo de colesterol. Análise de expressão gênica mostrou que quando macrófagos são infectados com *L. major*, a célula diminui a expressão de ABCA1 que é responsável pelo efluxo de colesterol e fosfolipídeos, gerando um acúmulo de colesterol intracelular. A infecção também é capaz de regular a síntese de ácido araquidônico, que tem relação com a via de produção de ácidos graxos e, além disso, promove a formação de corpos lipídicos na célula (Rabhi et al., 2012).

Rodriguez e colaboradores (2017) também mostram que macrófagos de camundongos C57BL/6 quando infectados com *L. infantum* promovem a formação de corpos lipídicos no macrófago, localizando-se próximo ao parasito. Esse fenômeno também foi observado em macrófagos derivados de medula óssea infectados com *L. major* (Rabhi et al., 2016). Esses dados corroboram com o fato de que as amastigotas de *L. infantum* e *L. donovani* apresentam altos níveis de ácidos graxos e colesterol, reduzindo em até 80% o conteúdo de ergosterol (Messaoud et al., 2017).

A infecção por *L. braziliensis* em macrófagos U937 super-regula a expressão da HMGCoA redutase em 72 h após a infecção, gerando um aumento de colesterol intracelular (Ovalle-Bracho et al., 2015), já a *L. donovani* é capaz de ativar a transcrição de SREBP2 do

macrófago, super-regulando os genes da HMGCoA redutase e UCP2, promovendo então a biossíntese de colesterol e a diminuição de ROS (Mukherjee et al., 2014).

### 1.8.3 Transporte de colesterol pela ORP1L

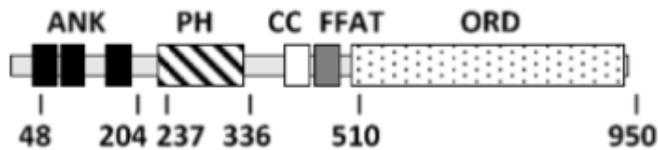
Há algum tempo já se vem investigando a exata formação e constituição do VP. Estudos mostram que no processo de fagocitose existe uma interação entre a membrana do fagossomo com o retículo endoplasmático, seja pela captação de vesículas enviadas pelo retículo ou pelo contato direto com proteínas marcadoras de retículo, como por exemplo a calnexina. Além disso, quando se inibe a ERS24, que é uma proteína do retículo relacionada ao transporte de vesículas, é possível inibir o processo de fagocitose da célula. Outros dados sugerem esta interação como específica para fagocitose de patógenos e não ocorre na fagocitose de partículas de látex (Gagnon et al., 2002; Becker et al., 2004).

Em 2010, Ndajamen e colaboradores demonstraram que o VP de *Leishmania* é um compartimento híbrido, que recebe moléculas do retículo endoplasmático (RE) e de vesículas endocíticas. A primeira etapa foi mostrar que a calnexina está presente no vacúolo de *Leishmania* por colocalização com LAMP-1. Em seguida, macrófagos J774 foram transfectados com calnexina-GFP ou sec22b (proteína de retículo) e infectados com *L. donovani*, *L. amazonensis*, *L. pifanoi*, zimozan (polissacarídeo preparado a partir da parede do fungo *Saccharomyces cerevisiae* que é capaz de ativar macrófagos), e parasitos mortos. Os dados mostram que tanto a calnexina quanto a sec22b foram recrutadas para os vacúolos com parasitos vivos, chegando esse percentual a 95%. Os vacúolos com parasitos mortos tiveram um pico de calnexina 1 h pós infecção, caindo em seguida, acompanhando a morte dos parasitos. Os vacúolos com zimozan recrutaram apenas 20% de calnexina. Esses dados são sugestivos que a interação com o retículo é específica de vacúolos contendo patógenos viáveis.

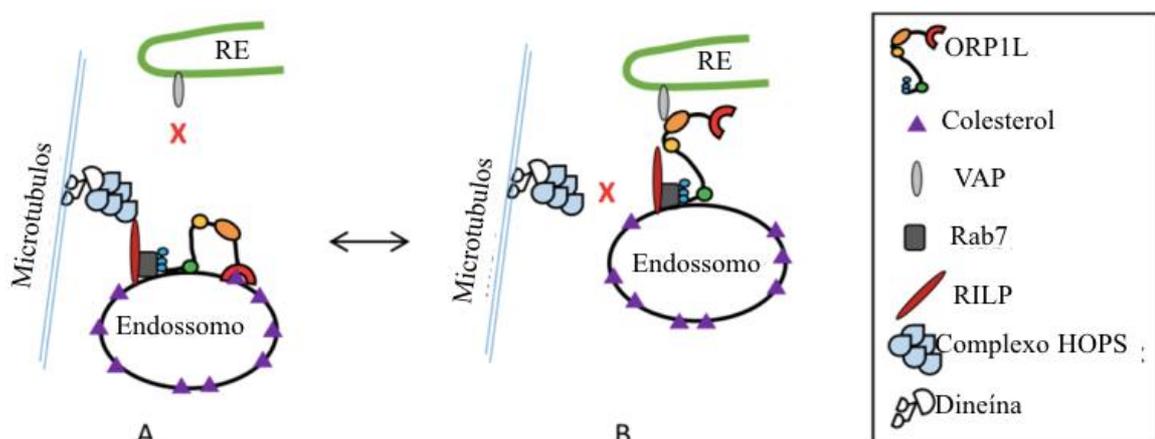
O RE tem uma grande importância na biossíntese de lipídeos. A membrana do retículo é um sítio de produção de lipídeos para a maioria das organelas celulares, incluindo o próprio retículo, o Golgi, os lisossomos, os endossomos, as vesículas secretoras e a membrana plasmática (Alberts et al., 2010). A regulação do conteúdo de lipídeos nas organelas é realizada por uma série de proteínas, tendo sido já mostrado que a proteína dependente de oxisterol – relacionada a proteína 1 longa (ORP1L), pertencente a família das proteínas dependentes de oxisterol (OSBP), está localizada nos endossomos tardios e lisossomos e é responsável por mediar o contato dessas vesículas com o retículo endoplasmático, de acordo com os níveis de colesterol intracelular (Johansson et al., 2003, Johansson et al., 2005, Wijdeven et al., 2016). Essa proteína sofre mudança conformacional de acordo com a concentração de colesterol

presente na célula, favorecendo a ligação a uma proteína presente no retículo (VAP), estabelecendo um contato entre as duas organelas.

Sabe-se que a ORP1L possui uma repetição do domínio de anquirina (Fig. 1.8) (motivo proteico que possui uma sequência de 33 a.a.) ligada a Rab7 que atua controlando a proteína RILP, que é a responsável por recrutar o sistema de microtúbulos para Rab7. Como resultado final, o sistema dineína-dinactina dos microtúbulos transporta endossomos e lisossomos (Jordens et al., 2001). Quando a célula está com condições adequadas de colesterol, a RILP permanece ligada a subunidade p150<sup>Glued</sup> de dinactina e dineína, facilitando a ligação do endossomo com os microtúbulos (Fig.1.9A). Na ausência ou baixos níveis de colesterol, a RILP se desliga da subunidade p150<sup>Glued</sup>, adotando uma nova conformação. Esta conformação se dá pelo contato do motivo FFAT [*Two-phenylalanines (FF) in an acidic c tract*] da ORP1L na proteína VAP (proteína associada de retículo), proporcionando um contato do endossomo com o RE (Fig.1.9B). Neste caso, a ORP1L pode fazer o transporte de lipídeos e influenciar a transcrição de genes de regulação de efluxo de colesterol (Jordens et al., 2001, Wijdeven et al., 2016, Justis, 2017, Rocha et al., 2018).



**Figura 1.8 - Diagrama de domínios da ORP1L.** ANK- repetição de anquirina, PH- domínio “plekstrin homology”, CC- domínio “coiled-coil”. FFAT- “two phenylalanines in an acidic tract”. ORD= “OSBP”. Imagem retirada de Justis, 2018.



**Figura 1.9 - Mudança conformacional da ORP1L.** A ORP1L possui duas conformações no endossomo de acordo com os níveis de colesterol intracelular. A- Conformação da proteína em níveis adequados de colesterol. B- Conformação da proteína em baixos níveis de colesterol intracelular (Adaptado de Justis, 2017).



# 2.Hipóteses

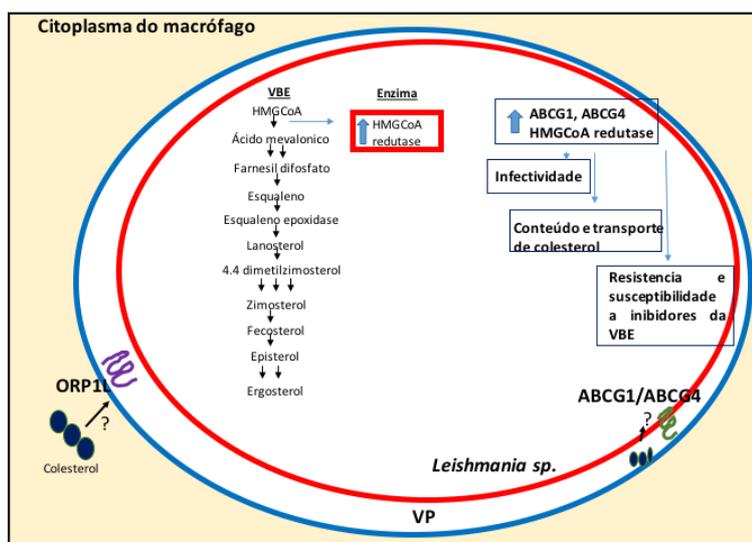
A partir dos dados apresentados na introdução do trabalho, reforçamos a ideia de que os parasitos do gênero *Leishmaniase* utilizam do colesterol exógeno em benefício próprio e são capazes de modular a homeostase de esteróis da célula hospedeira. Entretanto, este trabalho visa identificar como o parasito pode modular ou captar os esteróis do VP e qual a proteína responsável por colocar o colesterol livre para dentro do vacúolo.

Nossa primeira hipótese é que a HMGCoA redutase, que é uma enzima limitante no processo de biossíntese de esteróis, possa regular a homeostasia de esteróis de *L. amazonensis* quando o parasito estiver em situações adversas.

A segunda hipótese é que os transportadores ABCG1 e ABCG4 possam exercer papel de transporte e captação de colesterol no parasito.

A terceira hipótese é que a ORP1L esteja localizada no vacúolo parasitóforo de *Leishmania* spp.

As hipóteses do trabalho estão representadas no organograma da tese (Fig.2.1).



**Figura 2.1- Organograma da tese.** Avaliar o papel da HMGCoA redutase na homeostasia de esteróis do parasito, avaliar se ABCG1 e ABCG4 podem estar relacionados com a captação de colesterol do VP e identificar presença de ORP1L no vacúolo parasitóforo de *Leishmania* spp. Lenda: Bege-citoplasma do macrófago. Azul-vacúolo parasitóforo. Vermelho-*Leishmania* sp. Roxo- ORP1L. Verde- ABCG1/G4. Azul Marinho-colesterol

# 3.Objetivos

### 3.1 Objetivo Geral

Estudar o papel de transportadores e enzimas biossintéticas de *Leishmania* spp. e sua célula hospedeira na manutenção da homeostasia de esteróis do parasito sob estresse farmacológico.

### 3.2 Objetivos específicos

- 1- Avaliar o papel da HMGC<sub>o</sub>A redutase na regulação da homeostasia de esteróis em *Leishmania*.
- 2- Avaliar o papel das proteínas ABCG1 e ABCG4 no transporte e no conteúdo de colesterol e ergosterol.
- 3- Avaliar o papel da ABCG1, ABCG4 e HMGC<sub>o</sub>A redutase na sensibilidade aos inibidores da biossíntese de ergosterol.
- 4- Demonstrar a presença da ORP1L no vacúolo parasitóforo.

# 4. Materiais e Métodos

#### 4.1- Parasitos

- *Leishmania* spp.

As cepas de *Leishmania* spp. utilizadas para os ensaios foram *L. amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016), (IFLA/BR/67/PH8) e *L. major* (LV39,MRHO/SU/59/P).

Os parasitos da cepa PH8 foram mantidos como amastigotas axênicas a 32°C em meio Schneider (Sigma-Aldrich, EUA), acrescido de 10 % de soro fetal bovino (SFB). O protocolo de transformação de promastigotas para amastigotas axênicas foi realizado conforme estabelecido por Cysne-Finkelstein e colaboradores (1998).

Os parasitos da cepa LTB0016 e LV39 foram mantidos como promastigotas a 26°C em meio RPMI (Sigma-Aldrich, EUA) suplementado com 100µg/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina, 5 mg/mL de hemina, 0,5mg/mL ácido fólico, 0,2 mg/mL de D-biotina, 4 mg/mL de adenina e 10% SFB. Quando os parasitos estavam transfectados com os genes de interesse no vetor episomal, o antibiótico de seleção G418 (Sigma-Aldrich, EUA) era adicionado ao meio (200µg/mL). Entretanto, para a realização dos ensaios de atividade anti-amastigota, os parasitos foram cultivados em meio sem G418 por duas passagens. Os parasitos da cepa LTB0016 foram usados para transfecção dos genes HMG-CoA redutase e ABCG4, enquanto a LV39 foi usada para transfecção do gene ABCG1.

#### 4.2 Macrófagos e células de linhagem

- Macrófagos peritoneais murinos

Macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos *Mus musculus* da linhagem Swiss, fornecidos pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/FIOCRUZ). Todos os protocolos utilizados estão aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto Oswaldo Cruz (CEUA/IOC-020/2015).

- Células HeLa

As células HeLa (CCL-2) foram comercialmente obtidas da empresa *American Type Culture Collection* (ATCC), EUA, e mantidas até a oitava passagem

- Células Raw

As células RAW 264.7 foram gentilmente cedidas pela Dra. Leonor Leon (Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ).

#### 4.3 Superexpressão em *Leishmania* spp.

O DNA de promastigotas de *L. amazonensis* (LTB0016) foi extraído através de KIT de extração de DNA genômico (*Wizard Genomic DNA Purification*- Promega). Após a extração foi realizada uma reação em cadeia da polimerase (PCR), usando oligonucleotídeos baseados no N-terminal e C-terminal da sequência gênica de interesse.

- **3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase**

A amplificação do gene da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMGCoA redutase) foi realizada por PCR com oligonucleotídeos desenhados com base nas sequências de *L. mexicana* depositadas no *GeneBank* (LmxM.293190) (Fw:TCTAGAATGCGTCGCTCTCTGCTGCTTGCC/Rev:AAGCTTTTATTGAGTCGGGG GCTTGCGGTT).

O fragmento de DNA amplificado de *L. amazonensis* foi purificado a partir do gel de agarose e inserido no vetor pGEM T (3015pb) (Promega) através da estratégia de *TA cloning*. O vetor foi então inserido em *E. coli* DH5 $\alpha$  por choque térmico. As colônias positivas (de cor branca) foram identificadas pela utilização de IPTG e X-Gal (BioRad) e selecionadas por pressão com ampicilina (Sigma-Aldrich). A clonagem foi confirmada através da digestão com as enzimas XbaI (TCTAGA) e Hind III (AAGCTT), pela liberação do gene de 1305 pb. Em seguida o vetor de subclonagem, PSP72 $\alpha$ neo $\alpha$  (5021pb), foi aberto com as enzimas XbaI (TCTAGA) e HindIII (AAGCTT), e a ligação do vetor com o plasmídeo foi realizada.

Em seguida os parasitos foram transfectados com 20 $\mu$ g/mL de DNA em *L. amazonensis* com 200 $\mu$ L tampão HEPES-NaCl por eletroporação no programa V-033 do aparelho da Nucleofactor<sup>TM</sup>2b device, LONZA (EUA). A pré-seleção dos parasitos foi realizada com 800  $\mu$ g/mL de paramomicina e mantidos com 200  $\mu$ g/mL de G418. Os parasitos foram mantidos em meio RPMI sem vermelho de fenol, pH 6,5, suplementado com D-biotina, adenina, ácido fólico, hemina e 10% SFB. As cepas transfectadas foram mantidas com uma concentração de 200  $\mu$ g/mL de G418.

- **ABCG1 e ABCG4**

Os oligonucleotídeos para amplificação dos genes da ABCG1 e da ABCG4 foram desenhados com base nas sequências de *L. major* e *L. mexicana* depositadas no *GeneBank* como LmxM.1680725.1 e LmxM.15.0890, da seguinte forma: ABCG1 FW—TCTAGA ATGTCCCGCTTAGACAACGAACCG e Rev- AAGCTT CTACATCTTCTCGTGAGCGGCCAC-3'/ Primer ABCG4 Fw: TCTAGA ATGGAGACGGAAGTCGATCAGGCC e Rev CATATGTTACCACCGGTACTTGCGCCGCCT). O fragmento amplificado do DNA genômico de *L. amazonensis* foi purificado a partir do gel de agarose e inserido no vetor pGEM T (3015pb) (Promega) através da estratégia de *TA cloning*. O vetor foi então inserido em *E. coli* DH5 $\alpha$  por choque térmico. As colônias positivas foram identificadas pela utilização de IPTG e X-Gal (BIO-RAD) e selecionadas por pressão com ampicilina. As amostras de DNA plasmídeo foram purificadas de culturas de *E. coli*. A clonagem foi confirmada através da digestão com as seguintes enzimas: ABCG1: XbaI (TCTAGA) e HindIII (AAGCTT)/ ABCG4: XbaI (TCTAGA) e NdeI (CATATG) e consequente liberação dos fragmentos com as massas moleculares esperadas (ABCG1- 1974pb / ABCG4- 2232pb). Em seguida, o vetor de subclonagem PSP72aneoa (5021pb) foi digerido com as enzimas XbaI e Hind III, e a ligação do vetor com o plasmídeo foi realizada com sucesso.

Os parasitos foram transfectados com 20 $\mu$ g/mL de DNA em 200 $\mu$ L tampão HEPES-NaCl por eletroporação no programa V-033 do aparelho da Nucleofactor<sup>TM</sup>2b device, LONZA (US). A transfecção do gene ABCG4 foi em *L. amazonensis* e ABCG1 em *L. major*. A pré-seleção dos parasitos foi realizada com 800 $\mu$ g/mL de paramomicina e mantidos com 200 $\mu$ g/mL de G418. Os parasitos foram mantidos em meio RPMI sem vermelho de fenol pH6.5, suplementado com D-biotina, adenina, ácido fólico, hemina e 10% SFB. As cepas transfectadas foram selecionadas como descrito por Perez-Victoria (2003) e mantidas sob pressão de 200 $\mu$ g/mL de G418

#### 4.4 Sequenciamento dos genes ABCG1, ABCG4 e HMGC $\alpha$ redutase

Para a verificação da identidade dos genes clonados, foi realizado o sequenciamento na plataforma de sequenciamento de DNA (RPT01A/FIOCRUZ), pelo método de Sanger. Após o sequenciamento, foi realizado um BLAST com as sequências depositadas no *GeneBank* para identificar a homologia.

#### 4.5 Avaliação da expressão gênica por qPCR

Para avaliar o aumento da expressão gênica, o RNAm foi extraído de aproximadamente  $1 \times 10^8$  parasitos na fase logarítmica pelo *KITSV total RNA isolation System* (Promega) e o cDNA foi sintetizado pelo *KITGoScript™ Reverse Transcriptase-* (Promega). Todas as amostras foram ajustadas para 10 ng de cDNA. O qPCR foi realizado com o *SYBR Supermix Green*. Quantidades iguais de cDNA foram colocadas em triplicata e amplificadas em 20  $\mu$ L de reação contendo *SYBR Supermix Green* (50%). A quantidade relativa dos produtos gerados do PCR de cada conjunto de iniciador foi baseada no valor de “threshold cycle” (Ct) (calculado usando o método de  $\Delta\Delta CT = \Delta Ct \text{ amostra} - \Delta Ct \text{ de referência}$ ). Utilizamos actina e a enzima gliceraldeído 3-fostato desidrogenase (GAPDH) como controles endógenos. Os níveis de expressão gênica foram normalizados através da análise da expressão mRNA constitutivo de actina.

#### 4.6 Curva de crescimento dos parasitos

Os parasitos foram ajustados para  $1 \times 10^6$  parasitos/mL, incubados em garrafas de cultura num volume final de 10 mL, mantidos com meio RPMI sem vermelho de fenol, 10% SFB, 1% de adenina, 1% de D-biotina, 1% de ácido fólico, hemina e pH 6.5 em estufa de 26°C. Durante 13 dias consecutivos, uma alíquota de 200  $\mu$ l de cada garrafa foi colocada em uma placa de 96 poços. A viabilidade celular foi avaliada adicionando a cada poço 50  $\mu$ M de resazurina, um ensaio fluorimétrico baseado na redução da resazurina em resorufina pela ação da NADPH. Após 3 h, foi realizada a leitura da fluorescência com excitação a 560 nm e emissão a 590 nm, em leitor de microplaca ( $\mu$ Quant Bio-Tek Instruments, EUA).

#### 4.7 Atividade antipromastigota

Para a realização dos testes de viabilidade celular, os fármacos foram selecionados por atuarem em diferentes pontos da via da biossíntese de esteróis (sinvastatina 0-100  $\mu$ M, terbinafina 0-100  $\mu$ M e cetoconazol 0-48  $\mu$ M) e outros que não atuam na via, além de serem usados no tratamento clínico da doença (anfotericina B 0-4  $\mu$ M, miltefosina 0-48  $\mu$ M e o antimônio trivalente 0-100  $\mu$ M). As concentrações escolhidas foram eleitas de acordo com o  $IC_{50}$  previamente estabelecido na literatura em cepas selvagens. Também foi realizado um

experimento com G418 0-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , com o intuito de confirmar a presença do plasmídeo nas cepas utilizadas.

Promastigotas das cepas transfectadas ( $1 \times 10^6/\text{mL}$ ) foram incubadas por 72 h a 26 °C, em triplicata, em meio RPMI (suplementado com SFB, hemina, ácido fólico, adenina e biotina) em placas de 96 poços com volume final de 200  $\mu\text{L}$ . A viabilidade celular foi avaliada de acordo com o protocolo descrito no tópico 4.6.

#### 4.8 Atividade anti-amastigota

Para a avaliação da atividade sobre as amastigotas das cepas superexpressando os genes de interesse foram escolhidos três fármacos: 1- miltefosina (0,25 – 2  $\mu\text{M}$ ), como fármaco controle utilizado na clínica; 2- cetoconazol (4 – 32  $\mu\text{M}$ ), de acordo com os resultados de resistência obtidos nos testes de viabilidade celular; 3- terbinafina (3,25 -30  $\mu\text{M}$ ), por ser um fármaco que também atua na via de biossíntese de esteróis e não apresentou diferença em relação ao controle.

Os macrófagos peritoneais murinos foram obtidos por lavagem peritoneal com 10 mL de meio RPMI gelado (Sigma-Aldrich) pH 7.2. O lavado peritoneal foi ajustado à concentração de  $2 \times 10^6$  macrófagos/mL, plaqueado em placas de 24 poços com lamínulas de vidro, no volume final de 500  $\mu\text{L}$ , e incubados por 2 ou 24 h a 37 °C e 5 %  $\text{CO}_2$ . Após período para adesão celular na lamínula, as células foram incubadas com promastigotas das cepas transfectadas (proporção 5:1), e mantidas na mesma condição descrita acima. Após 4 h, os poços foram lavados três vezes, para remover os parasitos que não entraram nas células. As monocamadas foram incubadas com os fármacos por 72 h a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$ . Após o período de incubação, a atividade anti-amastigota foi avaliada microscopicamente, corando-se as lamínulas com InstantProv (Newprov, Brasil) e contando pelo menos 100 macrófagos por amostra. Os resultados foram expressos em índice de infecção (IF), utilizando a seguinte fórmula:  $\text{IF} = \% \text{ células infectadas} \times \text{número de amastigotas/número total de macrófagos}$ .

#### 4.9 Extração de lipídeos

Os lipídeos de promastigotas das cepas superexpressando os genes de interesse foram extraídos, de acordo com o método de Bligh e Dyer (1959).

Após a incubação por 72h de acordo com as condições experimentais, os parasitos foram lavados três vezes em PBS (3000rpm/10min). Antes da terceira lavagem as leishmanias foram contadas e ajustadas entre si pela menor concentração obtida. Ao pellet da terceira lavagem, foi

adicionado na proporção 2:1:0.5, metanol, clorofórmio e água, respectivamente. O sedimento foi ressuspensão no solvente e armazenado no freezer *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas por 20 min a 3000 rpm e o sobrenadante, contendo os lipídeos, foi separado do precipitado. O precipitado foi submetido a uma segunda extração, nas mesmas condições de solvente e proporção da primeira, em seguida passou por agitação em vortex de 5 em 5 min por 1 h, e nova centrifugação. Os sobrenadantes foram misturados e a eles adicionados água destilada e clorofórmio (1:1 v/v). Após alguns segundos de agitação, o material foi novamente centrifugado (3000rpm/30 min). A partir de então a fase orgânica, contendo os lipídeos, foi separada e transferida para tubos de 1,5 mL, resistentes a solventes orgânicos (Axygen Scientific Inc., EUA). O solvente foi evaporado por arraste de nitrogênio gasoso (N<sub>2</sub>) ou *speed vacuum* e os lipídeos analisados por cromatografia em camada fina (CCF/TLC), conforme descrito adiante.

#### 4.10 Deslipidação do soro fetal bovino

Alíquotas de 5 mL de SFB foram misturadas com 0,5mg de EDTA e 10 mL de butanol: éter-diisopropílico (40:60 v/v). Os tubos com o soro e o solvente foram deixados em orbital com rotação de 30rpm/30min e centrifugados a 2000rpm/2min para separação da fase orgânica da aquosa. A fase aquosa foi separada e submetida a arraste por fluxo de N<sub>2</sub> para garantir que todo o solvente tenha evaporado.

No término do processo o soro fetal bovino deslipidado (SFBd) foi esterilizado em membrana Millex – GV de 0,22 µm (Milipore S.A, França).

#### 4.11 Análise de lipídeos neutros por cromatografia em camada fina (CCF/TLC)

Para a realização da TLC foram utilizadas placas de sílica (Silica Gel, 60F<sub>254</sub>, Merck KGaA, Alemanha) que foram previamente impregnadas com nitrato de prata (1%) em metanol, para auxiliar na separação do colesterol e do ergosterol, que possuem estruturas extremamente semelhantes. Colesterol, ergosterol e lanosterol foram identificados através de comparação com padrões comerciais (Sigma-Aldrich), na concentração de 1mg/mL.

A realização da TLC foi dividida em duas corridas. A primeira corrida foi realizada com hexano:éter etílico:ácido acético, na proporção 60:40:1(V:V:V), até a metade da placa. A segunda corrida cromatográfica foi realizada com hexano:clorofórmio:ácido acético, na proporção 80:20:1 (V:V:V), até o final da placa. Em seguida, a placa foi incubada com reagente de Charring (10% CuSO<sub>4</sub> + 8% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) por alguns segundos. Depois de secas a temperatura

ambiente, as placas foram aquecidas a 200°C, conforme descrito por Andrade-Neto e colaboradores (2011).

Posteriormente, a placa de TLC foi submetida a análise por densitometria. A imagem da TLC foi digitalizada e analisada pelo programa “ImageMaster TotalLab v1.11”.

#### 4.12 Captação de NBD-colesterol

Os parasitos superexpressando os genes de interesse foram lavados 3 vezes com PBS para retirada de qualquer soro residual e deixados por 4 h em estresse nutricional (meio RPMI pH 6.5 suplementado com hemina, ácido fólico, biotina e adenina). Após esse período, as promastigotas de *Leishmania* na concentração de  $1 \times 10^6$ /mL foram incubadas com 10  $\mu$ M de NBD-colesterol (Invitrogen, EUA), em meio HPMI (hepes 20 mM, NaCl 132 mM, KCl 3.5 mM, MgCl 0,5 mM, glicose 5 mM, CaCl 1 mM, BSA 0,3%) por 30 min, 1, 2 e 4 h a 26°C. Após a incubação, os parasitos foram lavados 2 vezes com PBS/BSA 0,3%. Foram então ressuspensas no mesmo tampão e levadas para análise em citômetro de fluxo. Esta metodologia foi adaptada do trabalho de Araujo-Santos e colaboradores (2005).

As amostras foram analisadas na Plataforma de Citometria de Fluxo- Análise Multiparamétrica do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, no citometro Cyan ADP (Dako Cytomation) avaliando 20000 eventos por amostra. Os dados foram analisados pelo software *Summit 4.3*

#### 4.13 Transfecção e infecção em célula de linhagem

Os plasmídeos contendo ORP1L-GFP, ORP1L-mCherry foram cedidos em colaboração com a Dr. Stacey Gilk da School of Medicine, Indiana University – Purdue University, Indianapolis, EUA.

##### 4.13.1 Análise por imunofluorescência

As células HeLa foram plaqueadas na concentração de  $6 \times 10^4$ /mL em placas de 24 poços. As células foram transfectadas com os plasmídeos referentes a ORP1L-GFP com FUGENE 6 (Promega, EUA) na proporção 3:1 com 200 ng/ $\mu$ L de DNA, de acordo com as instruções do fabricante. Após 24 h, as células foram infectadas com *L. amazonensis* na forma amastigota axênica (proporção 10:1), e incubadas a 37°C/5% CO<sub>2</sub> por mais 72h.

Após a incubação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS a 37°C e fixadas com 2,5% de PFA/PBS por 15 min. Depois de fixadas, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e permeabilizadas com 0,1% de saponina em PBS/BSA 1% por 20 min. Em seguida, foi realizada a incubação com os anticorpos primários (HeLa - anticorpo contra CD63 humano feito em camundongo 1:1000; *Leishmania* – anticorpo contra *Leishmania* foi obtido em coelho 1:5000) por 1 h. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com o anticorpo secundário por 30 min (HeLa- anticorpo contra camundongo foi obtido em rato acoplado a alexa 647, *Leishmania* - anticorpo contra coelho feito em rato acoplado alexa 568). Depois dos anticorpos secundários, as lamínulas foram coladas em lâminas com *antifade ProLong Gold* com DAPI (Invitrogen, USA) e secaram *overnight* protegidas da luz.

As imagens foram visualizadas no microscópio Nikon Eclipse Ti inverted (Nikon Instruments Inc., Melville, EUA) com a objetiva de 100x. As imagens foram capturadas com a câmera ORCA-Flash 4.0 LT PLUS Digital CMOS (Hamamatsu Corporation, EUA) e *NIS Elements BR Analysis* software (Nikon Instrument Inc.). As imagens foram processadas no software Image J.

#### 4.13.2 Microscopia confocal

As células Raw foram plaqueadas na concentração de  $2 \times 10^5$ /mL em placas de 24 poços. As células foram transfectadas com os plasmídeos referentes a ORP1L-mCherry e  $\Delta$ Ank-GFP com FUGENE HD (Promega, Madison-EUA) na proporção 3:1 com 200 ng/ $\mu$ L de DNA, de acordo com as instruções do fabricante. Após 24 h, as células transfectadas com o plasmídeo ORP1L-mCherry foram infectadas com *L. amazonensis*-GFP, enquanto que as células transfectadas com o plasmídeo  $\Delta$ Ank-GFP foram infectadas com *L. amazonensis*- RFP na proporção 5:1 e incubadas a 37 °C/5% CO<sub>2</sub> por mais 72h.

Após 72 h, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS a 37°C, fixadas com InstantProv (Newprov, Curitiba, Brasil) por cerca de 15 segundos, lavadas 3 vezes com PBS e coladas em lâminas com *antifade ProLong Gold* com DAPI (Invitrogen) e deixadas para secar *overnight* protegidas da luz.

As imagens foram obtidas no microscópio confocal Leica DMI8 (Alemanhã) e analisadas no software Las X da Leica.

#### 4.14 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos, pelo menos, duas vezes. As análises estatísticas foram realizadas no software Graphpad Prisma 5 e 7, com o teste *t* student e o teste ANOVA ONE-WAY.

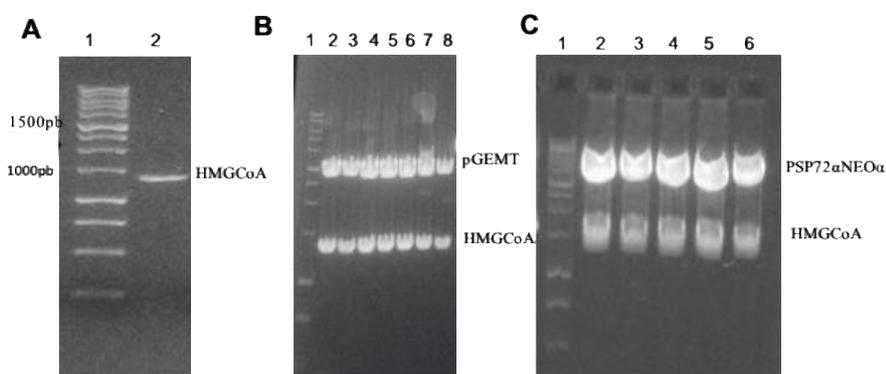
# 5.Resultados

Considerando que neste trabalho foram estudadas proteínas com funções variadas, para maior clareza os resultados serão apresentados da seguinte forma: Inicialmente serão apresentados os resultados iniciais de superexpressão dos genes de interesse em *Leishmania* spp. e caracterização do perfil de esteróis de todos os parasitos estudados. Em seguida serão abordados individualmente os resultados de cada cepa, dessa forma os primeiros dados apresentados serão os estudos do papel da HMGC<sub>o</sub>A redutase na homeostase de esteróis. Na parte seguinte, será abordado o papel dos transportadores ABCG1 e ABCG4, de modo não comparativo, em relação a captação de esterol exógeno pelo parasito. E, por fim, serão apresentados os resultados relacionados a proteína ORP1L, que está associada a célula hospedeira.

## 5.1– Obtenção de parasitos superexpressando a enzima HMGC<sub>o</sub>A redutase e os transportadores ABCG4 e ABCG1.

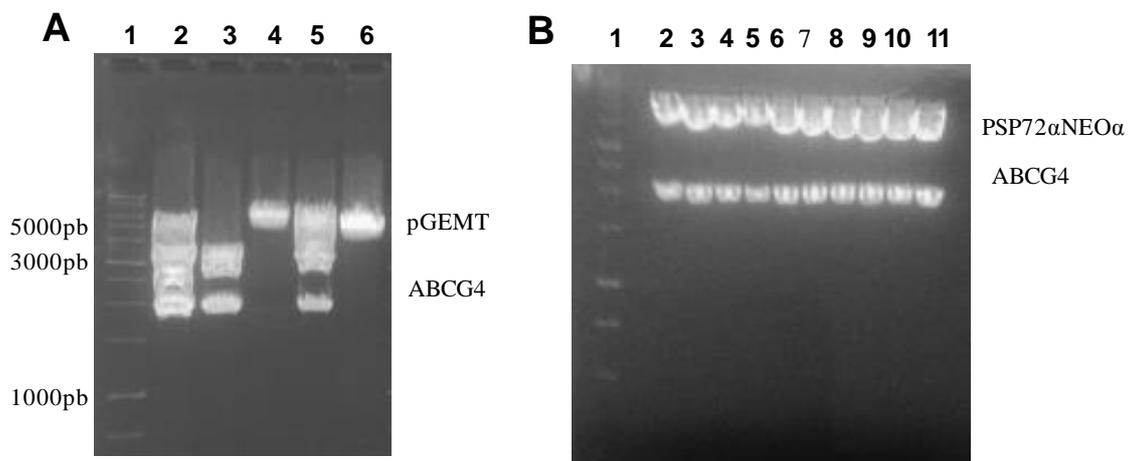
### 5.1.1– Clonagem, superexpressão e confirmação

Para estudar a HMGC<sub>o</sub>A redutase de *Leishmania*, produzimos parasitos de *L. amazonensis* superexpressando essa enzima. Na Fig. 5.1, o gene amplificado com 1305pb pode ser observado. Na Fig.5.1B, podemos observar a presença de duas bandas que representam o gene e o plasmídeo pGEMT (3015pb). Após a clonagem, o gene foi subclonado no vetor PSP72 $\alpha$ neo $\alpha$ . A presença da banda correspondente ao gene e ao vetor (5021pb) pode ser observada na Fig. 5.1C. O produto obtido da banda foi sequenciado para confirmação.

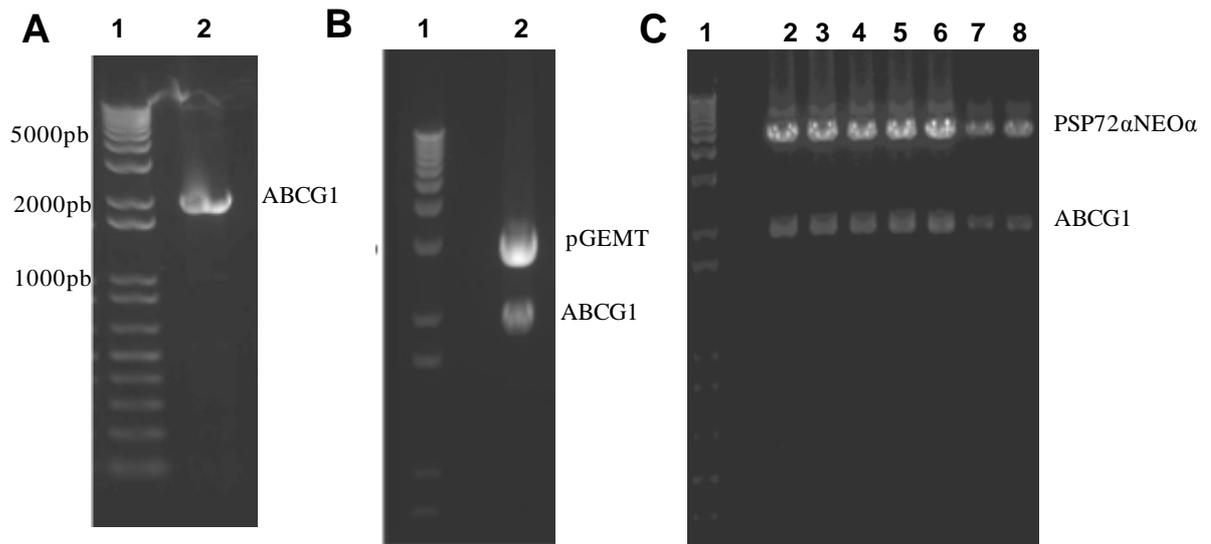


**Figura 5.1 -Amplificação e clonagem do gene da HMGCoA redutase:** A – A PCR foi realizada empregando o DNA genômico de *L. amazonensis*. O gene da HMG corresponde ao amplicon de 1305 pb observado em gel de agarose. B- HMGjá digerida do vetor pGEMT (3015pb). C- HMGCoA e PSP72 $\alpha$ neo $\alpha$  (5021pb). 1- Peso molecular. 2a- Gene amplificado. 2-8b- Digestão de clones com o plasmídeo pGEMT ligados ao gene da HMGCoA redutase. 2-6c- Digestão de clones com o plasmídeo PSP72 $\alpha$ neo $\alpha$  ligados ao gene da HMGCoA redutase

Para estudar os transportadores ABCG1 e ABCG4 foram produzidos parasitos de *L. major* superexpressando o gene ABCG1 e *L. amazonensis* superexpressando o gene de ABCG4, sendo os genes amplificados e clonados. Para superexpressão do gene da ABCG4, o gene amplificado com 2232pb (Fig. 5.2), observa-se a presença de duas bandas que representam o gene e o plasmídeo pGEMT (3015pb) detectadas (Fig. 5.2B). Após a clonagem, o gene foi subclonado no vetor PSP72 $\alpha$ neo $\alpha$  e as bandas correspondentes ao gene e ao vetor (5021pb) observadas (Fig. 5.2C). O mesmo processo foi realizado com o gene da ABCG1, como pode-se observar na Fig. 5.3a a amplificação do gene com 1974pb; já nas Figs 5.2A e B pode-se observar o mesmo processo de clonagem e subclonagem realizado para ABCG4. As bandas dos genes foram enviadas para sequenciamento.

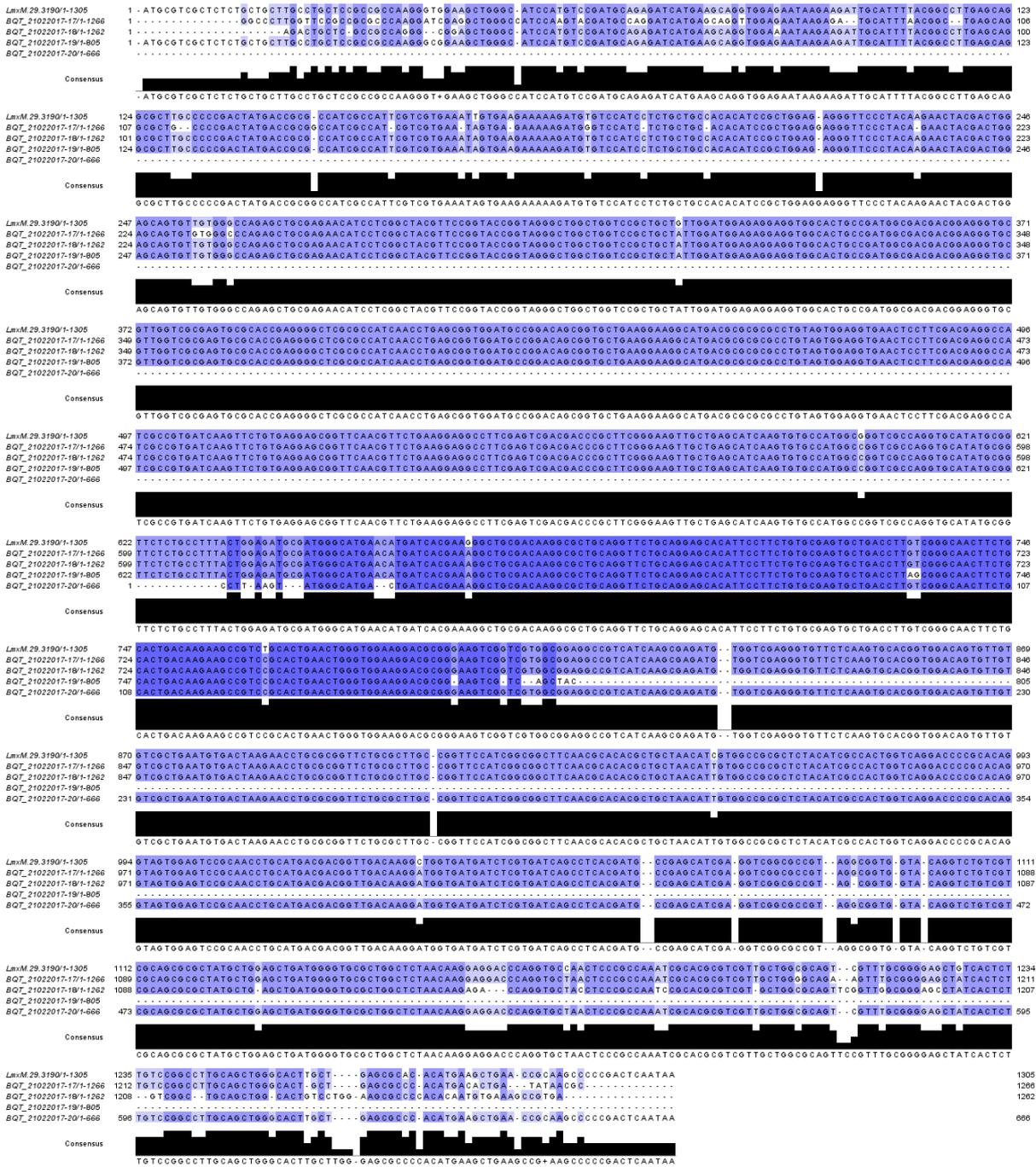


**Figura 5.2 -Amplificação e clonagem do gene da ABCG4:** A – A PCR foi realizada empregando o DNA genômico de *L. amazonensis*. ABCG4 (2232pb) já digerida do vetor pGEMT (3015pb). B- ABCG4 (2232PB) e PSP72 $\alpha$ neo $\alpha$  (5021pb). 1- Peso molecular. 2-6a- Digestão de clones com o plasmídeo pGEMT ligados ao gene da ABCG4. 2-11b- Digestão de clones com o plasmídeo PSP72 $\alpha$ neo $\alpha$  ligados ao gene da ABCG4.



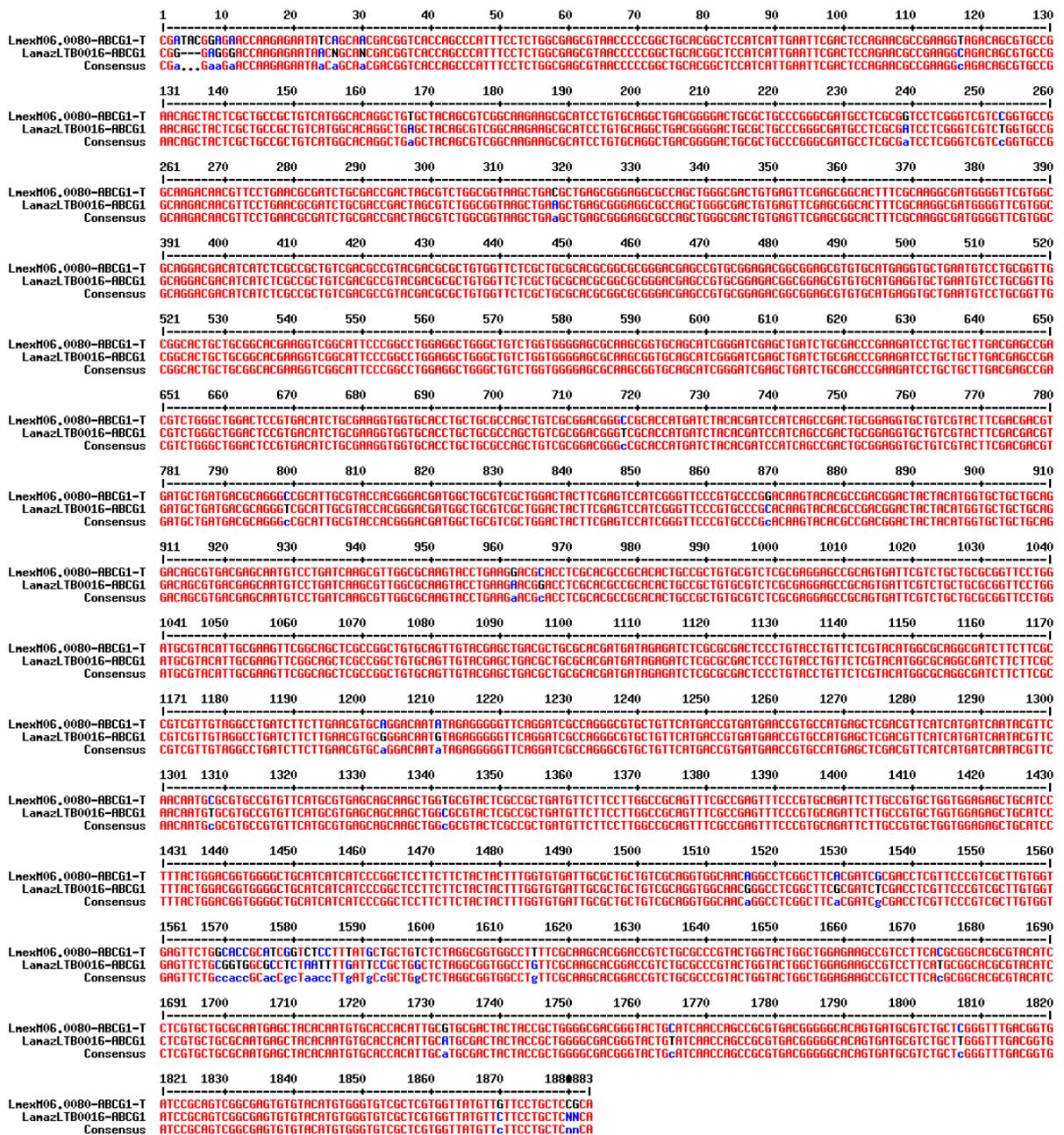
**Figura 5.3- Amplificação e clonagem do gene da ABCG1** – A PCR foi realizada empregando o DNA genômico de *L. amazonensis*. A - O gene da ABCG1 corresponde ao amplicon de 1974 pb observado em gel de agarose. B- ABCG1 já digerida do vetor pGEMT (3015pb). C- ABCG1 e PSP72 $\alpha$ NEO $\alpha$  (5021pb). 1- Peso molecular. 2a- Gene amplificado. 2b- Digestão de clones com o plasmídeo pGEMT ligados ao gene da ABCG1. 2-8c- Digestão de clones com o plasmídeo PSP72 $\alpha$ neo $\alpha$  ligados ao gene da ABCG1.

Os genes HMGC $\alpha$  redutase, ABCG4 e ABCG1 clonados foram sequenciados para garantir que as sequências clonadas possuíssem homologia com os genes depositados no *Genebank*. Os três genes apresentaram alta similaridade de 98% (Figs.5.4-5.6).



**Figura 5.4- Sequenciamento da enzima HMGCoA redutase.** Lmex.293190/1-13 (seqüência de *L. mexicanadepositada* no Gene bank Database), BQT17/1-BQT18/1-BQT-19/1-BQT-20/1 (seqüência de clones *L. amazonensis* LTB0016 da HMGCoA redutase amplificadas).





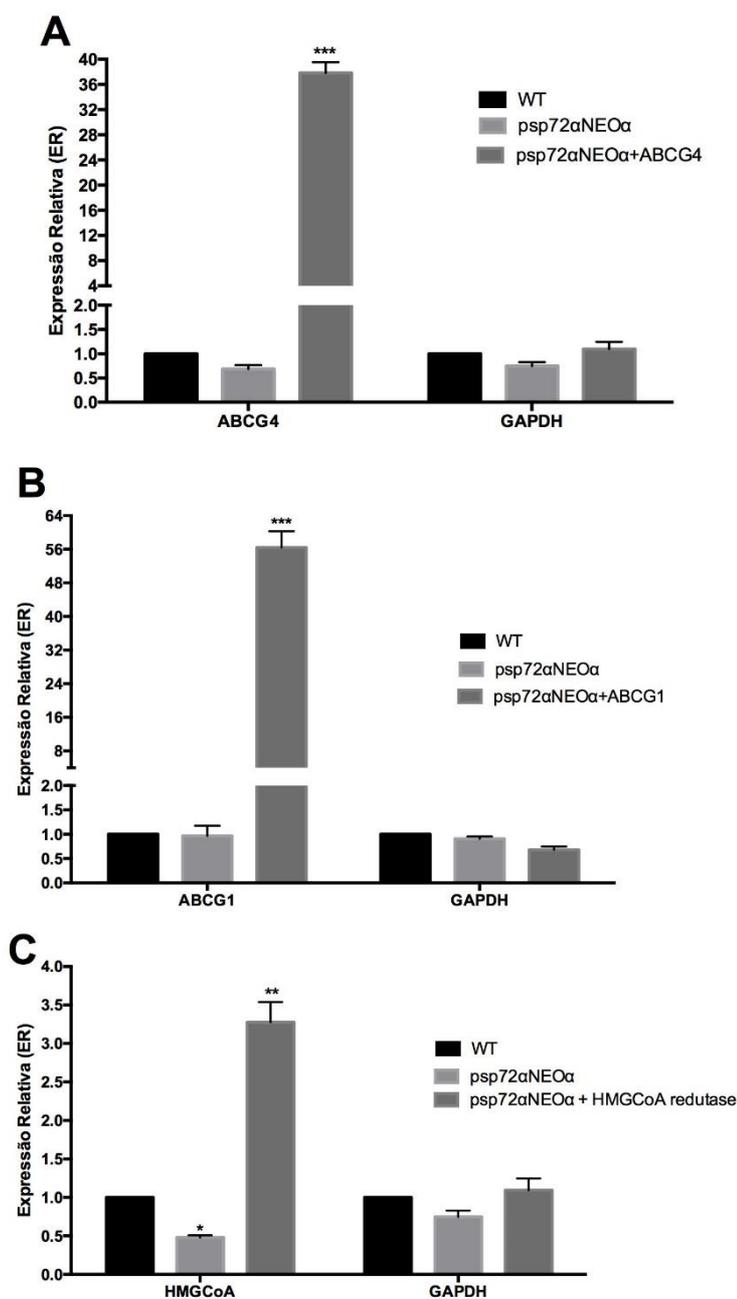
**Figura 5.6- Sequenciamento do transportador ABCG1.** Lmex.06.0080-ABCG1 (sequência de *L. mexicana* do transportador ABCG1 depositada no Gene bank Database), LamazLTB0016-ABCG1 (sequência de *L. amazonensis* LTB0016 do transportador ABCG1 amplificada).

### 5.1.2- Avaliação da expressão gênica por qPCR

Após a obtenção dos plasmídeos com os genes de interesse, os parasitos foram transfectados, obtendo as seguintes cepas: LaHMGCoA<sup>high</sup>, *L. amazonensis* superexpressando a HMGCoA redutase; LaABCG4<sup>high</sup>, *L. amazonensis* superexpressando a ABCG4; LmABCG1<sup>high</sup>, *L. major* superexpressando a ABCG1.

A análise da expressão gênica dos parasitos transfectados foi realizada para confirmar a maior produção do RNAm dos genes de interesse. Na Fig.5.7 é possível observar que os RNAm

da ABCG4, ABCG1 e da HMGC $\alpha$  redutase estão aumentados em aproximadamente 36, 60 e 3,5 vezes, respectivamente, em relação à cepa selvagem.



**Figura 5.7 - Análise da expressão gênica das cepas transfectadas.** O RNAm foi extraído de todas as cepas transfectadas e seus controles (WT). O RNAm foi ajustado para 10ng para síntese do cDNA e a RT-PCR realizada numa reação com *SYBR Supermix Green*. A- Aumento da expressão relativa do gene ABCG4 em aproximadamente 36 vezes. B- Aumento da expressão relativa do gene da ABCG1 em aproximadamente 60 vezes. C- Aumento da expressão relativa do gene HMGC $\alpha$  em aproximadamente 3,5 vezes. \*\*\*= $p < 0,001$ , \*\*= $p < 0,01$ , \*= $p < 0,05$ .

### 5.1.3 Curva de crescimento dos parasitos transfectados e selvagens

Depois que as sequências e a análise de expressão dos genes transfectados foram determinadas, foi realizada uma curva de crescimento de todas as cepas, como primeira etapa de caracterização fenotípica.

O crescimento parasitário das cepas selvagem (WT) e as transfectadas com o plasmídeo vazio (PSP72 $\alpha$ NEO $\alpha$ ) e com os genes de interesse mostram que não houve diferença de crescimento entre a cepa selvagem e na transfecção com o plasmídeo vazio (Fig. 5.8 e 5.9).

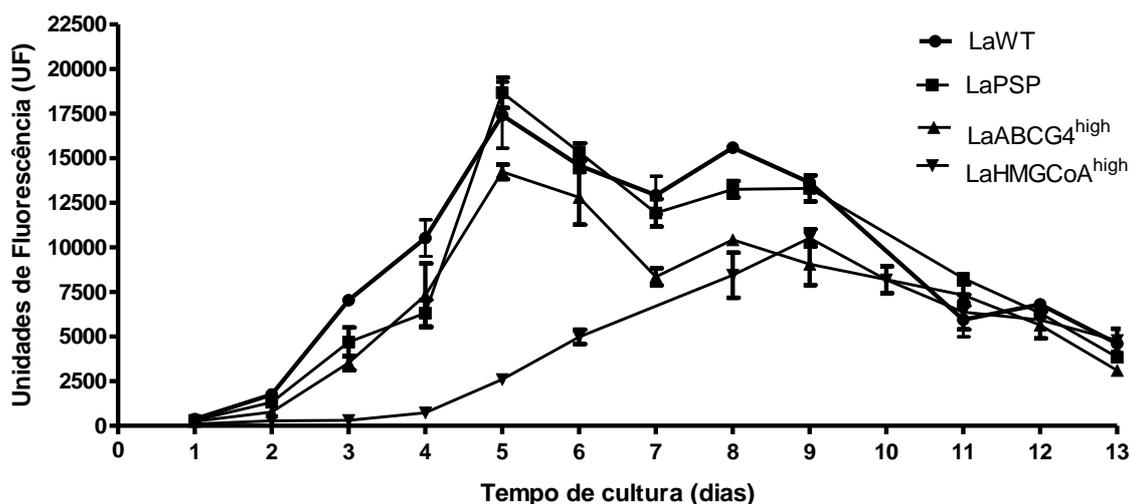


Figura 5.8-. Curva de crescimento das cepas transfectadas com LaABCG4<sup>high</sup>, LaHMGC0A<sup>high</sup>, LaPSP e LaWT. Inóculo de 1x10<sup>6</sup> leish/ml em garrafa de cultura com volume final de 10mL. Diariamente, 200 $\mu$ L foram retirados da garrafa e incubados com 10% de resazurina por 3h em estufa de 26°.

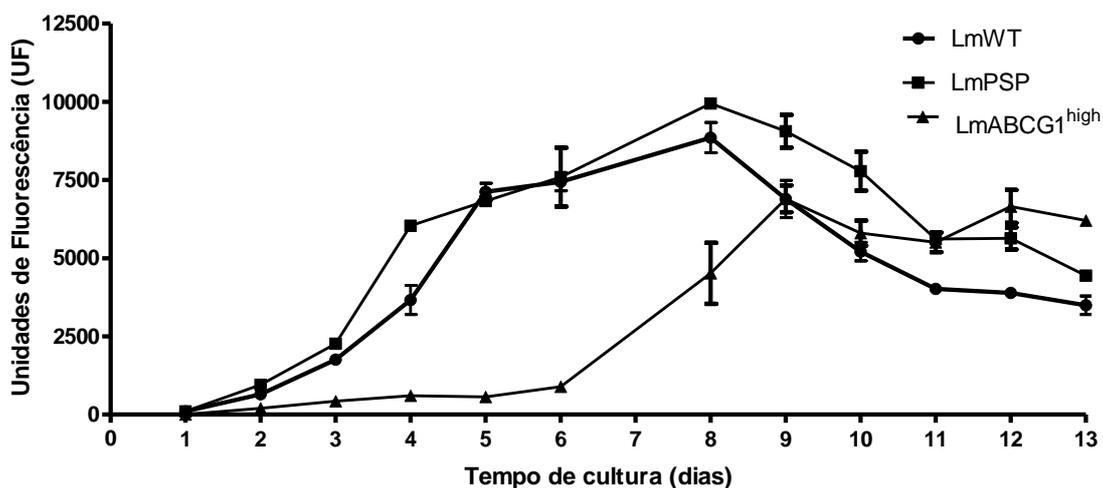
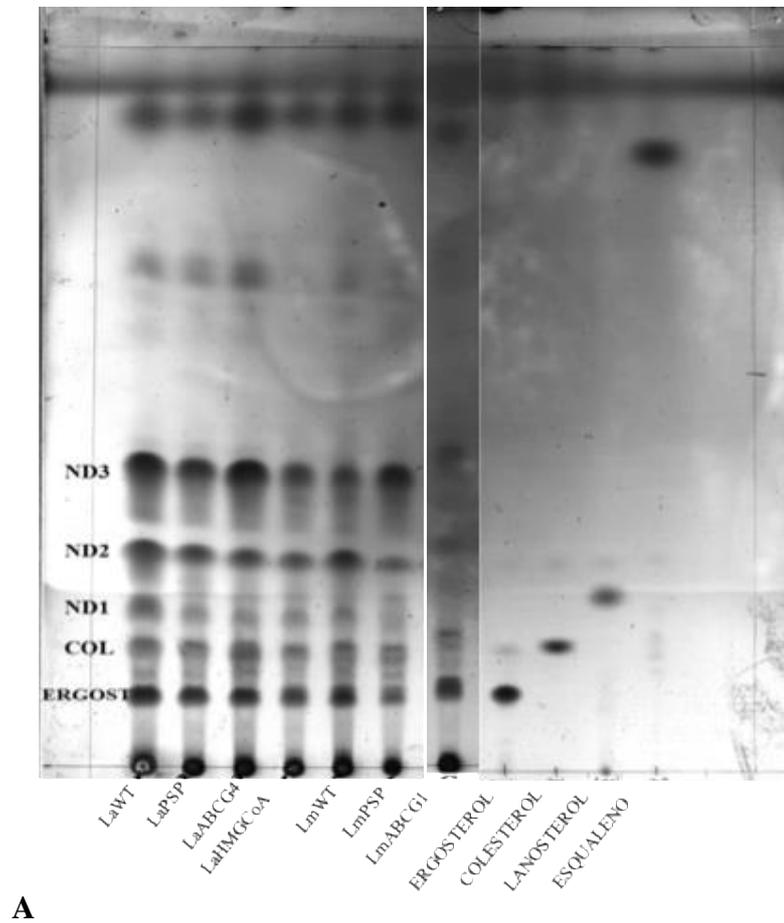
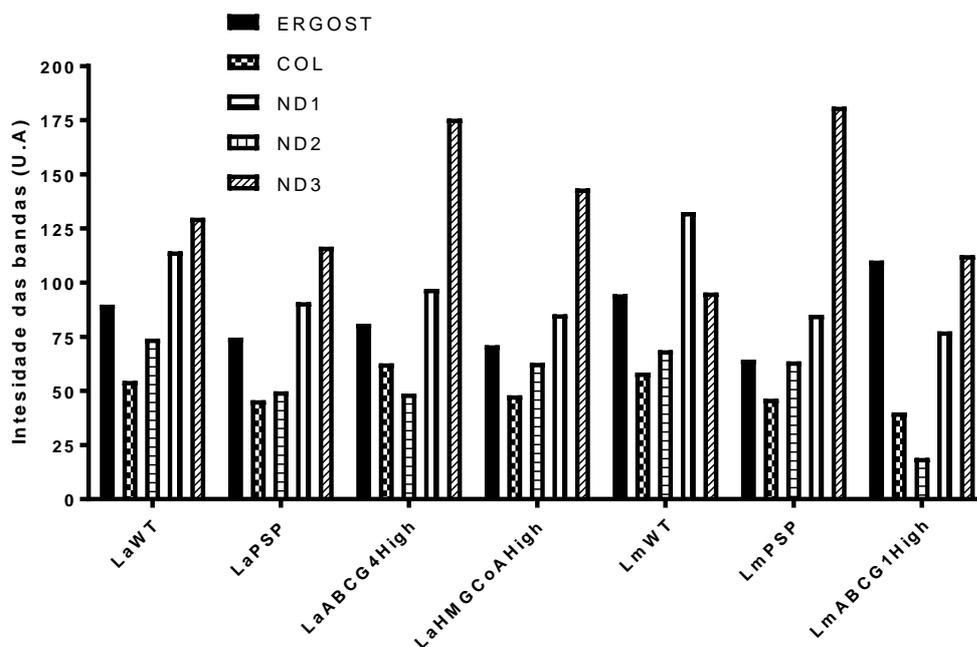


Figura 5.9- Curva de crescimento da leishmania transfectada LmABCG1<sup>high</sup>, LmPSP e LmWT. Curva de crescimento da cepa transfectada com ABCG1, PSP e WT. Inóculo de 1x10<sup>6</sup> leish/ml em garrafa de cultura com volume final de 10mL. Diariamente, 200 $\mu$ L foram retirados da garrafa e incubados com 10% de resazurina por 3h em estufa de 26°.

### 5.1.4 Avaliação do perfil lipídico das cepas após superexpressão

Inicialmente, foi realizada uma extração de lipídeos sem pressão farmacológica, para traçar o perfil de esteróis padrão de cada cepa. Os resultados mostram que os parasitos sem tratamento não sofreram alteração no perfil lipídico, independentemente do gene que superexpressão e a densitometria realizada a partir da TLC confirmou que não houve alteração no perfil de ergosterol das cepas superexpressando os genes estudados (Fig.5.10).





B

**Figura 5.10 -Perfil de esteróis das cepas transfectadas sem tratamento.** Promastigotas das cepas transfectadas ou não com os genes de interesse foram incubadas em meio RPMI 10%SFB por 72 h e os lipídeos foram extraídos e analisados. A-TLC das cepas sem tratamento. B- Densitometria das cepas de *L. amazonensis* e de *L. major*. As cromatografias de camada foram digitalizadas e analisadas por densitometria com o programa “ImageMaster TotalLab v1.11” (UA – Unidades arbitrárias). O gráfico é representativo de um experimento. ERGOST- Esterol com esqueleto ergostano, COL – Colesterol, ND1 – Esterol não identificado, ND2 - Esterol não identificado, ND3 - Esterol não identificado, ERG – Ergosterol, LAN – Lanosterol, SQ – Esqualeno.

Tendo em vista os dados de curva de crescimento e perfil lipídico após a transfecção dos parasitos mostrando que não teve alteração entre a cepa selvagem e a cepa com o plasmídeo vazio, nós decidimos usar como controle ao longo dos experimentos o parasito transfectado com o plasmídeo vazio.

## 5.2 O papel da HMGC oA redutase na regulação da homeostasia do parasito

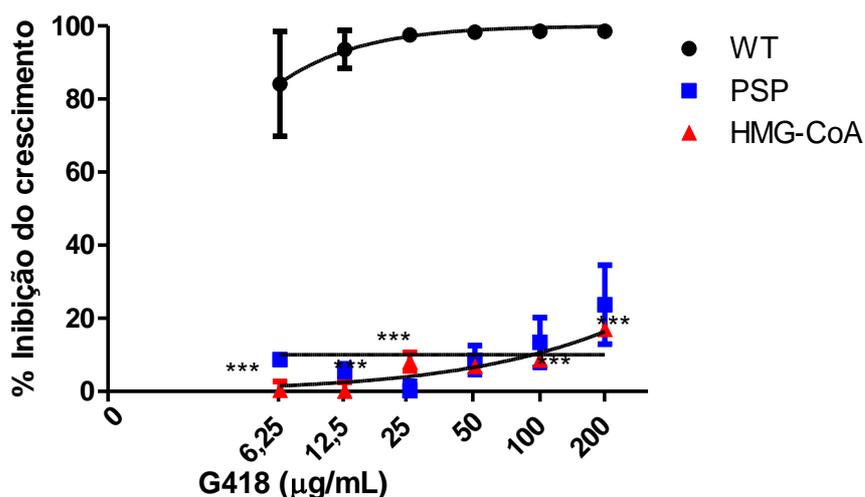
### 5.2.1 Avaliação da sensibilidade a fármacos.

A primeira etapa foi avaliar a sensibilidade da cepa de *L. amazonensis* transfectada com HMGC oA redutase (LaHMGC oA) e seu respectivo controle (LaPSP) a um painel de fármacos com atividade leishmanicida nas formas promastigotas.

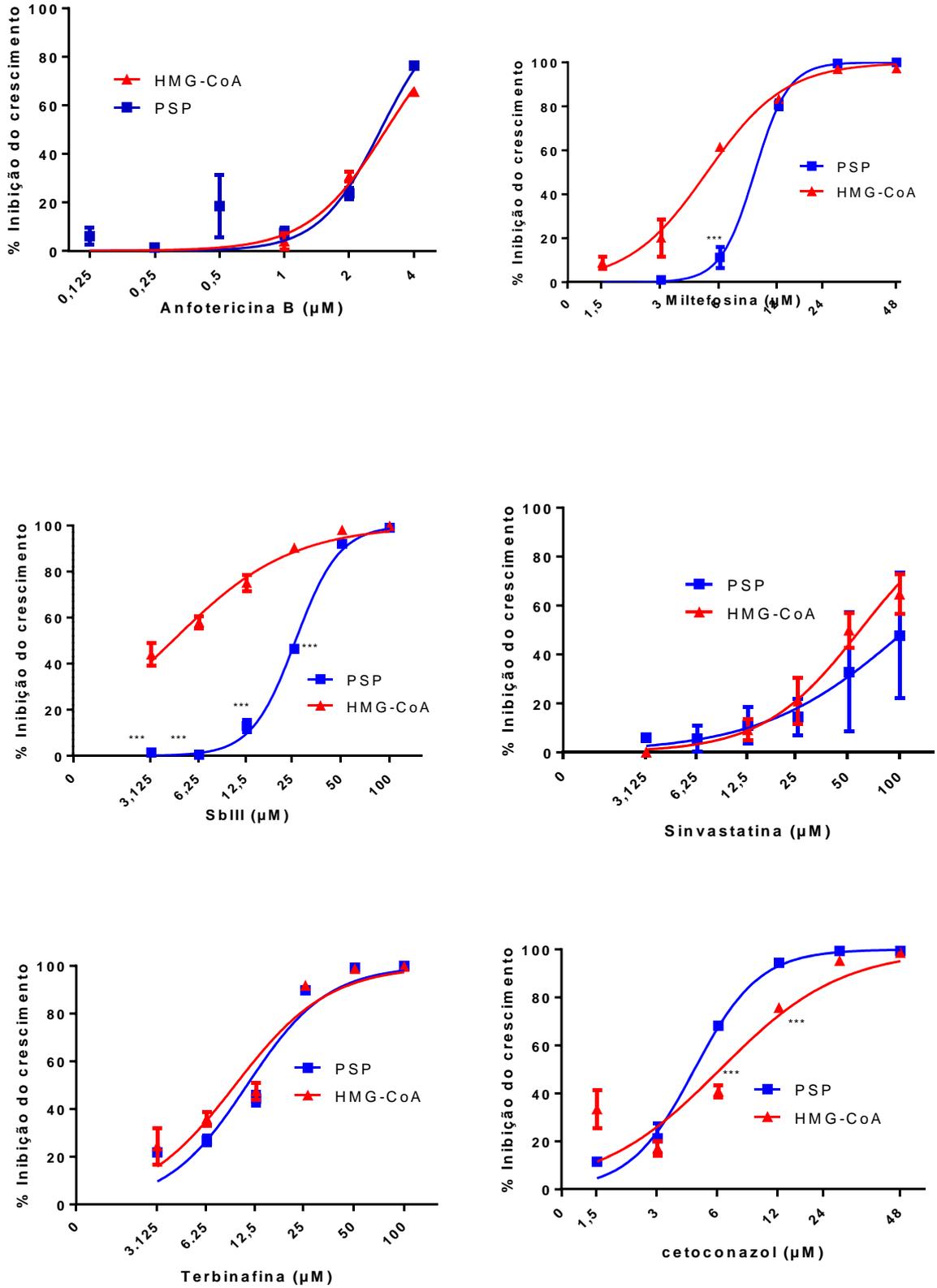
Os fármacos foram selecionados por atuarem em diferentes pontos da via de biossíntese de esteróis (sinvastatina 0-100µM, terbinafina 0-100µM e cetoconazol 0-48µM) e outros que não atuam na via (anfotericina B 0-4µM, miltefosina 0-48µM e o antimonial trivalente (Sb<sup>3+</sup>))

0-100 $\mu$ M). As concentrações escolhidas foram eleitas de acordo com o IC<sub>50</sub> de 72h previamente estabelecido na literatura em cepas selvagens. Também foi realizado experimento com G418 0-200 $\mu$ g/mL, com o intuito de confirmar a presença do plasmídeo nas cepas utilizadas (Fig. 5.11).

Os parasitos transfectados com o gene da HMGC<sub>o</sub>A redutase não apresentaram diferença significativa em relação à cepa transfectada com o PSP vazio, sob pressão de diferentes concentrações de anfotericina B (IC<sub>50</sub>→PSP- 2,8  $\mu$ M; HMGC<sub>o</sub>A<sup>high</sup>- 3,0  $\mu$ M) e terbinafina (IC<sub>50</sub>→ PSP- 11,0  $\mu$ M e HMGC<sub>o</sub>A<sup>high</sup>- 9,3  $\mu$ M). Porém, apresentou resistência ao cetoconazol, tendo um IC<sub>50</sub> de 6,1  $\mu$ M, enquanto o PSP apresentou IC<sub>50</sub> de 4,6  $\mu$ M. Além disso, apresentou-se mais sensível ao Sb<sup>3+</sup> (IC<sub>50</sub>→ PSP- 25,9  $\mu$ M; HMGC<sub>o</sub>A<sup>high</sup>- 4,3 $\mu$ M) e à sinvastatina (IC<sub>50</sub>→ PSP- >100  $\mu$ M; HMGC<sub>o</sub>A<sup>high</sup>- 58,2  $\mu$ M ) (Fig. 5.12 e Tabela 5.1).



**Figura 5.11-Confirmação da resistência ao antibiótico de seleção G418.** Promastigotas de *L. amazonensis* transfectadas ou não foram incubadas com diferentes concentrações de G418 para demonstrar o fenótipo de resistência conferido pelo plasmídeo. ANOVA ONE-WAY. \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\* p<0,0001.

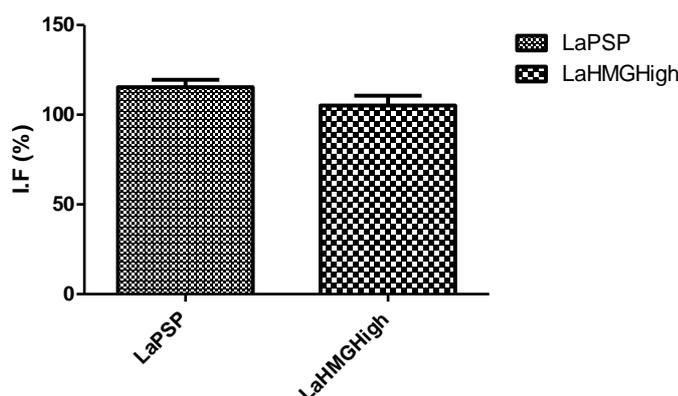


**Figura 5.12 -Sensibilidade de promastigotas LaHMGCoA<sup>high</sup> aos fármacos com atividade leishmanicida.** Promastigotas de *L. amazonensis*, transfectadas ou não, foram incubadas com diferentes concentrações de anfotericina B, miltefosina, Sb<sup>3+</sup>, sinvastatina, terbinafina ou cetoconazol. A viabilidade celular foi mensurada por resazurina e a leitura realizada em fluorímetro. ANOVA ONE-WAY. \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\* p<0,0001.

**Tabela 5.1 -IC<sub>50</sub> de 72h da atividade antipromastigota em LaHMGC<sub>oA</sub><sup>high</sup>**

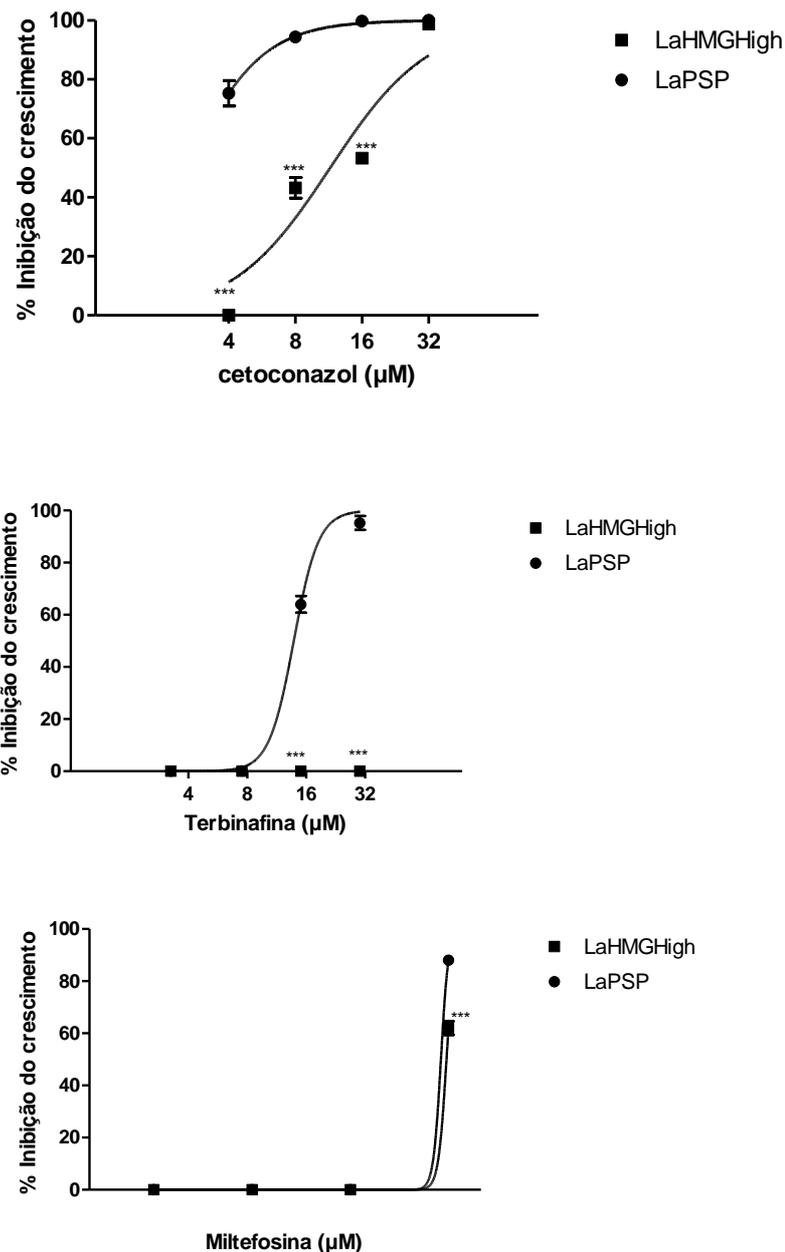
Fármacos	IC <sub>50</sub> (μM)	
	LaPSP	LaHMGC <sub>oA</sub> <sup>high</sup>
Anfotericina B	2,8±1,0	2,9±1,0
Miltefosina	9±1,0	5,1±1,0
Sb <sup>3+</sup>	25,9±1,0	4,2±1,0
Sinvastatina	>100	58,3±1,1
Terbinafina	11±1,0	9,3±1,1
Cetoconazol	4,5±1,0	6,1±1,1

Para avaliar susceptibilidade das formas amastigotas aos fármacos, primeiro analisamos o índice de infecção da cepa transfectada em relação ao controle e depois verificamos a susceptibilidade ao cetoconazol, terbinafina e miltefosina. Podemos observar que não houve alteração no índice de infectividade da LaHMGC<sub>oA</sub><sup>high</sup> quando comparada ao controle (Fig.5.13).



**Figura 5.13 - Índice de infecção da cepa LaHMGC<sub>oA</sub><sup>high</sup>.** Macrófagos peritoneais murinos de camundongos Swiss foram infectados na proporção 5:1 com LaHMGC<sub>oA</sub><sup>high</sup> e LaPSP por 4h e incubados por 72h a 37° C com 5% de CO<sub>2</sub>. As lâminas foram fixadas e coradas com InstantProv e contados 100 macrófagos por campo. Test t de student. \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\* p<0,0001

Nos testes de atividade antiamastigota, a cepa LaHMGC<sub>oA</sub><sup>high</sup> não apresentou diferença em relação a cepa controle quando tratada com miltefosina, entretanto foi significativamente mais resistente aos fármacos inibidores da via de biossíntese de esteróis. Em relação a terbinafina, a concentração mais alta utilizada (30μM) não interferiu em nada com o crescimento das amastigotas, ficando exatamente igual ao controle da cepa (Fig. 5.14, Tabela 5.2).



**Figura 5.14 – Porcentagem de inibição de amastigotas intracelulares da cepa LaHMGCoA<sup>high</sup> tratadas com fármacos com atividade leishmanicida.** Macrófagos peritoneais de camundongos Swiss foram infectados com LaPSP ou LaABCG4<sup>high</sup> e incubados com diferentes concentrações de miltefosina, terbinafina e cetoconazol. A viabilidade celular foi mensurada por contagem em microscópio de luz contando 100 macrófagos por campo. ANOVA ONE-WAY. \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\* p<0,0001.

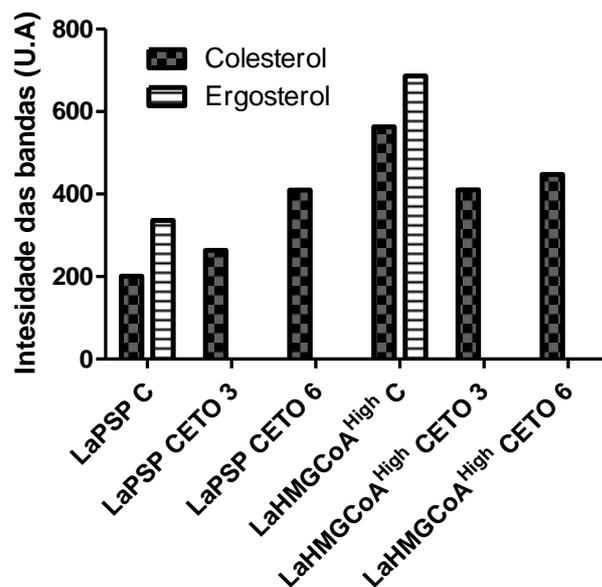
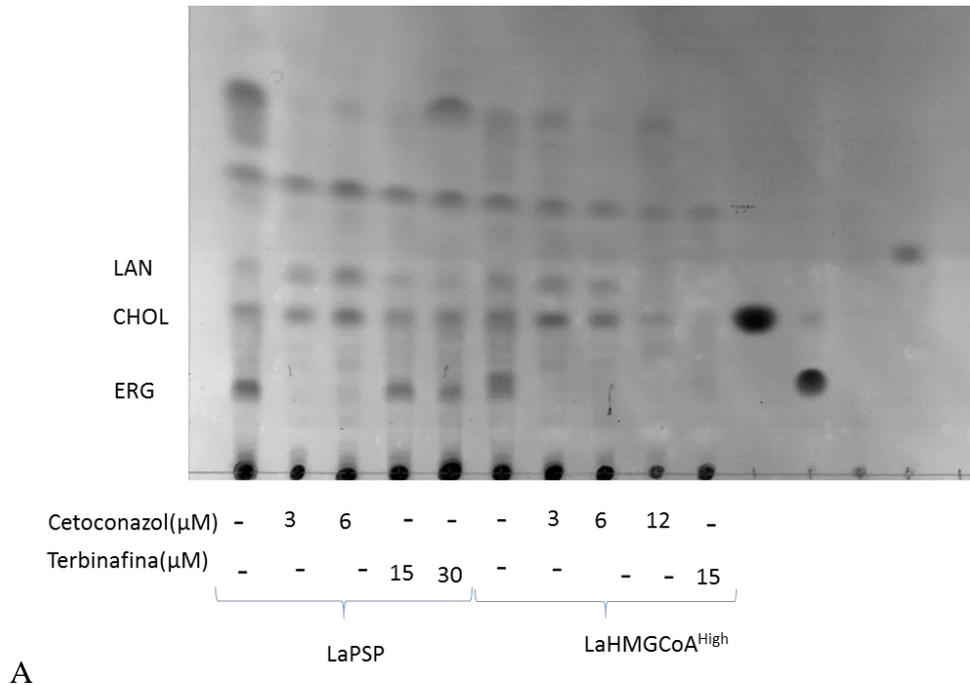
**Tabela 5.2- IC<sub>50</sub> de 72h dos fármacos leishmanicidas sobre a cepa LaHMGCoA<sup>high</sup>**

Fármacos	IC <sub>50</sub> (μM)	
	LaPSP	LaHMGCoA <sup>high</sup>
Cetoconazol	<4±0,4	11,4±1,5
Terbinafina	13,8±0,3	>40
Miltefosina	1,8±0,3	1,9±0,7

### 5.2.2 Avaliação do perfil de esteróis de após o tratamento com inibidores da VBE

Após os resultados de viabilidade celulares chamou a atenção o aumento, em algumas concentrações, da resistência de *LaHMGC<sub>oA</sub><sup>high</sup>* ao cetoconazol, em ambas as formas evolutivas do parasito, considerando que os azóis atuam na C14 desmetilase e a enzima superexpressa é a primeira da via de biossíntese de esteróis. A partir desses dados, o perfil de esteróis de *LaHMGC<sub>oA</sub><sup>high</sup>* tratadas com cetoconazol foi comparado tendo em vista a resistência, e também com terbinafina, por atuar na mesma via mas não ter tido sua atividade alterada pela superexpressão.

Promastigotas foram incubadas com diferentes concentrações dos fármacos por 72 h e seus lipídeos foram extraídos e analisados por TLC (Fig.5.15). Os dados da densitometria mostram que não houve aumento significativo da captação de colesterol do meio de cultura quando os parasitos foram incubados com ambos os fármacos. Entretanto, quando comparado aos controles, a *HMGC<sub>oA</sub><sup>high</sup>* apresenta uma dupla banda na altura dos esteróis de esqueleto ergostano.



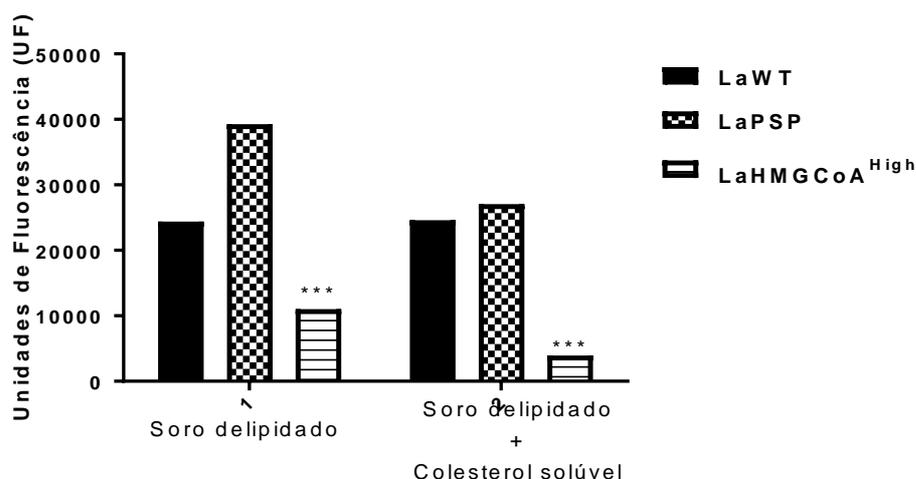
**Figura 5.15 -Perfil de esteróis em promastigotas da cepa LaHMGCoA<sup>high</sup> tratada com cetoconazol.** Promastigotas das cepas transfectadas ou não foram incubadas em meio RPMI 10%SFB por 72 h e os lipídeos foram extraídos e analisado. A- TLC das cepas tratadas com diferentes concentrações de cetoconazol e terbinafina. B- Densitometria da TLC de LaHMGCoA tratadas com diferentes concentrações de cetoconazol e terbinafina. O gráfico é representativo de um experimento. A cromatografia de camada fina foi digitalizada e

analisada por densitometria com o programa “ImageMaster TotalLab v1.11”. (UA – Unidades arbitrárias). COL – Colesterol, ERG – Ergosterol, LAN – Lanosterol. CETO- cetoconazol. TERB-Terbinafina.

### 5.2.3 Avaliação do perfil de esteróis em meio deslipidado

Tendo em vista que não houve diferença na captação de colesterol nas promastigotas tratadas com os fármacos acima, decidimos investigar o comportamento da LaHMGC $oA^{high}$  em meio deslipidado.

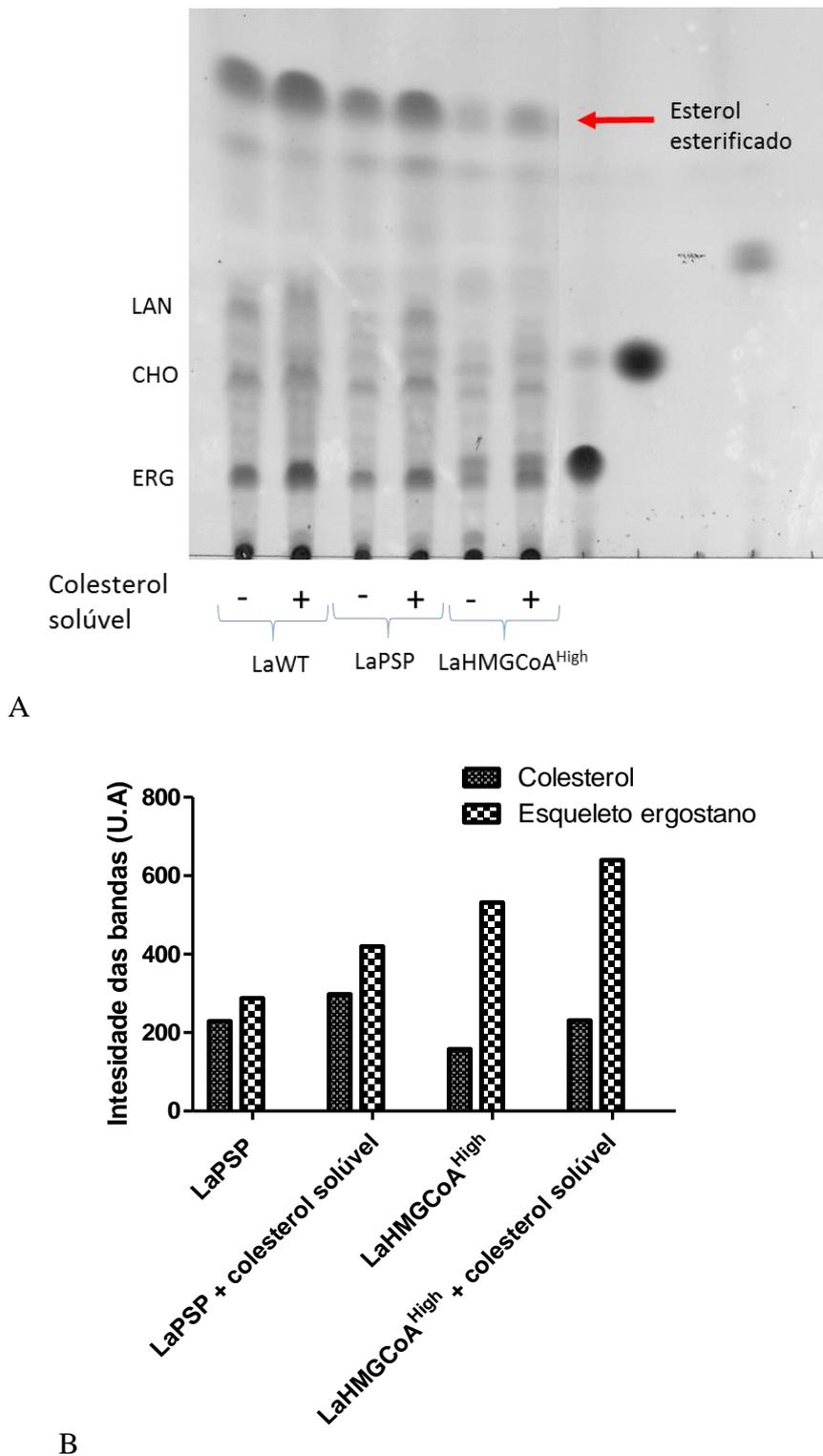
Os parasitos foram incubados em meio com soro deslipidado na presença de colesterol livre a 5 mg/mL por 72 h. Após este período, os parasitos foram incubados com 10  $\mu$ M de bodipy por 3 h e analisadas por fluorimetria. A cepa LaHMG $^{high}$  apresenta menor intensidade de fluorescência quando comparada ao controle, mesmo quando incubada com colesterol solúvel. (Fig.5.16).



**Figura 5.16 - Análise de lipídeos neutros de promastigotas LaHMG $^{high}$  por marcação com Bodipy.** As cepas transfectadas ou não foram incubadas por 72h com colesterol solúvel. Após esse período, foram incubadas com 10 $\mu$ M de bodipy por 3 h e analisadas por fluorimetria. Test t de student. \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\* p<0,0001.

A partir de então, resolvemos analisar o conteúdo de colesterol e ergosterol de promastigotas LaHMGC $oA^{high}$  com a oferta de 10  $\mu$ M de colesterol livre por um período de incubação de 72h. Conforme observado na Fig. 5.17, a cepa com o gene de interesse superexpresso apresenta maior quantidade de esteróis com esqueleto ergostano, em relação ao seu controle.

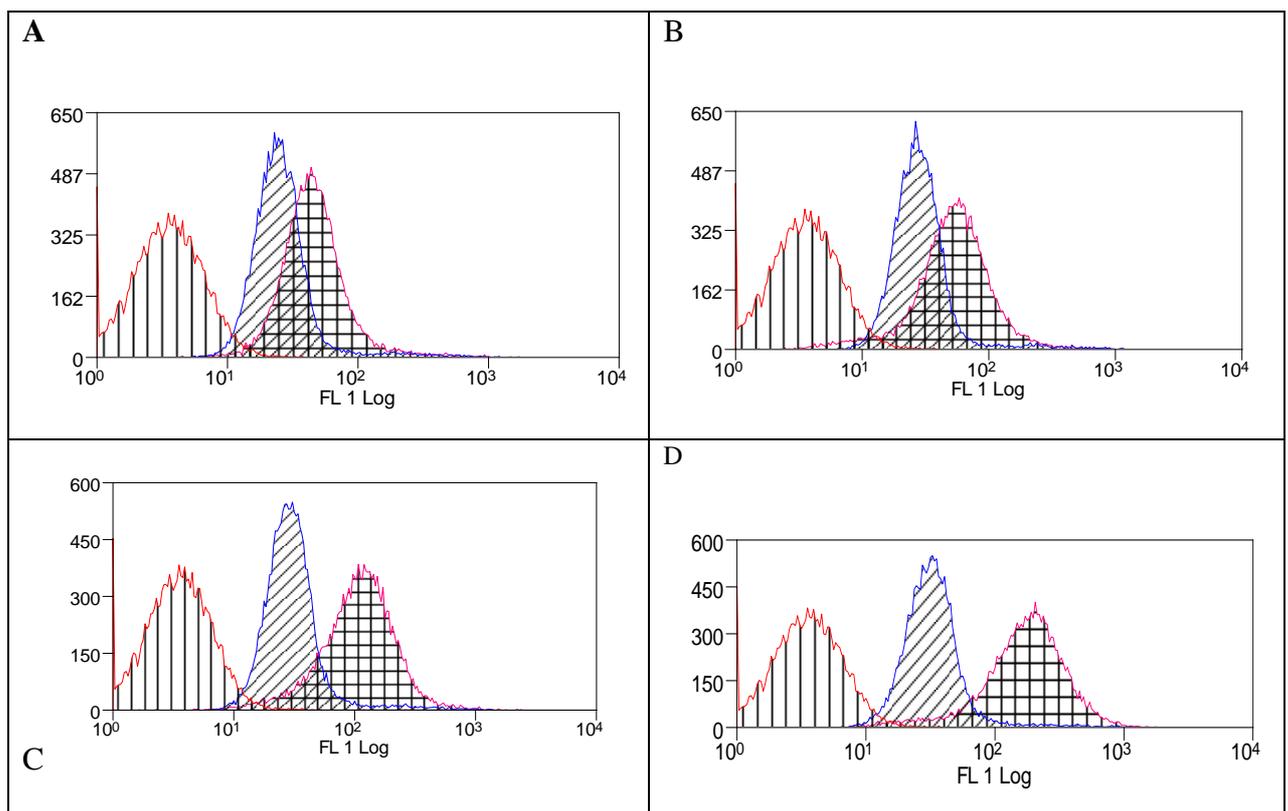
Também é possível observar que a LaHMGC $oA^{high}$  apresenta uma significativa redução de esteróis esterificados.

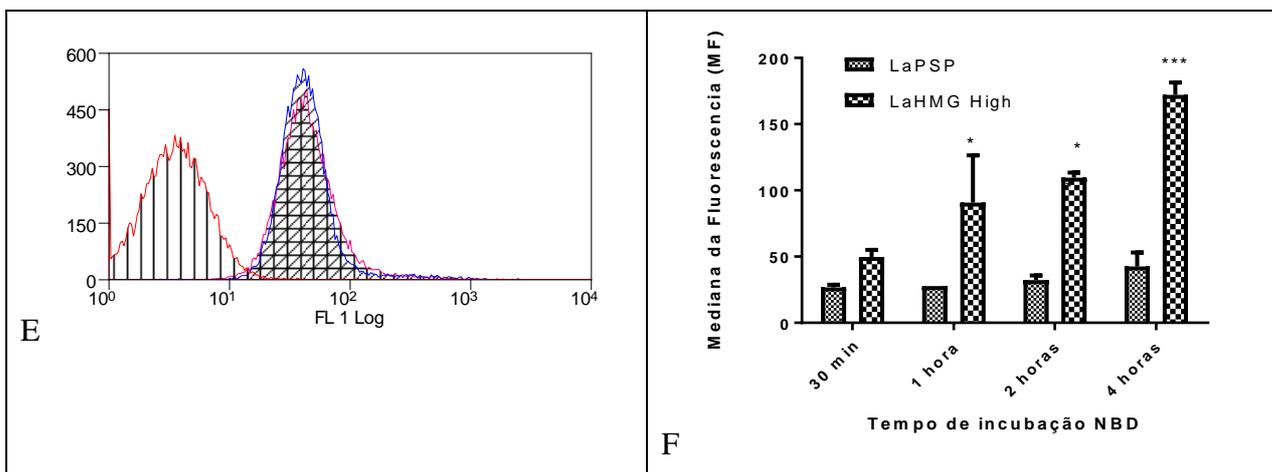


**Figura 5.17- Análise do conteúdo de colesterol e ergosterol de promastigotas LaHMGCoA<sup>high</sup> incubadas ou não com colesterol solúvel.** As cepas transfectadas ou não foram incubadas por 72h com colesterol livre. Após este período, os lipídeos foram extraídos e analisados. A- TLC das cepas com oferta ou não de colesterol solúvel. O gráfico é representativo de um experimento. B- Densitometria da TLC analisada por com o programa “ImageMaster TotalLab v1.11”(UA – Unidades arbitrárias). **LAN**- Lanosterol. **CHO**- colesterol. **ERG**- ergosterol.

#### 5.2.4 Avaliação da captação de esteróis exógenos

Na Fig. 5.18, é possível observar um aumento significativo da captação de NBD-colesterol a partir de 1h. Realizamos o experimento também com 4 h de estresse nutricional e 4 h de incubação com NBD-colesterol a 4°C, tendo em vista que temperaturas baixas diminuem o transporte e a captação de moléculas pelo parasito. Sendo assim, confirmamos que em temperaturas baixas a LaHMGC*CoA*<sup>high</sup> não capta colesterol exógeno



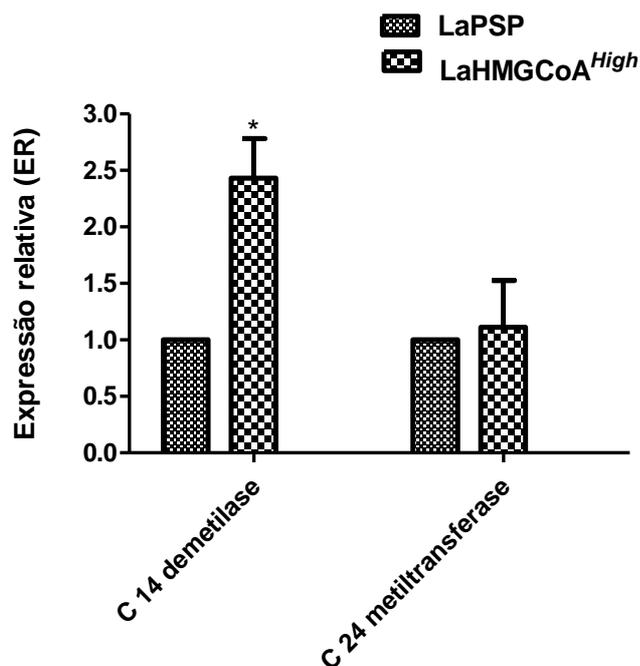


**Figura 5.18 -Captação de NBD-colesterol por LaHMG<sup>High</sup>.** As cepas LaPSP e LaHMGCoA<sup>high</sup> foram deixadas por 4h em estresse nutricional e incubadas por diferentes tempos com 10 $\mu$ M de NBD-colesterol. A- Tempo de incubação de 30 min a 26°C. B- Tempo de incubação de 1h a 26°C. C- Tempo de incubação de 2h a 26°C. D- Tempo de incubação de 4h a 26°C. E- Tempo de incubação de 4h a 4°C. F- Cinética de captura de NBD a 26°C. Na sobreposição as cores são representadas da seguinte forma: Vermelho: parasitos não marcados, Azul: LaPSP, Rosa: LaHMGCoA<sup>high</sup>. Teste t de student \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\* p<0,0001.

### 5.2.5 Expressão relativa de outras enzimas da via de biossíntese de esteróis

Considerando os resultados expostos acima, decidimos avaliar a influência da superexpressão da HMGCoA redutase na expressão de outras enzimas da via. A C14-desmetilase foi escolhida por ser alvo dos azóis e a cepa ter mostrado uma resistência aumentada nos ensaios de sensibilidade. A outra enzima avaliada foi a C24-metiltransferase, tendo em vista que só é expressa por tripanossomatídeos e está presente em uma das etapas finais da via.

A Fig.5.19 demonstra que quando superexpressamos a HMGCoA redutase em *Leishmania*, ocorre uma regulação da via, aumentando em torno de 2 vezes a expressão da C14-desmetilase. Este dado pode ser então relacionado com a resistência ao cetoconazol que a cepa LaHMGCoA<sup>high</sup> apresentou e ao aumento de esteróis com esqueleto ergostano.



**Figura 5.19** - Análise quantitativa da expressão gênica da C14-desmetilase e C24-metiltransferase de LaHMGC0A<sup>high</sup>. O RNAm dos parasitos foi extraído e ajustado para 10ng para síntese do cDNA e a RT-qPCR realizada numa reação com SYBR Supermix Green. Aumento da expressão relativa do gene C14-desmetilase em aproximadamente 2 vezes. Test t de student. \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\* p<0,0001.

### 5.3.0 papel da ABCG4 na regulação do colesterol exógeno do parasito

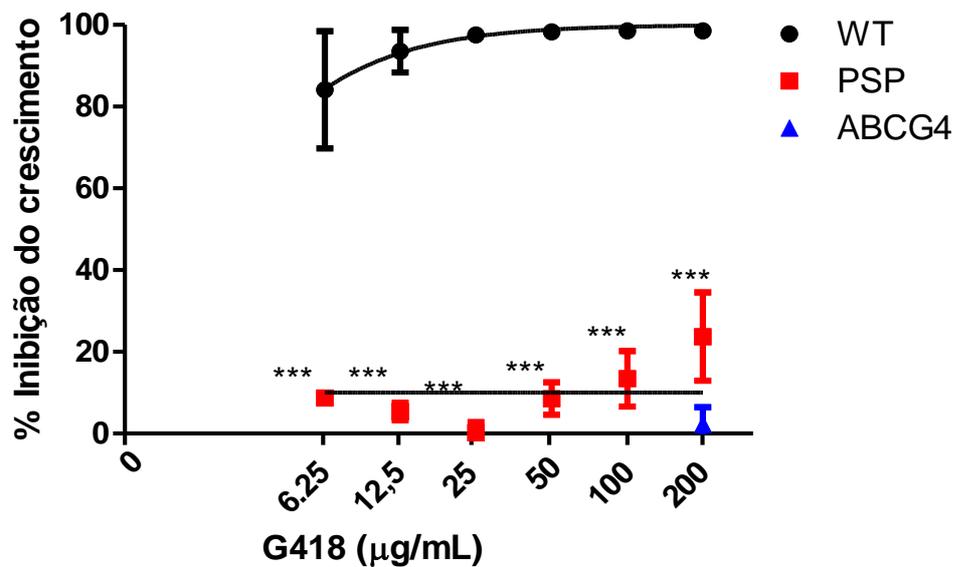
Uma vez que é relatado na literatura que ABCG1, ABCG4 e ABCG6 são transportadores de fosfolipídeos em células de mamíferos, decidimos estudar o papel de alguns desses transportadores por superexpressão em *Leishmania* spp. Para a avaliação da regulação de colesterol exógeno por ABCG4 foram utilizados os parasitos de *L. amazonensis* superexpressando este transportador (LaABCG4) e as comparações foram realizadas com o controle (LaPSP).

#### 5.3.1 Avaliação da sensibilidade a fármacos

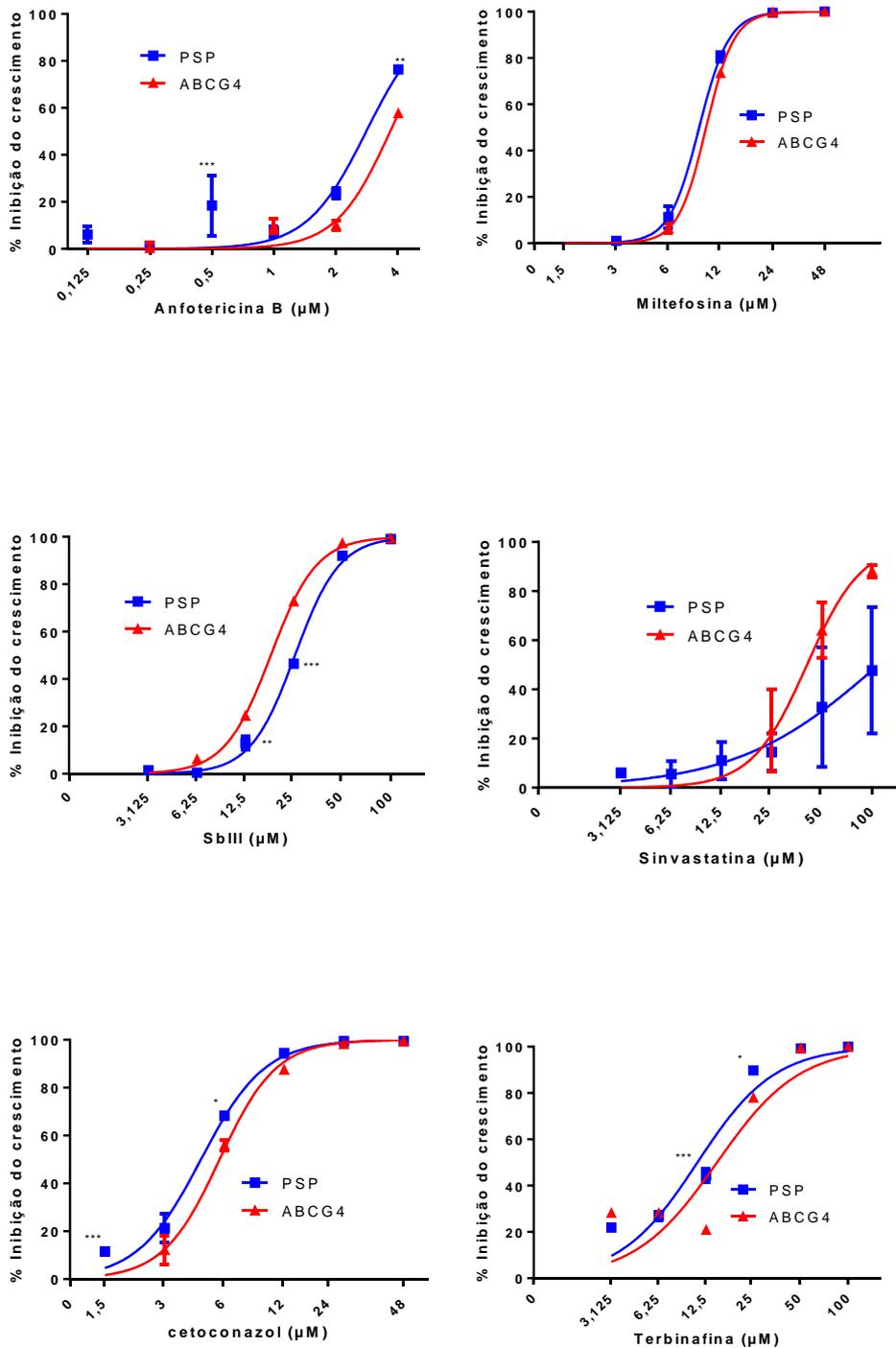
A escolha dos fármacos e das concentrações testadas foi feita da mesma forma que descrito para o ensaio com a LaHMGC0A<sup>high</sup>. Também foi realizado o experimento com G418 0-200µg/mL, com o intuito de confirmar a presença do plasmídeo nas cepas utilizadas (Fig.5.20).

A cepa transfectada com o gene da ABCG4 (LaABCG4<sup>high</sup>) não apresentou diferença de significativa de sensibilidade à miltefosina (IC<sub>50</sub> → PSP- 9 µM; LaABCG4<sup>high</sup> – 9,9 µM) e ao cetoconazol (IC<sub>50</sub> → PSP- 4,6 µM, ABCG4- 4,5 µM), mas apresentou resistência moderada

à anfotericina B ( $IC_{50} \rightarrow$  PSP-2,8  $\mu$ M, LaABCG4<sup>high</sup>-3,7  $\mu$ M) e à terbinafina ( $IC_{50} \rightarrow$  PSP-11,0  $\mu$ M, ABCG4- 14,7  $\mu$ M). Porém, apresentou susceptibilidade aumentada ao antimônio trivalente ( $IC_{50} \rightarrow$  PSP- 25,4  $\mu$ M, ABCG4- 18,0  $\mu$ M) (Fig. 5.21 e Tabela 5.3)



**Figura 5.20 -Confirmação da resistência ao antibiótico de seleção G418.** Promastigotas de *L. amazonensis* transfectadas ou não foram incubadas com diferentes concentrações de G418 para demonstrar o fenótipo de resistência conferido pelo plasmídeo. ANOVA ONE-WAY. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,0001$ .

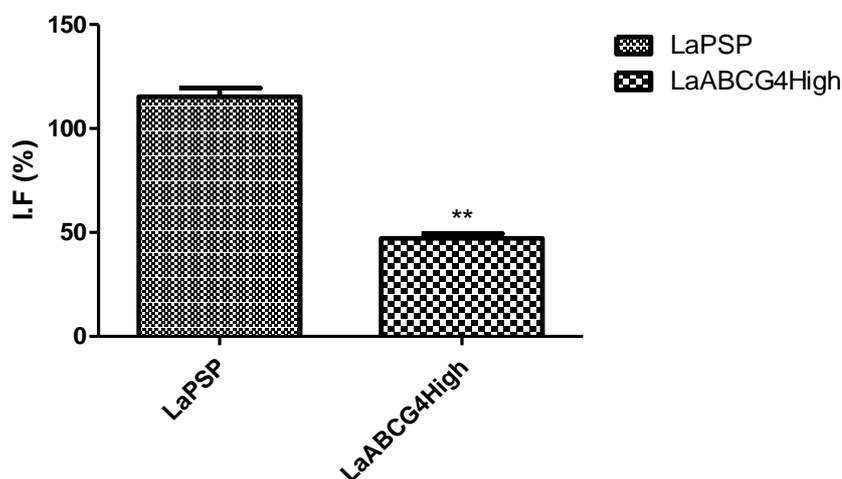


**Figura 5.21 -Sensibilidade de LaABCG4<sup>high</sup> aos fármacos com atividade leishmanicida.** Promastigotas de *L. amazonensis* transfectadas ou não foram incubadas com diferentes concentrações de anfotericina B, miltefosina, Sb<sup>3+</sup>, sinvastatina, terbinafina e cetoconazol. A viabilidade celular foi mensurada por resazurina e a leitura realizada em fluorímetro. ANOVA-ONE WAY. \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\* p<0,0001.

**Tabela 5.3-** Valores de IC<sub>50</sub> em 72h de teste anti-promastigota em LaABCG4<sup>high</sup>

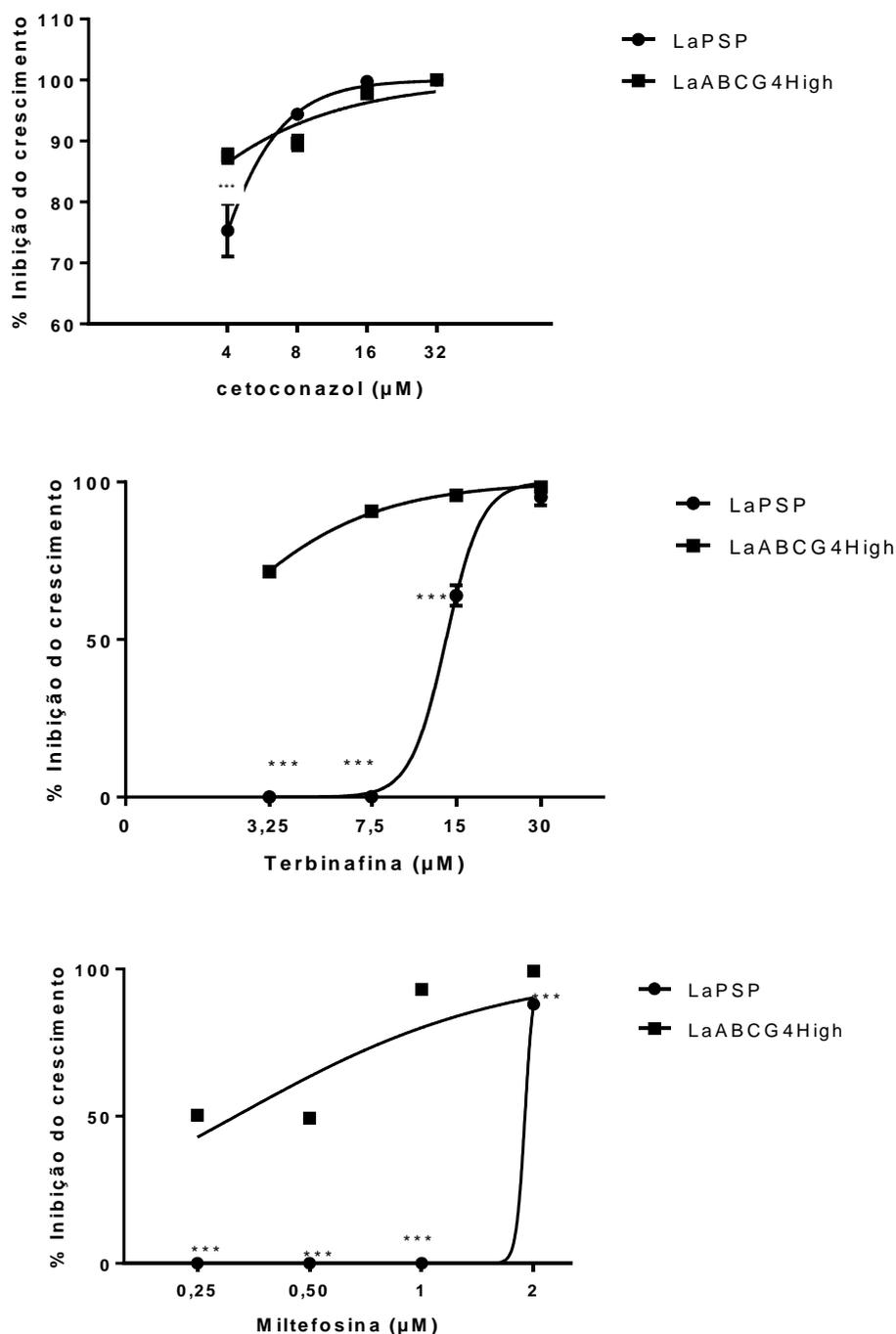
Fármacos	IC <sub>50</sub> (μM)	
	LaPSP	LaABCG4 <sup>high</sup>
Anfotericina B	2,8±1,0	3,6±1,0
Miltefosina	9±1,0	9,9±1,0
Sb <sup>3+</sup>	25,9±1,0	17,9±1,0
Sinvastatina	>100	40,7±1,1
Terbinafina	11±1,0	14,6±1,1
Cetoconazol	4,5±1,0	5,6±1,0

Para avaliar a susceptibilidade das formas amastigotas aos fármacos, primeiro analisamos o índice de infecção da cepa tratada em relação ao controle e depois verificamos a susceptibilidade ao cetoconazol, terbinafina e miltefosina. Podemos observar que a superexpressão do transportador ABCG4 alterou infectividade do parasito, deixando a cepa LaABCG4<sup>high</sup> menos infectiva quando comparada ao controle (Fig.5.22).



**Figura 5.22 -Índice de infecção da cepa LaABCG4<sup>high</sup>.** Macrófagos peritoneais de camundongos Swiss foram infectados na proporção 5:1 com LaABCG4<sup>high</sup> e LaPSP por 4h e incubados por 72h a 37° C com 5% de CO<sub>2</sub>. As lâminas foram fixadas e coradas com InstantProv e contados 100 macrófagos por campo. Test t de student. \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\* p<0,0001

Nos testes anti-amastigotas, podemos observar que LaABCG4<sup>high</sup> foi significativamente mais sensível a terbinafina e a miltefosina. Em relação ao cetoconazol, a cepa não apresentou diferença quando comparada com o controle (Fig. 5.23 e Tabela 5.4)



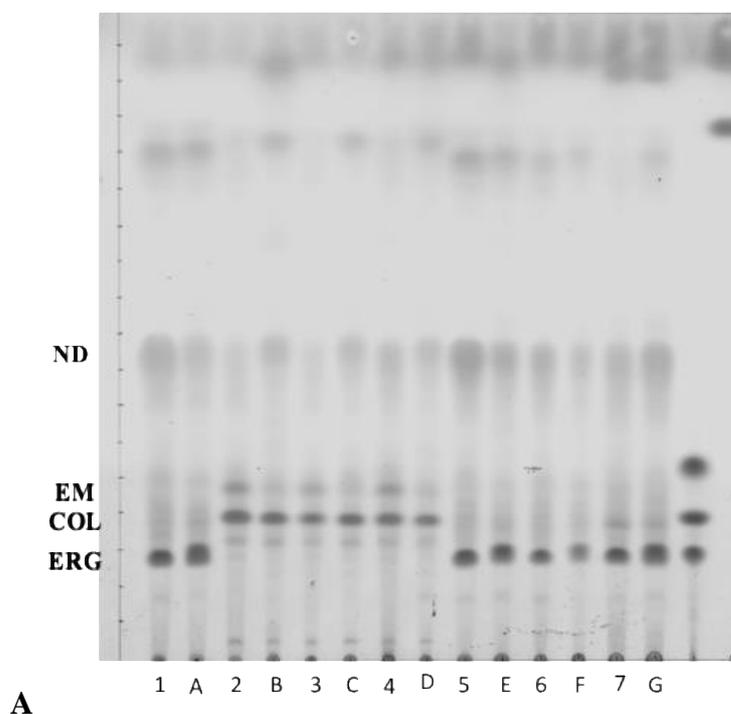
**Figura 5.23 – Porcentagem de inibição de amastigotas intracelulares da cepa LaABCG4<sup>high</sup> aos fármacos leishmanicidas.** Macrófagos peritoneais de camundongos Swiss foram infectados com LaPSP ou LaABCG4<sup>high</sup> e incubados com diferentes concentrações de miltefosina, terbinafina e cetoconazol. A viabilidade celular foi mensurada em microscópio de luz contando 100 macrófagos por campo. Média ± SD de três experimentos independentes, em triplicata. ANOVA ONE-WAY. \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\* p<0,0001.

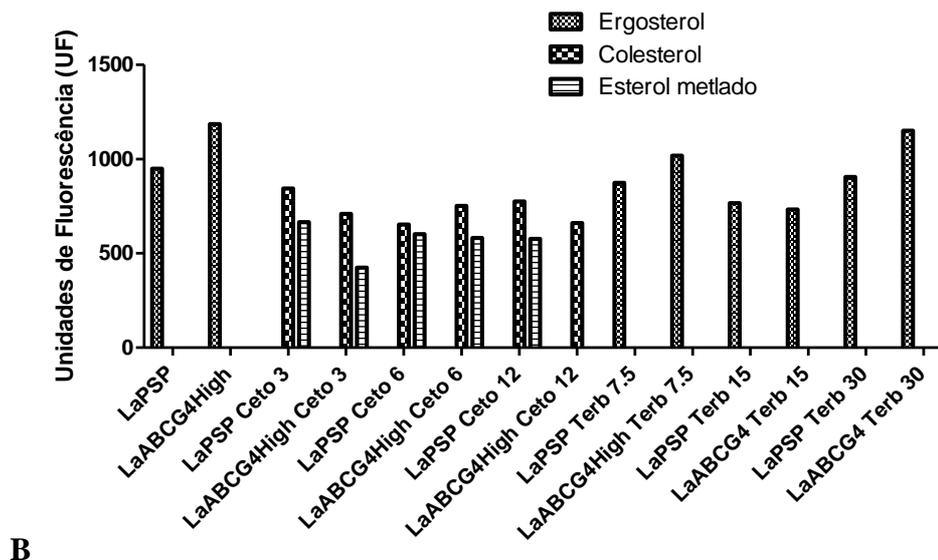
**Tabela 5.4- IC<sub>50</sub> de 72h da atividade antiamestigota em LaABCG4<sup>high</sup>**

Fármacos	IC <sub>50</sub> (μM)	
	LaPSP	LaABCG4 <sup>high</sup>
Cetoconazol	<4±0,4	<4±2,1
Terbinafina	14,43±1,7	<3,25±1,0
Miltefosina	1,92±1,1	0,42±0,07

### 5.3.2 Avaliação do perfil de esteróis da cepa LaABCG4<sup>high</sup> após o tratamento com inibidores da via de biossíntese de esteróis

Após a observação de um discreto aumento na resistência das promastigotas LaABCG4<sup>high</sup> aos fármacos inibidores da biossíntese de esteróis, cetoconazol e terbinafina, resolvemos avaliar o conteúdo de colesterol após o tratamento. Na cepa LaABCG4<sup>high</sup> tratada com cetoconazol, foi possível observar um aumento de esteróis metilados e uma banda maior na altura do ergosterol que pode estar associado ao aumento de esteróis com esqueleto ergostano (Fig. 5.24).

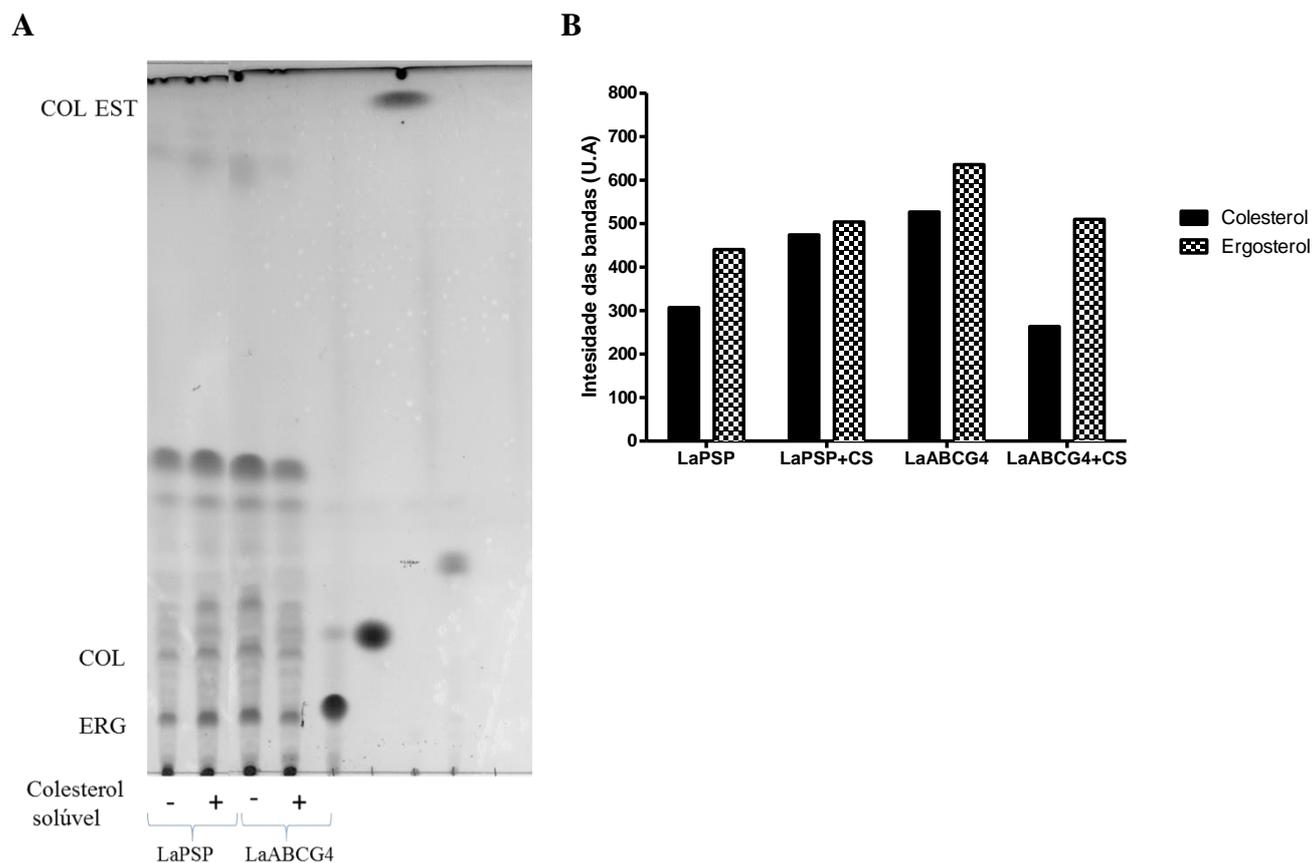




**Figura 5.24 -Perfil de esteróis de promastigotas LaABCg4<sup>high</sup> tratadas com cetoconazol e terbinafina.** Promastigotas das cepas transfectadas ou não foram incubadas em meio RPMI 10% SFB por 72 h e os lipídeos foram extraídos e analisados, A- TLC da cepa LaABCg4<sup>High</sup> tratadas ou não com cetoconazol. O gráfico é representativo de um experimento .1-7 LaPSP; A-G-LaABCg4<sup>high</sup>; 2,B- Cetoconazol 3μM; 3,C- Cetoconazol 6μM; 4,D- cetoconazol 12μM; 5,E-Terbinafina 7.5μM; 6,F- Terbinafina 15μM; 7,G- Terbinafina 30μM. B- Densitometria da cromatografia analisada pelo software “ImageMaster TotalLab v1.11” COL – Colesterol, ERG – Ergosterol, EM – Esterol metilado. CETO-cetoconazol. TERB-Terbinafina

### 5.3.3 Avaliação da captação de esteróis exógenos

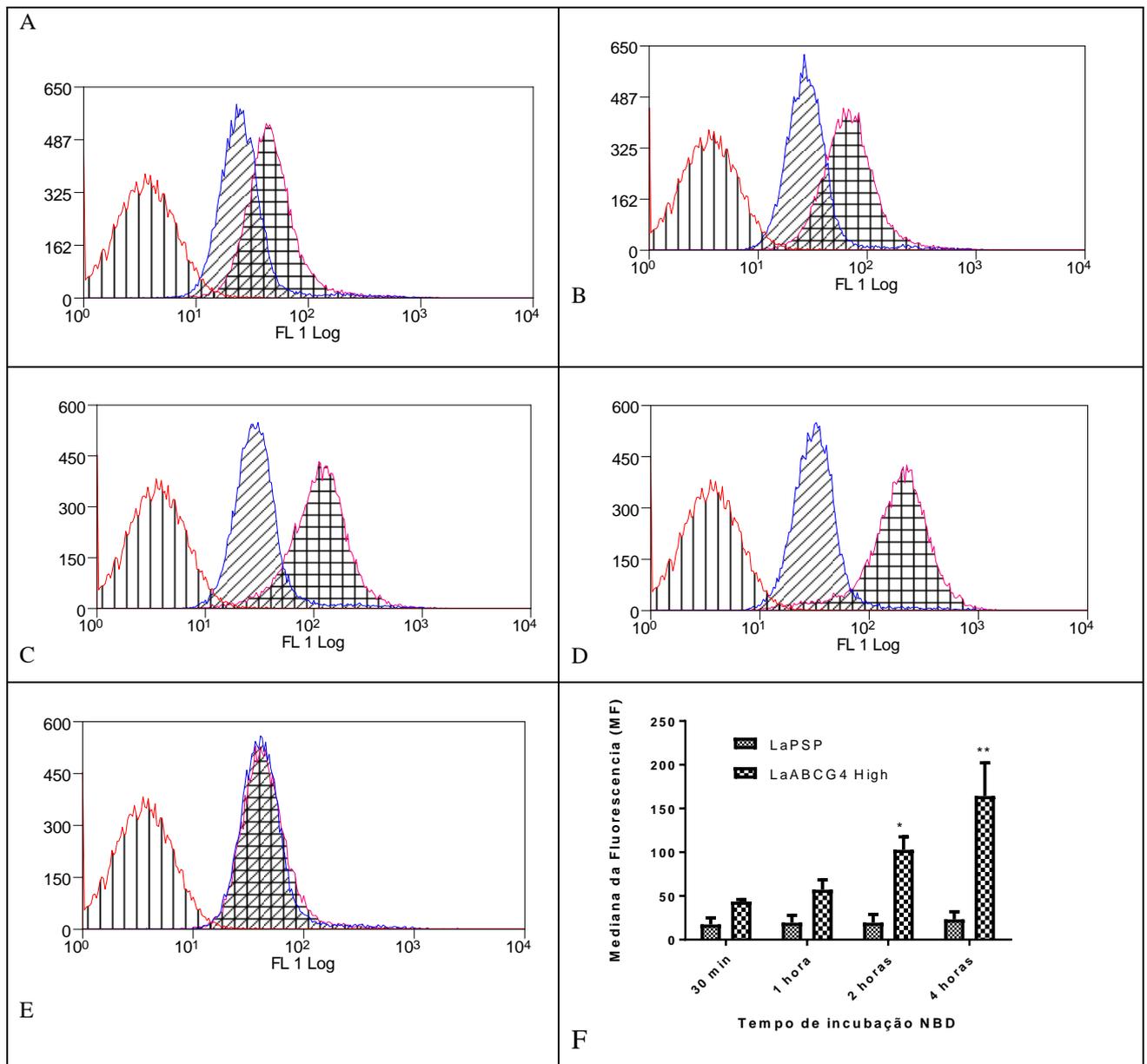
A partir dos dados de sensibilidade aos fármacos, iniciamos a avaliação de captação de esteróis exógenos. Para tal, as cepas LaABCg4<sup>high</sup> e o controle foram incubadas por 72 h em meio RPMI com 10% de soro deslipídado (SBFd), suplementadas ou não com 5 mg/mL de colesterol livre. Na Fig.5.25, pode-se observar que além de não haver aumento de captação de colesterol em relação ao controle, mesmo quando oferecido colesterol livre, ainda existe uma redução da quantidade de colesterol quando comparado ao controle na mesma condição.



**Figura 5.25 - Análise do conteúdo de esteróis de promastigotas LaABCG4<sup>high</sup> incubadas ou não com colesterol solúvel por TLC.** As cepas transfectadas ou não foram incubadas por 72h com colesterol livre. Após esse período, os lipídeos foram extraídos e analisados por TLC. A- TLC das cepas com oferta ou não de colesterol solúvel. B- Densitometria da TLC analisada por com o programa “ImageMaster TotalLab v1.11”(UA – Unidades arbitrárias). O gráfico é representativo de um experimento. LAN- Lanosterol. CHO- colesterol. ERG- ergosterol.

Em seguida, analisamos a captação de NBD-colesterol. Portanto, os parasitos foram mantidos em por 4 h e foi realizada uma cinética de captação de NBD-colesterol nos períodos de 30 min, 1, 2 e 4 h.

Podemos verificar que a LaABCG4<sup>high</sup> incorpora significativamente mais NBD-colesterol com o aumento do tempo de incubação. Fomos, então, avaliar se a captação de NBD-colesterol era um processo ativo, isto é, dependente de energia. Para tal, repetimos o experimento nas mesmas condições, mas com incubação com o NBD-colesterol a 4°C. Como observado na Fig. 5.26E, confirmamos que em baixas temperaturaso transportador ABCG4 não está ativo.



**Figura 5.26-Captação de NBD-colesterol por LaABCG4<sup>High</sup>.** As cepas LaPSP e LaABCG4<sup>High</sup> foram deixadas por 4h em estresse nutricional e incubadas por diferentes tempos com 10 $\mu$ M de NBD-colesterol. A- Tempo de incubação de 30 min a 26°C. B- Tempo de incubação de 1h a 26°C. C- Tempo de incubação de 2h a 26°C. D- Tempo de incubação de 4h a 26°C. E- Tempo de incubação de 4h a 4°C. F-Cinética de captação de NBD. Na sobreposição as cores são representadas da seguinte forma: Vermelho: parasitos não marcados, Azul: LaPSP, Rosa: LaABCG4<sup>high</sup>. Test t de student. \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\* p<0,0001

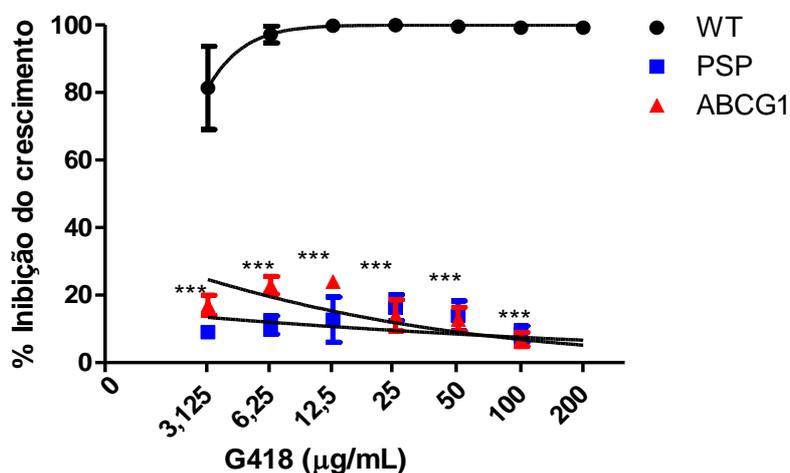
#### 5.4O papel da ABCG1 na regulação do colesterol exógeno do parasito

Para a avaliação da regulação de colesterol exógeno por ABCG1 foram utilizados os parasitos de *L. major* superexpressando este transportador (LmABCG1) e as comparações foram realizadas com o controle (LmPSP).

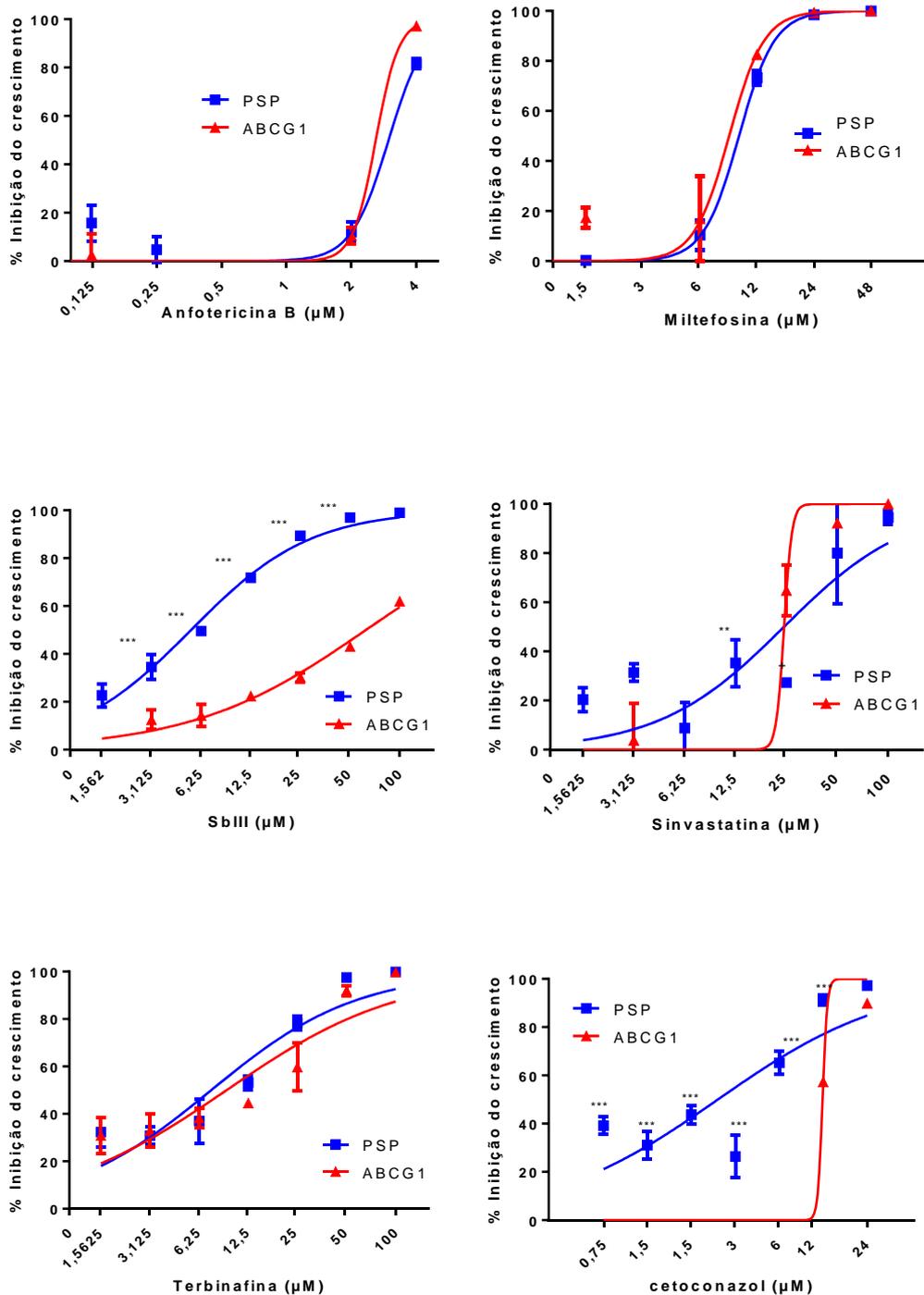
#### 5.4.1 Avaliação da sensibilidade a fármacos

Assim como realizado para as outras cepas transfectadas, a sensibilidade da cepa *LmABC*G1<sup>high</sup> a um painel de fármacos foi avaliada. Como controle de transfecção, o fenótipo de resistências ao antibiótico G418 também foi avaliado (Fig. 5.27).

Os parasitos transfectados com o gene da ABCG1 não apresentaram diferença significativa sob pressão da miltefosina (IC<sub>50</sub>→PSP- 9,6 μM; ABCG1- 8,5 μM), terbinafina (IC<sub>50</sub>→ PSP-7,4 μM; ABCG1- 9,2 μM) e sinvastatina (IC<sub>50</sub>-PSP-24,3 μM, ABCG1-24,2 μM). Porém, apresentou resistência aos fármacos não relacionados Sb<sup>3+</sup> (IC<sub>50</sub>- PSP- 5,4 μM; ABCG1 – 62,4 μM) e cetoconazol (IC<sub>50</sub>→ PSP- 4,5 μM; ABCG1- 23,7 μM) (Fig. 5.28 e Tabela 5.5).



**Figura 5.27 -Confirmação da resistência ao antibiótico de seleção G418.** Promastigotas de *L. major* transfectadas ou não foram incubadas com diferentes concentrações de G418 para demonstrar o fenótipo de resistência conferido pelo plasmídeo. ANOVA ONE-WAY. \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\* p<0,0001

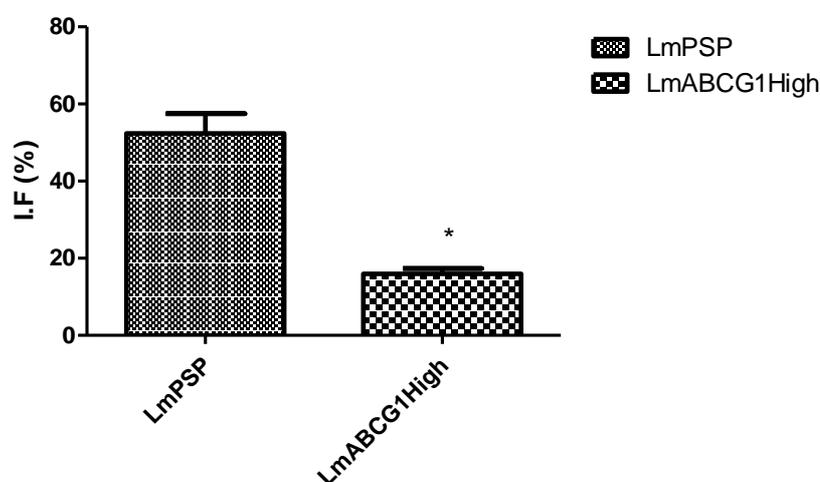


**Figura 5.28 -Sensibilidade de *LmABCG1<sup>high</sup>* aos fármacos com atividade leishmanicida.** Promastigotas de *L. major* transfectadas ou não foram incubadas com diferentes concentrações de anfotericina B, miltefosina,  $\text{Sb}^{3+}$ , sinvastatina, terbinafina e cetoconazol. A viabilidade celular foi mensurada por resazurina e a leitura realizada em fluorímetro. ANOVA ONE-WAY. \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\* p<0,0001.

Tabela 5.5. IC<sub>50</sub> de 72h da a tividade antipromastigota em LmABCG1<sup>high</sup>

Fármacos	IC <sub>50</sub> (μM)	
	LaPSP	LmABCG1 <sup>high</sup>
Anfotericina B	2,9±1,1	2,5±1,1
Miltefosina	9,6±1,0	8,5±1,0
Sb <sup>3+</sup>	5,4±1,0	62,4±1,1
Sinvastatina	24,1±1,3	24,2±1,2
Terbinafina	7,4±1,1	9,2±1,2
Cetoconazol	4,5±1,3	23,74±1,2

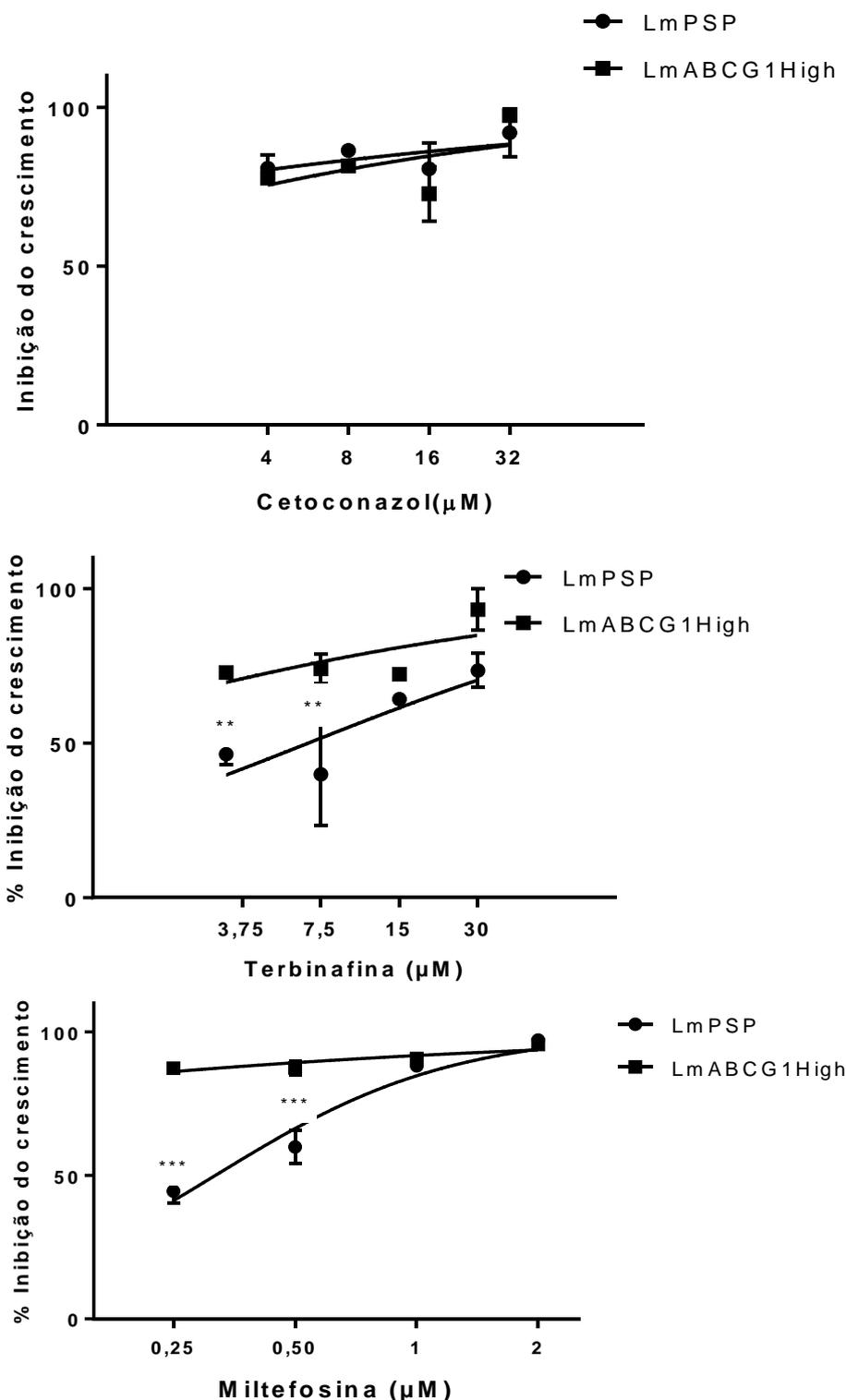
Para avaliar susceptibilidade das formas amastigotas a fármacos, primeiro analisamos infecção da cepa tratada em relação ao controle e depois verificamos a susceptibilidade ao cetoconazol, terbinafina e miltefosina. Podemos observar que a superexpressão do transportador ABCG1 alterou a infecção do parasito, deixando a cepa LmABCG1<sup>high</sup> menos infectiva quando comparada ao controle (Fig.5.29).



**Figura 5.29 - Índice de infecção da cepa LmABCG1<sup>high</sup>.** Macrófagos peritoneais de camundongos Swiss foram infectados na proporção 5:1 com LmABCG1<sup>high</sup> e LMPSP por 4h e incubados por 72h a 37° C com 5% de CO<sub>2</sub>. As lâminas foram fixadas e coradas com InstantProv e contados pelo menos 100 macrófagos por campo. Test t de student. \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\* p<0,0001

No ensaio anti-amastigota, podemos observar que LmABCG1<sup>high</sup> não apresentou diferença em relação ao controle quando tratada com o cetoconazol, como a forma promastigota. Entretanto foi mais sensível à terbinafina e não apresentou diferença no IC<sub>50</sub> do tratamento com miltefosina, entretanto houve uma diferença significativa nas concentrações

de 0,25 e 0,5  $\mu\text{M}$  que mostrando que a LmABCG1 requer concentrações maiores para atingir a mesma inibição que o controle. (Fig. 5.30 e Tabela 5.6).



**Figura 5.30 -Porcentagem de inibição de amastigotas LmABCG1<sup>high</sup> tratadas com fármacos com atividade leishmanicida.** Macrófagos peritoneais de camundongos Swiss foram infectados com LmPSP ou LmABCG1<sup>high</sup> e incubados com diferentes concentrações de miltefosina, terbinafina e cetoconazol. A infecção foi mensurada por contagem em microscópio óptico contando ao menos 100 macrófagos por campo. ANOVA ONE-WAY. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,0001$ .

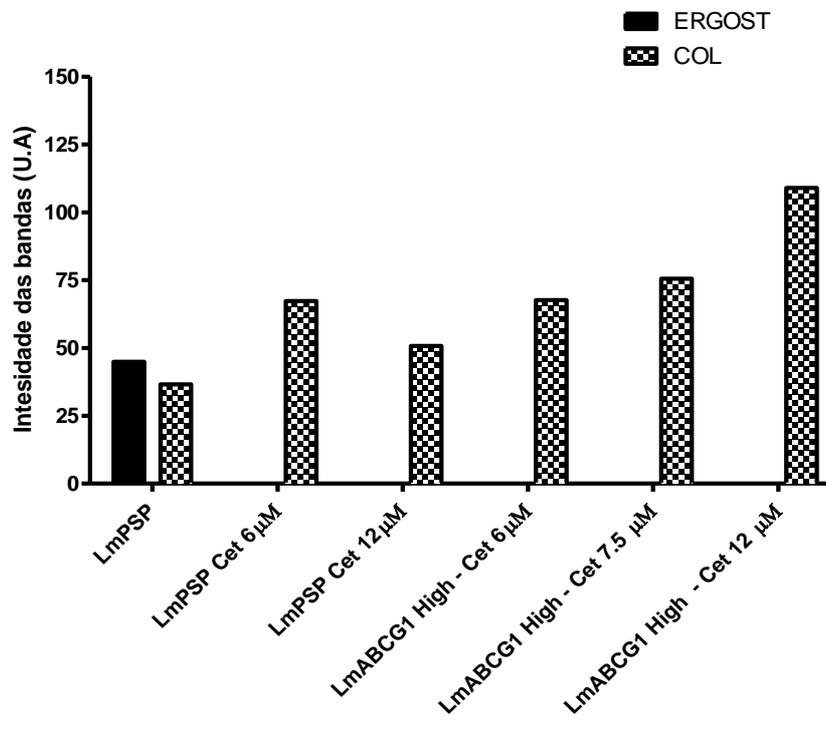
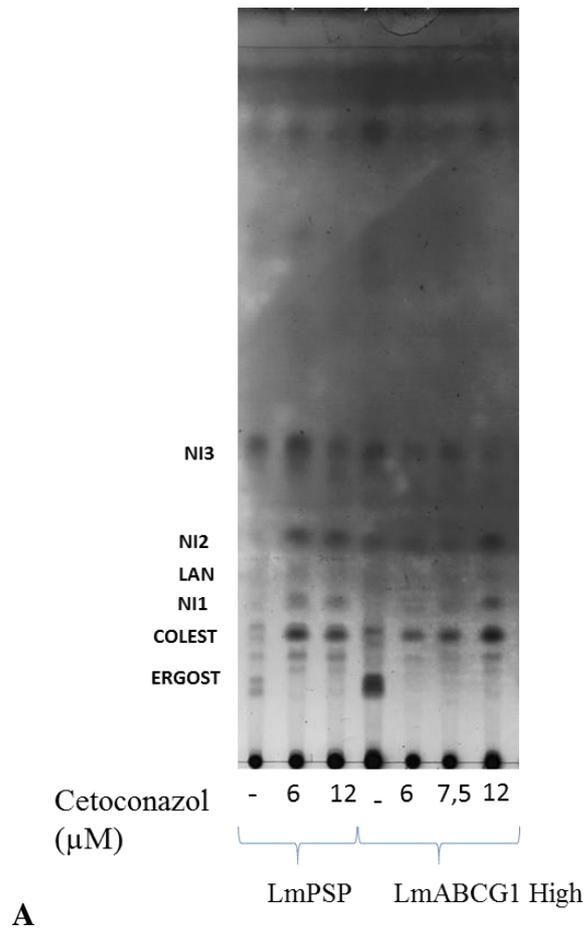
**Tabela 5.6- IC<sub>50</sub> de 72h da atividade antiamestigota em LmABCG1<sup>high</sup>**

Fármacos	IC <sub>50</sub> (µM)	
	LmPSP	LmABCG1 <sup>high</sup>
Cetoconazol	>4±1,1	>4±2,0
Terbinafina	12,33±2,9	>3,2±1,6
Miltefosina	0,3±0,0	>0,2±0,1

#### 5.4.2 Avaliação do perfil de esteróis de após o tratamento com inibidores da VBE

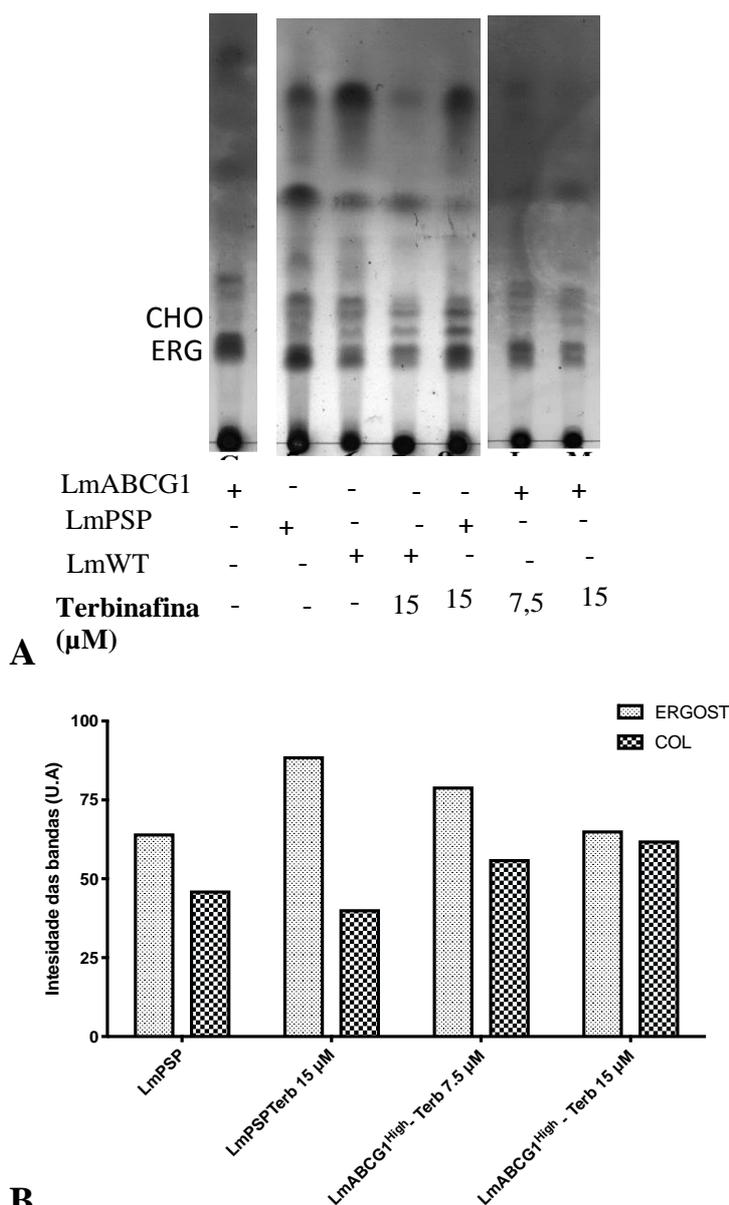
Realizamos a análise do perfil de esteróis da cepa ABCG1 e seus controles sob pressão do cetoconazol, uma vez que as promastigotas se apresentaram resistentes. Para fins de comparação, avaliamos o efeito da terbinafina, pelo fato da cepa em questão não ter apresentado diferença significativa nos testes de resistência e susceptibilidade em promastigotas, mas ter apresentado maior sensibilidade nos testes antiamestigota.

O tratamento com cetoconazol, nas formas promastigotas, inibiu completamente a biossíntese do ergosterol e causou aumento da banda correspondente ao colesterol proporcionalmente à concentração do fármaco. Quando analisamos a densitometria, observamos que o tratamento com cetoconazol força um aumento da presença de colesterol em duas vezes (Fig 5.31). A análise do perfil lipídico após o tratamento com terbinafina não apresentou diferença entre a cepa ABCG1<sup>high</sup> e a cepa controle (Fig. 5.32)



**Figura 5.31 -Perfil de esteróis de promastigotas *LmABCG1<sup>high</sup>* tratadas com cetoconazol** Promastigotas das cepas transfectadas ou não foram incubadas em meio RPMI 10%SFB por 72 h e os lipídeos foram extraídos e analisados. A- TLC das cepas tratadas com cetoconazol. B-Densitometria da cromatografia analisada por densitometria com o programa “ImageMaster TotalLab v1.11” (UA – Unidades arbitrárias). O gráfico é representativo de um experimento. COL – Colesterol, ERG –

Ergosterol, LAN – Lanosterol. NI1- Não identificado 1, NI2- não identificado 2, NI3- Não identificado 3.

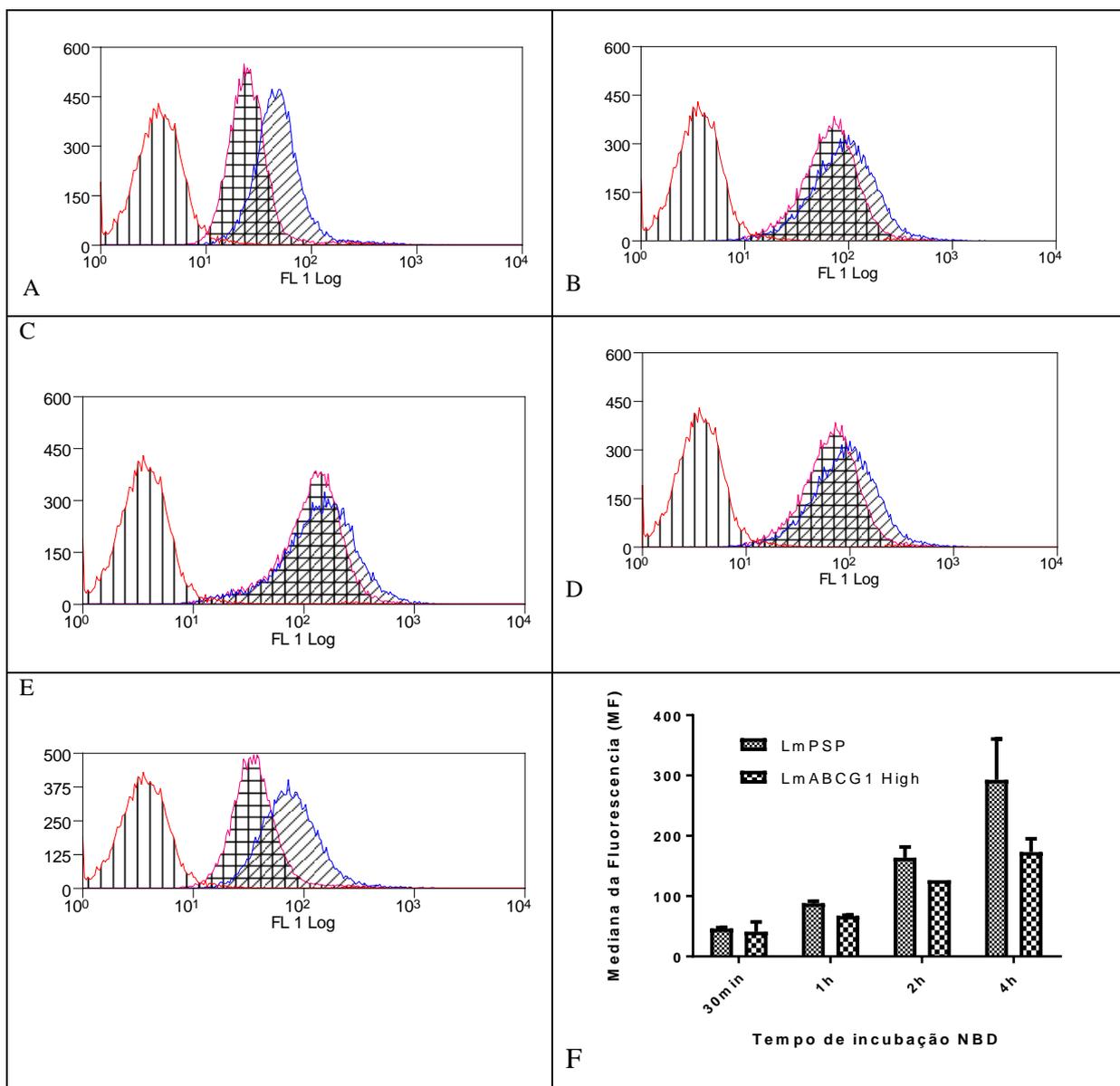


**Figura 5.32 -Perfil de esteróis de promastigotas LmABCG1<sup>high</sup> tratadas com terbinafina.** Promastigotas das cepas transfectadas ou não foram incubadas em meio RPMI 10%SFB por 72 h e os lipídeos foram extraídos e analisados. A- TLC das cepas tratadas com terbinafina. B-Densitometria da cromatografia analisada por densitometria com o programa “ImageMaster TotalLab v1.11” (UA – Unidades arbitrárias). O gráfico é representativo de um experimento. COL – Colesterol, ERG – Ergosterol,

#### 5.4.3 Avaliação da captação de esteróis exógenos

Uma vez observado que ocorre o aumento de captação de colesterol nas promastigotas LmABCG1<sup>high</sup> tratadas com cetoconazol, fomos analisar a captação de colesterol NBD-colesterol. Portanto deixamos o parasito em estresse nutricional por 4 h e realizamos uma

cinética de captação de NBD-colesterol nos períodos de 30 min, 1, 2 e 4 h. Podemos verificar que a *LmABCG1<sup>high</sup>* não capta o colesterol externo, mesmo nos maiores tempos de incubação, e embora não seja estatisticamente significativo, é possível observar que esta cepa capta menos colesterol que o controle. A semelhança do estudo das outras cepas transfectadas, fomos avaliar a atividade de transporte a uma temperatura baixa. O experimento foi realizado nas mesmas condições, com exceção da temperatura de incubação com o NBD-colesterol, que foi 4°C. Surpreendentemente, observamos que mesmo em temperatura baixa, o transportador ABCG1 está ativo captando menos NBD-colesterol do que o controle. (Fig. 5.33).



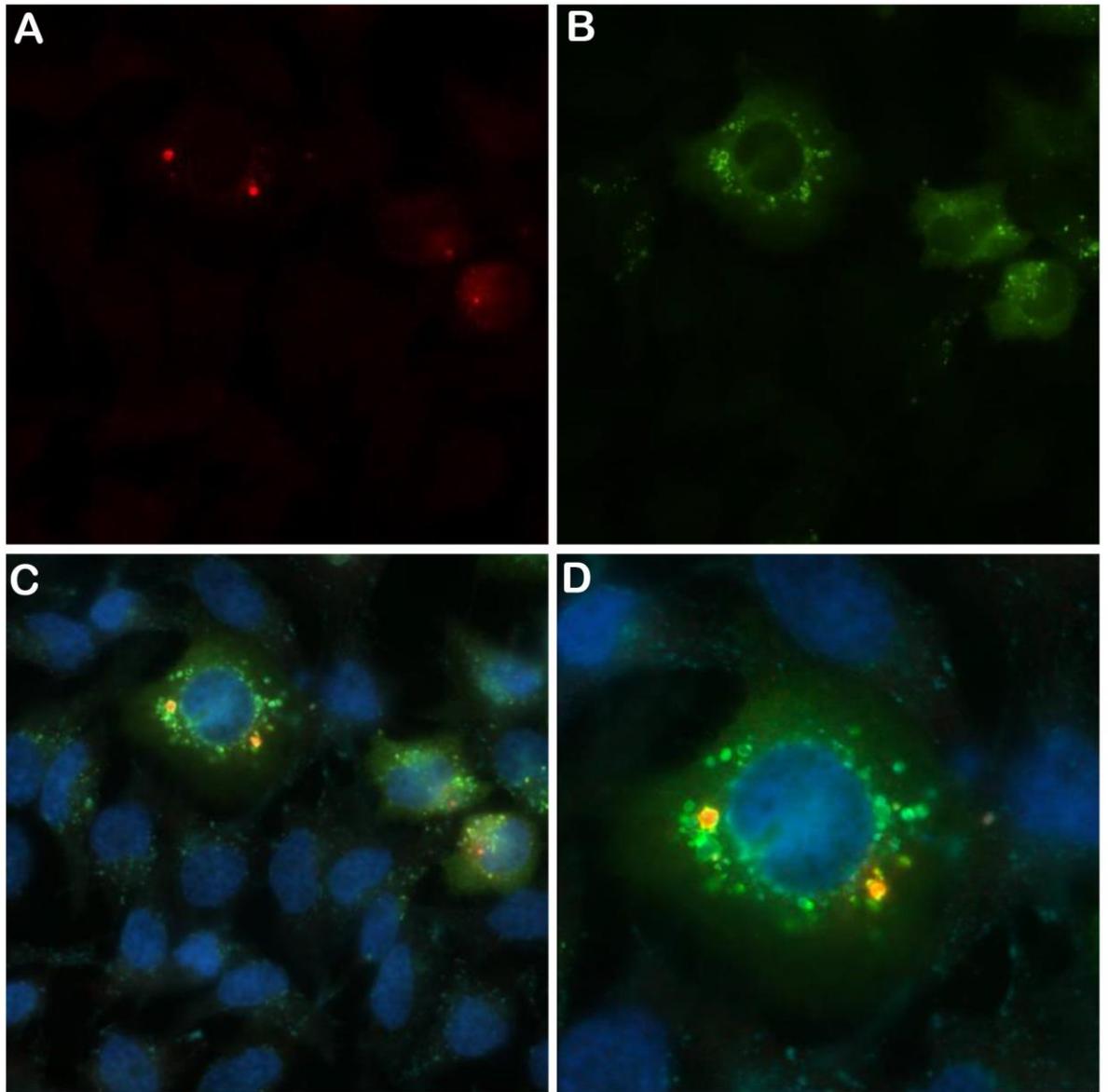
**Figura 5.33 -Captação de NBD-colesterol por *LmABCG1<sup>High</sup>*.** As cepas *LmPSP* e *LmABCG1<sup>High</sup>* foram deixadas por 4h em estresse nutricional e incubadas por diferentes tempos com 10µM de NBD-colesterol. A- Tempo de incubação de 30 min a 26°C. B- Tempo de incubação de 1h a 26°C . C- Tempo de incubação de 2h a 26°C . D- Tempo de incubação de 4h a 26°C. E- Tempo de incubação de 4h a 4°C . F- Cinética de captação de NBD.Na sobreposição as cores são representadas da seguinte forma: Vermelho: parasitos não marcados, Azul: LaPSP, Rosa: *LmABCG1<sup>high</sup>*. Test t de student. \*\*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\* p<0,0001

### 5.5 Localização da ORP1L no vacúolo parasitóforo de *Leishmania* spp.

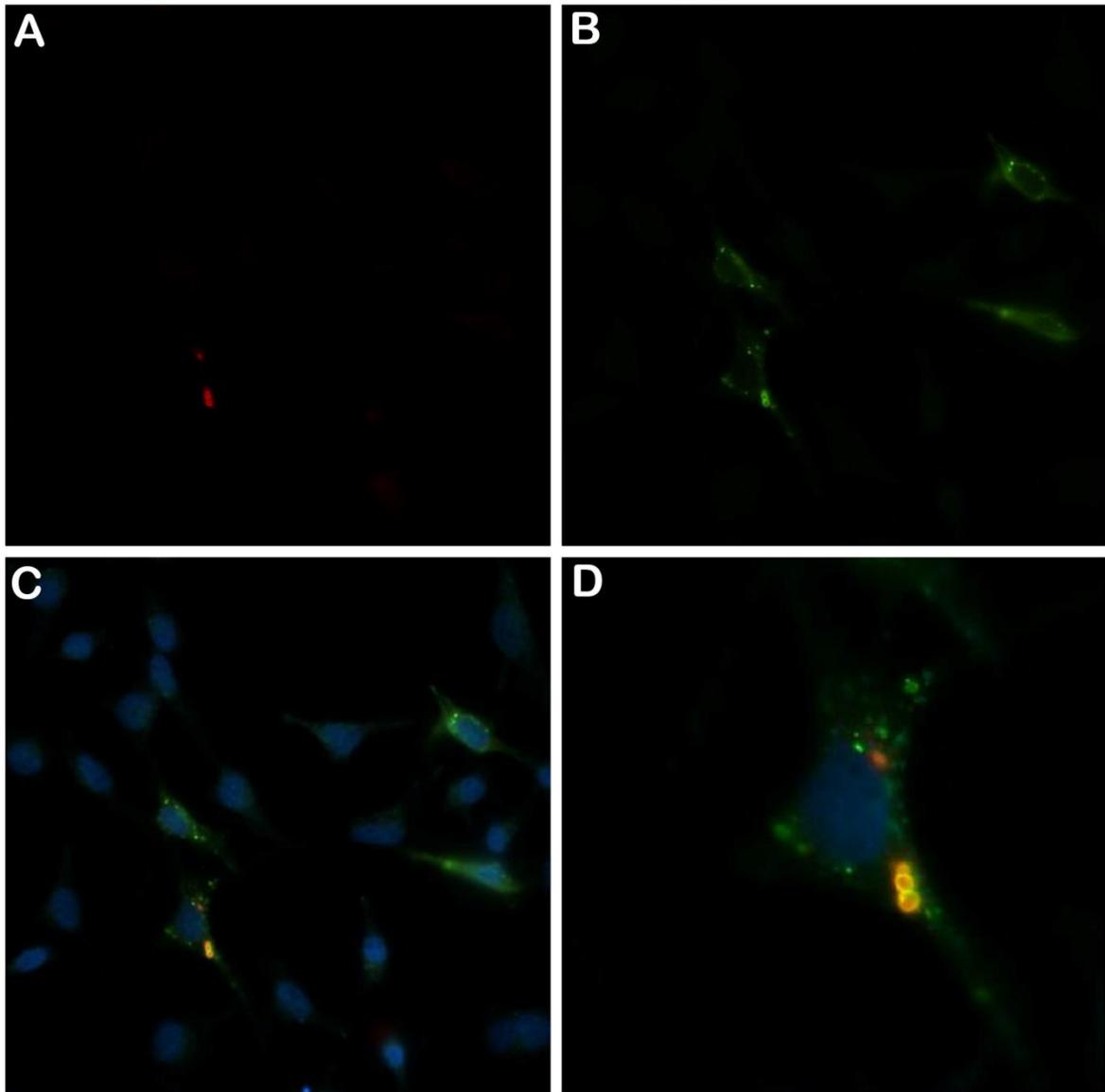
Outro questionamento que se tem em relação a utilização do colesterol do hospedeiro pelo parasito é como o colesterol livre entra no vacúolo parasitóforo.

A ORP1L está presente em várias células de mamíferos e é abundante em macrófagos, além de já ter sido demonstrada a sua presença em endossomos tardios. Esta proteína está relacionada ao transporte de colesterol nessas células, mudando a sua conformação de acordo com o nível de colesterol. Considerando as evidências de que *Leishmania* spp. usa o colesterol da célula hospedeira, mas ainda não se sabe ao certo como é feito o transporte de colesterol para o vacúolo, a interação ORP1L-VAP pode estar envolvida nesse sistema.

A primeira etapa então foi verificar a presença da ORP1L no vacúolo parasitóforo de *Leishmania*. Para isso, células HeLa foram transfectadas com ORP1L-GFP e após 24 h, foram infectadas com amastigotas axênicas de *L. amazonensis*. Os resultados observados a partir da imunofluorescência sugerem a presença da ORP1L nos endossomos tardios que formam oVP de *Leishmania*. Vale salientar que mesmo com o número de amastigotas por célula HeLa sendo baixo, a presença da ORP1L em todos os vacúolos foi notada (Figs. 5.34 e 5.35).

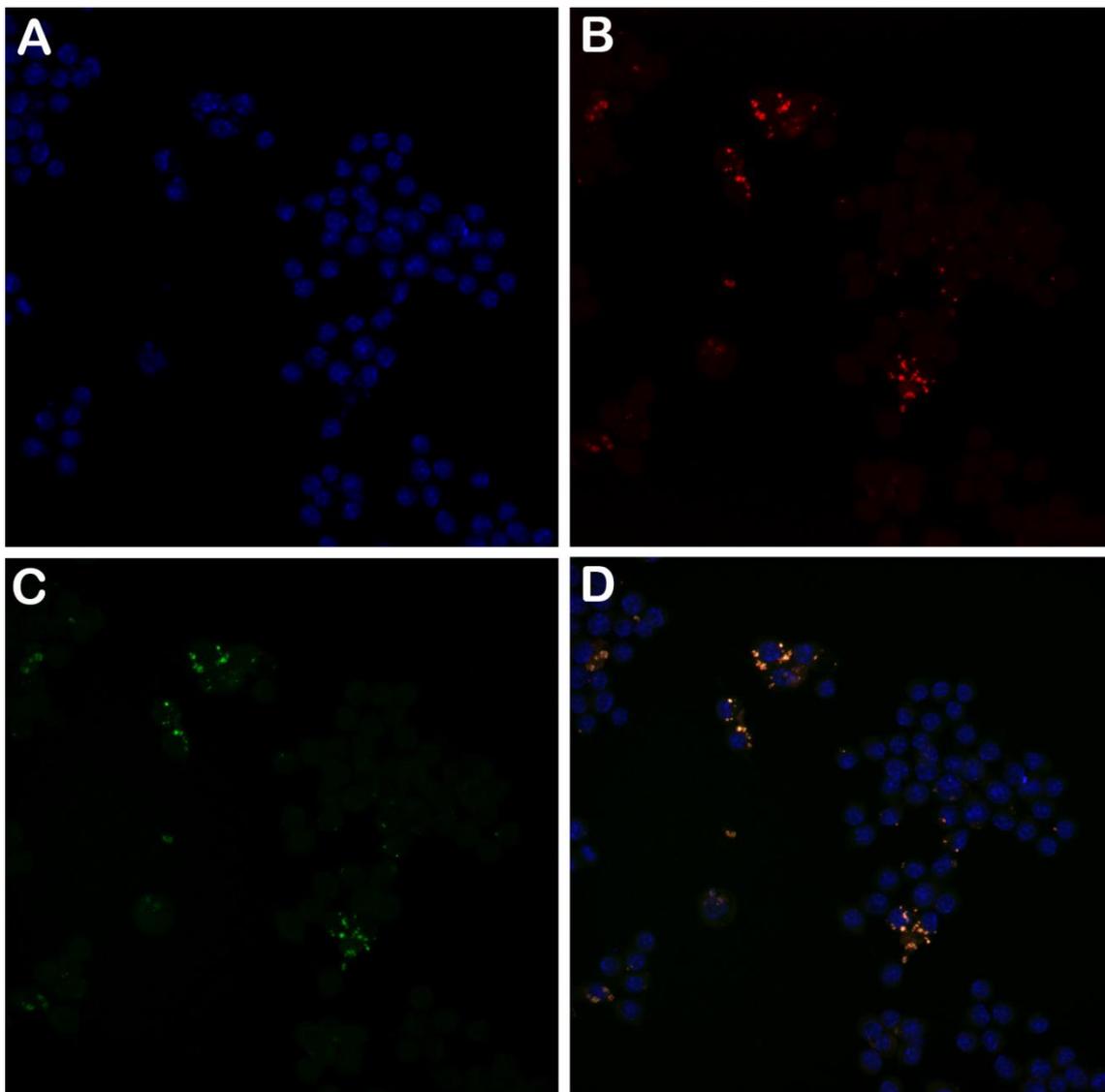


**Figura 5.34 - Localização de ORP1L no VP de *L. amazonensis*.** Célula HeLa transfectadas com ORP1L-mCherry e infectada com amastigotas axênicas de *L. amazonensis* na proporção 10:1 por 72h. Após este período foram analisadas por imunofluorescência. **A-** *L. amazonensis*. **B-** ORP1L-GFP. **C-** Merge. **D-** Aproximação do merge. Imagem registrada com aumento de 100x.



**Figura 5.35- Localização de ORP1L no VP de *L. amazonensis*.** Célula HeLa transfectadas com ORP1L-GFP e infectada com amastigotas axênicas de *L. amazonensis* na proporção 10:1 por 72h. Após este período foram analisadas por imunofluorescência **A-** *L. amazonensis* . **B-** ORP1L-GFP. **C-** Merge. **D-**aproximação do merge. Imagem registrada com aumento de 60x.

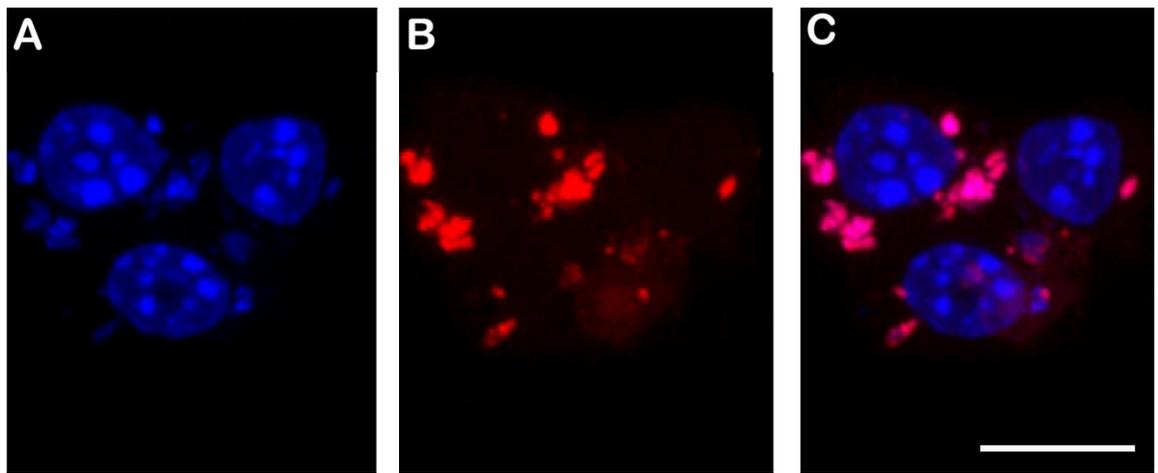
Uma vez que a ORP1L foi detectada no vacúolo parasitóforo de células HeLa, como modelo experimental, fomos avaliar a presença em macrófagos RAW. Conforme, podemos observar na Fig. 5.36, a proteína marcada com mCherry está presente no vacúolo de *Leishmania* e praticamente 100% dos vacúolos de *Leishmania* recrutaram a ORP1L.



**Fig. 5.36. Localização de ORP1L no VP de *L. amazonensis*.** Células Raw transfectadas com ORP1L-MCherry e infectadas com promastigotas de *L. amazonensis*-GFP e analisadas por imunofluorescência. **A-** DAPI. **B-** *L. amazonensis*-GFP. **C-** ORP1L-MCherry **D-** Merge. Imagem registrada com aumento de 63x.

Tendo em vista que o recrutamento de ORP1L foi 100% no VP, investigamos qual a razão desse recrutamento total. Observamos uma sobreposição das cores verde e vermelho sugerindo que esteja ocorrendo um *cross-talking* de cores, por essa razão fomos analisar no software Las X as células com um aumento sobre a imagem.

Conforme podemos observar na imagem, ao redor do núcleo do macrófago existem pequenas marcações em DAPI que podem ser indicativas do núcleo do parasito. A imagem foi analisada apenas para emissão do azul e em vermelho, para que identificássemos se a ORP1L estava colocalizando com os possíveis núcleos dos parasitos e optamos por não usar o filtro em verde para que garantisse apenas a fluorescência do vermelho. A imagem sugere que a ORP1L está muito próxima dos parasitos, identificados através de seus núcleos (Fig.5.36).



**Fig 5.37- Localização de ORP1L no VP de *L. amazonensis*.** Células Raw transfectadas com ORP1L-Cherry e infectada com promastigotas de *L. amazonensis*-GFP e analisadas por imunofluorescência. **A-** DAPI. **B-** ORP1L-MCherry **C-** Merge. Escala- 10 $\mu$ m analisada no Las X.

# 6. Discussão

Neste trabalho avaliamos o papel de uma enzima relacionada a VBE, dois transportadores relacionados com a captação de colesterol e uma proteína presente no VP de *Leishmania* spp. que pode estar relacionada ao transporte de colesterol para dentro do vacúolo.

Tendo em vista que a HMGC<sub>o</sub>A redutase é bem caracterizada em células de mamíferos como uma etapa limitante na VBE, decidimos superexpressar essa enzima e analisar qual seria o papel dela na homeostasia de esteróis de leishmania. Em 2004, Pena-Diaz e colaboradores, mostraram que essa enzima se localiza na matriz mitocondrial em *L. major*, diferentemente de mamíferos, onde se situa no citosol. Estudos mostram que a inibição da HMGC<sub>o</sub>A redutase em *L. donovani* promove uma redução do ergosterol do parasito que pode levá-lo a morte, o que indica que a enzima é essencial no processo de produção de esteróis também em tripanossomatídeos (Dinesh et al., 2017). A superexpressão dessa enzima provoca um aumento de esteróis com esqueleto ergostano e, quando submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de cetoconazol em meio de cultura suplementado com SFB, não promove uma maior captação de colesterol do meio. Esse dado sugere que esteja ocorrendo alguma regulação da via que leva ao acúmulo de algum intermediário após a metilação no carbono 24, que é característico dos ergostanos. O fato de promastigotas de LaHMGC<sub>o</sub>A<sup>high</sup> não terem apresentado resistência a sinvastatina, mas ao cetoconazol sem captação de colesterol do meio como fonte externa, nos motivou a tentar entender quais os fatores levavam a esse aumento.

Em relação ao efeito sobre amastigotas, a cepa LaHMGC<sub>o</sub>A<sup>high</sup> foi resistente aos dois fármacos inibidores da VBE, dado que pode ser correlacionado com o fato de que naturalmente essas formas do parasito possuem uma alteração de componentes celulares em relação a promastigotas, como por exemplo o aumento de ácidos graxos totais (Messoud et al., 2017). Dessa forma, a superexpressão da enzima reforça a regulação da homeostasia, com as alterações naturais do parasito que o tornam resistente aos inibidores. Outro trabalho mostra que quando as formas intracelulares de *L. amazonensis* são tratadas em combinação com cetoconazol e terbinafina, os fármacos apresentam efeito sinérgico, caracterizando estes dois fármacos como promissores para o tratamento de leishmaniose (Vannier-Santos et al., 1995). Como perspectiva, iremos investigar o mecanismo de ação de cepas LaHMGC<sub>o</sub>A<sup>high</sup> tratadas em combinação com esses dois fármacos.

Já foi mostrado em células humanas HepG2 que o tratamento com cetoconazol (fármaco que atua na C14-desmetilase) provoca uma regulação na via aumentando a expressão da HMGC<sub>o</sub>A redutase (Gibbons, 2012). Esse mesmo processo de regulação da via pode estar ocorrendo em *Leishmania* spp. Ao longo dos experimentos com LaHMGC<sub>o</sub>A<sup>high</sup>, fomos avaliar a regulação de outras enzimas da via e verificar por PCR quantitativo duas enzimas da via: C24

metiltransferase, enzima específica de tripanossomatídeos, e a C14 desmetilase. No resultado foi observado que a cepa que estava superexpressando a HMGC<sub>o</sub>A redutase, também estava aumentando em 2 vezes a regulação da C14 desmetilase. Este dado corrobora com dados na literatura que mostram que a atividade da enzima HMGC<sub>o</sub>A redutase em *L. major* aumenta proporcionalmente com as concentrações de cetoconazol; entretanto, quando a atividade enzimática é medida em parasitos tratados com diferentes concentrações de lovastatina (estatina) não ocorre alteração. Este mesmo trabalho mostra que na presença de LDL, a atividade enzimática da HMGC<sub>o</sub>A redutase cai em cerca de 90% (Montaveltti et al., 2000).

Resolvemos então trabalhar com SFBd e sem pressão farmacológica, oferecendo esteróis exógenos. A cepa LaHMGC<sub>o</sub>A<sup>high</sup> não capta o colesterol solúvel mesmo sem a fonte de esteróis do soro. Estes resultados sugerem que como o parasito tem um aumento da produção de esteróis com esqueleto ergostano e um aumento na expressão de RNAm da C14 desmetilase, consegue se manter estável com a sua própria regulação da homeostasia de esteróis.

Em contrapartida, já se sabe que quando espécies de leishmania são tratadas com sinvastatina ou cetanserina (um antidepressivo com atividade sobre a HMGC<sub>o</sub>A redutase) e em seguida é oferecido ergosterol aos parasitos, ocorre uma recuperação de cerca de 60% na viabilidade celular. Este dado mostra que em situações de estresse que envolvam a enzima HMGC<sub>o</sub>A redutase, pode ocorrer uma regulação da captação de esterol exógeno (Singh et al., 2014; Dinesh et al., 2013). Embora não tenha sido usado nenhum tipo de inibidor farmacológico, o estresse nutricional por quatro horas representa uma situação de estresse importante para os parasitos levando a captação de NBD-colesterol a partir de uma hora. Esse resultado demonstra que mesmo possuindo uma regulação significativa da via de biossíntese de esteróis, a cepa LaHMGC<sub>o</sub>A<sup>high</sup> necessita da captação de colesterol exógeno quando privada por um longo tempo de fontes de esteróis.

Outro fato que chamou a atenção foi a redução de esteróis esterificados observado nas TLCs. Podemos inferir que a cepa LaHMGC<sub>o</sub>A<sup>high</sup> esteja desviando moléculas de acetil-CoA para outras vias, como a prenilação de proteínas, ou a enzima responsável por esterificação de esteróis esteja sendo regulada negativamente. Pouco se sabe sobre esterificação de esteróis em leishmania. Entretanto, Cicco e colaboradores (2012) demonstraram a atividade de esterificação em *L. amazonensis* e sugeriram a presença de uma acil-CoA:colesterol aciltransferase (ACAT) em tripanossomatídeos, uma vez que já foi identificada a presença dessa enzima em *T. brucei* (Coppens et al., 1995). Assim como em *T. brucei*, a presença do colesterol exógeno e partículas de LDL podem influenciar na regulação da ACAT em *T. gondii*, influenciando outras proteínas de transporte no VP, como as proteínas ABCG (Nishikawa et al., 2005). Embora a

LaHMGCoA<sup>high</sup> não tenha alterado a captação de colesterol exógeno, acreditamos que esteja ocorrendo alguma regulação nesta via.

Em relação ao transporte de colesterol em *Leishmania* spp. decidimos investigar o papel das proteínas ABC da subfamília G, pois já foi estabelecido que as subfamílias A e G estão envolvidas no processo de transporte de fosfolípidos no parasito (Leprohon et al., 2006; Castanys-Munoz et al., 2007). Escolhemos investigar as proteínas ABCG1 e ABCG4, pois em células de mamíferos estas moléculas estão associadas ao transporte de colesterol (Wang et al., 2004). A maioria dos transportadores da família ABC de fungos e patógenos estão relacionados ao efluxo de moléculas do citosol para fora da célula. Portanto existe uma série de trabalhos que caracterizam esses transportadores como mecanismos de resistência, permitindo que o parasito se torne resistente a vários tipos de fármacos (Leprohon et al., 2006). Ao analisarmos os resultados de susceptibilidade e resistência ao painel de fármacos testado, observamos que promastigotas LaABCG4<sup>high</sup> apresentaram uma sutil resistência em alguns pontos da curva a anfotericina B e ao cetoconazol, entretanto não apresentou diferença no tratamento com miltefosina; por outro lado, os parasitos se apresentaram sensíveis ao Sb<sup>3+</sup>. Os dados de susceptibilidade desta cepa não reproduzem os resultados da superexpressão de ABCG4 em *L. infantum*, onde a cepa foi resistente a miltefosina e não apresentou diferença significativa quando sob pressão de diferentes concentrações de cetoconazol (Castanys-Munoz et al., 2007). Essas diferenças podem estar associadas ao papel da proteína em diferentes espécies.

Em relação ao teste de susceptibilidade da LmABCG1<sup>high</sup> é possível observar uma drástica resistência de promastigotas da cepa transfectada ao Sb<sup>3+</sup> e ao cetoconazol. Considerando que em *Leishmania* spp., os genes da ABCG1 e ABCG2 estão repetidos *in tandem* e apresentam uma identidade de 93% de aminoácidos entre eles (Manzano et al. 2017), torna-se válida a comparação de resultados esperados com os trabalhos de ABCG2. Esses dados corroboram com trabalhos que mostram que os genes da ABCG1 e ABCG2, em diferentes espécies e inclusive *L. major*, são resistentes ao antimônio. Esta resistência está associada ao fato de serem transportadores ativos de tiol, que pertencem a um sistema de defesa de radicais livres de tripanossomatídeos (Perea et al., 2016; Manzano et al., 2017; Campo-Salinas et al., 2011). Em relação à resistência nos testes de susceptibilidade ao cetoconazol, podemos associar ao acúmulo dose-dependente de colesterol. Este acúmulo não necessariamente está associado ao transporte de colesterol para dentro do parasito exclusivamente pela superexpressão da ABCG1. Alternativamente, pode estar acontecendo alguma outra regulação paralela relacionada ao transporte de colesterol para o parasito durante a pressão farmacológica em promastigotas. Interessantemente, já foi demonstrado que cepas de *Aspergillus fumigatus* resistente a azóis apresentam um aumento da expressão de RNAm de CYP51A (C14-

desmetilase) e ABCG1 (Paul et al., 2017). Fazendo um paralelo com nossos resultados, planejamos futuramente avaliar a expressão da C14 desmetilase na cepa LmABCG1<sup>high</sup>.

Vale ressaltar que houve uma redução no índice de infectividade de LaABCG4<sup>high</sup> e LmABCG1<sup>high</sup> que corroboram com os resultados de Manzano e colaboradores (2017) que mostram a superexpressão dos ABCG1 e ABCG2, realizada em *L. major*, reduz a infectividade das cepas tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A capacidade de infecção das cepas com superexpressão de proteínas da família ABC pode estar relacionada a mais de um tipo de proteínas da sub-família, como foi mostrado que superexpressão da ABCA1 e ABCA2 em *L. tropica* reduz a capacidade de infecção em relação ao controle (Parodi-Talice et al., 2003). Além disso, a deleção de ABCB3 reduz a capacidade de infecção quando comparada ao controle e, quando testada *in vivo* as lesões dos animais controle foram significativamente maiores enquanto que a infecção dos animais superexpressando o gene da ABCB3 se assemelhou ao grupo não infectado (Martinez-Garcia et al., 2016).

Em relação à captação de colesterol ou seus análogos, as duas cepas que superexpressam transportadores apresentaram comportamento bastante distinto. A LaABCG4<sup>high</sup> capta significativamente o NBD-colesterol, quando em estresse nutricional em duas e quatro horas. Entretanto, quando em meio deslipidado e com oferta de colesterol, houve redução de captação em relação ao controle. Esses dados sugerem que a ABCG4 possa ser um transportador que se torne ativo em situações de privação de nutrientes e que possa funcionar como bomba de efluxo do colesterol excedente do parasito. Por outro lado, foi demonstrado que *L. infantum* que superexpressa ABCG4 em condições sem restrição de nutrientes incorpora menos fosfocolina marcada com NBD (NBD-PC) menos que o controle (Castanys-Munoz et al., 2007). Entretanto, já foi descrito que outras proteínas dessa família podem aumentar a captação de fosfatidilserina (NBD-PS) sem restrição de nutrientes, sugerindo sua associação ao transporte de análogos de fosfolípidos de cadeia pequena, como a LaABCG2 (Campos-Salinas et al., 2013).

A cepa LmABCG1<sup>high</sup> incorporou menos colesterol marcado que o controle, corroborando com outros trabalhos que mostram que proteínas da família ABC fazem papel de efluxo em *Leishmania* spp. Um trabalho realizado com *L. major* superexpressando ABCG1 e ABCG2 mostrou que estes parasitos também captaram menos NBD-PS (Perea et al, 2017). As proteínas ABCG2 de *L. major*, ABCG6 de *L. infantum*, ABCA2 e ABCA1 de *L. tropica* estão relacionadas com o efluxo de lipídeos do parasito, tais como: NBD-PC, NBD-PS, fosfoetanolamida (NBD-PE), esfingomileina (NBD-SM). Vale considerar que a superexpressão de ABCG2, ABCA2 e ABCA1 levou a uma baixa infecção quando comparada ao controle, sugerindo que o processo de exocitose de lipídeos possa ser o fator responsável pela redução de infectividade (Castanys-Munoz et al., 2008; Araujo-Santos et al., 2005; Campos-Salina et

al., 2013; Parodi-Talice et al., 2003). A proteína ABCG1 também foi caracterizada em *T. gondii* como tendo papel de efluxo do colesterol. Entretanto, os motivos pelos quais ocorre esse efluxo em parasitos que necessitam do colesterol ainda deve ser estudado (Ehrenman et al., 2010). Os dados de captação de LmABCG1<sup>High</sup> sugere que sem a pressão farmacológica e mesmo na condição de privação de nutrientes, o transporte realizado pela ABCG1 se dá para fora, e que a captação de colesterol nas cepas tratadas com azol se deve a outros fatores.

Pode-se associar os resultados de captação de colesterol exógeno com a sensibilidade das formas amastigotas que se apresentaram sensíveis a terbinafina. Possivelmente o fato de fazer o efluxo de colesterol, seja pela manutenção da homeostasia ou como característica do transportador, pode estar relacionado ao fato do parasito apresentar uma quantidade menor de esterol total e por esta razão ficar mais suscetível a um fármaco que atue na VBE.

Para que seja possível entender os mecanismos que levam o parasito a captar o colesterol exógeno é preciso entender também como ocorre à relação parasito-hospedeiro, considerando os nutrientes que podem ser utilizados pelo parasito, assim como a modulação gênica provocada na célula hospedeira e quais os meios que tornam acessíveis essas moléculas para o parasito.

Os macrófagos podem obter o colesterol por fontes exógenas ou endógenas, sendo esta dualidade da homeostasia de colesterol da célula hospedeira regulada de acordo com os níveis intracelulares. Os macrófagos obtêm colesterol por via exógena a partir de partículas de LDL. A síntese endógena se dá por inúmeras enzimas e a expressão de vários genes que estão associados ao complexo SCAP/SREBP, onde o precursor está localizado no RE. Quando os níveis de colesterol intracelular estão baixos, este complexo sai do RE é transportado para o Golgi, onde sofre alterações e é redirecionado para o núcleo onde vai promover a transcrição do gene da HMGCoA redutase. O último estágio da produção de colesterol ocorre no RE sendo produzido de forma mais rápida e direcionado de forma não vesicular (Chang et al., 2006). Além desta produção, existem outras proteínas que estão relacionadas ao bom fluxo de colesterol intracelular, como as proteínas relacionadas a esterificação do colesterol (ACAT), proteínas transportadoras de colesterol (NPC1 e ABC), e as proteínas dependente de oxisterol (OSBP) (Chang et al., 2006).

A relação de parasitos do gênero *Leishmania* com os esteróis tem sido bastante estudada. Sabe-se que o colesterol medeia a entrada do parasito na célula hospedeira (Pucadyil et al., 2003) e uma vez a infecção estabelecida o parasito provoca uma série de mudanças no macrófago relacionadas a captação e produção deste esterol. A infecção por *Leishmania* spp. é capaz de regular negativamente a proteína NPC1, aumentando a atividade da HMGCoA redutase pela ativação de SREBP (Proteínas de ligação do elemento de regulação do esterol)

nos estágios iniciais de infecção, promovendo a formação de corpos lipídicos que se localizam próximo as amastigotas de *L. major*, levando ainda a um aumento da captação de LDL (Podinovska & Descoteaux. 2015; Mukherjee et al., 2014; Rabhi et al., 2016; Semini et al., 2017; Cicco et al., 2012; Andrade-Neto et al., 2011).

Recentemente, a interação do VP de *Coxiella burnetti* com o RE da célula hospedeira envolvendo a OSBP – ORP1L foi mostrada. Este grupo demonstrou ainda que a ORP1L está presente no VP de *C. burnetti* e que esta proteína faz contato com o RE. Estes dados fundamentaram a hipótese que a ORP1L está transportando colesterol do retículo para o vacúolo (Justis et al., 2017). Desta forma, fomos investigar se essa relação ocorre também no VP de *Leishmania*.

A semelhança entre os vacúolos de *Leishmania* e *Coxiella* é grande, mesmo possuindo algumas alterações na expressão de diferentes genes em cada vacúolo (Millar et al., 2015). Além disso, também já foi demonstrada a estreita relação do parasito com o RE da célula, considerando que, quando é realizado um *knock-down* de moléculas que constituem o RE, a infecção de macrófagos Raw264.7 por *L. amazonensis* é controlada, resultado de um vacúolo limitado com poucos parasitos e baixa replicação intracelular (Canton et al., 2012).

Inicialmente avaliamos por imunofluorescência a presença da ORP1L do VP de formas axênicas de *L. amazonensis* em células HeLa. A escolha da célula HeLa como modelo experimental ocorreu devido ao papel importante que os fibroblastos têm na infecção por *Leishmania* (Bogdan et al., 2000). Foi demonstrado que ORP1L está presente nos vacúolos de *Leishmania* em células HeLa, sendo em seguida investigada sua presença também em macrófagos Raw264.7 por microscopia confocal. Nossas análises sugerem que quase 100% dos VP que estão infectados recrutaram a ORP1L. A presença da ORP1L no VP de *Leishmania* indica que a presença da proteína não está associada a um tipo celular e sim a constituição do vacúolo.

Entretanto, ao analisar a localização de ORP1L nas células Raw, foi possível identificar sobreposição do padrão de marcação dos fluoróforos mCherry e GFP. Ao analisarmos as imagens do controle com células transfectadas com a proteína e não infectada (dados não mostrados), observamos o padrão de marcação de ORP1L também era observado, indicando fortemente que esteja ocorrendo uma sobreposição das cores do fluoróforos. Para tentar solucionar esta questão, fomos investigar o campo marcado com DAPI, uma vez que o DAPI intercala ácidos nucleicos em geral.

A marcação com DAPI mostra que ao redor de alguns núcleos da célula hospedeira, existem pequenas marcações que sugerem a presença do parasito. Portanto, consideramos que ORP1L esteja no VP de células Raw infectadas com *L. amazonensis* e que neste experimento a

*Leishmania* GFP não estava fluorescente por alguma razão ainda desconhecida. Por outro lado, temos clareza que este experimento precisa ser repetido, uma vez que existe a colocalização dos fluoróforos verde e vermelho e que os pontos são bem similares as estruturas dos núcleos.

Além da associação já estabelecida do contato com o RE por *Leishmania* e *Coxiella*, vale ressaltar a relação de outros organismos que se utilizam do colesterol do hospedeiro justamente pelo contato com o RE. Já foi demonstrado que o adenovírus se utiliza da região 3 da proteína de RID $\infty$  para fazer contato com a ORP1L e regular a quantidade de colesterol dentro do vacúolo (Cianciola et al., 2017). A clamídia, embora não utilize a ORP1L, também faz associação com VAP (*vesicle-associated-membrane protein-associated protein*), via FFAT (*Two-phenylalanines(FF) in an acidic c tract*), para entrar em contato com o RE e obter colesterol (Stanhope & Derré, 2018). Estes dados mostram que a associação com o RE pode ser um mecanismo compensatório de alguns tipos de patógenos que possuam maquinaria para fazer esta associação, e embora não se saiba qual o mecanismo pelo qual a *Leishmania* recruta a ORP1L podemos acreditar que este seja responsável por enviar o colesterol endógeno para o RE.

Os resultados apresentados nesta tese, reforçam a hipótese de que a *Leishmania* usa o colesterol exógeno em benefício próprio e que é capaz de fazer uma regulação de enzimas e transportadores internos quando sob alguma situação adversa e que talvez possa utilizar moléculas do VP para captação de colesterol.

# 7. Conclusões

- A HMGCoA redutase tem um papel fundamental na regulação da homeostasia do colesterol, regulando a C14-desmetilase e fazendo o equilíbrio de esteróis em situações adversas.
- A ABCG4 está envolvida na captação de esteróis em situações adversas como de privação nutricional. Em situações de pressão farmacológica e oferta de colesterol, o transportador não se mostrou importante.
- A ABCG1 parece desempenhar um papel central no transporte de esteróis direta e indiretamente, talvez interferindo com outros transportadores, mediando o efluxo em estresse nutricional, porém aumentando o influxo de colesterol, sob pressão farmacológica.
- A ORP1L está no VP de *Leishmania* spp. em células HeLa e pode ter relação com o equilíbrio de colesterol, dentro do vacúolo.

## 8. Referências Bibliográficas

ALMEIDA-AMARAL EE, ANDRADE-NETO VV, CANTO-CAVALHEIRO MM, TORRES-SANTOS EC. Lipídeos. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F AND ALVES, CR (Org). *Leishmanioses do continente americano*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. 2014. 83 – 98.

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. *Biologia Molecular da célula*. 5 edição. Editora Artmed. 2010.

AMATO VS, TUON FF, SIQUEIRA AM, NICODEMO AC, NETO VA. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin america: Systematic review. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2007; 77: 266-274.

ANDRADE-NETO VV, CUNHA-JUNIOR EF, CANTO-CAVALHEIRO MM, ATELLA G, FERNANDES T, COSTA PRR, TORRES-SANTOS EC. Antileishmanial activity of ezetimibe:inhibition of sterol biosynthesis, in vitro synergy with azoles and efficacious in experimental cutaneous leishmaniasis. *Antim Agents and chemot*. 2016.

ANDRADE-NETO VV, CUNHA-JUNIOR EF, DOS SANTOS FAIOES V, PEREIRA TM, SILVA RL, LEON LL, TORRES-SANTOS EC. Leishmaniasis treatment: update of possibilities for drug repurposing. *Front Biosci* 2018. (23): 967-96.

ANDRADE-NETO VV, CICCONE NT, CUNHA EF, CANTO-CAVALHEIRO MM, ATELLA GC, TORRES-SANTOS EC. The pharmacological inhibition of sterol biosynthesis in *Leishmania* is counteracted by enhancement of LDL endocytosis. *Acta Tropica*. 2011(119): 194- 198.

ARAÚJO-SANTOS JM, PARODI-TALICE A, CASTANYS S, GAMARRO F. The overexpression of an intracellular ABCA-like transporter alters phospholipid trafficking in *Leishmania*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005. 330(1):349-55.

ASHFORD RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology* ,2000; 30: 1269-1281.

ARAÚJO-SANTOS JM, PARODI-TALICE A, CASTANYS S, GAMARRO F. The overexpression of an intracellular ABCA-like transporter alters phospholipid trafficking in *Leishmania*. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 (330):349-355.

BASTIN P, STEPHAN A, RAPER J, SAINTREMY JM, OPPERDOES FR, COURTOY PJ. An M(r) 145000 low-density lipoprotein (LDL)-binding protein is conserved throughout the Kinetoplastida order. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1996; 76(1-2):43-56.

BEACH DH, GOAD LJ, HOLZ GG. Effects of Antimycotic Azoles on Growth and Sterol Biosynthesis of *Leishmania* Promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1988 (31): 149-162

BECKER T, VOLCHUK A, ROTHMAN J. Differential use of endoplasmic reticulum membrane for phagocytosis in J774 macrophages.2004. *PNAS*. 102:11.

BELKAID Y, MENDEZ S, LIRA R, KADAMBI N, MILON G, SACKS D. A natural model of *Leishmania* major infection reveals a prolonged “silent” phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J Immunol* 2000 (165): 969–977.

BERMAN JD, HOLZ GG, BEACH DH. Effects of Ketoconazole on Growth and Sterol Biosynthesis of *Leishmania-Mexicana* Promastigotes in Culture. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1984(12): 1-13.

BERMAN DJ, GOAD LJ, BEACH HD, HOLZ GG. Effects of ketoconazole on sterol biosynthesis by *Leishmania mexicana mexicana* in murine macrophage tumor cells. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1986; 85-92.

BERMAN JD. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Reviews of infectious diseases*. 1988. 10 (3): 560–586.

BERMAN JD. Treatment of leishmaniasis with miltefosine: 2008 status. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*.2008. 4( 9):1209–1216.

BLIGH EG & DRYER MJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol* 1959 37(8): 911-913

BOGDAN C, DONHAUSER N, DÖRING R, RÖLLINGHOFF M, DIEFENBACH A, RITTIG MG. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. *J Exp Med*. 2000 Jun 19;191(12):2121-3

BOUAZIZI-BEN MESSAOUD H, GUICHARD M, LAWTON P, DELTON I, AZZOUZ-MAACHE S. Changes in Lipid and Fatty Acid Composition During Intramacrophagic Transformation of *Leishmania donovani* Complex Promastigotes into Amastigotes. *Lipids*.

BUCKNER, F. Sterol 14 desmethylase inhibitors for trypanosoma cruzi infections. IN: Drug target in kinetoplastid Parasites. 2009

CAMPOS-SALINAS J, LEON-GUERRERO D, GONZALEZ-REY E, DELGADO M, CASTANYS S, PEREZ- VICTORIA JM, GAMARRO F. LABCG2, a New ABC Transporter Implicated in Phosphatidylserine Exposure, Is Involved in the Infectivity and Pathogenicity of *Leishmania*. *Plos Neglected Tropical Diseases* 2013; 7.

CAMPOS-SALINAS J, CABELLO-DONAYRE M, GARCÍA-HERNÁNDEZ R, PÉREZ-VICTORIA I, CASTANYS S, GAMARRO F, PÉREZ-VICTORIA JM. A new ATP-binding cassette protein is involved in intracellular haem trafficking in *Leishmania*. *Mol Micro* 2011; 79:1430- 1444

CANTON J, NDJAMEN B, HATSUZAWA K, KIMA PE. Disruption of the fusion of *Leishmania* parasitophorous vacuole with ER vesicles results in the control of the infection. *Cell Microbiol*. 2012. 14(6):937-48.

CASTANYS-MUÑOZ E, ALDER-BAERENS N, POMORSKI T, GAMARRO F, CASTANYS S. A novel ATP-binding cassette transporter from *Leishmania* is involved in transport of phosphatidylcholine analogues and resistance to alkyl-phospholipids. *Mol Microbiol* 2007 (64):1141-1153.

CASTANYS-MUÑOZ E, PEREZ-VICTORIA JM, GAMARRO F, CASTANYS S. Characterization of an ABCG-like transporter from the protozoan parasite *Leishmania* with a role in drug resistance and transbilayer lipid movement. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; (52): 3573-3579.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Parasito –Leishmania – Biologia. Disponível em < <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html> > Acessado em 1 de agosto de 2018.

CHANG TY, CHANG CC, OHGAMIN, YAMAUCHI Y. Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006 (22):129-57

CIANCIOLA NL, CHUNG S, MANOR D, CARLIN CR. Adenovirus Modulates Toll-Like Receptor 4 Signaling by Reprogramming ORP1L-VAP Protein Contacts for Cholesterol Transport from Endosomes to the Endoplasmic Reticulum. *J Virol.* 2017 ( 28):91-6.

DE CICCO NN, PEREIRA MG, CORRÊA JR, ANDRADE-NETO VV, SARAIVA FB, CHAGAS-LIMA AC, GONDIM KC, TORRES-SANTOS EC, FOLLY E, SARAIVA EM, CUNHA-E-SILVA NL, SOARES MJ, ATELLA GC. LDL uptake by *Leishmania amazonensis*: involvement of membrane lipid microdomains. *Exp Parasitol.* 2012;130(4):330-40.

COPPENS I, LEVADE T, COURTOY PJ. Host Plasma Low-Density-Lipoprotein Particles As An Essential Source of Lipids for the Blood-Stream Forms of *Trypanosoma-Brucei*. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270(11):5736-5741.

COSTA SDOS S, DE ASSIS GOLIM M, ROSSI-BERGMANN B, COSTA FT, GIORGIO S. Use of in vivo and in vitro systems to select *Leishmania amazonensis* expressing green fluorescent protein. *Korean J Parasitol.* 2011 .49(4):357-64

CYSNE-FINKELSTEIN L, TEMPORAL RM, ALVES FA, LEON LL. *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of exenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. *Exp Parasitol.* 1998 May;89(1):58-62

DAS VN, PANDEY K, VERMA N, LAL CS, BIMAL S, TOPNO RK, SINGH D, SIDDIQUI NA, VERMA RB, DAS P. Short report: Development of post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) in miltefosine-treated visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2009 80 (3), 336-338

DAS S, LAL, S. Reduced <sup>high</sup> Density Lipoprotein Concentration Modulates Increased Interleukin-10 and Decreased Interferon-Gamma in Visceral Leishmaniasis Patients . *General Medicine.* 2016. 4:2.

DESJEUX P, GHOSH RS, DHALARIA P, STRUB-WOURGAFT N, ZIJLSTRA EE. Report of the Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis (PKDL) consortium meeting, New Delhi, India, *Parasites & Vectors* 2013; 6

DINESH N, PALLERLA DS, KAUR PK, KISHORE BABU N, SINGH S. Exploring *Leishmania donovani* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG) as a potential drug target by biochemical, biophysical and inhibition studies. *Microb Pathog.* 2014 .66:14-23.

DINESH N, NEELAGIRI S, KUMAR V, SINGH S. Glycyrrhizic acid attenuates growth of *Leishmania donovani* by depleting ergosterol levels. *Exp Parasitol.* 2017 176:21-29.

DNDi. Doenças e projetos-Leishmanioses. Disponível em <<https://www.dndial.org/doencas/leishmanioses/>> Acessado em 1 de agosto de 2018

EHRENMAN K, SEGAL A, LIGE B, STEDMAN TT, JOINER KA, COPPENS I. Novel roles for ATP-binding cassette G transporters in lipid redistribution in *Toxoplasma*. Mol Microbiol. 2010 .76(5):1232-49.

FRAGA, J., VELAND, N., MONTALVO, A.M., PRAET, N., BOGGILD, A.K., VALENCIA, B.M., ARÉVALO, J., LLANOS-CUENTAS, A., DUJARDIN, J.C., VAN, D. A.G. Accurate and rapid species typing from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions of the New World. *Diagn Microbiol Infect Dis.*,2012. **74** (2):142-150

FORTÉA JO, LLAVE E, REGNAULT B, COPPÉE J, MILON G, LANG T, PRINA E. Transcriptional signatures of BALB/c mouse macrophages housing multiplying *Leishmania amazonensis* amastigotes.. *BMC Genomics* 2009. 10:119:1-1

GALVÃO EL, RABELLO A, COTA GF. Efficacy of azole therapy for tegumentary leishmaniasis: A systematic review and meta- analysis. *Plos one* 2017

GAGNON E, DUCLOS S, RONDEAU C, CHEVET E, CAMERON P, STEELE-MORTIMER O, PAIEMENT, BERGERON J, DESJARDINS M. Endoplasmic Reticulum-Mediated Phagocytosis Is a Mechanism of Entry into Macrophage. *Cell*.2002 ( 110) 119–131 . 2002

GIBBONS G. Regulation of fatty acid and cholesterol synthesis: co-operation or competition? *Progress in Lipid Research* .2003(42) 479–497

GASSER RA, MAGILL AJ, OSTER CN, FRANKE ED, GRÖGL M, BERMAN JD. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis*. 1994; 18:83–90.

GATTO M, ABREU MM, TASKA K, SIMAO JC, FORTALEZA CM, PEREIRA PC, CALVI AS. Biochemical and nutritional evaluation of patients with visceral leishmaniasis before and after treatment with leishmanicidal drugs. *Ver. Soc Bras Med Trop*. 2013 .46(6)

GEORGIADOU SP, MAKARITSIS KP, DALEKOS GN. Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. *Journal of Translational internal medicine*. 2015. (3) 43-50.

GOAD LJ, HOLZ GG, BEACH DH. Sterols of *Leishmania* species. Implications for biosynthesis. *Mol Biochem Parasitol*.1984. 10 (2):161-170.

GOODWIN LG. Pentostam (sodium stibogluconate); a 50-year personal reminiscence. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 199. 89(3):339–41.

GHOSH J, DAS S, GUHA R, GHOSH D, NASKAR K, DAS A, ROY S. Hyperlipidemia offers protection against *Leishmania donovani* infection: role of membrane cholesterol . *Journal of Lipid Research* 2012 (53)

GOTO H & LINDOSO JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther*.2010. 8 (4): 419-433.

HOLLAND IB, BLIGHT MA. ABC-ATPases, adaptable energy generators fueling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J Mol Biol* 1999 ( 293):381-399

JOHANSSON M, BOCHER V, LEHTO M, CHINETTI G, KUISMAMEN E, EHNHOLM C, STAELS B, OLKKONEN V. The two variants of oxysterol binding protein-related protein-1 display different tissue expression patterns, have different intracellular localization, and are functionally distinct. *Mol Biol Cell*, 2003. 14(3): p. 903-15

JOHANSSON M, LEHTO M, TANHUANPA K, COVER T, OLKKONEN V. The oxysterol-binding protein homologue ORP1L interacts with Rab7 and alters functional properties of late endocytic compartments. *Mol Biol Cell*, 2005. 16(12): p. 5480-92.

JUSTIS, ANNA. recruitment and function of orp11 on the *coxiella burnetii* parasitophorous vacuole. UIPUI. 2018

JORDENS I, FERNANDEZ-BORJA M, MARSMAN M, DUSSELJEE S, JANSSEN L, CALAFAT J, JANSSEN H, WUBBOLTS R, NEEFJES J. The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Curr Biol*, 2001. 11(21): p. 1680-5.

KREUTZER RD, YEMMA JJ, GROGI M, TESH RB, MARTIN TI. Evidence of sexual reproduction in the protozoan parasite *Leishmania* (Kinetoplastida:Trypanosomatidae). *Am J Trop Med Hyg*. 1994. 51 (3).301-7.

LAINSON, R. . The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev. Pan-Amazon Sau.*, 2010. 1 (2):13–32.

LEPROHON P, LEGARE D, GIRARD I, PAPADOPOULOU B, OUELLETTE M. Modulation of *Leishmania* ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites. *Eukaryotic Cell* 2006. 5: 1713-1725.

LEPROHON P, LEGARE D, RAYMOND F, MADORE E, HARDIMAN G, CORBEIL J, OUELLETTE M. Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*. *Nucleic Acids Research*. 2009. 37: 1387-1399

LYRA MR, PASSOS SRL, PIMENTEL MIF, BEDOYA-PACHECO SJ, VALETE-ROSALINO CM, VASCONCELLOS ECF, ANTONIO LF, SAHEKI MN, SALGUEIRO M M, SANTOS GPL, RIBEIRO MN, CONCEIÇÃO-SILVA F, MADEIRA MF, SILVA JLN, FAGUNDES A, SCHUBACH A. O. Pancreatic toxicity as an adverse effect induced by meglumine antimoniate therapy in a clinical trial for cutaneous leishmaniasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2016 .58(68) :1–6.

LOCHER K. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Nature*. 2016. 27:487-493.

MACHADO PR, AMPUERO J, GUIMARÃES LH, VILLASBOAS L, ROCHA AT, SCHRIEFER A. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *leishmania braziliensis* in Brazil: A randomized and controlled trial. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2010;4:1–6.

- MANZANO JI, PEREA A, LEÓN-GUERRERO D, CAMPOS-SALINAS J, PIACENZA L, CASTANYS S, GAMARRO F. Leishmania LaABCG1 and LaABCG2 transporters are involved in virulence and oxidative stress: functional linkage with autophagy. *Parasit Vectors*. 2017 May 30;10(1):267
- MARETTI-MIRA AC, BITTNER J, OLIVEIRA-NETO MP, LIU M, KANG D, LI H, PIRMEZ C, CRAFT N. Transcriptome patterns from primary cutaneous Leishmania braziliensis infections associate with eventual development of mucosal disease in humans. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2012. 6 (9).
- MARTINEZ-GARCIA M, CAMPOS-SALINA J, CABELLO-DONAYRE, PINEDA-MOLINA E, GALVEZ F, ORREGO L, SANCHEZ-CANETE M, MALAGARIE-CAZENAVE S, KOELLER D, PEREZ-VICTORIA, J. LmABCB3, an atypical mitochondrial ABC transporter essential for Leishmania major virulence, acts in heme and cytosolic iron/sulfur clusters biogenesis. *Parasites & Vectors*. 2016. 9:7.
- MESSAOUD H, GUICHARD M, LAWTON P, DELTON I, AZZOUZ-MAACHE S. Changes in Lipid and Fatty Acid Composition During Intramacrophagic Transformation of *Leishmania donovani* Complex Promastigotes into Amastigotes. *Lipids*. 2017
- MILLAR JÁ, VÁLDES R, KACHARIA FR, LANDFEAR SM, CAMBRONNE ED, RAGHAVAN R. Coxiella burnetii and Leishmania mexicana residing within similar parasitophorous vacuoles elicit disparate host responses. *Front Microbiol*. 2015 Aug 7;6:794
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Nota técnica nº 11/2016/cpv/dfip/sda/gm/mapa, 2016. . Disponível em: <<https://www.apipa10.org/images/apipa/downloads/nota-tecnica-milteforan.pdf>>.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2017
- MOURA T, JESUS AR, ALMEIDA RP. Terapeutica da Leishmaniose Tegumentar. .IN: Leishmanias e a leishmaniose tegumentar nas américas. 1 edição. 2011
- MUKHERJEE M, BASU BALL W, DAS PK. Leishmania donovani activates SREBP2 to modulate macrophage membrane cholesterol and mitochondrial oxidants for establishment of infection. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014 Oct;55:196-208
- NDJAMEN B, KANG BH, HATSUZAWA K, KIMA PE. Leishmania parasitophorous vacuole Interact continuously with the host cells endoplasmic reticulum; parasitophorous vacuole are hybrid compartments. *Cell Microbiol*. 2010 (10):1480-94
- NEUBER H. Leishmaniasis. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.*, 6 (9):754-765. 2008
- NISHIKAWA Y, QUITTAT F, STEDMAN TT, VOELKER DR, CHOI JY, ZAHN M, YANG M, PYPAERT M, JOINER KA, COPPENS I. Host cell lipids control cholesteryl ester synthesis and storage in intracellular Toxoplasma. *Cellular Microbiology* 2005; 7: 849-867.
- OLIVEIRA LF, SCHUBACH AO, MARTINS MM, PASSOS SL, OLIVEIRA RV, MARZOCHI MC, ANDRADE CA. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Tropica* 2011; 118: 87-96.

OVALLE-BRACHO C, FRANCO-MUÑOZ C, LONDOÑO-BARBOSA D, RESTREPO-MONTOYA D, CLAVIJO-RAMÍREZ C. Changes in macrophage gene expression. Associated with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* Infection. *PLoS One*. 2015 Jun 8;10(6)

PACE D. Leishmaniasis. *Journal of Infection*, v. 69, n. S1, p. S10–S18, 2014.

PANDEY K, SINHA PK, DAS VR, BIMAL S, SINGH SK, DAS P. Pharmacotherapeutic options for visceral leishmaniasis - Current scenario. *Clinical Medicine: Pathology*, v. 2009, n. 2, p. 1–4,

PANDEY K, PANDEY BD, MALLIK AK, KANEKO O, UEMURA H, KANBARA H, YANAGI T, HIRAYAMA K. Diagnosis of visceral leishmaniasis by polymerase chain reaction of DNA extracted from Giemsa's solution-stained slides. *Parasitol Res* 2010 107 (3), 727-730

PARODI-TALICE A, ARAÚJO JM, TORRES C, PÉREZ-VICTORIA JM, GAMARRO F, CASTANYS S. The overexpression of a new ABC transporter in *Leishmania* is related to phospholipid trafficking and reduced infectivity. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1612:195-207.

PAUL,S; DIEKEMA D, MOVE-ROWLEY WS. Contributions of both ATP-Binding Cassette Transporter and Cyp51A Proteins Are Essential for Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Apr 24;61(5)

PENA-DIAZ J, MONTALVETTI A, FLORES CL, CONSTAN A, HURTADO-GUERRERO R, DE SOUZA W, GANCEDO C, RUIZ-PEREZ LM, GONZALEZ-PACANOWSKA D. Mitochondrial localization of the mevalonate pathway enzyme 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase in the trypanosomatidae. *Molecular Biology of the Cell* 2004; 15: 1356-1363

PONTE-SUCRE A, GAMARRO F, DUJARDIN JC, BARRETT MP, LÓPEZ-VÉLEZ R, GARCÍA-HERNÁNDEZ R, POUNTAIN AW, MWENECHANYA R, PAPADOPOULOU B. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLOS Neglected Tropical Diseases*.2017. v. 11, n. 12, p. 1–24.

PORTUGAL LR, FERNANDES LR, ALVAREZ-LEITE JI. Host cholesterol and inflammation as common key regulators of toxoplasmosis and atherosclerosis development. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 2009; 7(7):807-819.

PODINOVSKAIA M, DESCOTEAUX A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future Microbiol*. 2015;10(1):111-29.

PUCADYIL TJ, TEWARY P, MADHUBALA R, CHATTOPADHYAY A. Cholesterol is required for *Leishmania donovani* infection: Implications in leishmaniasis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2004. (133): 145– 152.

RABHI I, RABHI S, BEN-OTHTMAN R, RASCHE A, DASKALAKI A, TRENTIN B, PIQUEMAL D, REGNAULT B, DESCOTEAUX A, GUIZANI-TABBANE L; SYSCO CONSORTIUM. Transcriptomic signature of *Leishmania* infected mice macrophages: a metabolic point of view. *Plos Neglected Tropical Diseases* 2012; 6(8):1-11

RABHI S, RABHI I, TRENTIN B, PIQUEMAL D, REGNAULT B, GOYARD S, LANG T, DESCOTEAUX A, ENNINGA J, GUIZANI-TABBAN I. Lipid Droplet Formation, Their Localization and Dynamics during *Leishmania* major Macrophage Infection. *Plos one*.2016. 11(2)

REY LUIZ. Parasitologia. 4 edicao. Guanabara Koogan. 2008

ROCHA N, KUJIL C, KANT R, JANSSEN L, HOUBEN D, JANSSEN H, ZWART W, NEEFJES J. Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7–RILP–p150Glued and late endosome positioning. *JCB*.2018. 1209-24.185:7

ROBERTS CW, MCLEOD R, RICE DW, GINGER M, CHANCE ML, GOAD LJ. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2003; 126: 129-142

RODRIGUES JCF, ATTIAS M, RODRIGUEZ C, URBINA JA, DE SOUZA W. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a Delta (24(25))-sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; 46: 487-499.

RODRÍGUEZ NE, LOCKARD RD, TURCOTTE EA, ARAÚJO-SANTOS T, BOZZA PT, BORGES VM, WILSON ME. Lipid bodies accumulation in *Leishmania infantum*-infected c57BL/6macrophages. *Parasite Immunol*. 2017.39(8).

ROUGERON V, DE MEEUS T, BANULS AL. Reproduction in *Leishmania*: A focus on genetic Exchange. *Infect Genet Evol*. 2017. 50: 128-32.

SANTOS DO, COUTINHO CE, MADEIRA MF, BOTTINO CG, VIEIRA RT, NASCIMENTO SB, BERNARDINO A, BOURGUIGNON SC, CORTE-REAL S, PINHO RT, RODRIGUES CR, CASTRO HC. Leishmaniasis treatment--a challenge that remains: a review. *Parasitol Res* 2008 103 (1), 1-10

SAURIN W, HOFNUNG M, DASSA E. Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J Mol Evol* 1999; 48:22-41.

SAUVAGE V, AUBERT D, ESCOTTE-BINET S, VILLENA I. The role of ATP-binding cassette (ABC) proteins in protozoan parasites. *Mol Biochem Parasitol* 2009; 167:81-94.

SEMINI G, PAAPE D, PATEROU A, SCHROEDER J, BARRIOS-LLERENA M, AEBISCHER T. Changes to cholesterol trafficking in macrophages by *Leishmania* parasites infections. *Microbiologyopen*. 2017 Aug;6(4)

SERENO D, M CAVALEYRA, ZEMZOUMI K, MAQUAIRE S, OUASSI A, LEMESRE JL. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrob Agents Chemother*.1998. v.42, n.12, Dec, p.3097-102.

SINGH SSR. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Infection and Chemotherapy* 2004; 10: 307-315

SOARES NM, LEAL TF, FIÚZA MC, REIS EA, SOUZA MA, DOS-SANTOS WL, PONTES-DE-CARVALHO L Plasma lipoproteins in visceral leishmaniasis and their effect on *Leishmania*-infected macrophages. *Parasite Immunol*. 2010 Apr;32(4):259-66

SOTO J, ARANA BA, TOLEDO J, RIZZO N, VEJA JC, DIAZ A, LUZ M, GUTIERREZ P, ARBOLEDA M, BERMAN JD, JUNGE K, ENGEL J, SINDERMANN H. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis.*2004. 36 (9)1256-72.

SOUZA W & RODRIGUES J. Sterol Biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomatid drugs. *Inter Perspect on inf disease.* 2009

STANHOPE R, DERRÉ I. Making Contact: VAP targeting Intracellular Pathogens, 2018

STUART K, BRUN R, CROFT S, FAIRLAMB A, GURTLER RE, MCKERROW J, REED S, TARLETON R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J. Clin. Invest.*2008, 118 (4): 1301-1310.

SUNDAR S, CHAKRAVARTY J. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. *Current Opinion in Infectious Diseases.*2008. v. 17, n. 5, p. 787–794.

SUNTER J & GULL K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *The Royal Society* 2017.v.7.

TARLING EJ, VALLIM TQD, EDWARDS PA. Role of ABC transporters in lipid transport and human disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2013; 24: 342-350.

TEIXEIRA DE, BENCHIMOL M, RODRIGUES JCF, CREPALDI PH, PIMENTA PFP, DE SOUZA W. The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations. *PLoS Pathogens*,2013. v. 9, n. 10, p. 7–11.

VANNIER-SANTOS MA, URBINA JA, MARTINY A, NEVES A, DE SOUZA W. Alterations induced by the antifungal compounds ketoconazole and terbinafine in *Leishmania*.*The Journal of Eukaryotic Microbiology*, .1995. vol. 42, no. 4, pp. 337– 346.

VERMA NK, DEY CS. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48(8):3010–5.

WANG N, LAN D, CHEN W, MATSUURA F, TALL AR. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jun 29;101(26):9774-9

WHO. Leishmaniasis and Geneva. WHO technical Report series control of leishmaniasis. II World Heal. Organ. III series. 2010. ISBN 978, 22-26

WHO. Fourth WHO Report on neglected Tropical Diseases: Integrating neglected tropical diseases into global health and development. WHO Report on Neglected Tropical Diseases, 2017

WIJDEVEN RH, JANSSEN H, NAHIDIAZAR L, JANSSEN L, JALINK K, BERLIN I, NEEFIES J. Cholesterol and ORP1L-mediated ER contact sites control autophagosome transport and fusion with the endocytic pathway. 2016 .*Nat Commun*

ZIJLSTRA EE, MUSA AM, KHALIL EAG, EL HASSAN IM, EL- HASSAN AM. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Lancet Infectious Diseases.*2003, v. 3, n. 2, p. 87–98.

