



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz  
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Papel do colesterol exógeno nos mecanismos de adaptação de  
*Leishmania* spp a condições de estresse metabólico e  
farmacológico**

**VALTER VIANA DE ANDRADE NETO**

**Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz visando a obtenção do Título de  
Doutor em Ciências.**

**Área de concentração: Biologia Celular e Molecular**

**Rio de Janeiro  
2013**



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz  
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Papel do colesterol exógeno nos mecanismos de adaptação de  
*Leishmania* spp a condições de estresse metabólico e  
farmacológico**

**VALTER VIANA DE ANDRADE NETO**

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

Tese apresentada ao curso de Doutorado em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

**VALTER VIANA DE ANDRADE NETO**

**Papel do colesterol exógeno nos mecanismos de adaptação de  
*Leishmania* spp a condições de estresse metabólico e  
farmacológico**

**Orientador:**

**Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

**Aprovada em:**

**EXAMINADORES:**

---

Dra. Cláudia Masini d'Avila Levy  
Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ

---

Profa. Bartira Rossi Bergmann  
Instituto de Biofísica, UFRJ

---

Dr. Rubens Lima do Monte Neto  
Université Laval - Canadá

**SUPLENTES:**

Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral - Revisor (IOC/FIOCRUZ)

Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto (IOC/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro  
2013

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 sanduíche na Universidade Laval, Quebec, Canadá, sob a supervisão do Prof. Marc Ouellette.

**DEDICATÓRIA:**

*A Deus que sempre  
esteve do meu lado, aos  
meus pais, orientador e  
amigos pelo apoio  
durante essa  
caminhada.*

## **AGRADECIMENTOS:**

- A Deus por todas as oportunidades e momentos na minha vida.
- Aos meus pais, Marlene de Paiva Rodrigues e Valter Fernando Viana de Andrade, por acreditarem em mim, incentivarem e ajudarem durante todo esse tempo e a minha namorada Cíntia por todo apoio neste momento.
- Ao meu orientador Eduardo Caio Torres dos Santos pelo apoio, paciência compreensão e atenção que me foram dados e, principalmente, pelo aprendizado desde a iniciação científica até esse momento.
- Ao Prof Herbert Guedes pelo apoio, ajuda em muitos experimentos desta tese e amizade.
- À Dra. Leonor Leon e à Dra Marilene Marcuzzo do Canto Cavalheiro, por terem me recebido com todo o carinho no Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos e pelo apoio para a realização deste trabalho.
- À Profa. Georgia Correa Atella, do Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ, por ter me dado todo o apoio na realização de vários experimentos.
- À Profa. Bartira Rossi Bergmann do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ por ter disponibilizado o seu laboratório no período de obras, que foi importantíssimo para o término de alguns experimentos.
- À Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral por aceitar revisar esta dissertação.
- Ao Prof. Marc Ouellette por ter me recebido no seu laboratório na Université Laval – Québec- Canadá, no período de doutorado sanduíche.
- Ao Dr. Rubens Lima do Monte Neto por toda ajuda nos experimentos no período de doutorado sanduíche, por ter aceitado participar a banda da minha tese e pela amizade.
- Ao Dr. Rubem Sadok Menna Barreto por toda ajuda nos experimentos de microscopia electrónica de Transmissão.
- Ao Dr. Pedro Paulo Manso por toda ajuda nos experimentos de microscopia confocal.
- À Dra. Mirian por toda ajuda nos experimentos de microscopia eletrônica de transmissão usando a LDL-ouro.
- Ao meu amigo Edézio pelo apoio e na ajuda em muitos experimentos desta tese. Essa tese também é sua, meu amigo.
- À minha amiga Nuccia do Instituto de Bioquímica da UFRJ pela atenção em muitos experimentos importantes e pela sua amizade em muitos momentos.
- Às minhas amigas Mariela, Vivi e Lili e Gazi por todo o apoio e ajuda durante vários momentos dessa tese, muito obrigado.
- A todos os integrantes e amigos do Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos.

- Obrigado por todos os momentos de descontração e trabalho.
- Aos meus amigos dos laboratórios do Instituto de Biofísica e Bioquímica da UFRJ pela amizade e apoio.
- A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu agradecimento.

*Você não sabe o quanto eu caminhei pra chegar até aqui.  
Percorri milhas e milhas antes de dormir, eu nem cochilei...  
Cidade Negra*

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                       |   |
|-----------------------|---|
| - LC                  | LEISHMANIOSE CUTÂNEA                                    |
| - LM                  | LEISHMANIOSE MUCOSA                                     |
| - LCD                 | LEISHMANIOSE CUTÂNEO-DIFUSA                             |
| - LDPC                | LEISHMANIOSE DÉRMICA PÓS CALAZAR                        |
| - OMS                 | ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE                            |
| - LTA                 | LEISHMANIOSE TEGUMENTAS AMERICANA                       |
| - LV                  | LEISHMANIOSE VISCERAL                                   |
| - ATP                 | ADENOSINA TRIFOSFATO                                    |
| - GTP                 | GUANOSINA TRIFOSTFATO                                   |
| - FDA                 | “FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION                          |
| - DMC                 | 2, 6-DIDROXI-4-METOXICALCONA                            |
| - CYP51               | P450 C-14 DESMETILASE                                   |
| - LDL                 | LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE                         |
| - VLDL                | LIPOPROTEÍNA DE MUITO BAIXA DENSIDADE                   |
| - IDL                 | LIPOPROTEÍNA DE DENSIDADE INTERMEDIÁRIA                 |
| - HDL                 | LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE                          |
| - DHFR-TS             | DIIDROFOLATO REDUTASE-TIMIDILATO SINTASE                |
| - PTR1                | PTERIDINA REDUTASE 1                                    |
| - HMGC <sub>o</sub> A | HIDROMETILGLUTARIL COENZIMA A                           |
| - CG/MS               | CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA AO ESPECTOMETRO DE MASSAS |
| - MEM                 | MEIO MÍNIMO ESSENCIAL                                   |
| - PCR                 | REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE                          |
| - SMT                 | ESTEROL METIL TRANSFERASE                               |
| - MVAC                | MEVALONATO CINASE                                       |
| - HMGR                | HIDROMETILGLUTARIL COENZIMA A REDUTASE                  |
| - SEO                 | ESQUALENO 2,3, EPOXIDASE                                |

|          |   |
|----------|---|
| - 14DM   | ENZIMA C-14 DESMETILASE   |
| - CHO    | COLESTEROL  |
| - VP     | VACÚOLO PARASITÓFORO  |
| - SSD    | DOMÍNIO SENSÍVEL À ESTEROL  |
| - GFP    | PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE                                       |
| - ERG    | ERGOSTEROL  |
| - KBr    | BROMETO DE POTÁSSIO   |
| - SFB    | SORO FETAL BOVINO   |
| - LAN    | LANOSTEROL  |
| - DIPE   | ÉTER DIISOPROPÍLICO   |
| - SFBd   | SORO FETAL BOVINO DESLIPIDADO                                     |
| - TLC    | CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA                                      |
| - DMSO   | DIMETILSULFÓXIDO  |
| - FICI   | ÍNDICE DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONAL                       |
| - WT     | SELVAGEM  |
| - D.O    | DENSIDADE ÓPTICA  |
| - ALT    | ALANINA AMINOTRANSFERASE  |
| - AST    | ASPARTATO AMINOTRANSFERASE  |
| - LBqT01 | MOLÉCULA NÚMERO 1- LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA DE TRIPANOSOMATÍDEOS |

## RESUMO

Os tripanossomatídeos não sintetizam o colesterol e sim esteróis com o esqueleto ergostano, porém um percentual significativo de colesterol exógeno é encontrado em todas as espécies de *Leishmania*, sugerindo um papel biológico para esta molécula. Esta tese tem como objetivo estudar a importância do uso de colesterol para *Leishmania spp.* em várias situações, avaliando o potencial deste sistema como um possível alvo farmacológico. A atividade dos inibidores de biossíntese de ergosterol associado com inibidores de transporte de colesterol derivado de LDL, foi avaliada em promastigotas e amastigotas intracelulares. A associação entre LBqT01 e cetoconazol, miconazol ou terbinafina mostrou sinergia. A associação entre a imipramina ou progesterona e cetoconazol ou terbinafina indicaram um efeito aditivo. O cetoconazol e miconazol demonstraram uma diminuição de até duas vezes o valor de IC<sub>50</sub> nas formas amastigotas, quando combinado com os inibidores de transporte de colesterol. Foi observado também alteração da biossíntese de ergosterol após tratamento dos parasitos com os inibidores de transporte de colesterol, demonstrado por CG/MS. A combinação de LBqT01 e cetoconazol mostrou ser mais ativa *in vivo* do que cada fármaco individualmente. Estudamos também o mecanismo de resistência desses inibidores, avaliando a modulação de enzimas da via de biossíntese de esteróis e a utilização de colesterol exógeno pelos parasitos. Promastigotas de *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis* foram cultivadas com concentrações crescentes de sinvastatina, terbinafina e miconazol. Estes inibidores mostraram um índice de resistência de 2,5 - 8 vezes. A resistência cruzada também foi avaliada, com estes inibidores e fármacos de referência (miltefosina, anfotericina B e antimônio trivalente). A expressão de genes da biossíntese de esterol e utilização do colesterol exógeno entre as cepas selvagens e resistentes, foram avaliadas por PCR em tempo real e CG/MS, respectivamente. As enzimas HMGCoA e C -14 desmetilase foram as mais moduladas, independente do fármaco utilizado, variando sua expressão nas cepas resistentes. Promastigotas de *L. braziliensis* resistentes à terbinafina apresentaram alteração no perfil de esteróis, *L. amazonensis* resistente aos três inibidores e *L. guyanensis* resistente ao miconazol mostraram alteração da biossíntese de esteróis e aumento na absorção do colesterol exógeno. Os resultados mostram que alguns genes foram amplificados na cepa resistente em relação à cepa selvagem. Juntos estes resultados sugerem que o colesterol desempenha um papel importante na atividade e resistência aos inibidores da biossíntese de esteróis e que o bloqueio da sua utilização pela *Leishmania spp.* pode ser um alvo para a síntese de novos fármacos para o tratamento da leishmaniose.

## ABSTRACT

The trypanosomes do not synthesize cholesterol sterols but with ergostane skeleton, but a significant percentage of exogenous cholesterol is found in all species of *Leishmania*, suggesting a biological role for this molecule. This work aims to study the importance of use cholesterol to *Leishmania spp.* in several cases, evaluating the potential of the system as a possible drug target. The activity of the inhibitors of ergosterol biosynthesis inhibitors associated with transport of LDL cholesterol derivative was evaluated in intracellular amastigotes and promastigotes. The association between LBqT01 and ketoconazole, miconazole or terbinafine showed synergy. The association between imipramine or progesterone, and ketoconazole, or terbinafine indicated an additive effect. The ketoconazole and miconazole showed a reduction of up to twice the IC50 value in amastigotes when combined with the inhibitors of cholesterol transport. Change of ergosterol biosynthesis of parasites after treatment with inhibitors of cholesterol transport as demonstrated by GC/MS was also observed. The combination of LBqT01 and ketoconazole was more active in vivo than either drug individually. We also studied the mechanism of resistance of these inhibitors by evaluating the modulation of enzymes of the sterol biosynthesis pathway and use of exogenous cholesterol by parasites. Promastigotes of *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania guyanensis* were cultured with increasing concentrations of simvastatin, terbinafine and miconazole. These inhibitors showed resistance index from 2.5 to 8 times. Cross-resistance was evaluated with these inhibitors and reference drugs (miltefosine, amphotericin B and trivalent antimony). The expression of sterol biosynthesis genes and use of exogenous cholesterol in the wild and resistant strains were analyzed by real-time PCR and GC / MS, respectively. The HMGCoA C and -14 demethylase enzymes were more modulated, regardless of the drug used, varying its expression in resistant strains. Promastigotes of *L. braziliensis* resistant to terbinafine presented changes in sterol profile, *L. amazonensis* resistant to all three inhibitors amazonensis and *L. guyanensis* miconazole resistant showed alterations in the biosynthesis of sterols and increase in the absorption of exogenous cholesterol. The results show that some genes were amplified in the resistant strain compared to the wild type strain. Together these results suggest that cholesterol plays an important role in the activity and resistance to inhibitors of sterol biosynthesis and blocking their use *Leishmania spp.* may be a target for the synthesis of new drugs for the treatment of leishmaniasis.

# SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1- INTRODUÇÃO</b>   | 1  |
| 1.1 – <i>LEISHMANIA</i> SPP.   | 2  |
| 1.2- LEISHMANIOSE  | 3  |
| 1.3- DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA   | 5  |
| 1.4 – TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE   | 7  |
| 1.5 – BIOSÍNTESE DE ESTERÓIS   | 10 |
| 1.6- INIBIDORES DA BIOSÍNTESE DO ERGOSTEROL                                  | 16 |
| 1.7- COLESTEROL NO PARASITISMO INTRACELULAR                                  | 19 |
| 1.8- CAPTAÇÃO DO COLESTEROL VIA RECEPTOR DE LDL                              | 22 |
| 1.9- TRANSPORTE INTRACELULAR DE COLESTEROL EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS           | 23 |
| 1.10- AMPLIFICAÇÃO GÊNICA COMO MECANISMO DE RESISTÊNCIA EM <i>LEISHMANIA</i> | 25 |
| <b>2- OBJETIVOS</b>  | 28 |
| <b>3- METODOLOGIA</b>  | 29 |
| 3.1- MANUTENÇÃO E CULTIVO DOS PARASITOS                                      | 30 |
| 3.2- PURIFICAÇÃO DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE (LDL)                    | 30 |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3.3- Complexação das partículas de ldl com nanopartículas de ouro coloidal</b>   | <b>31</b> |
| 3.4- Microscopia Confocal   | 31        |
| 3.5- Microscopia Eletrônica de Transmissão  | 32        |
| 3.6- Deslipidação do soro fetal bovino (SFB)  | 33        |
| 3.7- Ensaio sobre amastigotas intracelulares com ou sem fonte de colesterol exógeno.  | 33        |
| 3.8- Ensaio de associação de fármacos   | 34        |
| 3.9- Extração dos lipídeos  | 35        |
| 3.10- Análise dos lipídeos neutros de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. guyanensis</i> por Cromatografia em Camada Fina (CCF/TLC).                                    | 36        |
| 3.11- Análise do perfil de esteróis por Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de massas (GC/MS).   | 36        |
| 3.12- Indução de resistência aos inibidores da biossíntese do ergosterol  | 37        |
| 3.13- Análise da expressão gênica de enzimas da biossíntese do ergosterol em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. braziliensis</i> por PCR quantitativo | 37        |
| 3.14- Atividade da LBqT01 associada ao Cetoconazol <i>in vivo</i>   | 40        |
| 3.15- Caracterização e análise filogenética das espécies  | 40        |
| 3.16- Sequenciamento do genoma  | 41        |
| 3.17- Clonagem, subclonagem e transfecção dos Transportadores ABC   | 42        |
| <b>4- RESULTADOS</b>  | <b>43</b> |
| <b>CAPÍTULO 1: Influência do Colesterol na atividade dos inibidores da biossíntese do ergosterol</b>  | <b>44</b> |

|   |    |
|---|----|
| 4.1 - Disponibilidade de LDL para amastigotas intracelulares  | 45 |
| 4.2- Regulação da biossíntese do ergosterol na presença ou ausência de fonte exógena de colesterol.   | 47 |
| 4.3- Efeito da ausência de colesterol exógeno sobre a atividade antileishmania em amastigotas intracelulares  | 50 |
| 4.4- Atividade antileishmania dos inibidores da utilização de colesterol associados aos inibidores da biossíntese do ergosterol sobre promastigotas e amastigotas intracelulares. | 52 |
| 4.4.1 – Efeito dos inibidores da utilização de colesterol associados aos inibidores da biossíntese do ergosterol sobre promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .                   | 52 |
| 4.4.2 – Toxicidade dos inibidores de utilização de colesterol e dos inibidores da biossíntese de esteróis sobre macrófagos peritoneais.   | 57 |
| 4.4.3 – Atividade leishmanicida dos inibidores da utilização de colesterol e inibidores da biossíntese de esteróis sobre macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i>          | 60 |
| 4.5- Alteração no perfil de esteróis dos parasitos tratados com os inibidores da biossíntese do ergosterol e inibidores da utilização do colesterol                               | 63 |
| 4.6-Atividade leishmanicida <i>in vivo</i> da associação de inibidor do biossíntese do colesterol com um inibidor do aproveitamento do colesterol exógeno.                        | 69 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>CAPÍTULO 2: Avaliação do papel do colesterol exógeno e da expressão gênica relacionada a resistência aos inibidores da biossíntese de ergosterol.</b>            | 72  |
| 4.7- Caracterização das espécies de <i>L. braziliensis</i> (M2904), <i>L. amazonensis</i> (LTB0016) e <i>L. guyanensis</i> (M4147).                                 | 73  |
| 4.8- Indução de resistência aos inibidores da biossíntese de ergosterol em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. braziliensis</i> e <i>L. guyanensis</i> . | 76  |
| 4.9- Atividade leishmanicida dos inibidores da biossíntese de ergosterol em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> selvagem e resistentes                           | 77  |
| 4.10- Atividade leishmanicida dos inibidores da biossíntese de ergosterol em promastigotas de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. guyanensis</i> resistentes e selvagens | 81  |
| 4.11- Modulação da via de biossíntese de esteróis e utilização de colesterol exógeno pelas cepas resistentes aos inibidores da biossíntese do ergosterol.           | 86  |
| 4.12- Análise do sequenciamento do genoma total da cepa de <i>L. guyanensis</i> resistente a sinvastatina   | 93  |
| 4.13- Clonagem dos transportadores ABCG1, ABCG4 E ABCG6   | 99  |
| <br>  |     |
| <b>5- DISCUSSÃO</b>   | 108 |
| <br>  |     |
| <b>6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>  | 117 |

# **1- INTRODUÇÃO**

## 1.1- *Leishmania* spp.

A leishmaniose é uma doença causada por parasitos do gênero *Leishmania*, um eucarioto unicelular que pertence a ordem *Kinetoplastida* e família *Trypanosomatidae*. Estes organismos possuem minicírculos de DNA mitocondrial arranjados em uma estrutura muito característica, denominada de cinetoplasto, localizada no interior da mitocôndria única. Quinze espécies de *Leishmania* foram identificadas como patogênicas para humanos causando leishmaniose cutânea, mucosa e visceral (Revez et al. 2013; Stuart et al. 2008).

Esses parasitos habitam células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente macrófagos, do hospedeiro vertebrado e o intestino do hospedeiro invertebrado, flebotomíneo (Ashford et al, 2000). A *Leishmania* spp. tem seu ciclo biológico heteroxênico, realizado em dois hospedeiros. Os hospedeiros vertebrados incluem uma grande variedade de mamíferos, incluindo humanos, roedores, canídeos. Os hospedeiros invertebrados são pequenos insetos hematófagos (apenas as fêmeas), os flebotomíneos (Neuber et al, 2008).

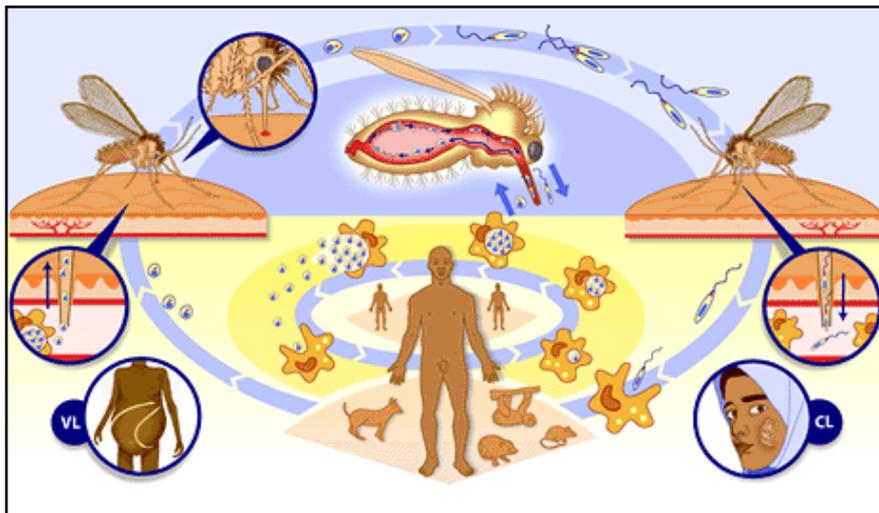
A *Leishmania* spp. é geralmente transmitida por 30 espécies de flebotomíneos, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. Outros modos de transmissão, incluindo transfusão sanguínea, compartilhamento de seringa por usuários de drogas ou raramente através de acidente laboratorial são observados (Myler & Fasel, 2008).

Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam dois estágios evolutivos: a forma promastigota, extracelular, que é longa, com um núcleo central, cinetoplasto posicionado na região anterior do parasito e longo flagelo, e a forma amastigota, intracelular, que tem corpo elipsóide, e um curto flagelo observável apenas ultraestruturalmente. Ambos promastigota e amastigota se dividem repetidamente por divisão binária longitudinal. O ciclo da *Leishmania* spp. inicia-se quando um flebotomíneo realiza seu repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, inoculando na pele formas promastigotas do parasito. Os parasitos invadem os macrófagos, com o envolvimento de receptores como o receptor de complemento que, em seguida, são clivados por proteases do parasito. Uma vez no interior de um endossoma diferenciado, chamado de vacúolo parasitóforo, os parasitos se diferenciam em amastigotas, que se multiplicam até o rompimento da célula hospedeira e infectam células adjacentes.

No intestino do inseto vetor, as formas promastigotas passam por um processo denominado metaciclógênese, que é o processo pelo qual estas formas deixam de se

dividir e tornam-se infectantes (promastigotas metacíclicas). As formas multiplicativas, não infectantes (procíclicas), aderem à parede do tubo digestivo do inseto vetor. Durante a metaciclogênese, as promastigotas sofrem modificações bioquímicas em sua superfície, perdendo assim sua capacidade de adesão ao epitélio do intestino médio do flebótomo. Como resultado, as promastigotas metacíclicas destacam-se, migrando para a faringe e cavidade bucal, de onde elas são transmitidas ao hospedeiro vertebrado, durante o próximo repasto sanguíneo.

O ciclo continua quando outro flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, e ingere amastigotas, que entram no trato gastrointestinal, se diferenciam em promastigotas, e se multiplicam no intestino médio ou anterior. Após maturação, eles colonizam a porção anterior do intestino, transformando-se em formas metacíclicas, que são infectivas (Stuart et al. 2008) (Fig. 1).



**Figura 1:** Ciclo biológico da *Leishmania* spp. (Organização Mundial da Saúde, 2004).

## 1.2- Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença infecciosa, não contagiosa, que pode acometer a pele e mucosas (leishmaniose tegumentar), ou as vísceras (leishmaniose visceral). A leishmaniose tegumentar pode, ainda, ser dividida em cutânea, mucosa ou cutânea difusa, como descrito mais adiante. As diferentes formas clínicas dependem da espécie do parasito envolvida e da resposta imune do hospedeiro (Neuber et al, 2008). As espécies mais importantes no Brasil são *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. chagasi* (Ministério da Saúde, 2011). As principais formas clínicas da leishmaniose são as seguintes:

- **Leishmaniose Cutânea (LC):** É forma mais comum de leishmaniose, causando úlceras principalmente nas partes expostas do corpo, membros anteriores, face, ou membros posteriores, (Blanco et al, 2013). A lesão inicia-se com uma área de vermelhidão e inchaço no local da inoculação com aumento no tamanho e, após 3-4 semanas, desenvolve lesão ulcerada com bordos elevados e fundo granulomatoso (Neuber et al 2008). A LC é tipicamente causada por *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* (de Brito et al, 2012; Fraga et al, 2012) embora *L. infantum* e *L. donovani* também possam estar implicadas (Neuber et al, 2008). Nas Américas, as principais espécies envolvidas são as do complexo *L. mexicana* e do subgênero *Vianna* (Myler, 2008). No Brasil a principal espécie causadora da LC é a *L. braziliensis*. A cura da doença é observada após 6-12 meses com cicatrização e desfiguração da pele do paciente. A cura espontânea nas Américas é mais rara, porque a lesão tende a ser mais severa (Neuber et al, 2008). Cerca de 1/3 dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem nas Américas, Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central. Estima-se que de 700 mil a 1,3 milhão de novos casos ocorram anualmente. (Organização Mundial da Saúde, 2010).

- **Leishmaniose mucosa ou mucocutânea (LM):** Causa uma parcial ou total destruição das mucosas do nariz, boca e garganta (Daneshbod et al. 2011, Strazzulla et al. 2013). É causada principalmente por *L. braziliensis*, mas também ocasionalmente por *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* (Fraga et al, 2012; Guerra et al, 2011). Esta forma ocorre devido à disseminação através do sangue ou vasos linfáticos, de células contendo amastigotas da pele para a mucosa nasofaríngea, culminando na sua destruição. É caracterizada por uma forte resposta imune celular, que pode estar envolvida com a destruição tissular. Muitos casos são relatados na Bolívia, Brasil e Peru (Myler & Fasel, 2008).

- **Leishmaniose cutâneo-difusa (LCD):** Caracteriza-se por apresentar evolução crônica progressiva, com numerosas lesões nodulares não ulceradas disseminadas pelo corpo. É usualmente uma manifestação de infecção com parasitos que normalmente causam leishmaniose cutânea localizada, associada com uma anergia específica ou perda de resposta imunológica pelo paciente (Ashford et al, 2000). É causada principalmente por *L. amazonensis*, mas também pode ser causada por *L. aethiopica* (Myler & Fasel, 2008).

- **Leishmaniose visceral ou calazar (LV):** É a forma mais grave da doença, afetando os nódulos linfáticos, baço, fígado, e medula óssea (Neuber et al, 2008). É causada pelo complexo de *L. donovani* que inclui, *L. donovani* e *L. infantum* no velho mundo e *L. infantum* (*syn. L. chagasi*) no novo mundo. Raramente a *L. tropica* (velho mundo) e *L. amazonensis* (novo mundo) tem sido implicadas nessa forma de leishmaniose (Myler & Fasel, 2008; van Griensven & Diro, 2012). Desde 1979, quando o primeiro caso de leishmaniose visceral em paciente que sofreu transplante renal apareceu na literatura, um aumento regular de todas as formas de leishmaniose tem sido observado em pacientes transplantados (Antinori et al. 2008).

- **Leishmaniose dérmica pós calazar (LDPC):** É uma complicação da leishmaniose visceral que aparece como uma pápula ou erupção cutânea nodular geralmente na face, braços, troncos ou outras partes do corpo. É uma manifestação dérmica após a cura do calazar por *L. donovani*.. Ocasionalmente alguns casos são reportados sem nenhum histórico de calazar (Ashford et al, 2000; Desjeux et al. 2013). A localização dérmica dos parasitos na LDPC torna-os mais acessíveis para o flebotomíneo e tem sugerido que pacientes com LPDC possivelmente servem como reservatórios de infecção, especialmente no intervalo entre a eclosão (Myler et al, 2008). Ocorre principalmente no leste da África (50%) e no subcontinente Indiano (10%) dos pacientes com Calazar, desenvolvem essa condição (Organização Mundial da Saúde, 2010).

### 1.3- Distribuição Geográfica

A epidemiologia da leishmaniose depende das características da espécie do parasito, características ecológicas locais dos sítios de transmissão, exposição atual ou anterior da população humana.

Um total de 98 países em 5 continentes apresentam transmissão endêmica de leishmaniose. O número de casos totais oficiais é mais do que 58,000 casos de leishmaniose visceral e 220,000 casos de leishmaniose cutânea. Foram registrados 0,2 a 0,4 milhões de casos de LV e 0,7 a 1,2 milhões de casos de LC a cada ano. Mais de 90% dos casos de LV ocorrem em apenas seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul e Etiópia. Leishmaniose cutânea é mais distribuída, com cerca de 1/3 dos casos ocorrendo em três regiões, nas Américas, bacia do Mediterrâneo e oeste da Ásia até o Oriente médio para Ásia central. Os dez países com um número grande de casos

registrados são: Afeganistão, Algeria, Colômbia, Brasil, Iran, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Perú. Esses países juntos correspondem a 70-75% da incidência global estimada de LC (Alvar et al. 2012).

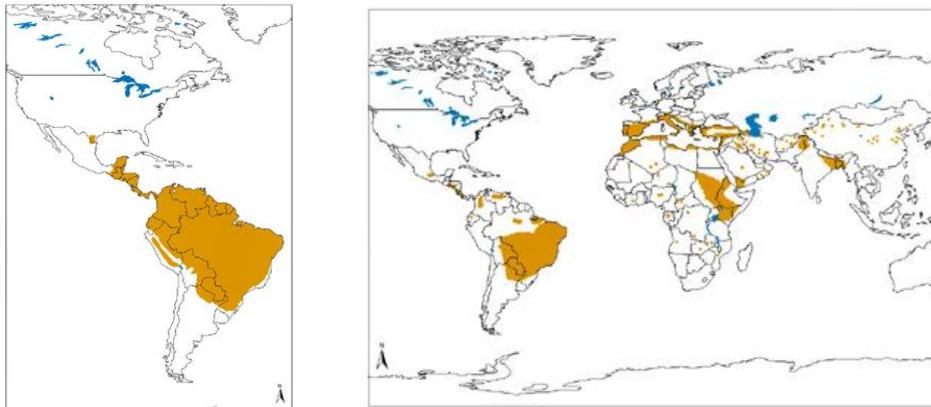
Entre 2001 a 2011 foram registrados 638.702 casos de leishmaniose cutânea e mucosa no continente americano. De um total de 57.287 casos registrados em 2011, 21.306 foram registrados no Brasil. O número de casos de leishmaniose visceral neste mesmo período foi de 38.808 casos no continente americano, sendo que 37.503 (96,6%) no Brasil (Organização Mundial da Saúde, 2013). A região amazônica corresponde aproximadamente 40% dos casos de leishmaniose (Benicio et al, 2011).

Na Figura 2 observamos a distribuição mundial da leishmaniose cutânea e da leishmaniose visceral, atingindo principalmente países em desenvolvimento (Organização Mundial da Saúde, 2010). De acordo com o Ministério da Saúde, 90% dos casos de leishmaniose visceral resultam em óbito. É endêmica em 65 países e, no continente americano, está descrita em pelo menos 12 países. Dos casos registrados na América Latina, 90% ocorrem no Brasil. A doença, desde então, vem sendo descrita em vários municípios brasileiros, apresentando mudanças importantes no padrão de transmissão, inicialmente predominando em ambientes silvestres e rurais e mais recentemente em centros urbanos (Ministério da Saúde, 2011).

Uma das principais ameaças ao controle da leishmaniose visceral é a sua interação com a infecção pelo HIV. A leishmaniose tem emergido como uma importante infecção oportunista associada ao HIV. Em áreas endêmicas, muitas pessoas têm infecção assintomática e a infecção concomitante com HIV aumenta o risco do desenvolvimento da LV (Organização Mundial da Saúde, 2010; Zampetti et al, 2012).

A associação entre leishmaniose e HIV apresenta um número crescente de casos no Brasil e no mundo sobretudo na região mediterrânea da Europa, que compreende Espanha, França, Itália e Portugal. Cerca de 34 países possuem registros de casos da coinfeção *Leishmania*/HIV. O primeiro caso de leishmaniose associada com infecção com HIV foi observado em 1985. Trinta e cinco países têm mostrado casos de co-infecção. Essa co-infecção é atualmente observada em 2 a 9% de todos os casos de leishmaniose visceral em determinados países endêmicos, mas essa proporção tem aumentado drasticamente (Alvar et al. 2008, Zampetti et al. 2012). Pessoas portadoras do vírus HIV são particularmente mais susceptíveis ao calazar, e a doença pode prejudicar a resposta ao tratamento antiretroviral, além disso a infecção por leishmaniose visceral acelera a replicação e progressão do HIV (Organização Mundial

da Saúde, 2010). O impacto epidemiológico é tão significativo que a OMS cogita introduzir a leishmaniose visceral como doença indicadora da SIDA. O Brasil é o epicentro da epidemia de HIV na América do Sul e representa um terço de todas as pessoas vivendo com o vírus na América do Sul. A presença de imunossupressão severa pode modificar as características clínicas da doença, dificultando o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (Lindoso et al. 2009).



**Figura 2:** Distribuição geográfica de Leishmaniose Cutânea nas Américas (esquerda) e Leishmaniose Visceral (direita) (World Health Organization, 2013).

Alguns trabalhos vêm sendo realizados com estudos de métodos de prevenção contra infecção por *Leishmania*. Os trabalhos têm focado principalmente em 4 abordagens: controle do reservatório animal, controle da população do vetor, controle do reservatório humano e múltiplas intervenções simultâneas (Stockdale & Newton, 2013).

#### **1.4- Tratamento da Leishmaniose**

Desde a década de 1940, o tratamento contra a leishmaniose inclui os antimoniais pentavalentes, estando disponibilizadas comercialmente duas formulações: o antimoniatto de N-metilglucamina (antimoniatto de meglumina) (Glucantime) e o estibogluconato de sódio (Pentostam) (Ameen et al, 2010; Amato et al. 2007; Blum & Hatz, 2009; Santos et al, 2008, Sundar & Chakravarty, 2013). Embora o mecanismo de ação ainda não seja totalmente conhecido, os antimoniais são conhecidos por inibirem enzimas glicolíticas e oxidação de ácidos graxos em amastigotas de *Leishmania* spp. e

há uma inibição na formação de adenosina trifosfato (ATP) e guanosina trifosfato (GTP) (Singh et al, 2004).

Esses fármacos apresentam muitos efeitos tóxicos incluindo toxicidade cardíaca, hepática, pancreática e renal, devendo ser utilizados com cautela e sob monitorização clínica e laboratorial, em pacientes com cardiopatia e hepatopatia. Sintomas que podem levar a redução ou a suspensão do tratamento são: dor musculoesquelética e distúrbios gastrointestinais (Oliveira et al, 2011; Santos et al, 2008). Outros efeitos adversos incluem pancitopenia, neuropatia periférica reversível, mialgias, artralgias, anorexia, cefaléia, dor no local da aplicação (intramuscular) e aumento da diurese por perda transitória da capacidade de concentração urinária (Singh et al, 2004). Em geral, observa-se alteração dos níveis de amilase sem repercussão clínica que requeira a suspensão do tratamento. Entretanto, este deve ser interrompido se ocorrer um aumento superior a quatro vezes do limite máximo da normalidade para a amilase e 15 vezes para a lipase (Ministério da Saúde, 2011).

O principal efeito adverso do antimoniato N-metilglucamina é decorrente de sua ação sobre o aparelho cardiovascular. Esse efeito é dose e tempo dependente e se traduz por distúrbios de repolarização (Oliveira et al. 2011). Em pacientes acima de 50 anos, precedendo ao tratamento, deve-se realizar o ECG e o acompanhamento com ausculta cardíaca sempre antes de cada infusão do medicamento, objetivando detectar arritmias. Caso essas ocorram, o tratamento deve ser imediatamente interrompido, e, após reavaliação do paciente, deve-se reiniciar o tratamento com o mesmo fármaco ou com fármacos alternativos (Ministério da Saúde, 2011).

Os antimoniais não são aprovados pela “Food and Drugs Administration (FDA)” nos Estados Unidos, mas no Brasil, o Ministério da Saúde distribui gratuitamente o antimoniato N-metilglucamina na rede pública de saúde, adotando o esquema terapêutico preconizado pela Organização Mundial da Saúde (Tabela 1).

**Tabela 1:** Esquema terapêutico de acordo com a OMS (Ministério da Saúde, 2013).

| Forma Clínica               | Dose                             | Tempo de Duração |
|-----------------------------|----------------------------------|------------------|
| <b>Leishmaniose cutânea</b> | 10-20mg/Sb <sup>+5</sup> /kg/dia | 20 dias          |
| <b>Leishmaniose difusa</b>  | 20mg/Sb <sup>+5</sup> /kg/dia    | 20 dias          |
| <b>Leishmaniose mucosa</b>  | 20mg/Sb <sup>+5</sup> /kg/dia    | 30 dias          |

A eficiência terapêutica dos antimoniais pode variar dependendo do país, e protocolos de tratamento são determinados dependendo da região. Muitos casos de resistência têm sido relatados, dificultando o tratamento (Santos et al, 2008; (Vanaerschot et al. 2011, Maltezou et al, 2010).

A miltefosina, único fármaco oral licenciado para o tratamento da leishmaniose, é atualmente o tratamento de primeira escolha do programa de eliminação da leishmaniose visceral no subcontinente indiano. Casos de resistência vêm sendo relatados, com aumento da falha no tratamento da leishmaniose visceral (Patra et al. 2012, Rijal et al. 2013).

Em alguns casos, outros fármacos, tal como pentamidina, anfotericina B e paramomicina são usados, como no caso de resistência ao tratamento de primeira escolha, mesmo eles tendo grandes efeitos tóxicos. A anfotericina B já pode ser considerada de primeira escolha em várias circunstâncias ou regiões. (Santos et al, 2008).

A pentamidina, uma diamidina, ainda não tem seu mecanismo de ação totalmente conhecido, mas alguns trabalhos sugerem sua ação no cinetoplasto, inibindo suas funções, é utilizada para o tratamento da leishmaniose. O tratamento com baixa dose e um regime de curto tempo comumente resulta em mialgias, dor no local da injeção, náusea, dor de cabeça e, em menor extensão, gosto metálico, sensação de queimação, dormência, taquicardia e hipotensão. Hipoglicemia reversível é observada em 2% dos casos de tratamento. A incidência e severidade desses efeitos são maiores quando são administradas altas doses e regimes de longo prazo para o tratamento de leishmaniose visceral na Índia (Singh et al, 2004). A terapia com pentamidina foi avaliada também como primeira opção de tratamento na leishmaniose cutânea e mucosa e não somente em casos de resistência aos antimoniais (Blum et al, 2009; Amato et al, 2007; Tuon et al, 2008). A resistência a pentamidina tem sido descrita na literatura, dificultando o tratamento (Santos et al, 2008).

A anfotericina B, um antifúngico poliênico, se liga aos esteróis da membrana plasmática de *Leishmania* spp. preferencialmente ao ergosterol, formando poros na sua membrana, com perda do conteúdo intracelular e morte do parasito. Esse fármaco também liga-se no colesterol das células do hospedeiro, apresentando muitos efeitos colaterais. Vários efeitos colaterais são observados, como febre, sensação de frio, dor nos ossos, e, raramente, parada cardíaca e efeitos tóxicos em longo prazo, como hipocalcemia e nefrotoxicidade. A anfotericina B é utilizada para o tratamento de pacientes com calazar que são clinicamente resistentes a pentamidina e aos antimoniais.

Foi utilizada também para o tratamento da leishmaniose mucosa, em um estudo realizado na Bolívia, com 80% de cura (Amato et al, 2007).

Visando diminuir os efeitos adversos, algumas formulações de anfotericina B vetorizadas por lipídeos foram desenvolvidas (Ejazi & Ali, 2013; Pham et al. 2013; Santos et al, 2008). Essas formulações, como anfotericina B lipossomal (Ambisome), dispersão coloidal de anfotericina B (Anfocil) e complexo lipídico de anfotericina B (Abelcet), provocam menos efeitos colaterais do que o fármaco livre (Blum et al, 2009; Amato et al, 2007). A utilização de anfotericina lipossomal é bem tolerada em crianças. No entanto, o sucesso no tratamento de pacientes infectados com HIV não é boa. Embora pacientes sejam curados inicialmente, metade deles tem recidivas. O uso dessas formulações tem permanecido limitado para casos severos e de resistência no tratamento de leishmaniose visceral (Singh et al, 2004). A produção dessas formulações possuem um alto custo, dificultando seu uso em países em desenvolvimento. Estudos têm sido realizados, na tentativa de obter métodos de baixo custo para a produção desses fármacos (Santos et al, 2008).

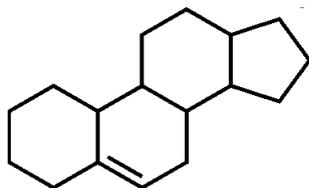
A paramomicina é um aminoglicosídeo usado para o tratamento de doenças bacterianas. No entanto, tem uma vasta atividade antiparasitária que não é compartilhada por outros aminoglicosídeos. Há relatos do seu uso para o tratamento de leishmaniose visceral e de sua formulação tópica para a leishmaniose cutânea (Blum et al, 2009; Tuon et al, 2008; Santos et al, 2008). A combinação da paramomicina e estibogluconato foi usada no tratamento de casos graves de leishmaniose cutânea. Esse fármaco tem um potencial de toxicidade renal. (Singh et al, 2004).

Devido às substanciais evidências da atividade leishmanicida de certos inibidores da protease (aspártico protease) do HIV (Santos et al, 2013a) esses fármacos estão sendo sugeridos como possível tratamento para a coinfeção HIV-*Leishmania*, nos casos de leishmaniose visceral (van Griensven et al, 2013; Santos et al, 2013b). Inibidores de aspártico proteases usados no tratamento do HIV (amprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir and saquinavir) possuem atividade leishmanicida, induzindo várias alterações ultraestruturais no parasito (Santos et al, 2009).

### **1.5- Biossíntese de Esteróis**

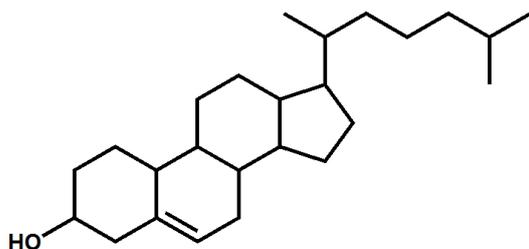
Compostos isoprenóides estão presentes em células de procariotos e eucariotos. Os esteróis são frequentemente o mais abundante grupo isoprenóide, sendo o ciclopentanoperidrofenantreno (Fig. 3) a sua estrutura fundamental, que possui 4 anéis

hidrocarbonetos fundidos, três com seis carbonos e um com cinco possuindo um núcleo quase planar e relativamente rígido (Roberts et al. 2003) .



**Figura 3:** Estrutura do Ciclopentanoperidrofenantreno.

Os esteróis são lipídeos estruturais e estão presentes nas membranas da maioria das células eucarióticas. Colesterol (Fig. 4), o mais importante esteroide das células de mamíferos, é anfipático, com um grupo polar (a hidroxila em C-3) e um corpo hidrocarbonado não-polar (o núcleo de esteróis e uma cadeia lateral hidrocarbonada em C-17) (Nelson, 2002).



**Figura 4:** Estrutura química do colesterol.

Ele é o esteroide mais abundante nas células de mamíferos e realiza uma série de funções, sendo importante para o crescimento e viabilidade celular. As células adquirem colesterol através da endocitose de Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) (rica em colesterol) via receptor ou através de síntese de novo (Chang et al. 2006). Desempenha um papel importante como elemento estrutural e funcional das membranas atuando como modulador de fluidez. A membrana plasmática é rica em colesterol enquanto as membranas do complexo de Golgi têm uma quantidade intermediária e as membranas das outras organelas são relativamente pobres em colesterol. Nas mitocôndrias, a membrana externa é mais rica em colesterol que a membrana interna. O colesterol também é importante por ser precursor dos ácidos biliares e de hormônios esteróides: hormônios adrenocorticais (aldosterona) e hormônios sexuais (estrogênios, testosterona e progesterona). O colesterol intracelular pode ser esterificado através da ação da enzima acil-CoA colesterol aciltransferase (ACAT), que catalisa a transformação do colesterol para éster de colesterol (Chang et al, 2006).

A HMG-CoA redutase é a enzima limitante da velocidade na síntese do colesterol, estando sujeita a diferentes tipos de controle metabólico. Podemos citar os seguintes tipos de controle: (i) Inibição por retroalimentação (“feedback”), onde o colesterol é um inibidor retroativo da HMG CoA redutase, diminuindo assim a síntese subsequente de colesterol, (ii) regulação hormonal, onde a síntese é ativada por insulina e inibida por glucagon; (iii) regulação da transcrição mediada por esterol, onde a transcrição do gene da HMG-CoA redutase é regulada pela quantidade de colesterol captado por endocitose de LDL mediada por receptor (Champe, 1997).

O colesterol é o esterol característico das células animais, mas os vegetais, fungos e alguns protozoários, em vez de colesterol, sintetizam outros esteróis intimamente relacionados, empregando a mesma via sintética até o passo do 2,3-epóxido de esqualeno. No caso de *Leishmania* spp. ocorre a produção de ergosterol e esteróis 24 alquilados no carbono 24 (Roberts et al, 2003).

Os tripanossomatídeos já foram extensivamente estudados quanto a sua produção de esteróis. A via biossintética de esteróis de *Leishmania* spp e *T. cruzi* tem sido deduzida por estudos com [<sup>14</sup>C]-acetato e [<sup>14</sup>C]-mevalonato e identificação de esteróis intermediários que acumulam após o tratamento com vários inibidores da biossíntese de esteróis (Roberts e cols, 2003). Por exemplo, a inibição da C-14 desmetilase, pelos azóis, causa o acúmulo de 4 $\alpha$ ,4 $\beta$ ,14 $\alpha$ -trimetilesteróis, 4 $\alpha$ , 14 $\alpha$ -dimetilesteróis e 14 $\alpha$ -metilesteróis (Coombs et al, 1991).

Na figura 5 podemos observar os esteróis já identificados em *Leishmania* spp. esqualeno, lanosterol (4,4,14 $\alpha$ -dimetilcolesta-8,24-dieno-3 $\beta$ -ol, **1**) e dimetilzimosterol (4 $\alpha$ ,14 $\alpha$ -dimetilcolesta-8,24-dieno-3 $\beta$ -ol, **3**)(Goad et al. 1984). A descoberta dessas substâncias sugeriu que a biossíntese de esterol ocorria de maneira similar a dos fungos, oferecendo uma oportunidade para o desenvolvimento de quimioterapia com alvo na via biossintética dos esteróis. O uso de fármacos já utilizados com sucesso contra infecções fúngicas pode ser uma alternativa, conforme mencionado anteriormente, com a utilização na clínica de cetoconazol, fluconazol e itraconazol, que inibem essa via em fungos e *Leishmania* (Roberts et al, 2003).

Os esteróis nos tripanossomatídeos participam no crescimento normal das células. Participam da manutenção da arquitetura da membrana, onde esteróis livres interagem com cadeia de ácidos graxos de fosfolipídios para controlar a fluidez de membrana e assim controlar a continuidade das funções (Coombs et al, 1991).

Os principais esteróis dos tripanossomatídeos possuem esqueleto  $\Delta^{5,7}$  C28-ergostano (com metila em 24) ou C29-estigmastano (com etila em 24). A ausência de 24-metil derivados de esteróis 4,4 dimetilados sugere que a metilação em 24 ocorre de forma tardia na via e o zimosterol (colesta-8,24-dieno-3 $\beta$ -ol, **7**) pode ser o maior substrato para esta reação (Fig. 5) (Coombs et al, 1991). Em *Leishmania* spp. os esteróis baseados no esqueleto ergostano são os mais abundantes tanto em amastigotas quanto em promastigotas, predominando o 5-desidroepisterol (ergosta-5,7,24(24<sup>1</sup>)-trieno-3 $\beta$ -ol, **12**) (Goad et al, 1984) embora o ergosterol (ergosta-5,7,22-trieno-3 $\beta$ -ol, **13**) predominante nos fungos, esteja em pequenas quantidades. Os esteróis de esqueleto relacionados ao estigmastano (estigma-7,24(24<sup>1</sup>)-dieno-3 $\beta$ -ol ou ergota-7-eno-3 $\beta$ -ol e 24-etilidinocolest-7eno-3 $\beta$ -ol (**14**); estigmasta-5,7,24(24<sup>1</sup>)-trieno-3 $\beta$ -ol (**15**); 7-desidroporiferasterol (estigma-5,7,22-trieno-3 $\beta$ -ol) (**17**) representam 5% do total de esteróis de promastigotas de *Leishmania* spp. mas em amastigotas podem chegar a 20% do total, sugerindo que esses esteróis podem ter um papel importante quando o parasito está na célula hospedeira (Roberts et al, 2003).

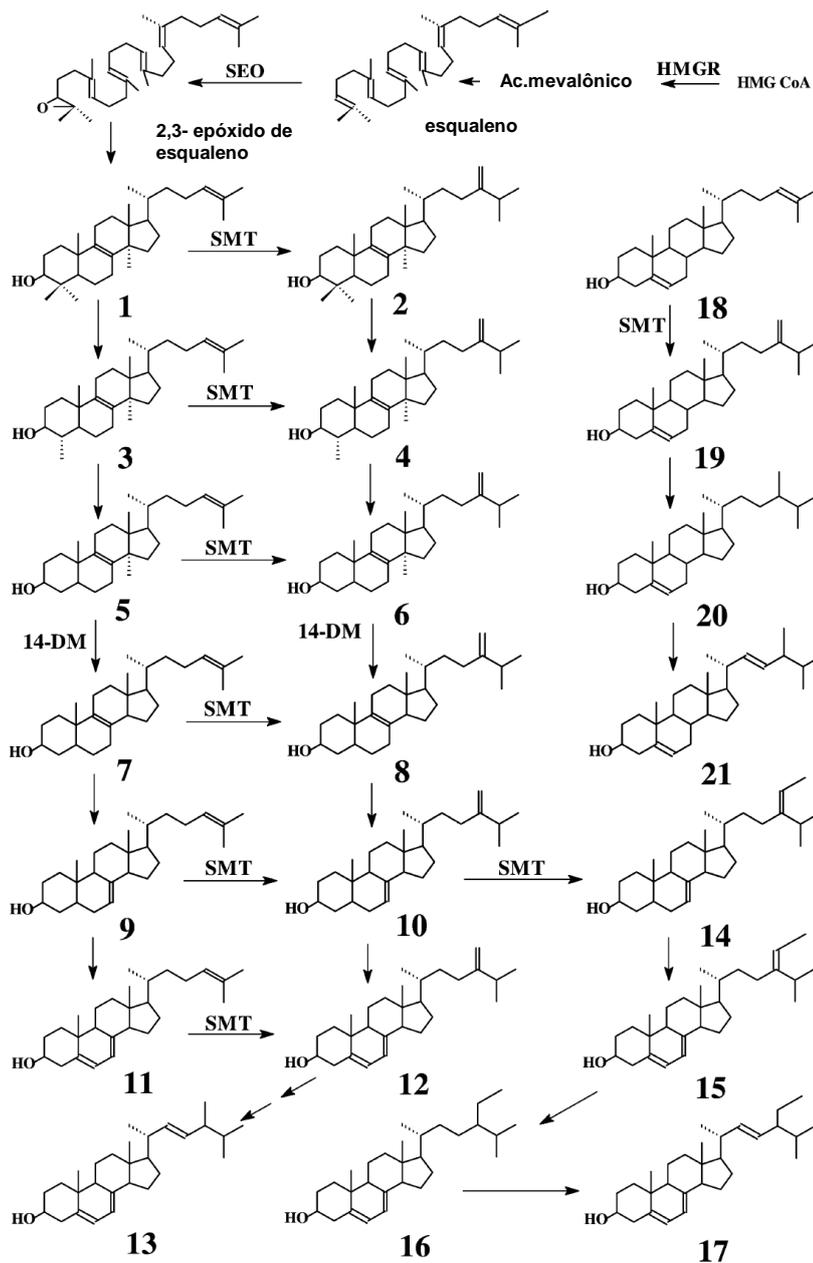
Os esteróis de amastigotas de *L. mexicana* são diferentes dos esteróis de promastigotas. O principal esterol é o episterol (ergosta-7,24(24<sup>1</sup>)-dieno-3 $\beta$ -ol, **10**) em vez de desidroepisterol (**12**) enquanto que desmosterol (colesta-5,24-dieno-3 $\beta$ -ol, **18**), ergosta-5,24(24<sup>1</sup>)-dieno-3 $\beta$ -ol (**19**), estigma-7,24(24<sup>1</sup>)-dieno-3 $\beta$ -ol (**14**) e estigma-5,7,24(24<sup>1</sup>)-trieno-3 $\beta$ -ol (**15**) são adicionais ao perfil de esteróis das formas promastigotas. A presença do esterol **19** (Fig. 5) sugere que o desmosterol tenha sido captado de macrófagos e metabolizado dentro dessa célula, uma vez que é improvável ser biossintetizado. A ocorrência de esteróis  $\Delta^5$  não é vista em promastigotas, porque possivelmente essas formas flageladas perdem a habilidade de dessaturação da ligação  $\Delta^7$ , possuindo somente  $\Delta^{5,7}$  e  $\Delta^7$ , assim como nos fungos (Coombs et al, 1991). Essa informação sugere que os esteróis  $\Delta^5$  são produzidos em amastigotas a partir do desmosterol, absorvidos de células do hospedeiro, macrófagos (Coombs et al, 1991). O mesmo esterol tem sido identificado em amastigotas de *L. braziliensis* (Holz et al. 1986).

As quantidades de esteróis predominantes diferem entre os tripanossomatídeos. A via de biossíntese de epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* foi elucidada de maneira similar a descrita para *Leishmania* spp., usando estrutura de esteróis conhecidas da biossíntese de fungos e estrutura de esteróis acumulados pela adição de inibidores. O modelo de biossíntese é diferente das etapas iniciais observadas em *Leishmania* spp.

como por exemplo metilação em 24 do lanosterol (**1**). A metilação em *Leishmania* spp. ocorre em uma etapa mais tardia. As formas epimastigotas de *T. cruzi* contêm ergosterol e ergosta-5,7-dieno-3 $\beta$ -ol que juntos, formam aproximadamente 40% do total de esteróis, e uma apreciável quantidade, aproximadamente 30%, de estigma-5,7-dieno-3 $\beta$ -ol (**16**) e 7-desidroporiferasterol (estigma-5,7,22-trieno-3 $\beta$ -ol, **17**) é observada nessa forma. Formas tripomastigotas de *T. cruzi*, de maneira similar a descrita para *L. mexicana*, são capazes de converter desmosterol do hospedeiro (Roberts et al, 2003).

Nas espécies de *Leishmania* o 7-desidroporiferasterol (**17**) é observado em pequenas quantidades, indicando que esse organismo tem uma capacidade limitada para reação de transmetilação secundária, no qual um precursor 24-metilado tal como, episterol (**10**) e desidroepisterol (**12**), é convertido em esteróis com o esqueleto estigmastano C-29. Esta reação é típica de algas e plantas superiores e é ausente em muitos fungos (Goad et al, 1984). As formas amastigotas de *T. cruzi* apresentam diferenças em relação as *Leishmania* spp. Formas amastigotas de *T. cruzi* aparentemente não produzem esteróis  $\Delta^{5,7}$  mas, ao invés contém episterol (ergosta-7,24(24<sup>1</sup>)-dieno-3 $\beta$ -ol, **10**), ergosta-7-eno-3 $\beta$ -ol e 24-etildinocolesta-7eno-3 $\beta$ -ol (**14**), indicando ausência de atividade da  $\Delta^5$  dessaturase (Roberts et al, 2003; Liendo et al. 1999). A via de biossíntese dos esteróis em *Leishmania* spp. e *T. cruzi* está representada na Figura 5. Estudos em células humanas têm indicado que as etapas iniciais da via de biossíntese ocorrem predominantemente nos peroxisomos (Kovacs et al. 2002; Kovacs & Krisans 2003; Kovacs et al. 2007), enquanto a principal localização de estágios iniciais em fungos é o retículo endoplasmático. A localização da via do mevalonato em tripanossomatídeos é pouco conhecida. A enzima HMG CoA redutase é uma enzima chave na biossíntese dos esteróis, de células de mamíferos, fungos e dos tripanossomatídeos e foi localizada na mitocôndria (Pena-Diaz et al. 2004). Outra enzima da biossíntese, o difosfato de farnesila sintase, que junto com outras enzimas é responsável pela síntese de isoprenóides, foi localizada no citosol em *L. major* (Ortiz-Gomez et al. 2006). Foi descrito também a caracterização e localização da  $\Delta^{24(25)}$  esterol metiltransferase (SMT) de *L. major*, que está envolvida em uma etapa mais tardia e única da biossíntese do ergosterol, sendo localizada no reticulo endoplasmático (Jimenez-Jimenez et al. 2008). A análise da localização da HMG CoA sintase e da mevalonato cinase (MVAC) em formas promastigotas de *L. major* e formas procíclicas e sanguíneas de *T. brucei* mostram que a biossíntese é distribuída em múltiplos compartimentos intracelulares. Em tripanossomatídeos a produção de HMG-CoA a

partir de acetil CoA e a geração de mevalonato ocorre principalmente na mitocôndria enquanto a fosforilação do mevalonato é quase exclusivamente localizada no glicosoma (Carrero-Lerida et al. 2009).



**Figura 5:** 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>)-

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:** colesta-7,24-dieno-3 $\beta$ -ol; **10:** episterol (ergosta-7,24(24<sup>1</sup>)-dieno-3 $\beta$ -ol); **11:** colesta-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-etilidinocolest-7eno-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). **HMG CoA:** 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A; **HMGR:** 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A redutase; **SEO:** esqualeno 2,3 epoxidase; **14DM;** C-14 desmetilase; **SMT:**  $\Delta^{24}$  esterol metiltransferase.

As fontes de carbono para a biossíntese dos esteróis nos tripanosomatídeos têm sido estudadas. O aminoácido leucina foi relatado como um precursor potencial na biossíntese de isoprenóides (Anastasis et al. 1985). A administração de leucina para formas promastigotas de *L. mexicana* é prontamente incorporada nos esteróis mostrando que este aminoácido é utilizado como principal fonte de carbono para a biossíntese de esteróis e pode ser encontrado em mais de 80% dos esteróis sintetizados (Ginger et al. 1996). várias espécies de *Leishmania* (Ginger et al. 1999).

### **1.6- Inibidores da biossíntese do ergosterol**

Uma vez que os tripanosomatídeos não sintetizam o colesterol e sim esteróis com o esqueleto ergostano (Roberts et al, 2003), fármacos que atuam na biossíntese do ergosterol possuem interessante atividade leishmanicida e tripanocida, inibindo diversas enzimas da via como, por exemplo, a HMG-CoA redutase, a esqualeno epoxidase, a C-14 desmetilase e a C-24 metiltransferase, que são inibidas pelas estatinas (sinvastatina, lovastatina), alilaminas (terbinafina), azóis (cetoconazol, miconazol, itraconazol, fluconazol e voriconazol) e azasteróis, respectivamente (Rodrigues et al. 2002, Haughan et al. 1992, Beach et al. 1988, Berman et al. 1984, Azofra et al. 2010).

A alilamina terbinafina é um potente inibidor da esqualeno-2,3-epoxidase e tem efeito em *Leishmania* spp. e *T. cruzi* (Vannier-santos et al. 1995, Vannier-santos et al, 1995, Urbina et al, 1997). O tratamento de promastigotas e amastigotas de *L. mexicana* com terbinafina resultou no acúmulo de 3 a 4 vezes de esqualeno e uma diminuição na quantidade de esteróis C29 e C28 endógenos (Roberts e cols, 2003). Foi demonstrada a atividade dessa molécula em *L. major* e *L. donovani* (Zakai & Zimmo, 2000). O efeito sobre o crescimento é atribuído pelo efeito na diminuição de esteróis das estruturas de membrana celulares e parece não estar relacionado ao excesso de esqualeno (Roberts et al, 2003).

Moléculas naturais têm mostrado excelente atividade leishmanicida como, por exemplo, as chalconas. A chalcona 2',6'-diidroxí-4'-metoxichalcona (DMC) possui potente atividade leishmanicida atuando na biossíntese e composição de esteróis de *Leishmania amazonensis* (Torres-Santos et al, 2009). Recentemente foi publicada a atividade leishmanicida da tomatidina, que promove a inibição da biossíntese de esteróis 24-alquilados e disfunção mitocondrial (Medina et al. 2012). Além disso, alguns esteróis como o pentalinosterol, um novo derivado de colesterol, e um novo esterol glicosilado isolado da raiz da *Pentalinon andrieuxii*, apresentaram atividade leishmanicida (Pan et al. 2012).

Os antifúngicos imidazólicos e triazólicos possuem uma alta atividade na inibição da biossíntese de esteróis e no crescimento de várias espécies de *Leishmania* (Ramos et al. 1994, Goad et al. 1985, Berman et al. 1986, Beach et al. 1988, Goad 1994) e *T. cruzi* (Beach et al. 1986, Liendo et al. 1999). Eles atuam na enzima do citocromo P450 C-14 desmetilase (CYP51), essencial na biossíntese de esteróis do fim da via, em promastigotas, amastigotas e epimastigotas, ocasionando a diminuição de esteróis C-28 e C-29 e acúmulo de vários esteróis metilados em 14 $\alpha$ . Novas isoformas de CYP51 foram encontradas em *Tripanosoma brucei*, *T. vivax*, *T. cruzi*, e *Leishmania spp.* Essas isoformas possuem 74-86% de identidade entre elas e de 22-33% com C-14 desmetilase de outros reinos biológicos. Há homologia também com a CYP51 de *Mycobacterium tuberculosis* (28%), tomate (28%) e humana (27%) (Lepesheva & Waterman, 2004).

O primeiro esterol da via de biossíntese que acumula após o tratamento com os azóis em promastigotas de *Leishmania spp.* é o dimetilzimosterol (**3**). No entanto, durante uma longa exposição, os esteróis podem ser metabolizados em esteróis alquilados (**4**) ou desmetilados no C-5 (**5**) para produzir finalmente um 4-desmetilesterol (**6**) (Roberts et al, 2003).

Amastigotas e promastigotas de *L. mexicana* em cultura, quando expostos ao cetoconazol, têm a biossíntese de seus esteróis normais majoritários, 5-desidroepisterol (**12**), ergosterol (**13**) e episterol (**10**) prejudicada e ocorre acúmulo de dimetilzimosterol (**3**) e obtusofoliol (**4**) (Berman et al. 1986, Goad et al. 1985). O efeito de itraconazol, cetoconazol e fluconazol sobre a biossíntese de esteróis de promastigotas de *L. aethiopica* e *L. donovani*, e subespécies de *L. mexicana* crescidas por longo período na presença de concentrações de azóis causam a diminuição dos esteróis majoritários e a

substituição desses por 14 $\alpha$ -metilesteróis endógenos e colesterol exógeno em grande quantidade (Beach et al. 1988).

A perturbação da biossíntese de esteróis pelo itraconazol e cetoconazol também foi analisada em amastigotas de *L. mexicana* demonstrando uma maior sensibilidade a essas moléculas do que macrófagos da linhagem J774 e demonstraram que a infecção com amastigotas resulta na inibição da síntese de colesterol da célula hospedeira. Foi observado também que as amastigotas tratadas apresentaram grande quantidade de colesterol exógeno, como observado em formas promastigotas (Hart et al, 1989).

Em epimastigotas e amastigotas de *T. cruzi* tratadas com os azóis, o acúmulo de 14 $\alpha$ -metilesteróis foi principalmente de lanosterol (**1**) e particularmente do produto de alquilação no C-24, o 24-metilenodesidrolanosterol (**2**). Além disso, em comparação com *Leishmania* spp. a quantidade total de esterol acumulado e a proporção de colesterol não diferem significativamente entre tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi* tratadas e não tratadas com cetoconazol, sugerindo alguma diferença no processo regulatório comparado com a situação da *Leishmania* spp. (Roberts et al, 2003). O tratamento com o miconazol causou a diminuição de esteróis  $\Delta^{5,7}$  de epimastigotas de *T. cruzi* (Coombs et al, 1991).

O miconazol e a lovastatina (inibidor da HMG CoA redutase) (Stancu & Sima, 2001), foram usadas em combinação para avaliar o potencial como agentes antileishmania. A combinação foi considerada sinérgica, inibindo promastigotas e amastigotas de *Leishmania* spp. Nas formas promastigotas o efeito foi maior em *L. amazonensis* do que em *L. donovani*. Análises da composição de esteróis de ambos promastigota e amastigota revelaram inibição da C-14 desmetilase pelo miconazol e mostraram evidências da inibição da biossíntese de esteróis pela lovastatina (Haughan et al. 1992) .

O efeito do azasterol, um inibidor da  $\Delta^{24}$ - esterol metiltransferase, que inibe a alquilação do C-24 foi estudado em *Leishmania* spp e *T. cruzi* (Gros et al, 2006; Haughan et al. 1995; Jimenez-Jimenez et al. 2008, Lorente et al. 2004,; Rodrigues et al. 2002). A atividade do azasterol mostrou um declínio de 24-alquil esteróis e acúmulo de colest-5,7,24-trieno-3 $\beta$ -ol (**11**) , colest-7,24-dieno-3 $\beta$ -ol (**9**) e colesterol (Fig. 5) e que os 24 alquil esteróis não são absolutamente necessários para a sobrevivência e crescimento da *Leishmania* spp. e sendo o parasito capaz de usar os esteróis endógenos acumulados e o colesterol captado do meio de cultura (Haughan et al, 1995).

Os inibidores da esqualeno sintase são utilizados como alvo para quimioterapia em *Leishmania* spp. e *T. cruzi* inibindo assim a formação do esqualeno e o seu crescimento (Granthon et al. 2007). Os experimentos com esses inibidores também demonstram um aumento na quantidade de colesterol, que pode ser uma tentativa de manter sua membrana e outras funções (Urbina et al, 2002, Braga et al, 2005, Lorente et al, 2005).

*Leishmania*, embora sintetize esteróis endogenamente, também obtém colesterol exógeno, como foi observado com a utilização dos vários inibidores da via de biossíntese de esteróis, através de receptor de membrana, em grande quantidade (Bastin et al. 1996), indicando que esse processo pode ser relevante para a sobrevivência do parasito em determinadas situações.

### **1.7- Colesterol no parasitismo intracelular**

Durante muito tempo, o colesterol foi tido apenas como um componente estrutural da membrana celular mas, atualmente, sabe-se que o colesterol desempenha papéis cruciais na organização, dinâmica e funcionalidade das membranas celulares, como a (i) estabilização de receptores transdutores de sinais (Lagane et al. 2000), (ii) modulação de receptores de acetilcolina (Baier et al. 2010, Borroni & Barrantes 2011), (iii) indução de alterações conformacionais em receptores de oxitocina e outras proteínas de membrana (Muth et al. 2011), (iv) liberação de vesículas sinápticas (Linetti et al. 2010), (v) modulação de canais iônicos (Bukiya et al. 2011) e está envolvido na entrada de microrganismos patogênicos intracelulares, como *Leishmania* (Simons & Toomre 2000, Pucadyil et al. 2004). Além dessas funções, o colesterol tem um importante papel na manutenção de fluidez de membrana, sendo essencial para a funcionalidade das células apresentadoras de antígenos (Mcgee et al. 2011, Trainor et al. 2011).

Em adição aos esteróis C-28 e C-29, *Leishmania* spp. e *T. cruzi* contêm quantidades variáveis de colesterol, que são derivados do meio de cultura ou da célula hospedeira. O cultivo de *Leishmania* spp. na presença de soro fetal bovino resulta no aumento do conteúdo de colesterol na membrana do parasito (Coombs et al, 1991). As formas sanguíneas de *T. brucei* diferem desses outros tripanossomatídeos, uma vez que contêm predominantemente colesterol e reprime a síntese *de novo* de esteróis C-28. O parasito, na forma sanguínea capta o colesterol do meio de cultura ou do sangue através de endocitose mediada pelo receptor de LDL (Coppens & Courtoy, 2000, Coppens &

Courtoy, 1995). No entanto, formas procíclicas podem realizar a biossíntese *de novo* apresentando o gene para uma enzima chave, 2,3-epóxido de esqualeno ciclase, que produz lanosterol (Roberts et al, 2003). Nos tripanossomatídeos, a captação de colesterol se dá, principalmente, através de um receptor de LDL, que é conservado em toda ordem Kinetoplastida, incluindo *Leishmania* spp. e *T. cruzi* (Bastin et al. 1996). Após a incorporação, a LDL é clivada por enzimas lisossomais, levando a liberação do colesterol. Esse sistema tem sido citado na literatura como um bom alvo farmacológico para a tripanossomíase africana ou doença do sono (Coppens et al. 1995).

Além das formas sanguíneas de *T. brucei* que dependem criticamente da presença de partículas de LDL, que contêm principalmente colesterol, para seu rápido crescimento e para manter suas fontes de lipídeos, podemos citar também o *Toxoplasma gondii*, pertencente ao filo Apicomplexa. Após a infecção por *T. gondii*, a célula hospedeira adquire um novo compartimento, o vacúolo parasitóforo (VP). Esse parasito é incapaz de sintetizar vários metabólitos, inclusive seus próprios esteróis, sendo considerados auxotróficos (Coppens et al, 2000). Eles trocam nutrientes através da membrana do vacúolo parasitóforo, com o objetivo de garantir sua sobrevivência e propagação (Sinai et al, 1997). A membrana do VP é bem próxima da mitocôndria e do retículo endoplasmático da célula do hospedeiro, onde é encontrada toda a maquinaria para a biossíntese de lipídeos do hospedeiro. A membrana do *T. gondii* é rica em colesterol, que intracelularmente é concentrado em organelas chamadas rhoptrias, que são organelas secretórias apicais. Esse colesterol é obtido tanto da biossíntese de colesterol da célula hospedeira, quanto da fonte de LDL que é captada por essa célula (Coppens & Courtoy, 2000; Sehgal et al. 2005). Corroborando esses dados de utilização do colesterol pelo *T. gondii*, um estudo mostrou que a infecção por esse parasito induz alterações no metabolismo lipídico da célula hospedeira (Milovanovic et al, 2008).

Vários microorganismos que residem e proliferam dentro de vacúolos no interior da célula hospedeira utilizam o colesterol para sua sobrevivência, como é o caso de algumas bactérias. *Helicobacter pylori*, por exemplo, capta colesterol do hospedeiro, contribuindo para sua virulência, patogenicidade e para a resistência a antibióticos e ao ambiente ácido do estômago. *Mycobacterium tuberculosis* usa o colesterol do hospedeiro como fonte de carbono durante a infecção e controla essa utilização através de fatores de transcrição, além de possuir uma via catabólica altamente conservada para metabolizar o colesterol. *Anaplasma phagocytophilum* utiliza o colesterol para a proliferação na célula hospedeira e a *Coxiella burnetii* necessita do colesterol para sua

replicação (Mcgee et al, 2011, Trainor et al, 2011, Kendall et al. 2010, Xiong et al, 2009, Howe & Heinzen 2006, Howe & Henzen, 2005).

Alterações lipídicas no plasma foram demonstradas em algumas doenças infecciosas e o colesterol em especial é estudado em muitas infecções parasitárias (Portugal et al. 2004). Especificamente na leishmaniose, de uma maneira global, duas abordagens de estudo são utilizadas: a correlação da homeostasia do colesterol sistêmico com a doença e a relação do colesterol da célula hospedeira com a infecção. A primeira abordagem é derivada de observações que pacientes com leishmaniose visceral apresentam hipocolesterolemia e a segunda da importância das "lipid rafts" para a entrada do parasito no macrófago e para a apresentação de antígenos. As duas abordagens se sobrepõem em alguns pontos, mas diferem essencialmente no fato de que os macrófagos *per se* não são responsáveis pela homeostasia de colesterol, papel desempenhado principalmente por hepatócitos.

Pacientes com leishmaniose visceral apresentam diminuição de LDL-colesterol do soro, levando a um processo de hipocolesterolemia, largamente evidenciado nessa forma da doença (Lal et al. 2007, Liberopoulos et al. 2012).

Ghosh e colaboradores mostraram que a hipercolesterolemia oferece proteção contra a infecção causada por *Leishmania donovani*, enquanto a hipocolesterolemia torna os camundongos mais susceptíveis à infecção pelo parasito (Ghosh et al, 2012). Recentes trabalhos mostraram que a hipocolesterolemia observada na infecção por *Leishmania donovani* é devido a liberação da metaloprotease GP63 pelo parasito infectando células de Kupffer no fígado, que cliva a *dicer* (Endonuclease RNase III) nos hepatócitos, reduzindo a expressão de miR122, levando a redução da produção de colesterol. miR122 é um regulador pós-transcricional (miRNAs), que é expresso abundantemente no fígado, modulando uma grande variedade de funções. Compreende mais do que 70% da quantidade de miRNA no fígado, sendo largamente responsável pela homeostasia e metabolismo lipídico. Esses eventos afetam a homeostasia do colesterol levando a isso a evolução da infecção, por conta de falhas na apresentação de antígenos (Ghosh et al, 2013; Descoteaux et al, 2013). O processo de transporte da GP63 do vacúolo parasitóforo das células de Kupffer até os hepatócitos e a própria expressão de GP63 por amastigotas ainda carece de esclarecimento. Corroborando esses dados, estudos anteriores demonstraram que lipoproteínas são capazes de modular a resposta imune celular na leishmaniose (Soares et al, 2010). Outros estudos mostram que macrófagos infectados com *Leishmania donovani* tem uma significativa diminuição do

colesterol de membrana, e que a administração de colesterol em hamsters infectados oferece uma forte proteção, mostrando a importância do colesterol na membrana do macrófago para a correta apresentação de antígeno e ativação do sistema imune (Sem et al, 2011; Banerjee et al, 2009).

Por outro lado, macrófagos infectados tem seu 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 et al, 2012; Foréa et al, 2009). Esse colesterol pode estar sendo utilizado de alguma forma pelo parasito, uma vez que já foi demonstrada a presença do colesterol em amastigotas (Hart et al. 1989, Berman et al. 1986). Promastigotas de *L. amazonensis*, sob pressão farmacológica de inibidores da biossíntese de esteróis, endocita mais LDL do meio de cultura e é mais sensível a esses inibidores quando privada de fontes exógenas de colesterol, mostrando um papel importante do colesterol na atividade dos inibidores da biossíntese do ergosterol (Andrade-Neto et al. 2011; de Cicco et al, 2012).

### **1.8- Captação do colesterol via receptor de Lipoproteína de baixa Densidade (LDL)**

O colesterol, ésteres de colesterol, triacilgliceróis e fosfolípidos são transportados de um tecido para outro pelo plasma sanguíneo na forma de lipoproteínas plasmáticas (Hoover-Plow & Huang, 2013). As lipoproteínas são complexos moleculares de proteínas transportadoras específicas chamadas de apolipoproteínas com combinações variadas de fosfolípidos, colesterol, ésteres do colesterol e triacilglicerídeos. As apoproteínas são divididas em cinco classes principais: Apo A, B, C, D e E e várias subclasses. A fração lipídica das lipoproteínas é muito variável, e permite a classificação das mesmas em 5 grupos, de acordo com suas densidades e mobilidade eletroforética:

- Quilomícron – é a lipoproteína menos densa, transportadora de triacilglicerol exógeno na corrente sanguínea.
- VLDL – “Lipoproteína de Densidade Muito Baixa”, transporta triacilglicerol endógeno.
- IDL – “Lipoproteína de Densidade Intermediária”, é formada na transformação de VLDL em LDL.

- LDL – “Lipoproteína de Densidade Baixa”, é a principal transportadora de colesterol; seus níveis aumentados no sangue aumentam o risco de infarto agudo do miocárdio.
- HDL – “Lipoproteína de Densidade Alta”, atua retirando o colesterol da circulação. Seus níveis aumentados no sangue estão associados a uma diminuição do risco de infarto agudo do miocárdio.

A lipoproteína de baixa densidade (LDL) é muito rica em colesterol e em ésteres de colesterol e contém a apoB-100 como sua principal apolipoproteína. A LDL transporta o colesterol para os tecidos periféricos, que possuem receptores de superfície específicos que reconhecem a apoB100 (receptores de LDL). A ligação de LDL em seu receptor inicia o processo de endocitose, para no final do processo o colesterol e ácidos graxos serem liberados. Os tripanossomatídeos também possuem receptor para LDL, que é conservado em toda ordem kinetoplastidae (Bastin et al, 1996), localizado na bolsa flagelar, e indica que o colesterol obtido por esse parasito seja proveniente da captação e metabolização da LDL.

### **1.9- Transporte intracelular do colesterol.**

A quantidade, distribuição e transporte de colesterol intracelular é fortemente regulado em células de mamíferos, para a manutenção da função celular. A distribuição do colesterol em diferentes compartimentos subcelulares é mantida por uma combinação de transporte mediado por vesículas e de proteínas que transferem substâncias para o citoplasma ou para dentro das organelas. Podemos citar algumas proteínas ABC (ATP-binding cassette) e proteínas intracelulares que atuam no transporte de colesterol intracelular e extracelular (Tarling et al, 2013; Tarling & Edwards, 2011; Elizabeth et al, 2005; Storch et al, 2009).

A superfamília de proteínas ABC é composta por proteínas que combinam a hidrólise de ATP com várias funções biológicas. Essas proteínas estão envolvidas no transporte de inúmeras moléculas através de membranas biológicas, incluindo aminoácidos, açúcares, peptídeos, lipídeos, íons e fármacos. Nos eucariotos essas proteínas estão principalmente relacionadas à exportação de moléculas do citoplasma para o espaço extracelular ou para compartimentos intracelulares. Muitas proteínas ABC estão envolvidas no transporte de fosfolipídeos e colesterol, como por exemplo, as proteínas da subfamília ABCG e ABCA (Leprohon et al. 2006).

Um número considerável de proteínas ABC foi encontrado no genoma dos parasitos da família Trypanosomatidae (Campos-Salinas et al. 2013). As funções dessas

proteínas compreendem, transporte e translocação de fosfolípidos, transporte de heme e resistência. (Campos-Salinas et al. 2013, Parodi-Talice et al. 2003, Araujo-Santos et al. 2005).

Os transportadores ABC em *Leishmania* foram descritos inicialmente através do estudo de mecanismo de resistência aos fármacos. O primeiro transportador ABC identificado em *Leishmania* foi o MRPA (PGPA), um membro da subfamília ABCC, que confere resistência ao antimônio. As proteínas ABC podem transportar além dos antimoniais pentavalentes, miltefosina, pentamidina e sitamaquina. O genoma da *Leishmania* contém cerca de 40 - 50 genes ABC, representando um número grande de subfamílias (de ABCA a ABCH). Os transportadores ABCG4 e ABCG6, localizados na membrana plasmática e bolsa flagelar, ABCA2 e ABCA4, localizados na bolsa flagelar e em vesículas internas do parasito têm sido caracterizados como transportadores de fosfolípidos em *Leishmania* (Campos-Salinas et al. 2013, Leprohon et al. 2011, Leprohon et al. 2009).

Além das proteínas ABC, outras proteínas também estão envolvidas com o transporte de colesterol em células de mamíferos. Essas proteínas intracelulares são importantes para exportar o colesterol de organelas endocíticas. A perda de função dessas proteínas causa o sequestro de colesterol derivado de LDL e de outros lipídeos nessa organelas, levando a uma desordem neurodegenerativa progressiva. Além dessas proteínas intracelulares, foi descrita uma proteína presente na membrana de enterócitos tendo um papel importante no transporte de colesterol intestinal. Essas três proteínas possuem um domínio chamado de “sterol-sensing domain” SSD que é comum para proteínas que tem o papel de regular a homeostasia do colesterol (Storch et al, 2009).

O transporte intracelular de colesterol pode ser bloqueado e modulado usando alguns inibidores. Podemos citar a progesterona e a imipramina que são usadas para inibir o transporte de colesterol derivado da LDL dos lisossomos para o restante da célula (Butler et al. 1992, Howe & Heinzen, 2006, Howe & Henzen, 2005, Nishikawa et al. 2011, Nishikawa et al. 2005). A captação de LDL é mediada via receptor e posteriormente seguida pela transferência da LDL para os lisossomos. A hidrólise lisossomal dos ésteres de colesterol libera colesterol, que então é distribuído por toda célula. A imipramina reduz a atividade lisossomal e causa grande acúmulo de colesterol nos lisossomos, inibindo o movimento do colesterol dos lisossomos para a membrana plasmática (Howe & Henzen, 2005).

A progesterona mostrou induzir o acúmulo reversível de colesterol nos lisossomos de fibroblastos durante o processamento endocítico da LDL. Além de ser capaz de bloquear o transporte do colesterol proveniente da endocitose de LDL dos lisossomos, a progesterona também atua em outras fontes de colesterol intracelular (Butler et al. 1992). Na presença de progesterona, grandes quantidades de colesterol derivado da LDL acumulam nos lisossomos (Mcgookey & Anderson 1983).

O tratamento com os inibidores do metabolismo de colesterol na infecção por *Coxiella burnetti* em muitos casos altera a morfologia do vacúolo parasitóforo (VP) e reduzem, mas não eliminam, o transporte de colesterol para a membrana do VP, com uma redução no conteúdo de colesterol do VP. Essa alteração e redução no conteúdo de colesterol do vacúolo parasitóforo é diretamente proporcional a redução da replicação da bactéria (Howe & Heinzen, 2006; Howe & Henzen, 2005).

### **1.10- Amplificação gênica como mecanismo de resistência em *Leishmania***

O fenômeno da resistência aos fármacos vem aumentando de forma significativa em todas as doenças parasitárias, transformando-se em um sério problema de saúde pública. O estudo do mecanismo de resistência é importante porque permite o desenvolvimento de ferramentas para o diagnóstico diferencial de resistência, prevenindo assim o tratamento inútil e frequentemente tóxico, permitindo o uso de forma mais racional dos fármacos e associações, minimizando o desenvolvimento de resistência (Myler, 2008).

Os antimoniais têm sido usados há 60 anos para o tratamento da leishmaniose em áreas endêmicas e com relatos de casos de resistência (Sereno et al, 2012, Mandal et al. 2010, Mittal et al, 2007, Kumar et al. 2012; Anacleto et al, 2003). Para permanecer com a sua atividade leishmanicida normal, a concentração e a duração do tratamento foram aumentados durante os anos, sugerindo que o parasito lentamente desenvolve aneuploidias levando a diminuição da susceptibilidade ao fármaco. Outros fatores podem estar relacionados com a perda da eficácia, como a baixa resposta do sistema imune (Mandal et al, 2009). A elucidação dos mecanismos moleculares na resistência ao antimônio é essencial para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento. Muitos estudos de resistência aos antimoniais foram realizados em promastigotas de *Leishmania* em que a resistência foi induzida *in vitro* sob condições de laboratório. Muito do conhecimento sobre mecanismos de resistência para outras moléculas anti-*Leishmania* é também derivado de parasitos em que a resistência foi induzida *in vitro*,

principalmente na forma de promastigota (Singh et al, 2001) (Mukherjee et al, 2013; Dadhich et al, 2009, Mukherjee et al. 2011, Coelho et al, 2012, do Monte-Neto et al. 2011). O estudo de resistência *in vitro* também vem sendo realizado em amastigotas axênicas. Kumar e colaboradores (2013) avaliaram a modulação gênica e os mecanismos moleculares relacionados a resistência ao nelfinavir.

Um dos métodos utilizados para entender melhor os mecanismos de resistência é a abordagem do sequenciamento total do DNA. Amplificação de DNAs podem ser encontradas tanto como DNAs circulares ou linear (*amplicons*). Podemos visualizar os *amplicons* circulares de *Leishmania* usando a técnica de lise alcalina usada para preparar plasmídeos de bactérias, enquanto o *amplicon* linear pode ser visualizado e isolado por eletroforese de campo pulsátil (PFGE). Mas círculos também podem ser identificados por PFGE/CHEF (Grondin et al. 1998).

Podemos citar alguns exemplos de amplificação gênica detectados em parasitos resistentes, como a região do cromossomo 9 de *L. major* que foi encontrada amplificada em isolados resistentes a antimônio, o gene diidrofolato redutase-timidilato sintase (DHFR-TS) e o gene pteridina redutase (PTR1) nos parasitos resistentes ao metotrexato (Singh et al. 2003, Beverley et al. 1986, Kundig et al. 1999). O gene de MRPA (proteína ABC) de *Leishmania*, um gene bem estabelecido como participante da resistência ao antimônio, foi encontrado amplificado em vários isolados de *L. donovani* em pacientes que não respondem ao tratamento. A presença de fragmentos amplificados de DNA associado ao fenótipo de resistência é sugestiva de implicação na resistência, embora necessite provar com superexpressão ou inativação do gene (Legare et al. 2001, Legare et al. 2001, Leprohon et al. 2011, El Fadili et al. 2005, Mukherjee et al. 2007).

Antes do genoma de *Leishmania* ser totalmente sequenciado, era necessário isolar o *amplicon*, subclonar fragmentos de DNA relativamente grandes em vetor de expressão, transfectar esse plasmídeo e observar se os parasitos transfectados tornavam-se resistentes (Papadopoulou et al. 1992). Uma vez que o genoma de várias espécies de *Leishmania* foi totalmente sequenciado ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)), é possível agora determinar qual porção do genoma está amplificada. Transfecção do gene candidato e testes de susceptibilidade tem que ser realizados para correlacionar o referido gene a resistência (Myler, 2008).

Vale ressaltar que embora o mecanismo de resistência seja frequentemente devido a amplificação gênica, há vários exemplos em que parasitos resistentes modulam RNAs específicos (aumentam ou diminuem) sem que tenha alguma alteração no número

de cópias do gene. Alterações na expressão do RNA nem sempre estão correlacionadas com aumento nos níveis de proteína, mas existe uma boa correlação entre aumento nos níveis de proteína e superexpressão do RNA (McNicoll et al. 2006).

## 2- Objetivos

### Objetivo geral

Avaliar o papel do colesterol exógeno nos mecanismos de adaptação de *Leishmania* spp a condições de estresse farmacológico e metabólico.

### Objetivos específicos

- 1- Estudar a disponibilidade de LDL por amastigotas intracelulares;
- 2- Estudar a influência do colesterol na atividade dos inibidores da biossíntese do ergosterol e na expressão da HMGCoA redutase;
- 3- Estudar a correlação entre o crescimento parasitário em macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis* com a disponibilidade de colesterol exógeno, com ou sem pressão farmacológica.
- 4- Investigar o sinergismo da associação de inibidores do transporte intracelular de colesterol com inibidores da biossíntese de esteróis sobre a viabilidade de *L. amazonensis* *in vitro* e *in vivo*.
- 5- Avaliar o papel do colesterol na resistência aos inibidores da biossíntese de esteróis em *L. amazonensis* e *L. braziliensis*;
- 6- Analisar a expressão das principais enzimas da via de biossíntese de esteróis nas cepas selvagens e resistentes;
- 7- Identificar aneuploidia em *L. guyanensis* resistentes à sinvastatina;

## **3- METODOLOGIA**

### 3.1- Manutenção e cultivo dos parasitos

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (cepa MHOM/BR/77/LTB 0016), *Leishmania amazonensis* GFP (cepa MHOM/BR/77/Josefa) e *Leishmania guyanensis* (cepa MHOM/BR/75/M4147) e *Leishmania braziliensis* (cepa MHOM/BR/77/M2904) foram mantidas a 26 ° C em meio RPMI ou “Minimum Essential Medium”-  $\alpha$ -MEM (Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA) suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100  $\mu$ g/mL de estreptomicina, e 100 U/mL de penicilina, 5 mg/mL de hemina, 0,5 mg/mL de ácido fólico, 0,2 mg/mL de D-biotina, 4mg/mL de adenina. Para manutenção dos parasitos foram feitos repiques duas vezes por semana até a décima passagem. Os parasitos foram obtidos de lesão de camundongos BALB/c.

### 3.2- Purificação da Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL).

O plasma sanguíneo foi gentilmente cedido pelo Banco de Sangue do Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), através do acordo n.º 171/07, firmado entre o comitê de Ética em Pesquisa do hospital e o Laboratório de Bioquímica de Lipídeos, Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ. Desta forma, esta parte do trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Bioquímica de Lipídeos, do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ, sob orientação da Profa. Georgia Correa Atella.

A purificação da LDL foi feita de acordo como descrito por Poumay & Ronveaux, 1985 com algumas modificações. Cerca de 15 mL de plasma foram descongelados e foi adicionado brometo de potássio (KBr) com a finalidade de ajustar sua densidade para 1,3 g/ml. Após o ajuste da densidade, 25 mL de solução salina (NaCl 150 mM) suplementado com 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético dissódico (EDTA) foi adicionado nos tubos de centrífuga próprios para o rotor vertical 50vTi (Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA, USA) e com a ajuda de uma seringa de vidro e agulha longa de metal, os 15 mL de soro foram depositados no fundo do tubo, formando duas fases.

Os tubos foram centrifugados em ultracentrífuga Beckman Optima LE 80K a 150,000g rpm por 18 h. Ao final a fração superior do gradiente, de cor laranja, contendo as partículas LDL, foi coletada, mantida a 4 °C e dialisadas, segundo Penefsky (1977), antes de sua utilização nos ensaios experimentais. A concentração de proteína da fração

enriquecida em LDL foi quantificada usando o método descrito por Lowry e colaboradores (1951), modificado, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,5%.

### **3.3- Complexação das partículas de LDL com nanopartículas de ouro coloidal.**

Inicialmente uma solução de nanopartículas de ouro coloidal (15nm) foi preparada através da redução de uma solução aquosa de ácido tetracloroáurico (HAuCl<sub>4</sub>), utilizando duas soluções, uma de citrato de sódio 1% e a outra de ácido tetracloroáurico 1%, preparadas em água desionizada, filtrada, para um volume final de 240 ml. Após aquecer 232,5 ml de água desionizada por 5 minutos, foram acrescentados 15 ml de citrato de sódio 1% e agitando e fervendo por cerca de 2 minutos. Após esse período, foi aumentada a agitação e 2,5 mL da solução de ácido tetracloroáurico 1% foram adicionados com a ajuda de uma seringa, sob fervura e agitação por aproximadamente 5 minutos. Após o preparo, a solução de ouro foi armazenada à 4°C.

Para a determinação do *gold number* (proporção ideal entre a concentração de proteínas e ouro coloidal, para ocorrer a complexação), o pH da solução de ouro coloidal foi ajustado em 5,5 e a concentração da solução de LDL ajustada a 1 mg/ml. O *gold number* foi determinado pelo método prático, por diluição seriada em placa, segundo metodologia adaptada de (Hayt et al, 1989). A complexação foi realizada, então, com a proporção de 31,25 µg de proteína da solução de LDL em 10 ml da solução de ouro coloidal. A mistura da LDL com ouro coloidal foi agitada por 3 minutos e acrescentada de 1 ml de polietilenoglicol 1%, seguida de nova agitação. A solução foi, então, centrifugada a 50.000g por 45 minutos. O sobrenadante foi retirado e o pellet ressuspenso em 1 ml de polietilenoglicol (PEG) 20.000 a 0,2mg/ml em PBS, pH 7,2, originando a suspensão utilizada nos experimentos de microscopia eletrônica de transmissão.

### **3.4- Microscopia Confocal**

Para os experimentos de microscopia confocal, macrófagos peritoneais de camundongos suíços (1,0 x 10<sup>6</sup>/ml) foram plaqueados e aderidos em lab-teks por um período de 1 hora e infectados com 3,0 x 10<sup>6</sup>/ml promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* (cepa MHOM/BR/77/Josefa) transfectadas com *Green Fluorescent Protein* (GFP) em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino por 72 horas a 37 °C (Costa et al, 2011). Os macrófagos foram lavados e incubados com meio sem soro 24 horas antes da incubação com a lipoproteína de baixa densidade (LDL)

marcada com Alexa Fluor®594 AcLDL (Invitrogen, Life Technologies Corporation), apolipoproteína B marcada em vermelho. Os macrófagos infectados foram incubados por 30 minutos ou 2 horas e 30 minutos nas concentrações de 0,125 e 0,5 µg/ml e por 30 minutos na concentração de 20 µg/ml. Após esse período as células foram lavadas 3 vezes em PBS, fixadas com paraformaldeído 4% por 10 min e incubadas com DAPI, para marcar o núcleo das células, por 20 min. As lâminas foram montadas utilizando o líquido de montagem Prolong® Gold Antifade (Invitrogen, Life Technologies Corporation) e observadas no microscópio confocal.

### 3.5- Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para os experimentos de microscopia eletrônica de transmissão, macrófagos peritoneais de camundongos suíços ( $1,0 \times 10^6$ /ml) foram plaqueados e aderidos em placas de petri pequenas por um período de 1 hora e infectados com  $3,0 \times 10^6$ /ml promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* (cepa MHOM/BR/77/LTB0016) por 3 horas. Após esse período as placas foram lavadas com meio sem soro e incubadas por 72 horas a 37°C. No período de 48 horas foi adicionado meio RPMI sem soro, com o objetivo de aumentar a expressão dos receptores de LDL e evitar a competição com as partículas do soro. A LDL marcada com ouro coloidal, na diluição de 1:10, foi incubada 4 horas antes de terminar o período de incubação final. Após esse período, os macrófagos infectados e não infectados foram lavados com PBS e fixados por 40 minutos na solução de 2,5% de glutaraldeído, diluído no tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4. As células foram lavadas 3 vezes com o mesmo tampão. A pós-fixação foi feita com 1% de tetróxido de ósmio em tampão cacodilato de sódio 0,2 M, contendo 0,8% de ferrocianeto de potássio e 5 mM de cloreto de sódio, por 20 minutos. Após esse período as células foram lavadas 3 vezes com cacodilato de sódio 0,1 M. Subsequentemente as células foram desidratadas em uma série crescente de acetona, 30 %, 50 %, 70 % e 100 %, por 5 minutos cada e incubadas a 4 °C. Na concentração de 70% de acetona as células foram removidas das placas. Após a desidratação, as células foram embebidas em Epon (Ennes-Vidal, 2011). Secções ultrafinas foram coletadas, marcadas com acetato de uranila e analisadas no microscópio eletrônico de transmissão CEM-900 (Oberkochen, Alemanha).

### **3.6- Deslipidação do soro fetal bovino**

Para avaliar o efeito da privação do colesterol no crescimento da *Leishmania* spp., com ou sem pressão de fármacos inibidores da biossíntese do ergosterol, soro fetal bovino (cultilab) foi deslipidado, utilizando uma combinação de dois solventes, butanol e éter diisopropílico (DIPE).

A extração dos lipídeos foi feita em temperatura ambiente em tubos de 15 mL. Alíquotas de 5 ml de soro contendo 0,5 mg de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), com 10 mL de fase orgânica consistindo de butanol-DIPE (40:60 v/v) (Tedia Brazil) foram colocados no tubo nesta ordem. Os tubos foram presos em orbital, com rotação de 30 rpm, por 30 minutos. Após a extração, a mistura foi centrifugada a 2000 rpm/2min para separação das fases orgânica e aquosa. A fase aquosa, que contém o soro, foi separada da fase orgânica, com cuidadosa sucção utilizando uma seringa, e então submetida à análise de seus lipídeos por TLC e dosagem do colesterol por Amplex Red (Invitrogen), um teste colorimétrico (Cham & Knowles, 1976). O soro fetal bovino deslipidado (SFBd) foi, esterilizado por filtração em membrana Millex- GV de 0,22µm (Milipore S.A., Molsheim, França). Esta parte do trabalho foi desenvolvida em colaboração com o Laboratório de Bioquímica de Lipídeos, do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ, sob orientação da Profa. Georgia Correa Atella.

### **3.7- Ensaio sobre amastigotas intracelulares com ou sem fonte de colesterol exógeno.**

Para estudar a influência da fonte de colesterol exógeno no crescimento de amastigotas intracelulares, macrófagos peritoneais murinos (MΦ) ( $1,0 \times 10^6$  células/ml) (Os experimentos foram realizados em lâminas, câmaras lab-teks (Thermo Scientific Nunc) foram infectados com  $3 \times 10^6$  promastigotas/ml de *L. amazonensis* (cepa MHOM/BR/77/LTB 0016), e cultivados em meio RPMI (Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino completo ou deslipidado., na ausência ou presença de miconazol, cetoconazol (0-8 µM), sinvastatina (0-40 µM) ou 25-OH-colesterol (0-40 µM) por um período de incubação de 72 horas. Após o tempo de incubação, as lâminas foram coradas com panótipo rápido e o índice de infecção foi determinado por contagem de amastigotas intracelulares em microscópio óptico. O índice de infecção foi calculado por meio da fórmula: % MØ infectados x N° de amastigotas/ N° MØ totais.

### 3.8- Ensaios de associação de fármacos.

Promastigotas e macrófagos peritoneais infectados ou não com *L. amazonensis* foram incubados com os inibidores da biossíntese do ergosterol ou inibidores do transporte do colesterol individualmente ou em associação por 72 horas. O crescimento parasitário de promastigotas e a viabilidade dos macrófagos foram avaliados por Sal de Tratazólíio (MTT) e o índice de infecção foi determinado por microscopia óptica.

Para avaliar a atividade dos inibidores da biossíntese do ergosterol associados com os inibidores do transporte do colesterol, promastigotas de *L. amazonensis* foram mantidos em frascos para cultivo celular a 26°C em meio RPMI sem vermelho de fenol (Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA) suplementado como descrito no item 3.1, com 10% de soro fetal bovino. As células foram monitoradas microscopicamente e os experimentos foram realizados com um mesmo número de passagens.

Os testes em promastigotas foram realizados em placa de 96 poços, com uma concentração inicial de  $1,0 \times 10^6$  promastigotas/ml e com as concentrações das moléculas variando de 0 a 24  $\mu\text{M}$  para cetoconazol e miconazol, de 0 a 100  $\mu\text{M}$  para terbinafina (inibidores da biossíntese do ergosterol), de 0 a 100  $\mu\text{M}$  para LBqT01, de 0 a 25  $\mu\text{M}$  para imipramina e de 0 a 100  $\mu\text{M}$  para progesterona (inibidores do transporte do colesterol), (Sigma-Aldrich). Para os experimentos de associação, as concentrações dos inibidores da utilização do colesterol variaram de 0-10  $\mu\text{M}$  para LBqT01, de 0-5  $\mu\text{M}$  para imipramina e de 0-25  $\mu\text{M}$  para progesterona. A placa de 96 poços foi incubada a 26°C por 72 horas. Após esse período o crescimento parasitário foi avaliado por ensaio colorimétrico MTT. Foram adicionados 10% de MTT (5 mg/mL) por poço e a placa foi incubada a 37°C por 1 hora. Após esse período, foram acrescentados 80  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO-100%), para dissolver os cristais de formazan. A reação foi analisada no espectrofotômetro no comprimento de 570 nm. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  foram obtidos por regressão não linear no programa Graphpad Prism 4 (Graphpad software, Inc, La Jolla, USA). Nos experimentos de associação foi calculado o índice da concentração inibitória fracional (FICI) para análise do sinergismo. A fórmula utilizada para calcular o FICI foi a seguinte  $\text{FICI} = \text{IC}_{50} \text{ de A em combinação} / \text{IC}_{50} \text{ de A sozinha} + \text{IC}_{50} \text{ de B em combinação} / \text{IC}_{50} \text{ de B sozinha}$  (Hallander et al, 1982). A interpretação dos resultados de FICI, segundo as diretrizes publicadas por são:  $\text{FICI} < 0,5$  – sinergismo;  $0,5 < \text{FICI} < 4$  - sem interação;  $\text{FICI} \geq 4$  – antagonismo (Odds e cols, 2003).

Para os experimentos de atividade em amastigotas intracelulares, macrófagos peritoneais foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis*, na presença ou ausência dos inibidores, associados ou não, em câmaras Lab-teks, a 37°C por 72 horas. As concentrações das moléculas variaram de 0 a 32 µM para cetoconazol, de 0 a 16 µM para miconazol, de 0 a 80 µM para terbinafina, de 0 a 40 µM para LBqT01, de 0 a 25 µM para imipramina e de 0 a 100 µM para progesterona. Para os testes de associação com os inibidores da utilização do colesterol foi usada somente uma concentração de cada inibidor. As concentrações utilizadas foram de 20 µM, 12,5 µM e 25 µM de LBqT01, imipramina e progesterona, respectivamente. Testes de toxicidade em macrófagos peritoneais não infectados também foram realizados nas mesmas concentrações por 72 horas a 37 °C. Após esse período, as células foram incubadas com 10% de MTT por 1 hora a 37 °C. O sobrenadante foi retirado e foram adicionados 200 µl de DMSO (100%), para dissolver os cristais de formazan. A absorbância foi lida em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 570 nm.

### **3.9- Extração dos lipídeos**

Os lipídeos de promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* selvagens e resistentes foram extraídos usando o método de Bligh e Dyer (1959). Foram adicionados as amostras metanol, clorofórmio e água (2:1:0,5 v/v). Após agitação da mistura de 5 em 5 minutos por 1 hora, a solução foi centrifugada por 20 min a 3.000 rpm e o sobrenadante, contendo os lipídeos, foi separado do precipitado. O precipitado foi submetido a uma segunda extração, tendo sido adicionado da mesma mistura de solventes descrita acima, seguindo-se agitação de 5 em 5 minutos por 1 hora, e nova centrifugação. Os sobrenadantes foram unificados e a eles adicionados água destilada e clorofórmio (1:1 v/v). Após 40 segundos de agitação, o material foi novamente centrifugado (3.000 rpm/30 min). A fase inferior (orgânica), contendo os lipídeos, foi então separada com o auxílio de seringa de vidro e transferida para tubos de 1,5 ml, resistentes a solventes orgânicos (Axygen Scientific Inc., Union city, CA, USA). O solvente foi evaporado por arraste de nitrogênio gasoso (N<sub>2</sub>) e os lipídeos analisados por cromatografia em camada fina (CCF/TLC) ou por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/EM), conforme descrito a seguir.

### **3.10- Análise dos lipídeos neutros de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* por Cromatografia em Camada Fina (CCF/TLC).**

Promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* selvagens ou resistentes aos inibidores da biossíntese do ergosterol (sinvastatina, terbinafina e miconazol) em meio suplementado com 10% de soro fetal bovino e promastigotas de *L. amazonensis* cultivados sem fonte de colesterol exógeno, substituindo o soro fetal bovino pelo Nutridoma-SP (suplemento para meio de cultura livre de soro fetal bovino) (Roche), foram incubados em frascos de cultura celular a 26 °C por 72 h. Após esse período as células foram lavadas 3x com PBS e os lipídeos foram extraídos conforme descrito acima.

Os lipídeos extraídos foram analisados por cromatografia em camada fina (TLC) em placa de sílica (Silica Gel, 60F<sub>254</sub>, Merck KGaA, Frankfurt, DS, Alemanha) após ressuspensão em 50 µl de clorofórmio. A placa cromatográfica foi previamente impregnada com nitrato de prata (1%) em metanol, com o objetivo de separar o colesterol do ergosterol que possuem estruturas extremamente semelhantes, uma vez que o nitrato de prata separa com grande eficiência compostos com ligações duplas de carbono. Foram utilizadas duas corridas com uma combinação diferente de solventes. A primeira corrida foi feita até a metade da placa utilizando a seguinte mistura de solventes: hexano:éter etílico:ácido acético (60:40:1 v/v) e a segunda corrida foi feita com hexano:clorofórmio:ácido acético (80:20:1 v/v). As placas foram, então, borrifadas com reagente de *Charring* (10% CuSO<sub>4</sub> + 8% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e aquecidas a 200° para revelação (Andrade-neto et al, 2011). O colesterol e o ergosterol foram identificados através de comparação com padrões comerciais com concentrações de 1mg/ml (Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA). A placa de TLC foi submetida a análise por densitometria. A imagem da TLC foi digitalizada e analisada pelo programa “ImageMaster TotalLab v1.11”. (UA – Unidades arbitrárias).

### **3.11- Análise do perfil de esteróis por Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de massas (GC/MS).**

Promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas na ausência ou na presença de 10, 20 e 40 µM de LBqT01 ou progesterona, com 2, 4 e 8 µM de miconazol ou cetoconazol e com 8, 16 e 32 µM de terbinafina ou somente meio de cultura por 72 horas. 1x10<sup>8</sup> parasitos de cada cultura foram lavados 3 vezes em tampão PBS e os esteróis foram extraídos como descrito no item 3.9. Para a separação e identificação dos

esteróis foi utilizado a cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/MS). As amostras foram injetadas no equipamento GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu Scientific Instruments, Tóquio, Japão). Após a injeção, a temperatura da coluna foi mantida a 50 °C por 1 minuto e então aumentada a 270 °C na razão de 10 °C/min e finalmente a 300°C na razão de 1 °C/min. O fluxo do gás (He) foi mantido constante a 1.1 mL/min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250°C e 280 °C, respectivamente (Torres-Santos et al, 2009).

### **3.12- Indução de resistência aos inibidores da biossíntese do ergosterol**

Promastigotas de *L. amazonensis* (cepa MHOM/BR/77/LTB 0016), *L. braziliensis* (cepa MHOM/BR/77/M2904) e *L. guyanensis* (cepa MHOM/BR/77/M4147) foram cultivados em meio  $\alpha$ -Mem adicionado de concentrações crescentes de sinvastatina, terbinafina ou miconazol, começando com a concentração de IC<sub>50</sub> de cada molécula, estabelecido como descrito no item 3.8. A indução de resistência das cepas selvagens de *L. amazonensis* iniciou com os valores de IC<sub>50</sub> de 24  $\mu$ M, 16  $\mu$ M e 2,5  $\mu$ M da sinvastatina, terbinafina e miconazol, respectivamente. As concentrações foram aumentadas sequencialmente duas vezes até a concentração de 100  $\mu$ M, 100  $\mu$ M e 16  $\mu$ M, para sinvastatina, terbinafina e miconazol, respectivamente. As células foram monitoradas e as passagens foram feitas com um inóculo inicial de  $1 \times 10^6$  promastigotas/mL. Para a indução de resistência das cepas selvagens de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* foi utilizado o mesmo procedimento. A indução da cepa selvagem de *L. braziliensis* iniciou com o valor de IC<sub>50</sub> de 9  $\mu$ M de terbinafina e da cepa selvagem de *L. guyanensis* iniciou com a concentração de IC<sub>50</sub> de 30  $\mu$ M e 1,9  $\mu$ M de sinvastatina e miconazol, respectivamente. As concentrações foram aumentadas sequencialmente duas vezes até a concentração de 60  $\mu$ M para terbinafina na cepa de *L. braziliensis* e até a concentração de 80  $\mu$ M e 12  $\mu$ M de sinvastatina e miconazol, respectivamente na cepa de *L. guyanensis*.

### **3.13- Análise da expressão gênica de enzimas da biossíntese do ergosterol em promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* por PCR quantitativo.**

Para análise da expressão gênica das enzimas da via de biossíntese do ergosterol por PCR quantitativo (tempo real) foram utilizados as cepas de *L. amazonensis* e de *L.*

*braziliensis* selvagens e resistentes aos inibidores. A expressão das enzimas também foi avaliada em promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas sem fonte de colesterol ou cultivadas com 80% de soro fetal bovino.

O RNA foi extraído de aproximadamente  $1 \times 10^7$  promastigotas em fase logarítmica de crescimento utilizando o kit RNeasy Plus (Qiagen Sciences, Maryland, USA). Para a extração de RNA, as células foram lavadas 2 vezes com tampão hepes-NaCl e ressuspensas com 600  $\mu$ l do tampão RLT e homogeneizadas por 30 segundos no vortex. O lisado homogeneizado foi transferido para uma coluna em um tubo coletor para eliminação do DNA e centrifugado por 30 segundos a 10.000 rpm. Após a centrifugação, a coluna foi desprezada e no tubo coletor foram adicionados 600  $\mu$ l de etanol 70%. Em seguida, 700  $\mu$ l foram transferidos para uma coluna de RNA acoplada em um tubo de 2 ml e centrifugado a 10.000 rpm por 15 segundos. Na coluna foram adicionados 700  $\mu$ l do tampão RW1 para centrifugação a 8000xg por 15 segundos. 500  $\mu$ l do tampão RPE foram adicionados duas vezes, com centrifugação por 8000xg por 15 segundos e por 1 minuto, para eliminar qualquer vestígio de álcool do tampão RPE. O RNA foi ressuspensado com 50  $\mu$ l de água livre de nuclease. A dosagem do RNA foi realizada usando o equipamento NanoDrop Lite (Thermo Scientific). A síntese de DNA complementar foi realizada através do kit Superscript Indirect cDNA Labeling (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), conforme o manual do fabricante. Para cada síntese foram utilizados 5  $\mu$ g de RNA (625ng/ $\mu$ l).

Para os experimentos de PCR em tempo real foi usado o SYBR® Supermix Green (Bio- Rad, Hercules, CA, USA). O PCR em tempo real foi feito usando o termociclador Rotor-Gene (RG 3000, Corbett Research, San Francisco, USA). Quantidades iguais de cDNA foram colocadas em triplicata e amplificadas em 25  $\mu$ L de reação contendo SYBR® Supermix Green (50%), 1  $\mu$ L do iniciador reverso (10mM), 1  $\mu$ L do iniciador direto (10 mM), 1  $\mu$ L de cDNA e 9,5  $\mu$ L de água livre de nuclease. Inicialmente no termociclador, a mistura foi incubada a 95 °C por 5 min e então 30 ciclos de 95, 60 e 72 °C por 15 segundos. Três triplicatas e replicatas biológicas foram utilizadas em cada reação. A quantidade relativa dos produtos gerados do PCR de cada conjunto de iniciador foi baseado no valor de (threshold cycle) (Ct) (calculado usando o método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  com o GAPDH como controle endógeno (do Monte-Neto et al. 2011). Os níveis de expressão gênica foram normalizados através da análise da expressão mRNA

constitutivo, do gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH, código de acesso: *LbrM30.2950*, *LmxM29.2980*).

Os iniciadores para os genes HMGC<sub>o</sub>A redutase ( código de acesso: *LbrM30.3180*, *LmxM29.3190*), farnesiltransferase (código de acesso: *LmxM30.2940*), esqualeno sintase (código de acesso: *LbrM31.3310*), esqualeno monooxigenase (código de acesso: *LbrM13.1480*, *LmxM13.1620*), lanosterol sintase (código de acesso: *LbrM06.0650*, *Lmx06.0650*), lanosterol C-14 desmetilase (código de acesso: *LbrM11.0880*, *AB250970.1*), 24-esterol metiltransferase (código de acesso: *LbrM35.2600*, *GQ451910.1*) foram desenhados usando Primer Quest<sup>SM</sup> ([www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest](http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest)).

As sequências dos iniciadores para o gene controle da GAPDH são direto 5'-GGTAAGCTCGGTGTGGATTAC-3' e reverso 5'-CGCTGATCACGACCTTCTTC-3' para *L. mexicana* (*LmxM29.2980*) e direto 5'-CGACCAGGACCTTATTGGTAAA-3' e reverso 5'-CACCGTATCGTGCTTCATCT-3' para *L. braziliensis* (*LbrM30.2950*). As sequências dos iniciadores para o gene HMGC<sub>o</sub>A redutase são direto 5'-TCGCCATTCGTTCGTGAAA-3' e reverso 5'-GCTCCAGTCGTAGTTCTTGTAG-3' (*L. mexicana*- *LmxM29.3190*) e direto 5'-CGCCATCCGTCGTGATATT-3' e reverso 5'-CCCAGTCGTAGTTCTTGTAAAGG-3' (*L. braziliensis*- *LbrM30.3180*), para o gene farnesiltransferase são direto 5'-CAAACATCATCCGCGACTACTA-3' e reverso 5'-CACTCTTCAGCTCCTTCAGTTC-3' (*L. mexicana*- *LmxM30.2940*), para o gene esqualeno sintase são direto 5'-GACGGAGCTGAAGGATCTAAAG-3' e reverse 5'-GTCCTGCAGAGTGGAAAGATAG-3' (*L. braziliensis*-*LbrM31.3310*), para o gene da esqualeno monooxigenase são direto 5'-GCTGAAAGAGGTAGGCATGAA-3' e reverso 5'-CTTATCGTCCACCACCACATAG-3' (*L. mexicana*- *LmxM13.1620*) e direto 5'-CGCTGAAGGAAGTTGGTATGA-3' e reverso 5'-CAAAGTCGCCAAAGTGGAAAG-3' (*L. braziliensis*- *LbrM13.1480*) e para o gene lanosterol sintase são direto 5'-AACAACCCAATCCACTACCC-3' e reverso 5'-CTACGCGATAGCCGCATATT-3' (*L. braziliensis*- *LbrM06.0650*) e direto 5'-GATCTTGATGCCGGATTGGA-3' e reverso 5'-CAGGCCGTAGAAGTATGAGAAG-3' (*L. mexicana* *Lmx06.0650*) e para o gene Lanosterol C-14 desmetilase são direto 5'-GCTGAGTGCGAAGAAGAAGTA-3' e reverso 5'-ACTTGCTGTGCTGGTGAA-3' (*L. amazonensis*- *AB250970.1*) e direto 5'-ACCTCTACCATCACCCTACTT-3' e reverso 5'-

CTGGGAACCTCGTCAATCTCTTC-3' (*L. braziliensis* - LbrM11.0880) e para o gene 24-esterol metiltransferase são direto 5'-CGAGTACCATCGCAAGATCAA-3' e reverso 5'- TGACGTCTATGACCTCCTCTAC-3' (*L. braziliensis*- LbrM35.2600) e direto 5'- ATGAGCTTAGCCGACAACAC-3' e reverso 5'- GGGCTTGATGACACGAAAGA-3' (*L. amazonensis* - GQ451910.1).

### **3.14- Atividade da LBqT01 associada ao Cetoconazol *in vivo*.**

Para a avaliar a atividade *in vivo* da associação da LBqT01, inibidor da utilização do colesterol, com o cetoconazol, inibidor da biossíntese do ergosterol, camundongos BALB/c (5 animais por grupo) foram infectados na orelha direita com  $2 \times 10^6$  promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária. O início do tratamento foi após 7 dias de infecção. Os animais foram tratados com LBqT01 (10 mg/kg/dia), cetoconazol (100 mg/kg/dia), glucantime (100 mg/kg/dia) e a combinação de LBqT01+cetoconazol (10 mg/kg/dia + 100 mg/kg/dia) . A administração oral foi escolhida para o tratamento com a LBqT01, cetoconazol e LBqT01+cetoconazol, enquanto a administração do fármaco de referência, glucantime, foi intraperitoneal. Os animais foram tratados 5 dias por semana por um período de 33 dias. Controles negativos também foram similarmente tratados com PBS. A medida da orelha, informando a evolução da infecção, foi registrada duas vezes por semana. Após o período de tratamento, os animais foram eutanaziados para a avaliação toxicológica. Os níveis no soro das enzimas creatina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), colesterol e creatina cinase foram medidas usando a plataforma tecnológica de análises clínicas do Programa de Desenvolvimento Tecnológico de Insumos para a Saúde (PDTIS) da Fundação Oswaldo Cruz.

### **3.15- Caracterização e análise filogenética .**

A identificação da *L. amazonensis* (cepa MHOM/BR/77/LTB 0016) foi feita pelo estudo do sequenciamento do gene que codifica a enzima diidrofolato redutase-timidilato sintase (DHFR-TS) e da *L. guyanensis* (cepa MHOM/BR/77/M4147) e *L. braziliensis* (cepa MHOM/BR/75/M2904), foi feita pela análise dos genes da pteridina redutase (PTR1).

As sequências dos iniciadores para o gene DHFR-TS são direto 5'- GGCTTCCCTCAACCTGTTATAC-3' e reverso 5'- TTGAGTGGCCGGAACCTTAC-3' (*L. amazonensis*- X51735-1), para o gene PTR1 são direto- 5'-

GGCTTCCCTCAACCTGTTATAC-3' reverso – 5'- TTGAGTGGCCGGAACCTTAC-3' (*L. guyanensis*- FJ234150.1) e direto- 5'- GCTCCTATTTCCCTCGTTCAG-3'reverso- 5'-TGTCATGGCGTCGATGATATT-3' (*L. braziliensis* – LbrM23.0300).

O DNA genômico foi extraído dos parasitos na fase logaritmica de crescimento usando o reagente DNAzol (Invitrogen) como descrito pelo fabricante. As reações de PCR foram realizadas com um volume final de 50 µL usando os iniciadores listados acima e continham 100 ng de DNA genômico, 50 pmol de cada iniciador, 0,2 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 5 U de Taq polimerase. A amplificação foi feita em 30 ciclos, cada ciclo usando as seguintes condições: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 62°C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1-2 minutos (dependendo do tamanho dos produtos de PCR). A extensão final foi feita a 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram inseridos em um gel de agarose 1%, e purificados com o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) e sequenciadas com o sequenciador ABI Prism 3100 DNA (plataforma de sequenciamento- Université Laval- Quebec- Canadá). As sequências obtidas foram comparadas com outras espécies de *Leishmania* presentes no banco de dados GeneBank usando o Lasergene Software (DNASTAR, Inc.).

### 3.16- Sequenciamento do DNA total

Para os experimentos de sequenciamento do DNA total da cepa selvagem e resistente a sinvastatina de *L. guyanensis* os parasitos precisaram ser clonados. A clonagem foi feita plaqueando 50 µl da cultura na fase log de crescimento em placas de petri contendo 25 ml de meio de cultura α-Mem duas vezes concentrado, 20 mL de Bacto agar, 5 mL de soro fetal bovino, 100 µL de hemina 5 mg/mL.

O DNA total do clone de promastigotas de *L. guyanensis* selvagens e resistentes a sinvastatina foi isolado na fase logarítmica de crescimento dos parasitos usando o protocolo de extração com fenol, de acordo com Smyth e colaboradores, 1992. Foram realizadas duas extrações, para maior purificação do DNA. Para o sequenciamento total do DNA as amostras foram preparadas de acordo com o kit Nextera<sup>tm</sup> DNA Illumina (Illumina Inc). O DNA total da cepa selvagem e resistente foi sequenciado usando o Hiseq9000, Illumina (Coelho et al, 2012).

### 3.17- Clonagem e transfecção dos Transportadores ABC

Para o estudo da função de transportadores ABC no transporte de colesterol/ergosterol e na resistência aos inibidores da biossíntese do ergosterol, os genes para ABCG1, ABCG4 e ABCG6 foram clonados, subclonados e transfectados em promastigotas de *L. amazonensis* LTB0016.

Esses transportadores foram primeiramente amplificados por PCR. Os transportadores ABCG1 (GeneDB-*L. mexicana*, código de acesso LmxM06.0080), ABCG4 (GeneDB-*L. mexicana*, código de acesso LmxM15.0890) e ABCG6 (GeneDB-*L. mexicana*, código de acesso LmxM36.2890) foram isolados do DNA genômico de *L. amazonensis* LTB0016 por PCR usando os primers, ABCG1 direto 5'-**TCTAGAATGTCCCGCTTAGACAACGAACCG**-3' e reverso 5'-**AAGCTTCTACATCTTCTCGTGAGCGGCCAC**-3', ABCG4 direto 5'-**TCTAGAATGGAGACGGAAGTCGATCAGGCC**-3' e reverso 5'-**CATATGTTACCACCGGTACTTGCGCCGCCT**-3', ABCG6 direto 5'-**TCTAGAATGTCGTCTCCGGCGCCACCTACC**-3' e reverso 5'-**AAGCTTTCACCTTCCCTCAGTGGACCGAAA**-3'. Os iniciadores possuem as sequências das enzimas de restrição *Xba*I (TCTAGA), usada nos iniciadores dos transportadores ABCG1, ABCG4 e ABCG6, *Hind*III (AAGCTT), usada nos iniciadores dos transportadores ABCG1 e ABCG6, *Nde*1 (CATATG), usada no iniciador do transportador ABCG4.

Para a expressão homóloga nos parasitos, cada gene foi clonado em vetor de expressão pGEM T easy (Promega) usando bactérias competentes DH5 $\alpha$  (*E.coli*). A sequência de cada gene foi liberada do pGEM T, usando as enzimas de restrição *Xba*I e *Hind*III ou *Nde*-1 e subclonados no vetor de expressão psp72aneoa (possui o gene de resistência a neomicina) e transfectados em promastigotas de *L. amazonensis* para a geração de 3 mutantes superexpressando cada gene. Os parasitos transfectados foram selecionados pela resistência a neomicina, como descrito por Perez-Victoria, 2003.

## **4- RESULTADOS**

## **CAPÍTULO 1:**

# **Influência do Colesterol na atividade dos inibidores da biossíntese do ergosterol**

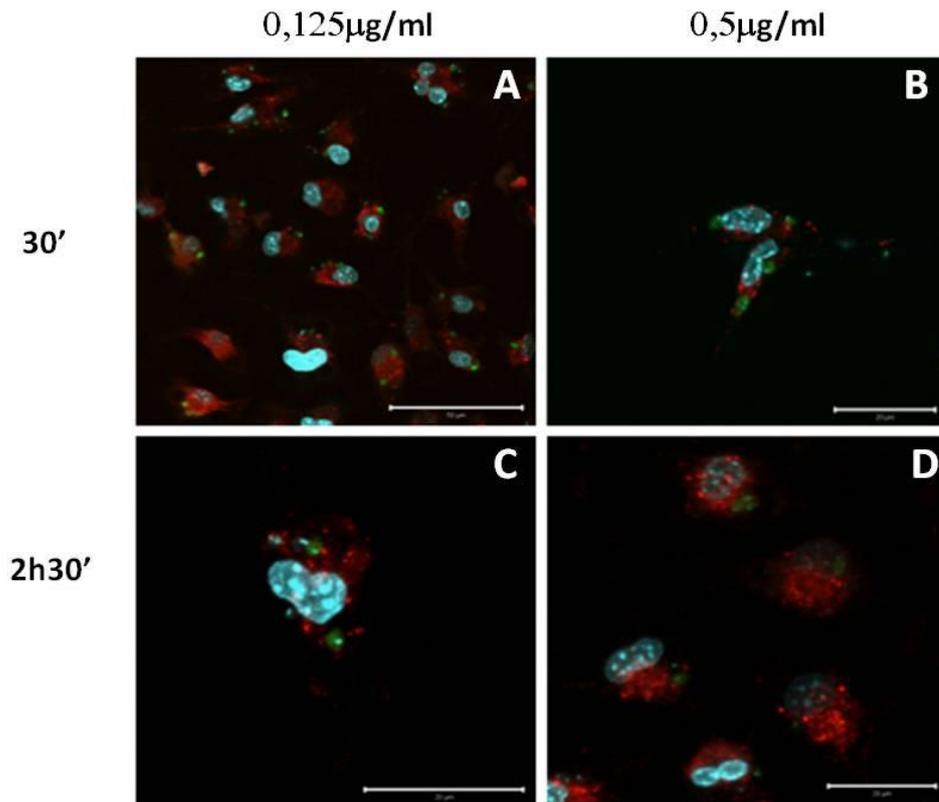
#### 4.1 - Disponibilidade de LDL para amastigotas intracelulares.

Esse capítulo se dedica a estudar a influência do colesterol exógeno na atividade dos inibidores da biossíntese do ergosterol. Inicialmente, mostraremos como as amastigotas intracelulares tem acesso ao colesterol, através da endocitose de LDL, e também qual é a influência da falta da fonte exógena de colesterol no crescimento do parasito.

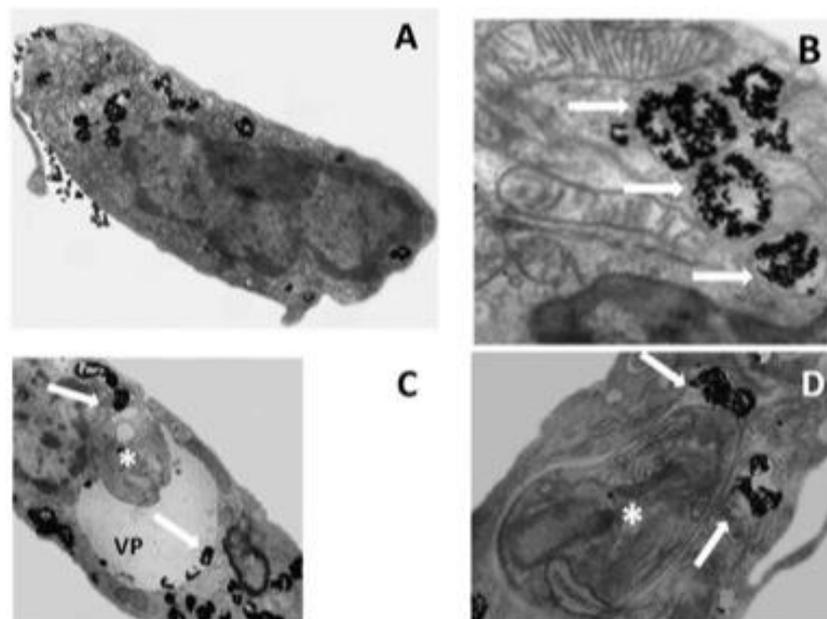
Para avaliar a disponibilidade de LDL para amastigotas intracelulares, macrófagos peritoneais murinos foram infectados com *L. amazonensis*-GFP e incubados com LDL marcada com Alexafluor- 594 (vermelho) ou infectados com *L. amazonensis* e incubados com LDL-ouro.

Macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis*-GFP foram incubados com LDL-alexa flúor a 0,125 ou 0,5 µg/mL por 30 minutos ou 2 horas e 30 minutos (Fig. 6). Podemos observar que a LDL está distribuída no interior do macrófago, inclusive ao redor das amastigotas, (Fig. 6).

Os resultados observados na microscopia confocal foram corroborados por microscopia eletrônica de transmissão. Na Figura 7 (painel A e painel B) os macrófagos não foram infectados, mostrando a distribuição das partículas de LDL em células normais. As partículas de LDL-ouro (pontos escuros) são endocitadas e ficam armazenadas em vacúolos endocíticos, para serem processadas e utilizadas pela célula hospedeira. Na Fig. 7 (Painel C e painel D), macrófagos infectados com *L. amazonensis* foram incubados com partículas de LDL-ouro. Os vacúolos endocíticos contendo as partículas de LDL estão se fundindo com o vacúolo parasitóforo. Observamos, também, a presença de partículas de LDL livres no interior do vacúolo parasitóforo, inclusive bem próximo das amastigotas, sugerindo até a adesão à membrana dos parasitos. Essas imagens demonstram que amastigotas intracelulares tem acesso a LDL e, dessa forma, podem estar obtendo seu conteúdo, principalmente colesterol. Nas setas brancas observamos as partículas de LDL-ouro. O asterisco representa as amastigotas dentro do vacúolo parasitóforo.



**Figura 6: Distribuição de partículas de LDL em macrófagos infectados com *L. amazonensis*.** Macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis*-GFP foram incubados com partículas de LDL marcadas com alexa flúor, conforme os tempos e concentrações indicados, e as imagens foram adquiridas em microscópio confocal. Verde - amastigotas de *L. amazonensis*; vermelho - partículas de LDL; azul - núcleos/cinetoplastos (DAPI)



**Figura 7: Disponibilidade de LDL para amastigotas intracelulares.** Macrófagos peritoneais infectados ou não com *L. amazonensis* foram incubados com LDL-ouro por 3 horas e analisados por microscopia eletrônica de transmissão. A e B - Macrófagos não infectados; C e D - Macrófagos infectados. Setas - partículas de LDL; asteriscos - amastigotas de *L. amazonensis*; VP - vacúolo parasitoforo.

#### **4.2- Regulação da biossíntese do ergosterol na presença ou ausência de fonte exógena de colesterol.**

Após demonstrar que promastigotas de *Leishmania* obtêm colesterol através de endocitose de LDL (Andrade-Neto, et al, 2011) e que amastigotas podem ter acesso a partículas de LDL, mesmo estando dentro do vacúolo parasitóforo, fomos investigar qual seria o papel do colesterol na regulação da biossíntese do ergosterol. Para o estudo da regulação gênica, a enzima avaliada foi a HMGCoA redutase, etapa limitante da biossíntese de colesterol em células de mamíferos, e que também está presente na biossíntese de ergosterol em *Leishmania* spp. Além de avaliar a expressão desse gene por PCR quantitativo, o perfil de produção de esteróis em diferentes condições de cultura foi avaliado por TLC.

Para a análise da expressão dos genes por PCR quantitativo, promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas por diversas passagens em meio sem fonte de colesterol, utilizando o Nutridoma-SP em substituição ao soro, ou com excesso de colesterol, cultivadas com 80% de soro fetal bovino (única passagem). Como podemos observar na Figura 8A, a expressão de HMGCoA redutase está aumentada em até 3 vezes na cepa cultivada sem fonte de colesterol (várias passagens), e levemente diminuída quando cultivadas com 80% de soro em única passagem, com maior fonte de colesterol exógeno, sugerindo que quanto menor a quantidade de colesterol exógeno disponível, maior a expressão da HMGCoA redutase.

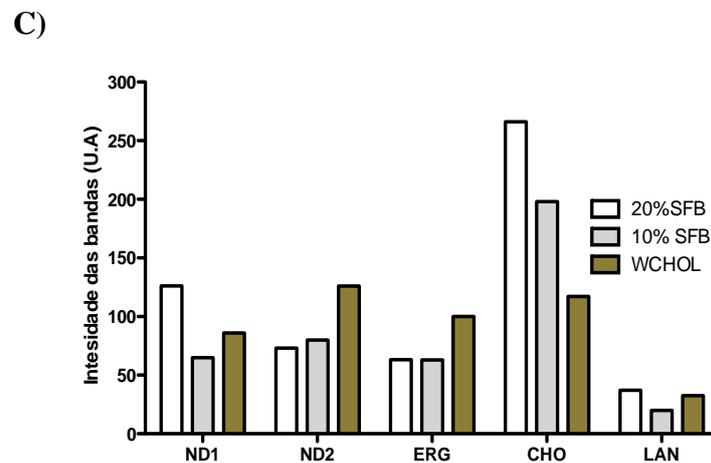
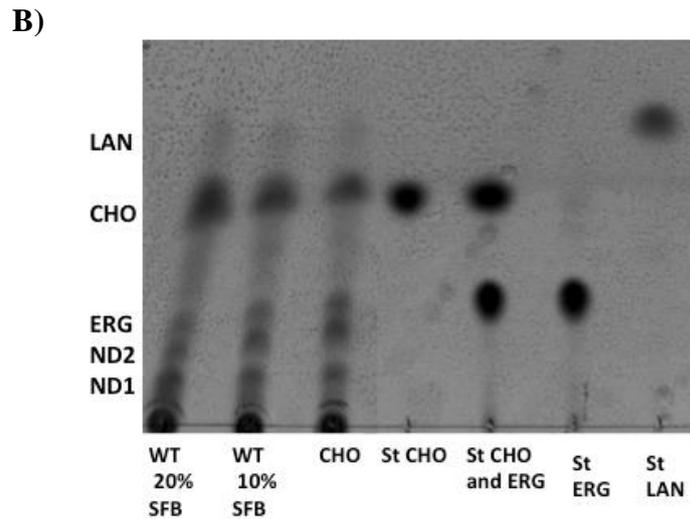
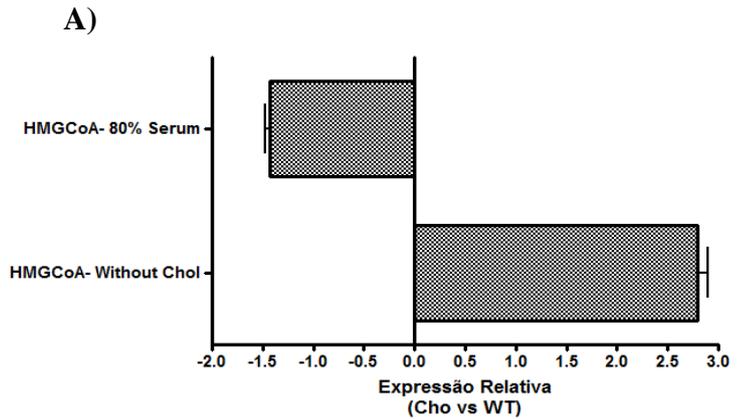
Em seguida, promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas por 72 horas com 10 ou 20% de SFB ou cultivadas por várias passagens com 10% de Nutridoma-sp (sem colesterol). Podemos observar o aumento do colesterol (CHO) diretamente proporcional ao aumento de soro fetal bovino (Fig. 8B-C). A quantidade de colesterol (CHO) é maior nos parasitos cultivados com 20% do que com 10% de SFB. Os parasitos cultivados por várias passagens no nutridoma tem uma diminuição no colesterol (CHO), mas ainda observamos uma quantidade expressiva de colesterol mostrando que, de alguma forma, os parasitos não perderam o conteúdo total de colesterol das suas membranas, mesmo sendo cultivados sem fonte de colesterol exógeno.

O aumento ou diminuição do conteúdo de colesterol, além de modular a expressão da HMGCoA redutase, modifica o conteúdo de esteróis endógenos da *Leishmania*. Os parasitos cultivados sem fonte de colesterol (WCHOL) apresentam uma maior produção das bandas ND2 e ergosterol (ERG), mostrando que o aumento da expressão da HMGCoA redutase resulta em uma maior produção dos esteróis com

esqueleto ergostano, que pode ser interpretada como um mecanismo homeostático para manter o conteúdo global de esteróis e a membrana estável. As bandas ND1 e ND2, que por falta de padrões comerciais não puderam ser identificadas, provavelmente são os outros esteróis com esqueleto ergostano já descritos em *Leishmania* spp, o episterol e o desidroepisterol.

Possivelmente, o conteúdo de colesterol influencia a expressão da HMGCoA redutase, regulando a biossíntese de ergosterol. A discreta diminuição da expressão desta enzima nos parasitos cultivados com 80% de SFB pode ter sido causado pelo tempo de incubação de 72 horas, curto demais para causar uma regulação maior da enzima.

Esses resultados mostram, então, que a alteração no conteúdo de colesterol do parasito pode modular uma enzima importante na biossíntese do ergosterol e modificar o conteúdo de esteróis endógenos de *Leishmania*.



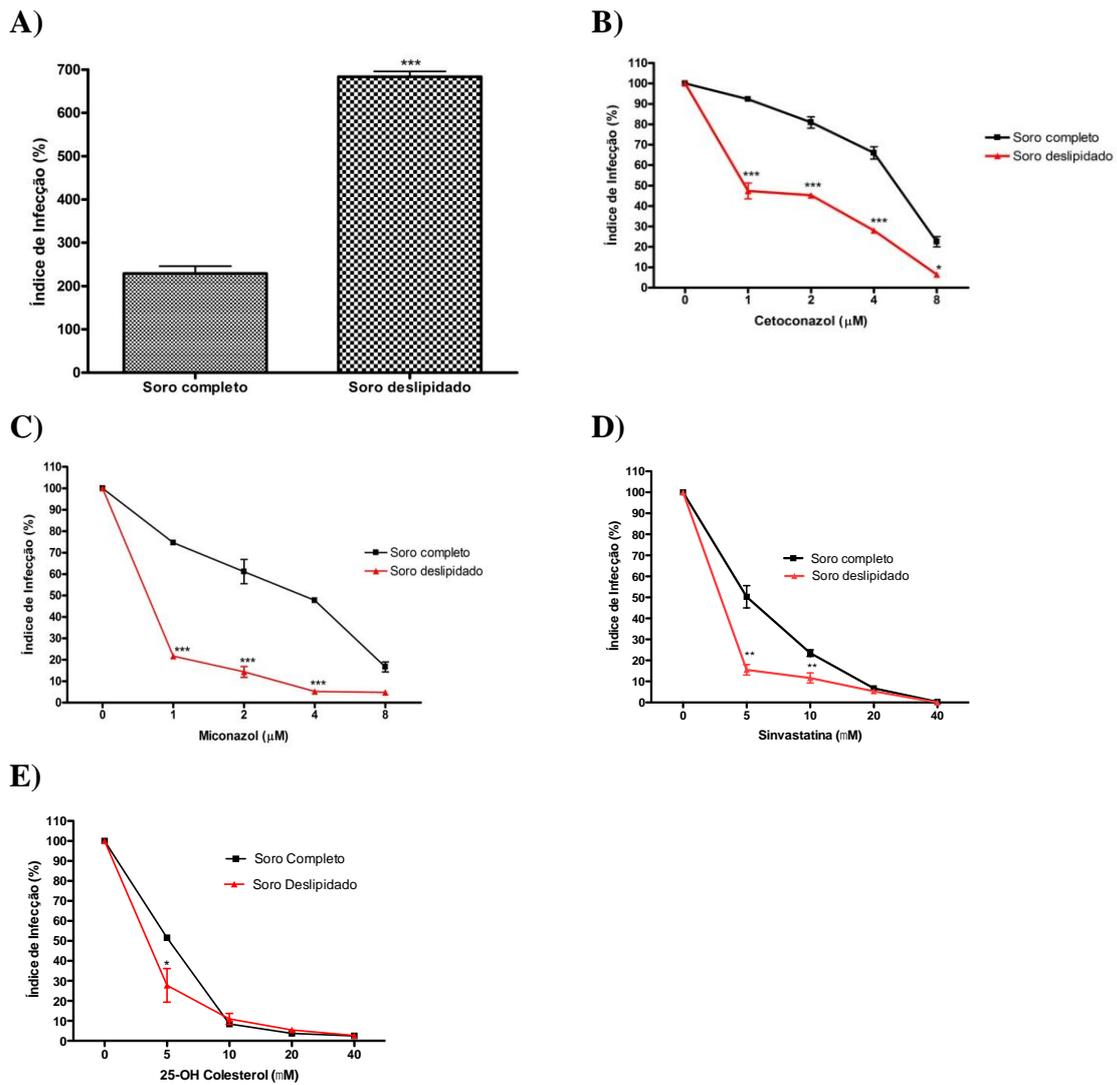
**Figura 8: Regulação da biossíntese do ergosterol.** (A) promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas a 26°C em meio  $\alpha$ -Mem com 80% de soro fetal bovino (HMGCoA-80% serum) por 72 horas ou por várias passagens em meio com nutritoma-sp (HMGCoA WithoutChol) e a expressão da HMGCoA redutase foi avaliada por PCR em tempo real (quantitativo). (B) para a análise do perfil de esteróis, os parasitos foram cultivados com 20% (WT 20%SFB) ou 10% (WT 10%SFB) de soro fetal bovino por 72 horas ou por várias passagens em meio com nutritoma-SP (CHO). Os lípideos neutros foram extraídos e submetidos a TLC. (C) a placa de TLC foi submetida a análise por densitometria. A imagem da TLC foi digitalizada e analisada pelo programa “ImageMaster TotalLab v1.11”. (UA – Unidades arbitrárias). Legenda: padrão de colesterol (st CHO), colesterol+ergosterol (st CHO and ERG), ergosterol (st ERG), lanosterol (LAN), não determinado (ND).

### **4.3- Efeito da ausência de colesterol exógeno sobre a atividade leishmanicida em amastigotas intracelulares**

Depois de observar que a amastigota intracelular tem acesso a LDL endocitada pelo macrófago e mostrar que a ausência de colesterol exógeno pode alterar o conteúdo de esteróis endógenos de promastigotas, avaliamos o efeito da ausência de fontes de colesterol exógeno sobre o crescimento do parasito e sobre a atividade leishmanicida do cetoconazol, miconazol e sinvastatina em amastigotas intracelulares. Macrófagos infectados também foram tratados com 25-OH colesterol, o qual inibe tanto a endocitose de LDL quanto a biossíntese de colesterol pelo macrófago.

Os parasitos apresentaram maior crescimento em macrófagos peritoneais cultivados em meio com soro deslipidado em relação aos cultivados em soro normal (Fig. 9A). Por outro lado, os parasitos tornaram-se mais sensíveis à atividade leishmanicida do cetoconazol (painel B), miconazol (painel C) e sinvastatina (painel D) quando os macrófagos infectados foram cultivados no soro deslipidado, comparado com o soro normal (Fig. 9B-D). O cetoconazol apresentou  $IC_{50}$  de 6  $\mu M$  na presença de soro completo, enquanto com soro deslipidado o  $IC_{50}$  foi de 1,4  $\mu M$ , uma diminuição de aproximadamente seis vezes. O miconazol apresentou  $IC_{50}$  de 4  $\mu M$  com soro completo e 0,5  $\mu M$  com soro deslipidado, uma diminuição maior do que quatro vezes e a sinvastatina apresentou  $IC_{50}$  de 6  $\mu M$  com soro completo e de 2  $\mu M$  com soro deslipidado, uma diminuição de 3 vezes. Os resultados mostram que a ausência de colesterol exógeno influenciam na atividade dos inibidores da biossíntese do ergosterol.

O tratamento com 25-OH colesterol foi capaz de inibir o crescimento de amastigotas intracelulares e também apresentou diferença de potência na presença de soro completo ou deslipidado. O  $IC_{50}$  com soro completo foi de 7  $\mu M$  e com soro deslipidado foi de 3,5  $\mu M$ . A inibição da endocitose de LDL e da produção de colesterol exógeno pela 25-OH colesterol parece influenciar no crescimento do parasito, mostrando que de alguma forma o colesterol obtido pelo macrófago, seja via LDL ou produção endógena pode participar no crescimento de amastigotas intracelulares.



**Figura 9: Efeito da ausência de colesterol exógeno sobre o crescimento e da atividade leishmanicida do cetoconazol, miconazol, sinvastatina e 25-OH colesterol em amastigotas intracelulares.** Macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis* foram incubados em meio de cultura RPMI suplementado com soro completo ou deslipidado. As culturas permaneceram sem tratamento (A) ou foram tratadas com cetoconazol (B), miconazol (C), sinvastatina (D) ou 25-OH colesterol (D) por 72 horas. Os experimentos foram feitos em triplicatas. Os resultados foram expressos em porcentagem do índice de infecção, pelo seguinte cálculo: % MØ infectados x N° de amastigotas/ N° MØ totais. Os experimentos foram realizados em triplicatas, n=3. Os gráficos são representativos de um experimento, com o valor do desvio padrão. Os gráficos e os valores de IC<sub>50</sub> foram obtidos no programa Graphpad Prism 4. Teste t student, \*p<0.5, \*\*p>0.05 \*\*\* p<0.001 em relação ao grupo controle.

#### **4.4- Atividade leishmanicida dos inibidores do transporte de colesterol associados aos inibidores da biossíntese do ergosterol sobre promastigotas e amastigotas intracelulares.**

##### **4.4.1 – Efeito dos inibidores do transporte de colesterol associados aos inibidores da biossíntese do ergosterol sobre promastigotas de *L. amazonensis*.**

Uma vez constatado na forma amastigota que a ausência do colesterol aumenta a atividade do miconazol, cetoconazol e sinvastatina fomos avaliar o efeito de substâncias que inibem a entrada ou o transporte intracelular de colesterol associadas aos inibidores da biossíntese do ergosterol inicialmente em promastigotas de *L. amazonensis*, com o objetivo de analisar o efeito direto nos parasitos . Para isso, utilizamos 3 fármacos como ferramentas farmacológicas: A progesterona, que bloqueia a translocação do colesterol após a degradação da LDL nos lisossomos; a imipramina e o fármaco experimental LBqT01, que inibem o transporte do colesterol por vias ainda não completamente elucidadas.

Esses inibidores foram avaliados, individualmente ou em associação com inibidores da biossíntese do ergosterol. Para avaliar graficamente a interação, os dados também foram plotados na forma de isoblograma, e para estimar o tipo de interação (sinergismo, antagonismo ou neutro), calculando o Índice da Concentração Inibitória Fracional (FICI). A fórmula utilizada para calcular o FICI foi a seguinte:  $FICI = IC_{50} \text{ de A em combinação} / IC_{50} \text{ de A sozinha} + IC_{50} \text{ de B em combinação} / IC_{50} \text{ de B sozinha}$ . A interpretação dos resultados de FICI, segundo as diretrizes publicadas por Odds (2003)(Odds 2003) são:  $FICI \leq 0,5$  – sinergismo;  $0,5 < FICI < 4$  - sem interação ou aditivo;  $FICI \geq 4$  – antagonismo.

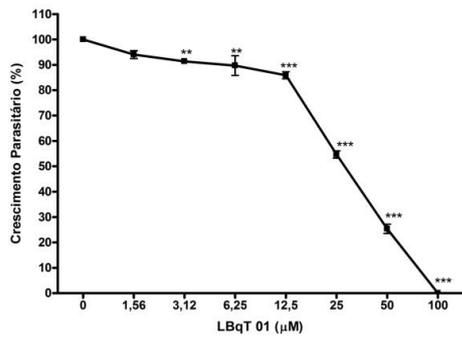
Os inibidores apresentaram atividade leishmanicida contra promastigotas de *L. amazonensis*, com  $IC_{50}$  de 30, 5,5 e 40  $\mu\text{M}$ , para LBqT 01 (Fig. 10A), imipramina (Fig. 10H) e progesterona (Fig. 10Q), respectivamente.

O  $IC_{50}$  dos inibidores da biossíntese de esteróis, cetoconazol, miconazol e terbinafina, diminuiu com a associação com os inibidores do transporte de colesterol, como podemos observar nos isobogramas (Figs. 10C, E, G, J, M, O, R) e nas tabelas 2, 3 e 4..

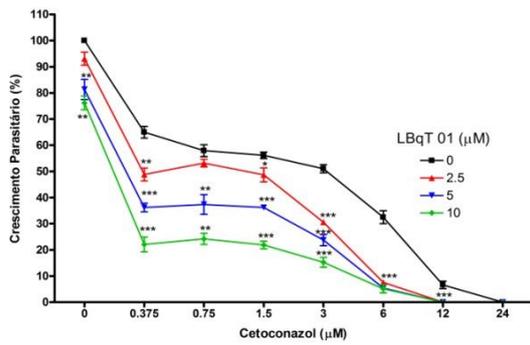
As associações entre LBqT01 e cetoconazol, miconazol ou terbinafina resultaram em sinergismo, com valores de FICI de 0,5, 0,2 e 0,5, respectivamente (Figs. 10B, D e F).

A associação entre imipramina e miconazol apresentou valor de FICI igual a 0,5, indicando efeito sinérgico (Fig. 10M). Observamos nas Figuras 5I e 5O as associações de imipramina com cetoconazol e terbinafina, respectivamente, que apresentaram valores de FICI igual a 0,7, indicando efeito aditivo. Em todas as associações observamos o aumento da atividade leishmanicida. O cetoconazol também apresentou uma maior atividade leishmanicida quando associado com a progesterona (Fig. 10R). Essa associação mostrou valor de FICI igual a 0,6, indicando efeito aditivo.

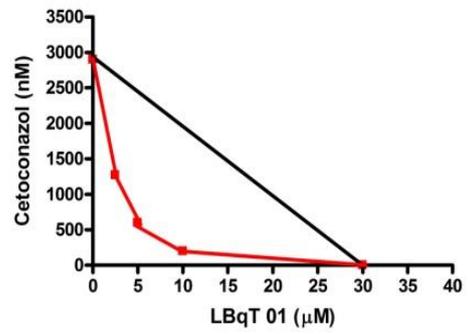
A)



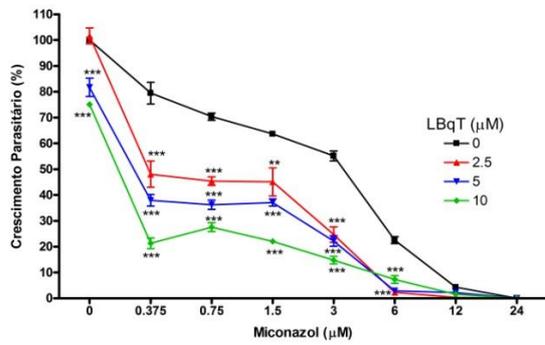
B)



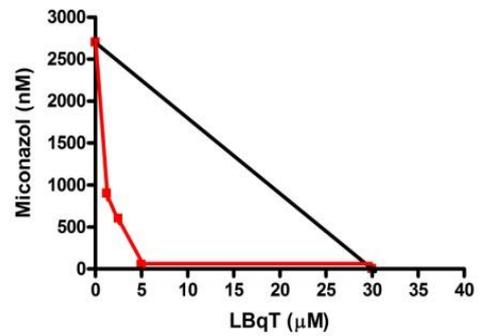
C)



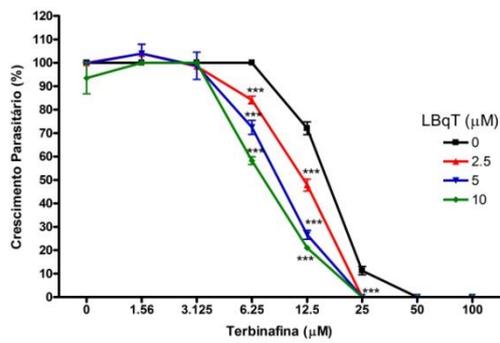
D)



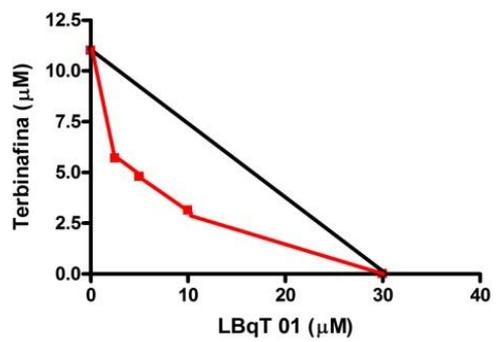
E)



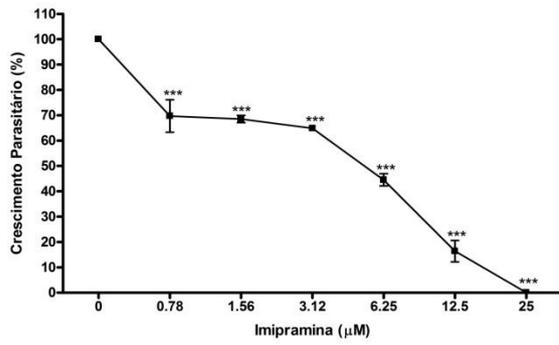
F)



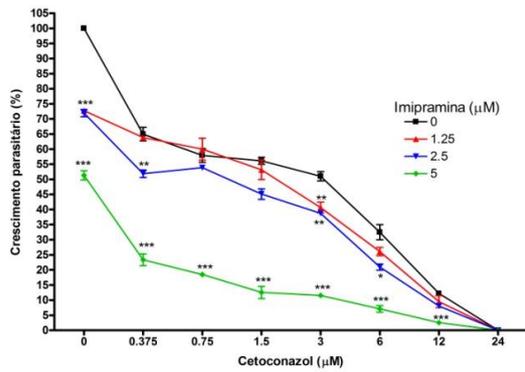
G)



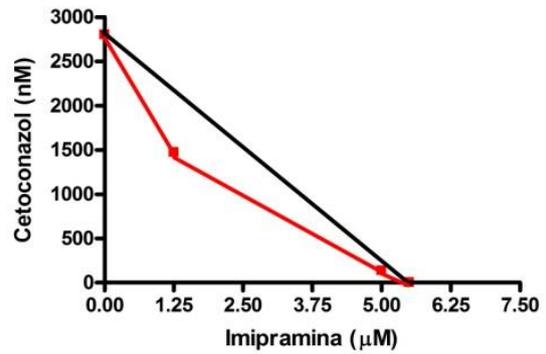
H)



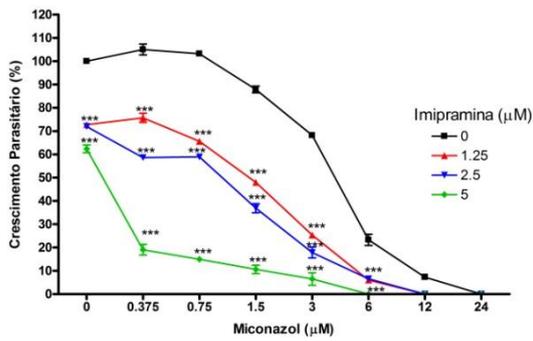
I)



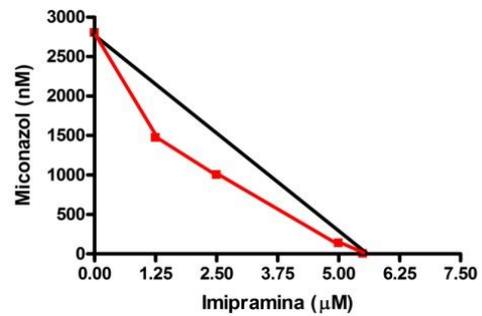
J)



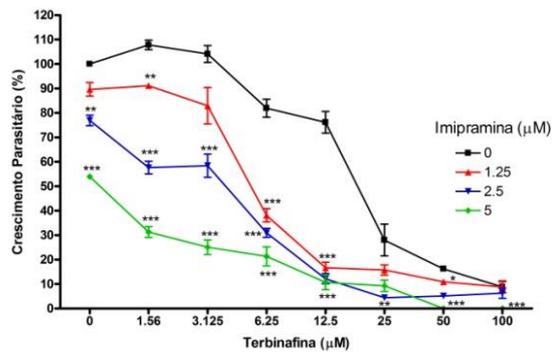
L)



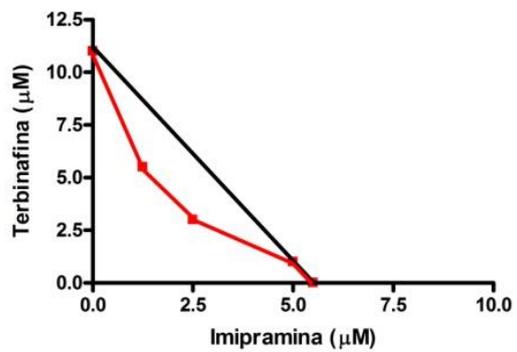
M)



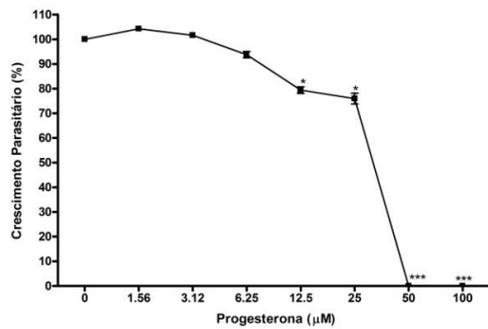
N)



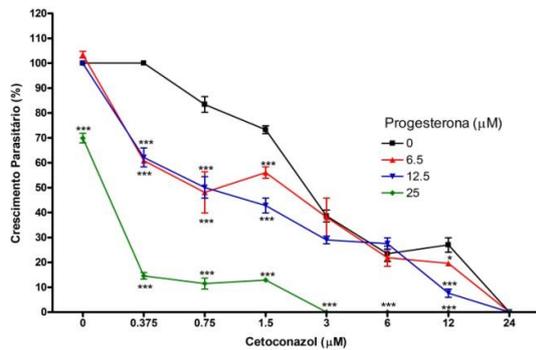
O)



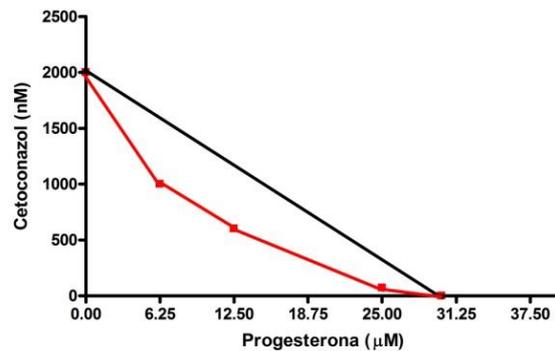
P)



Q)



R)



**Figura 10: Avaliação da atividade leishmanicida dos inibidores do transporte de colesterol associados aos inibidores da biossíntese de esteróis.** Promastigotas de *L. amazonensis* foram incubados com os inibidores sozinhos ou associados em diferentes concentrações por 72 horas a 26°C. (A) LBqT 01, (B) LBqT 01 + cetoconazol, (C) isoblograma –LBqT 01 + cetoconazol, (D) LBqT 01 + miconazol, (E) isoblograma – LBqT 01 + miconazol, (F) LBqT 01 + terbinafina, (G) isoblograma – LBqT 01 + terbinafina, (H) imipramina, (I) imipramina+cetoconazol, (L) isoblograma – imipramina +cetoconazol, (M) imipramina + miconazol, (N) isoblograma – imipramina +miconazol, (O) imipramina + terbinafina, (P) isoblograma – imipramina + terbinafina, (Q) progesterona, (R) progesterona + cetoconazol, (S) – isoblograma – progesterona + cetoconazol. Cada ponto plotado nos isoblogramas representa a IC<sub>50</sub> dos fármacos sozinhos ou em associação. A reta unindo os IC<sub>50</sub> individuais representa a linha de aditividade. Os experimentos foram realizados em triplicatas, n=3. Os gráficos são representativos de um experimento, com o valor do desvio padrão. Os gráficos e os valores de IC<sub>50</sub> foram obtidos no programa Graphpad Prism 4. Teste *t* student, \*p<0,5, \*\*p<0,05 \*\*\* p<0,001 em relação ao grupo controle.

**Tabela 2: Valores de IC<sub>50</sub> (μM) do cetoconazol, miconazol e terbinafina individualmente ou associados com LBqT01.**

| LBqT01 | Cetoconazol | Miconazol | Terbinafina |
|--------|-------------|-----------|-------------|
| 0      | 2,5         | 2,7       | 15          |
| 2,5    | 1,2         | 1,2       | 5,7         |
| 5      | 0,6         | 0,6       | 4,8         |
| 10     | 0,2         | 0,2       | 3.13        |
| 30     | 0           | 0         | 0           |

Os valores de IC<sub>50</sub> foram estimados como descrito no item 3.8.

**Tabela 3: Valores de IC<sub>50</sub> (μM) do cetoconazol, miconazol e terbinafina individualmente ou associados com Imipramina.**

| Imipramina | Cetoconazol | Miconazol | Terbinafina |
|------------|-------------|-----------|-------------|
| 0          | 2,5         | 2,7       | 15          |
| 1,25       | 1,47        | 0,9       | 5,3         |
| 2,5        | 1,04        | 0,6       | 3           |
| 5          | 0,13        | 0,05      | 0,6         |
| 5,5        | 0           | 0         | 0           |

Os valores de IC<sub>50</sub> foram estimados como descrito no item 3.8.

**Tabela 4: Valores de IC<sub>50</sub> (μM) do cetoconazol individualmente ou associados com progesterona.**

| Progesterona | Cetoconazol |
|--------------|-------------|
| 0            | 2,5         |
| 6,25         | 1           |
| 12,5         | 0,6         |
| 25           | 0,05        |
| 40           | 0           |

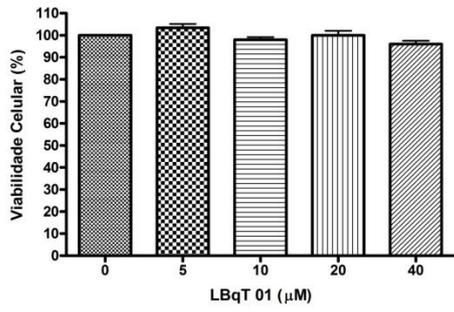
Os valores de IC<sub>50</sub> foram estimados como descrito no item 3.8.

#### 4.4.2 – Toxicidade dos inibidores de utilização de colesterol e dos inibidores da biossíntese de esteróis sobre macrófagos peritoneais.

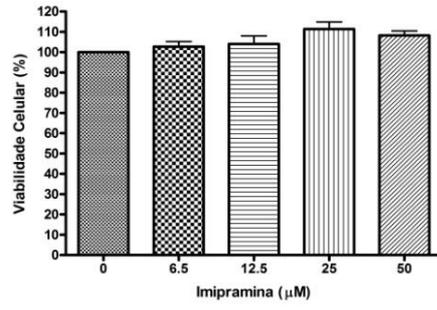
Para avaliar a atividade dos inibidores de utilização de colesterol pela célula hospedeira, associados com os inibidores da biossíntese do ergosterol, fomos inicialmente analisar a toxicidade desses fármacos. Como é possível observar na Fig. 12, somente a sinvastatina em todas as concentrações testadas (Fig. 11G) e a terbinafina na concentração de 80 μM (Figs. 11F, J, N, R) foram tóxicas para os macrófagos.

Com base no resultado de toxicidade, os ensaios de atividade leishmanicida foram planejados. A sinvastatina não foi testada em macrófagos infectados devido a sua toxicidade em todas as concentrações.

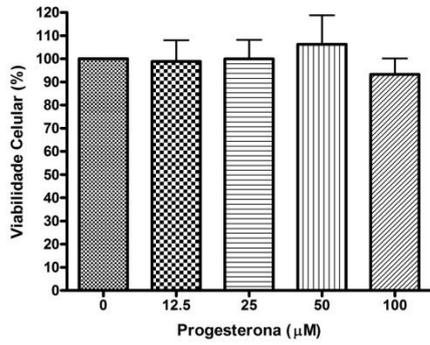
A)



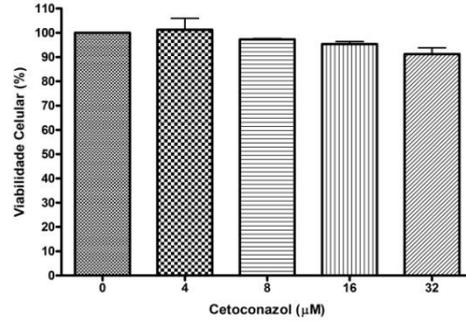
B)



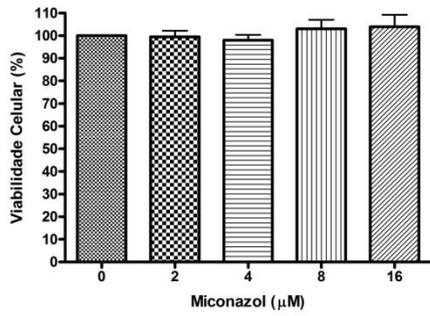
C)



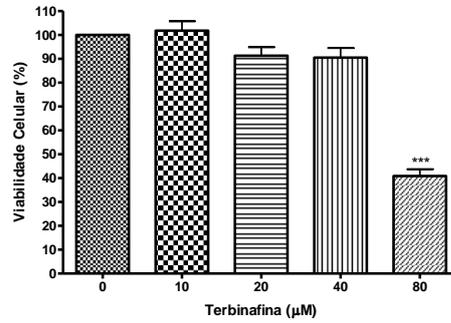
D)



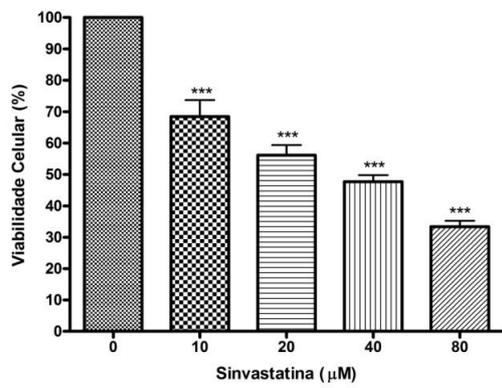
E)



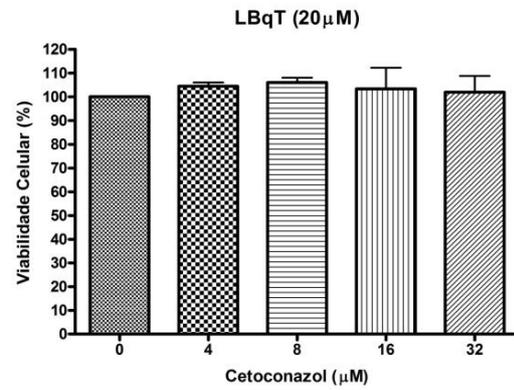
F)



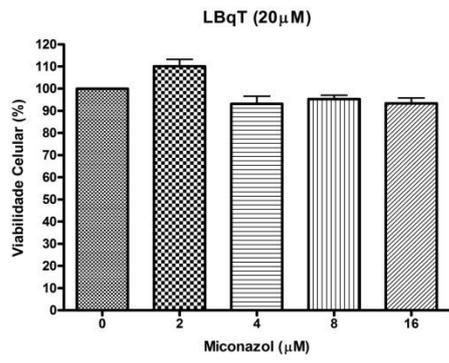
G)



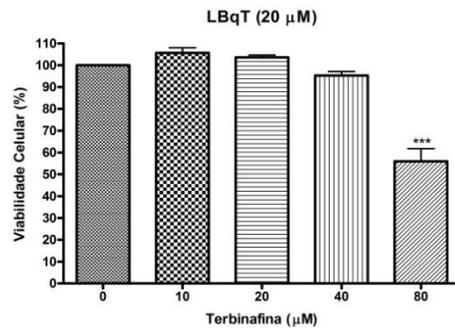
H)



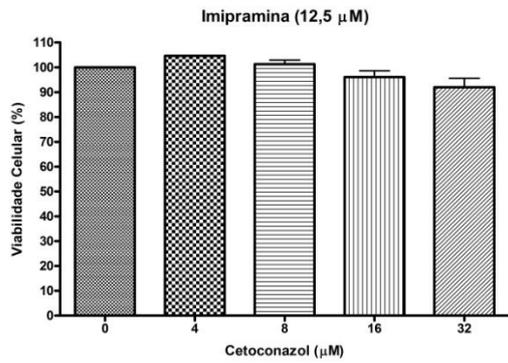
D)



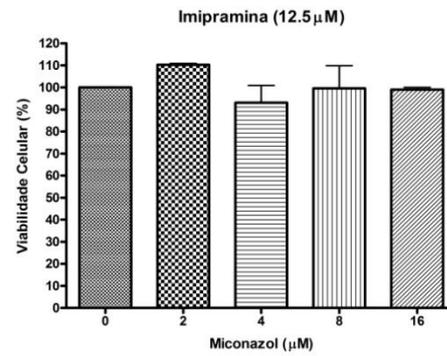
J)



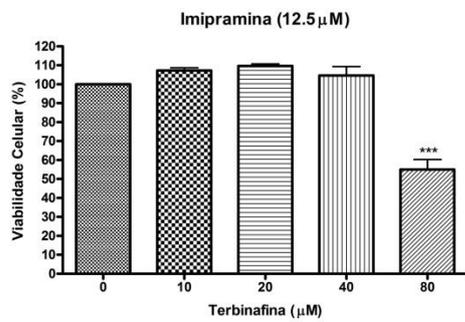
L)



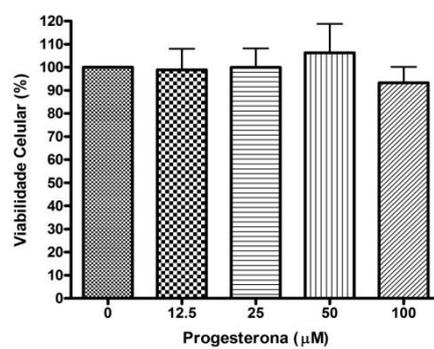
M)



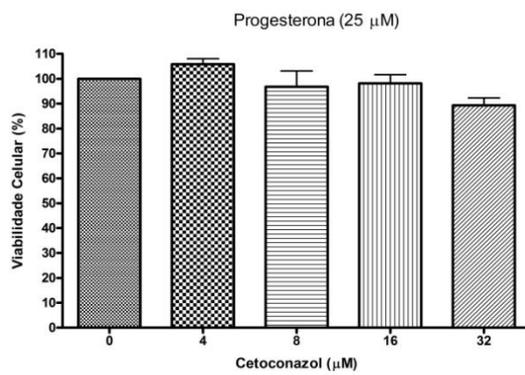
N)



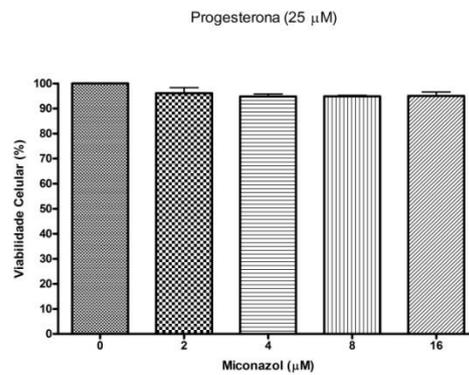
O)



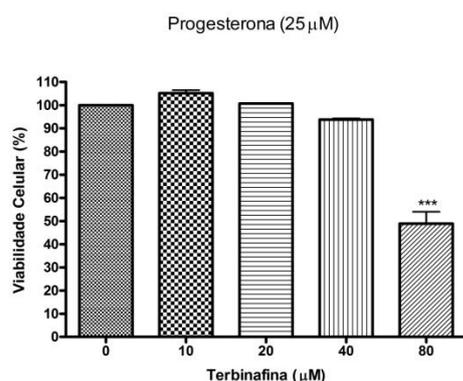
P)



Q)



R)



**Figura 11 – Efeito da toxicidade dos inibidores em macrófagos peritoneais.** Macrófagos peritoneais não infectados foram incubados com os inibidores da utilização do colesterol individualmente ou associados aos inibidores da biossíntese de esteróis por 72 horas a 37°C. Após esse período, as células foram incubadas com MTT por 1 hora a 37°C. O sobrenadante foi retirado e foram adicionados 200μl de DMSO, para dissolver os cristais de formazan. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 570nm. (A) LBqT 01, (B) imipramina, (C) progesterona, (D) cetoconazol, (E) miconazol, (F) terbinafina, (G) sinvastatina, (H) 20 μM LBqT 01 + cetoconazol, (I) 20 μM LBqT 01 + miconazol, (J) 20 μM LBqT 01 + terbinafina, (L) 12,5 μM imipramina + cetoconazol, (M) 12,5 μM imipramina + miconazol, (N) 12,5 μM imipramina + terbinafina, (O) progesterona, (P) 25 μM progesterona + cetoconazol, (Q) 25 μM progesterona + miconazol, (R) 25 μM progesterona + terbinafina. Os experimentos foram realizados em triplicatas, n=3. \*\*\*P<0.001 em relação ao controle.

#### 4.4.3 – Atividade leishmanicida dos inibidores da utilização de colesterol e inibidores da biossíntese de esteróis sobre macrófagos infectados com *L. amazonensis*.

Após avaliar a toxicidade, iniciamos os testes de atividade em macrófagos infectados com *L. amazonensis*.

As Figuras 12A, 12E e 12I representam a atividade leishmanicida em amastigotas intracelulares do inibidor de entrada e transporte do colesterol, a LBqT01, e dos inibidores do transporte de colesterol, imipramina e progesterona, respectivamente. Esses inibidores apresentaram atividade e mostraram IC<sub>50</sub> igual a 22 μM para LBqT01, 16 μM para imipramina e 28 μM para progesterona.

As associações entre LBqT01 (20 μM), cetoconazol ou miconazol apresentaram excelente atividade leishmanida. O cetoconazol e o miconazol, individualmente, apresentaram IC<sub>50</sub> de 7 μM e 4,7 μM, respectivamente enquanto que quando associadas à LBqT01, houve redução para 3 μM e 2 μM, respectivamente (Figs. 12B e C). A

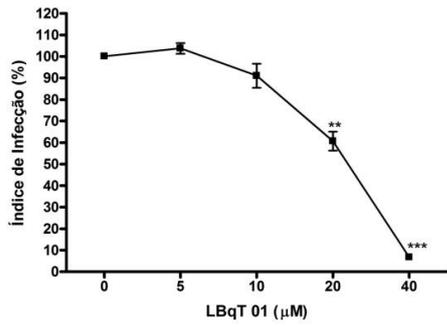
associação da LBqT 01 mais terbinafina não apresentou diferença em relação ao fármaco individualmente, com IC<sub>50</sub> de 23 µM (Fig 12D).

A atividade leishmanicida do cetoconazol e do miconazol foi aumentada quando associados a imipramina (12,5 µM), apresentando IC<sub>50</sub> de 3,8 µM e 3,5 µM, respectivamente (Figs. 12F e 12G). Assim como foi observado na associação da LBqT01, o IC<sub>50</sub> da terbinafina não foi alterado quando associada à imipramina (Fig. 12H).

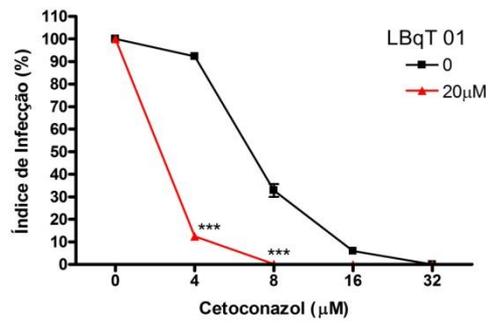
A associação entre progesterona e cetoconazol mostrou excelente atividade leishmanicida. O cetoconazol apresentou IC<sub>50</sub> de 7 µM e quando foi associada a 25 µM de progesterona, observamos uma diminuição no valor de IC<sub>50</sub> para 4 µM (Fig. 12J). O IC<sub>50</sub> do miconazol foi ligeiramente reduzido de 4,7 µM para 4,2 µM (Fig. 12L). O tratamento com terbinafina mostrou uma redução no IC<sub>50</sub> de 23 µM para 18 µM quando associado com a progesterona (Fig. 12M).

Os resultados apresentados nas Figuras 10 e 12, mostram que os inibidores da utilização do colesterol pelo macrófago tem atividade *per se* direta no parasito e que, além disso, o bloqueio da captação e biossíntese de colesterol pelo macrófago influencia a atividade dos inibidores da biossíntese do ergosterol.

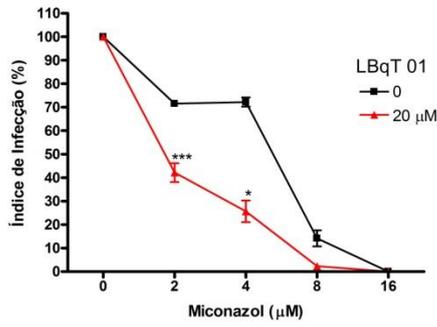
A)



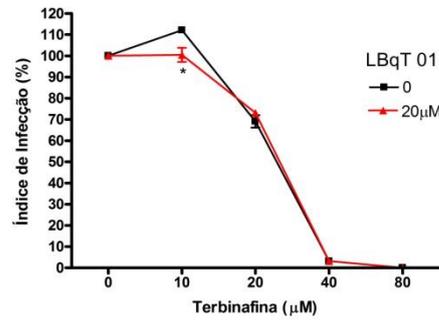
B)



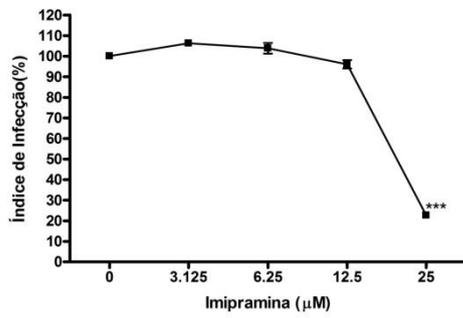
C)



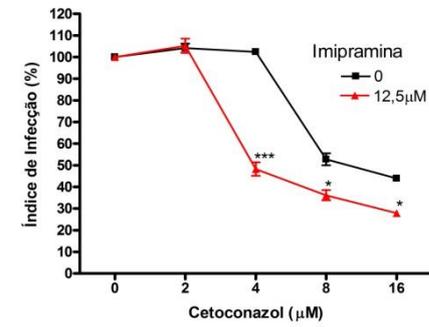
D)



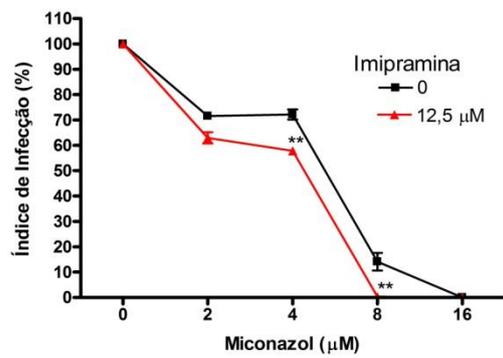
E)



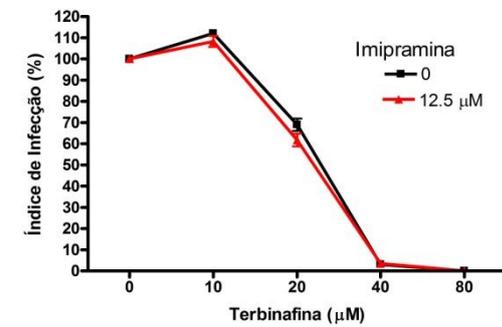
F)

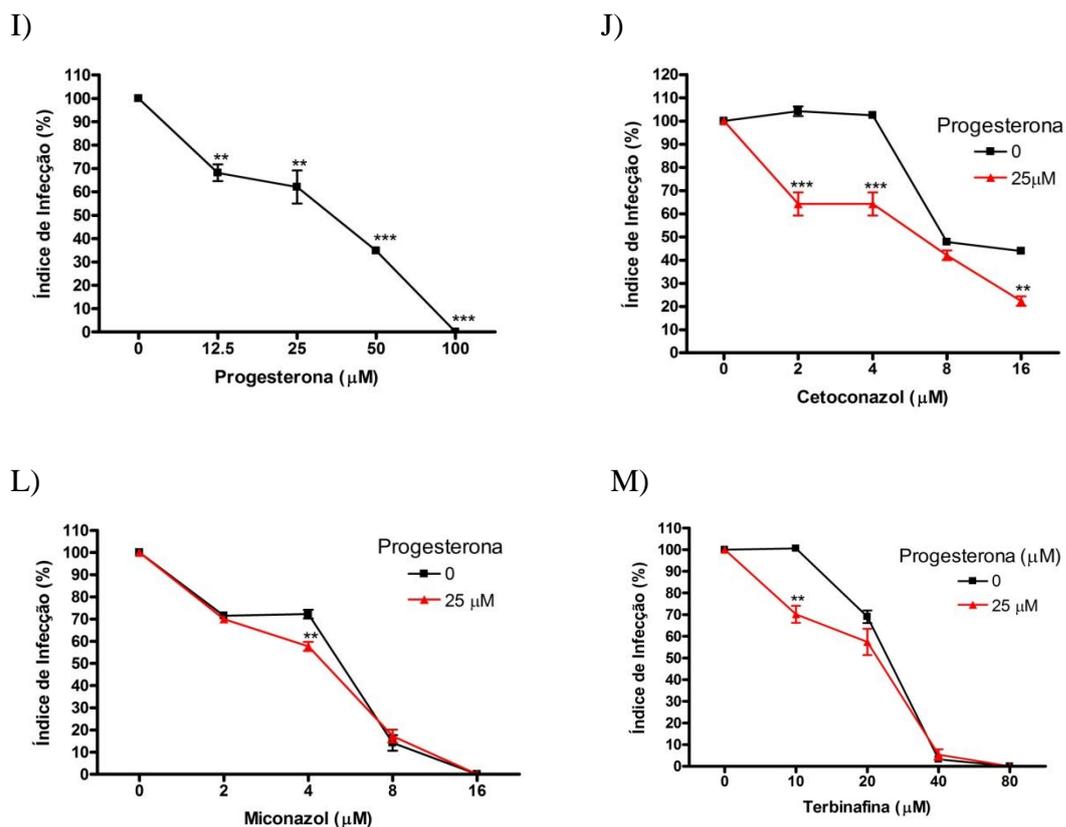


G)



H)





**Figura 12: Atividade leishmanicida dos inibidores em amastigotas intracelulares.**

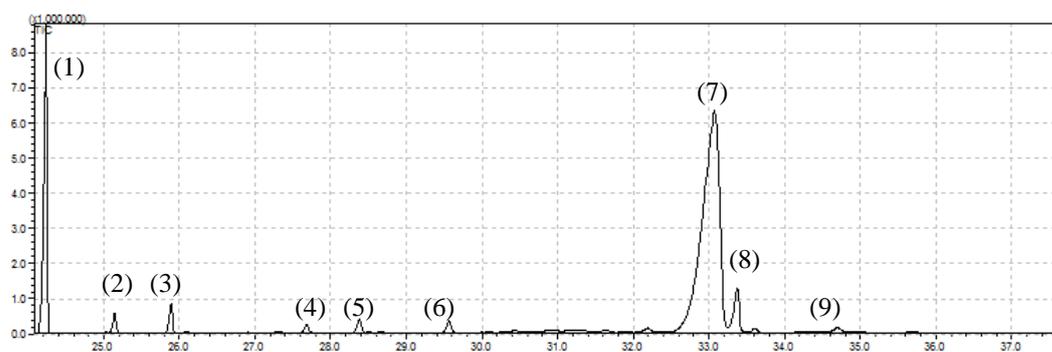
Macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis* não tratados ou tratados com os inibidores da utilização de colesterol e inibidores da biossíntese de esteróis foram incubados por 72 horas a 37°C. Após a incubação, as células foram fixadas e coradas. O índice de infecção foi calculado através da fórmula: % MØ infectados x N° de amastigotas / N° MØ totais. (A) LBqT01, (B) 20 μM LBqT01 + cetoconazol, (C) 20 μM LBqT01 + miconazol, (D) 20 μM LBqT01 + terbinafina, (E) imipramina, (F) 12,5 μM imipramina + cetoconazol, (G) 12,5 μM imipramina + miconazol, (H) 12,5 μM imipramina + terbinafina, (I) progesterona, (J) 25 μM progesterona + cetoconazol, (L) 25 μM progesterona + miconazol, (M) 25 μM progesterona + terbinafina. Os experimentos foram realizados em triplicatas, n=3. Os gráficos são representativos de um experimento, com o valor do desvio padrão. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

#### 4.5- Alteração no perfil de esteróis dos parasitos tratados com os inibidores da biossíntese do ergosterol e inibidores da utilização do colesterol

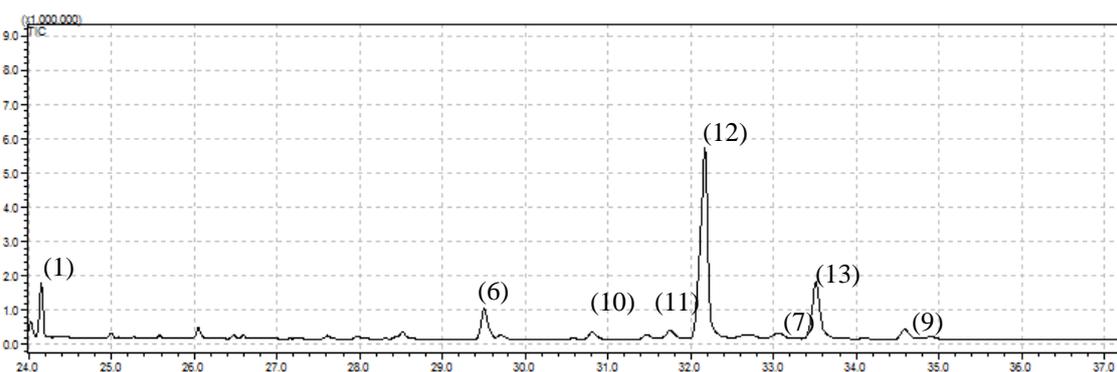
A análise da alteração do conteúdo de esteróis provocado por inibidores da biossíntese do ergosterol (miconazol, cetoconazol e terbinafina) e inibidores da utilização do colesterol (LBqT01, progesterona e imipramina) em promastigotas de *L. amazonensis* foi avaliada por cromatografia gasosa acoplada ao espectômetro de massas (CG-MS). Na Figura 13 (painel A à painel O) podemos observar o perfil cromatográfico dos esteróis dos parasitos tratados com diferentes concentrações dos fármacos descritos. É importante notar que a concentração de cada esterol na amostra é diretamente

proporcional a área do seu respectivo sinal. Dessa forma, uma análise mostrando a quantidade relativa percentual de cada esteroide foi realizada através da integração da área dos picos. Tabela 5.

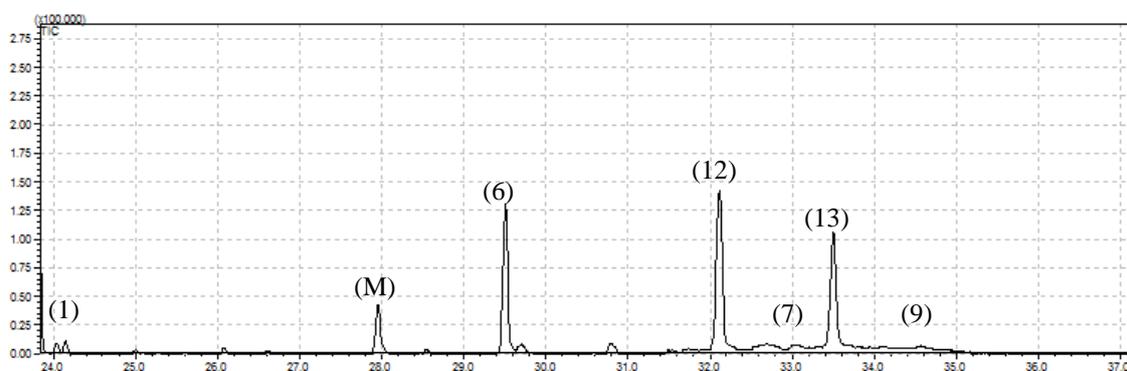
### A) Controle (C):



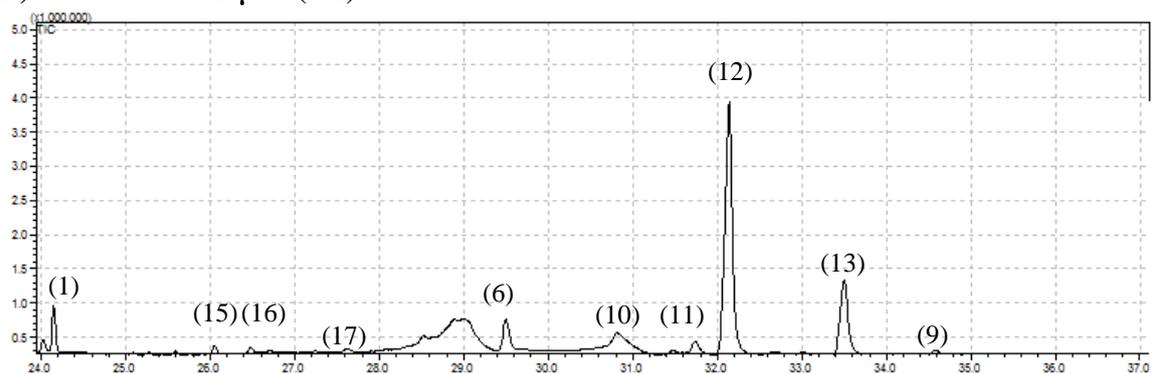
### B) Miconazol 2 $\mu$ M (M2)



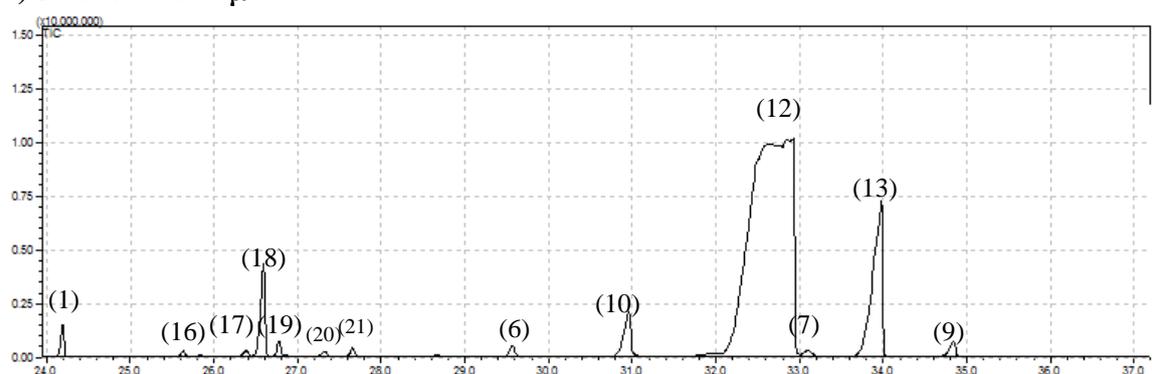
### C) Miconazol 8 $\mu$ M (M8)



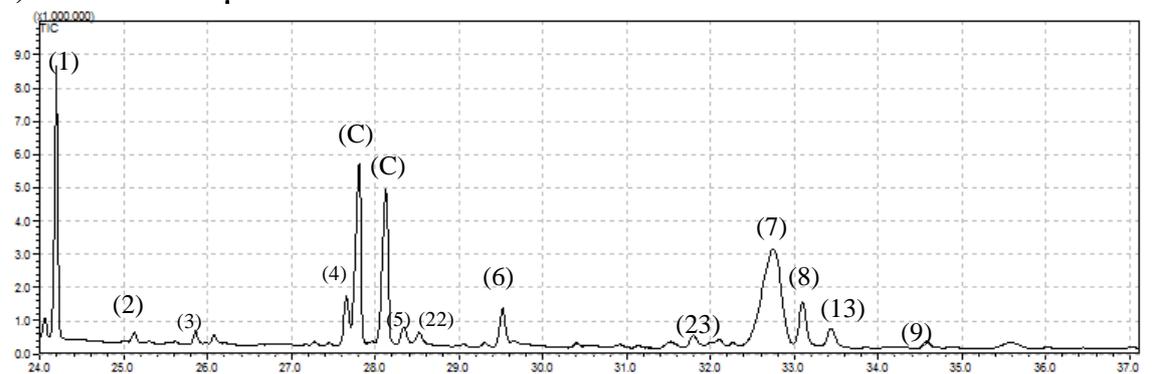
**D) Cetoconazol 2  $\mu$ M (C2)**



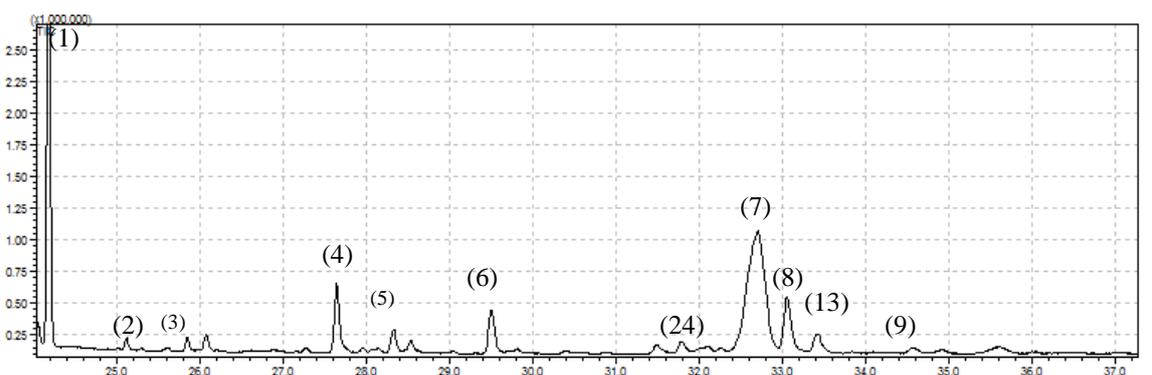
**E) Cetoconazol 8  $\mu$ M**



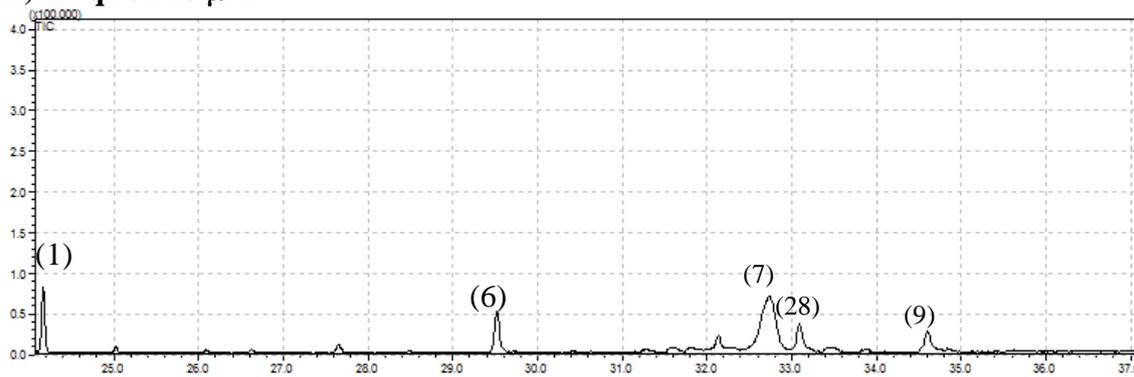
**F) Terbinafina 4  $\mu$ M**



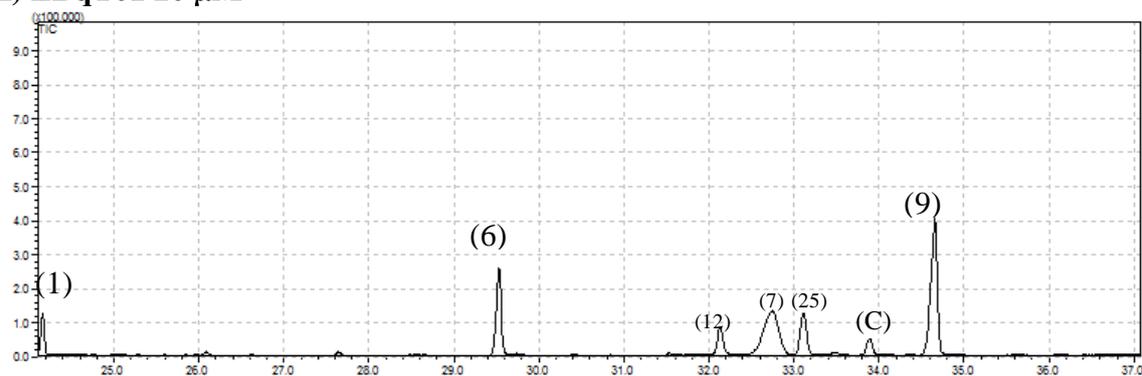
**G) Terbinafina 8  $\mu$ M**



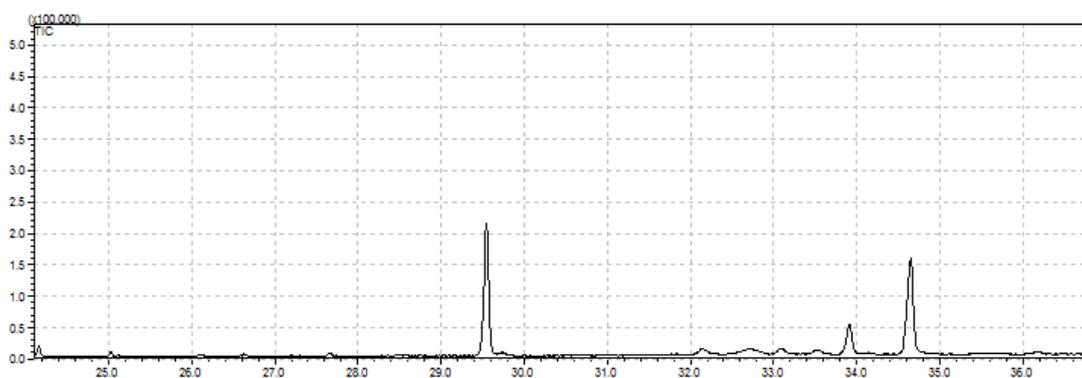
**H) LBqT01 10  $\mu$ M**



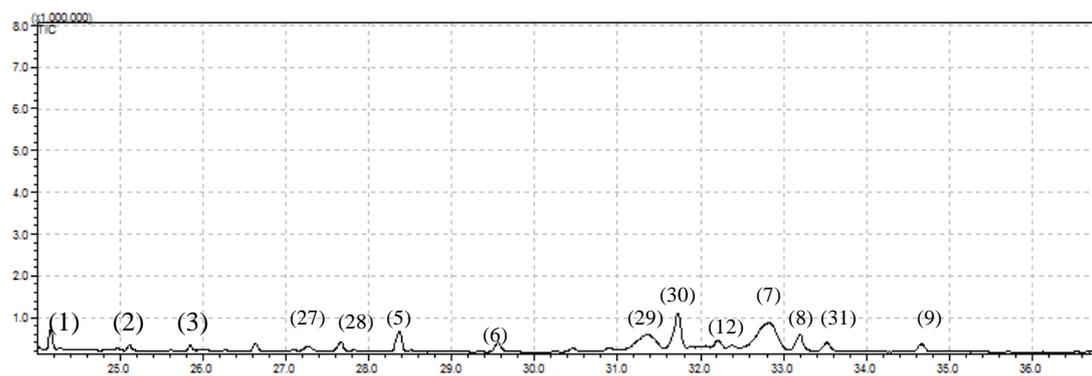
**I) LBqT01 20  $\mu$ M**



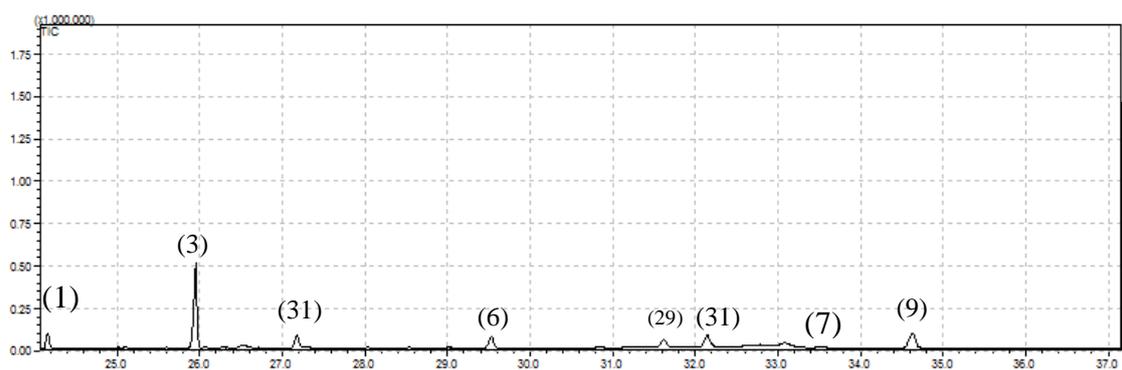
**J) LBqT01 40  $\mu$ M**



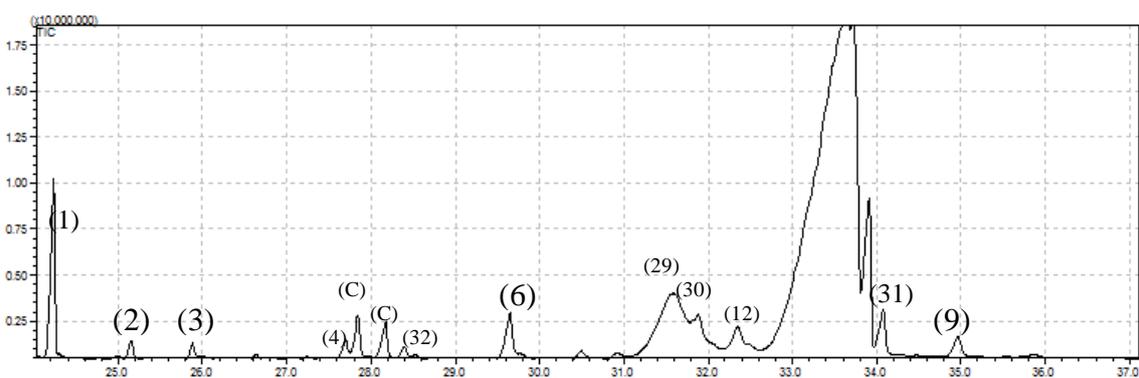
**L) Progesterona 10  $\mu$ M**



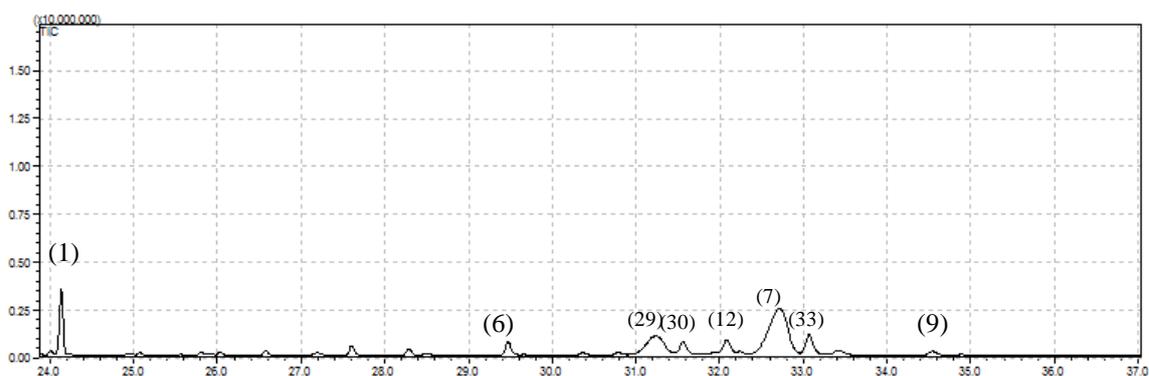
### M) Progesterona 20 $\mu\text{M}$



### N) Imipramina 4 $\mu\text{M}$



### O) Imipramina 8 $\mu\text{M}$



**Figura 13: Efeito dos inibidores da biossíntese do ergosterol e dos inibidores da utilização do colesterol sobre o perfil de esteróis de *L. amazonensis*.** Promastigotas de *L. amazonensis* foram crescidas com 10, 20 e 40  $\mu\text{M}$  de LBqT01, 10 e 20  $\mu\text{M}$  de progesterona, com 2 e 8  $\mu\text{M}$  de miconazol, 2 e 8  $\mu\text{M}$  de cetoconazol e com 4 e 8  $\mu\text{M}$  de terbinafina, 4 e 8  $\mu\text{M}$  de imipramina ou somente meio de cultura por 72 horas. Os lipídeos neutros foram extraídos e analisados por GC-MS. Legenda: (M) miconazol; (C) contaminantes do solvente.

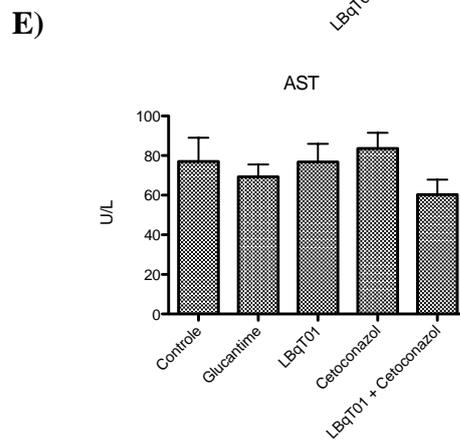
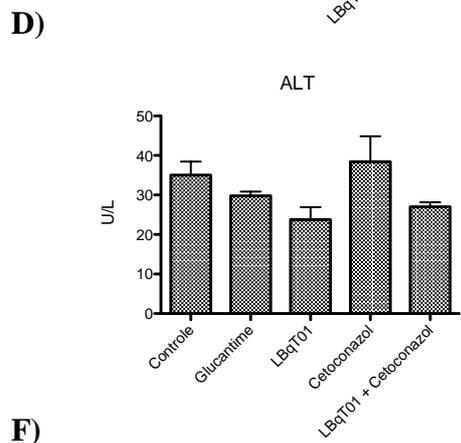
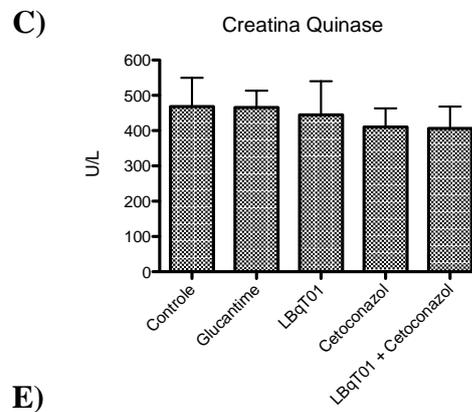
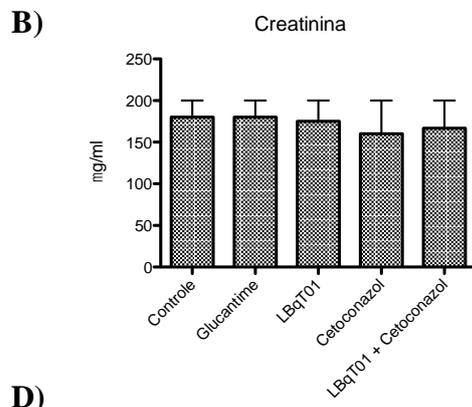
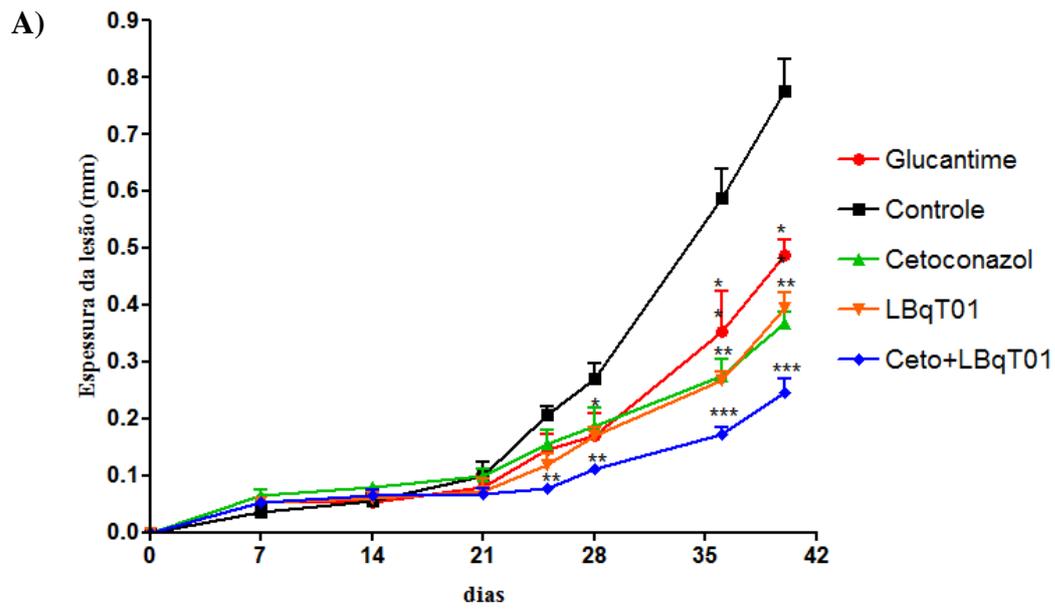
**Tabela 5:** Análise do efeito dos inibidores da biossíntese de ergosterol e dos inibidores da utilização de colesterol exógeno no perfil de esteróis de *L. amazonensis*

| Substância   | PM  | C                       | M2    | M8    | C2    | C8    | T4   | T8   | L10   | L20   | L40   | P10   | P20   | I4    | I8    |
|--|-----|-------------------------|-------|-------|-------|-------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|  |     | Quantidade Relativa (%) |       |       |       |       |      |      |       |       |       |       |       |       |       |
| (1) Esqualeno  | 410 | 20,61                   | 6,89  | 0,5   | 4,12  | 0,82  | 25,7 | 28   | 7     | 5,47  | 2,02  | 4,43  | 6,79  | 7     | 12,22 |
| (2) Ergosta-5,8,22-trien-3 $\beta$ -ol   | 396 | 1,28                    | -     | -     | -     | -     | 0,87 | 0,85 | -     | -     | -     | 1,29  | -     | 0,44  | -     |
| (3) Ergosta-4,7,22-trien-3 $\beta$ -ol   | 396 | 1,79                    | -     | -     | -     | -     | 1,28 | 1,02 | -     | -     | -     | 1,29  | 47,17 | 0,38  | -     |
| (4) Desconhecido   | 376 | 0,55                    | -     | -     | -     | -     | 4,36 | 7,47 | -     | -     | -     | -     | -     | 0,42  | -     |
| (5) Ergosta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol (24 desidropisterol)                                  | 396 | 1,01                    | -     | -     | -     | -     | 1,76 | 2,17 | -     | -     | -     | 6,54  | -     | -     | -     |
| (6) Colesterol   | 386 | 0,95                    | 7,87  | 27,59 | 4,71  | 0,51  | 5,74 | 5,12 | 16,85 | 17,58 | 45,86 | 3,24  | 8,98  | 1,72  | 4,6   |
| (7) Ergosta-5,7,24-trien-3 $\beta$ -ol (desidropisterol)                                 | 396 | 69,76                   | 3,27  | 2,11  | -     | -     | 46,8 | 40,9 | 53,74 | 25,46 | 1,01  | 31,24 | -     | 82,05 | 46,63 |
| (8) Ergosta-7,24-dien-3 $\beta$ -ol (Episterol)  | 398 | 3,81                    | -     | -     | -     | -     | 6,69 | 7,12 | -     | -     | -     | 6,56  | -     | -     | -     |
| (9) Lanosterol   | 426 | 0,24                    | 3,06  | 0,2   | 0,97  | 0,74  | 0,96 | 0,84 | 8,26  | 35,08 | 38,1  | 2,84  | 13,85 | 0,78  | 1,81  |
| (10) Ergosta-5,24 (28)-dien-3 $\beta$ -ol  | 398 | -                       | 1,94  | -     | 5,1   | 2,37  | -    | -    | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| (11) Estigmasta-4,7,22-trien-3 $\alpha$ -ol  | 410 | -                       | 1,68  | -     | 1,35  | -     | -    | -    | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| (12) 14 $\alpha$ -metilergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol                               | 412 | -                       | 52,41 | 36,48 | 50,85 | 78,16 | -    | -    | -     | 6,15  | -     | 2,7   | -     | 0,85  | -     |
| (13) 4 $\alpha$ -14 $\alpha$ -dimetilergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol, (obtusifoliol) | 426 | -                       | 17,88 | 24,5  | 15,31 | 12,68 | 3,55 | 2,61 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| (14) Estigmasta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol   | 412 | -                       | -     | -     | -     | -     | -    | -    | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| (15) Desconhecido  | 365 | -                       | -     | -     | 0,68  | -     | -    | -    | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| (16) Ergosta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol   | 380 | -                       | -     | -     | -     | 0,15  | -    | -    | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| (17) Colesta-8,24-dien-3 $\beta$ -ol (Zimosterol)  | 398 | -                       | -     | -     | -     | 0,18  | -    | -    | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| (18) Estigmasta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol   | 412 | -                       | -     | -     | -     | 3,36  | -    | -    | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| (19) Estigmasta 5,7,24-trien-3 $\beta$ -ol   | 412 | -                       | -     | -     | -     | 0,43  | -    | -    | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| (20) Não identificado  | 410 | -                       | -     | -     | -     | 0,12  | -    | -    | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| (21) Não identificado  | 398 | -                       | -     | -     | -     | 0,25  | -    | -    | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| (22) Não identificado  | 503 | -                       | -     | -     | -     | -     | 0,9  | -    | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| (23) Não identificado  | 394 | -                       | -     | -     | -     | -     | 1,4  | -    | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| (24) Não identificado  | 394 | -                       | -     | -     | -     | -     | -    | 1,41 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| (25) 26,26-dimetil-5,23-ergostadieno   | 426 | -                       | -     | -     | -     | -     | -    | -    | 1,28  | 10,26 | 0,4   | -     | -     | -     | -     |
| (26) 4-metilcolesta-8,24-dien-3 $\beta$ -ol  | 398 | -                       | -     | -     | -     | -     | -    | -    | -     | -     | 0,5   | -     | -     | -     | -     |
| (27) Não identificado  | 398 | -                       | -     | -     | -     | -     | -    | -    | -     | -     | -     | 1,48  | -     | -     | -     |
| (28) Não identificado  | 376 | -                       | -     | -     | -     | -     | -    | -    | -     | -     | -     | 2,75  | -     | -     | -     |
| (29) Esterol dimetilado  | 382 | -                       | -     | -     | -     | -     | -    | -    | -     | -     | -     | 14,78 | 5,97  | 4,75  | 16,24 |
| (30) Colesta-5,24-dien-3 $\beta$ -ol (Desmosterol)                                       | 384 | -                       | -     | -     | -     | -     | -    | -    | -     | -     | -     | 15,77 | -     | 0,51  | 4,09  |
| (31) Não identificado  | 380 | -                       | -     | -     | -     | -     | -    | -    | -     | -     | -     | 3,33  | 9,26  | 1,36  | -     |
| (32) Não identificado  | 406 | -                       | -     | -     | -     | -     | -    | -    | -     | -     | -     | -     | -     | 0,28  | -     |
| (33) Não identificado  | 412 | -                       | -     | -     | -     | -     | -    | -    | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 7,8   |

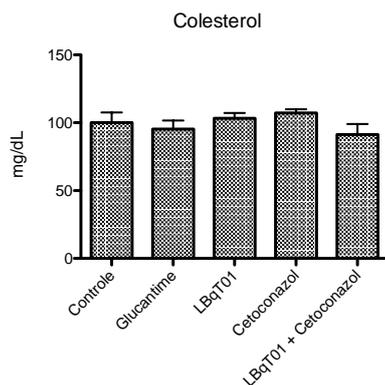
#### **4.6- Atividade leishmanicida *in vivo* da associação de inibidor do biossintese do ergosterol com um inibidor do transporte do colesterol exógeno.**

Para os testes *in vivo* foram selecionados a LBqT01 e o cetoconazol que apresentaram excelente atividade antipromastigota e antiamastigota *in vitro*, e não apresentaram toxicidade em macrófagos peritoneais sozinhos ou associados. Como podemos ver na Figura 14A, o tratamento oral com cetoconazol ou LBqT01 individualmente foi capaz de controlar o desenvolvimento da lesão de forma semelhante. Quando os fármacos foram associados, o desenvolvimento da lesão foi controlado de forma mais eficaz, sugerindo um efeito sinérgico.

Além do controle do desenvolvimento da lesão, não foi observada nenhuma diferença significativa nos níveis séricos das enzimas ALT, AST, creatinina e creatina quinase nos animais tratados e não tratados, mostrando que o tratamento não foi tóxico para o hospedeiro. O colesterol também foi dosado e também não apresentou nenhuma alteração significativa (Figs. 14B-F).



**F)**



**Figura 14: Atividade Leishmanicida *in vivo* do tratamento oral do cetoconazol em associação com LBqT01.** Camundongos BALB/c (5/grupo) foram infectados na orelha direita com  $2 \times 10^6$  promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária e os animais foram tratados com LBqT01 (10 mg/kg/dia), cetoconazol (100mg/kg/dia), antimoníato de meglumina (100mg/kg/dia) e a combinação de LBqT01+cetoconazol (10 mg/kg/dia + 100mg/kg/dia). Os animais foram tratados 5 dias por semana por um período de 33 dias. Controles negativos também foram similarmente tratados com PBS. A - Desenvolvimento da lesão durante o tratamento. B-F - Avaliação bioquímica da toxicidade do tratamento, conforme os parâmetros indicados. ALT - Alalina aminotransferase; AST - aspartate aminotransferase. Teste *t* student, \* $p < 0,5$ , \*\* $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao grupo controle.

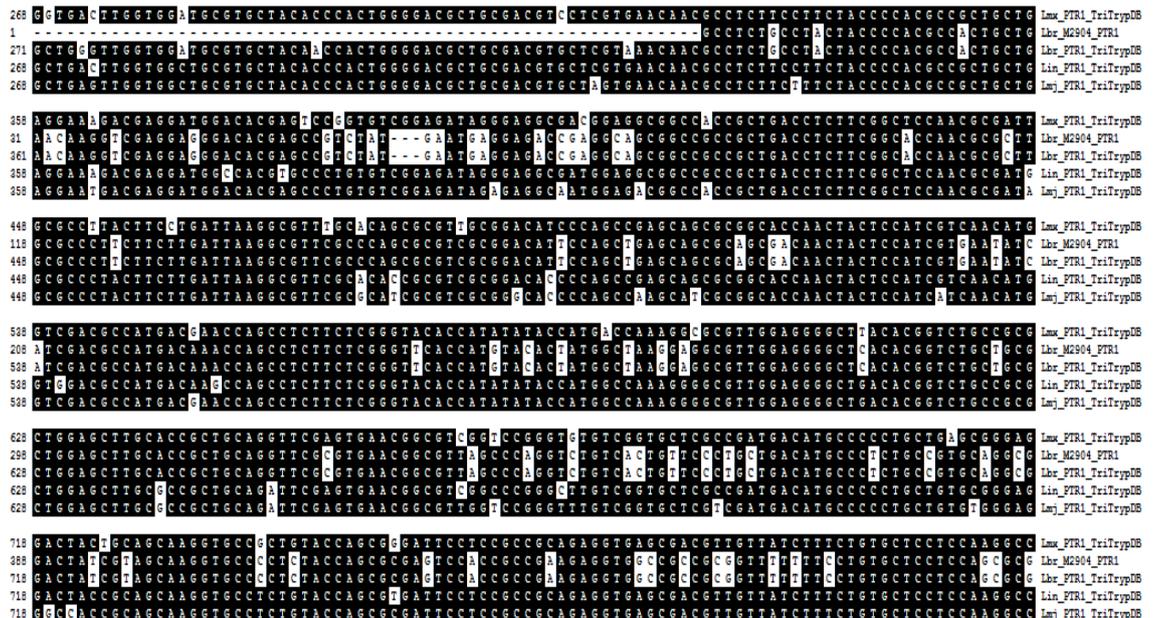
## **CAPÍTULO 2:**

**Avaliação do papel do colesterol exógeno e da expressão gênica relacionada a resistência aos inibidores da biossíntese de ergosterol**

#### 4.7- Caracterização das espécies de *L. braziliensis* (M2904), *L. amazonensis* (LTB0016) e *L. guyanensis* (M4147)

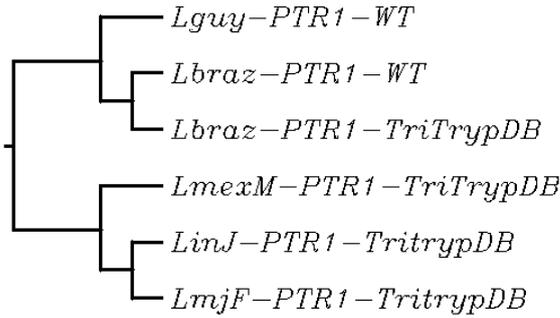
Para avaliar a relação do colesterol exógeno com o metabolismo de esteróis endógenos, cepas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* resistentes aos inibidores da biossíntese do ergosterol (miconazol, terbinafina e sinvastatina), foram induzidas por pressão farmacológica.

Antes de iniciar os estudos de resistência e expressão gênica, porém, uma análise filogenética foi realizada para confirmar a identificação de cada espécie. Para a caracterização das cepas de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* (selvagem) (Figs. 15 a 18), foi analisado o gene da pteridina redutase (PTR1) e para *L. amazonensis* (selvagem, sem colesterol e resistentes ao miconazol, terbinafina ou sinvastatina) (Fig. 19 e 20) foi analisado o gene da diidrofolato redutase-timidilato sintase (DHFR-TS). Para confirmar a identificação, as sequências desses genes devem ter 100% de homologia quando comparadas com as sequências correspondentes no GeneBank Database. A análise da caracterização mostrou que as espécies estudadas estão corretas.

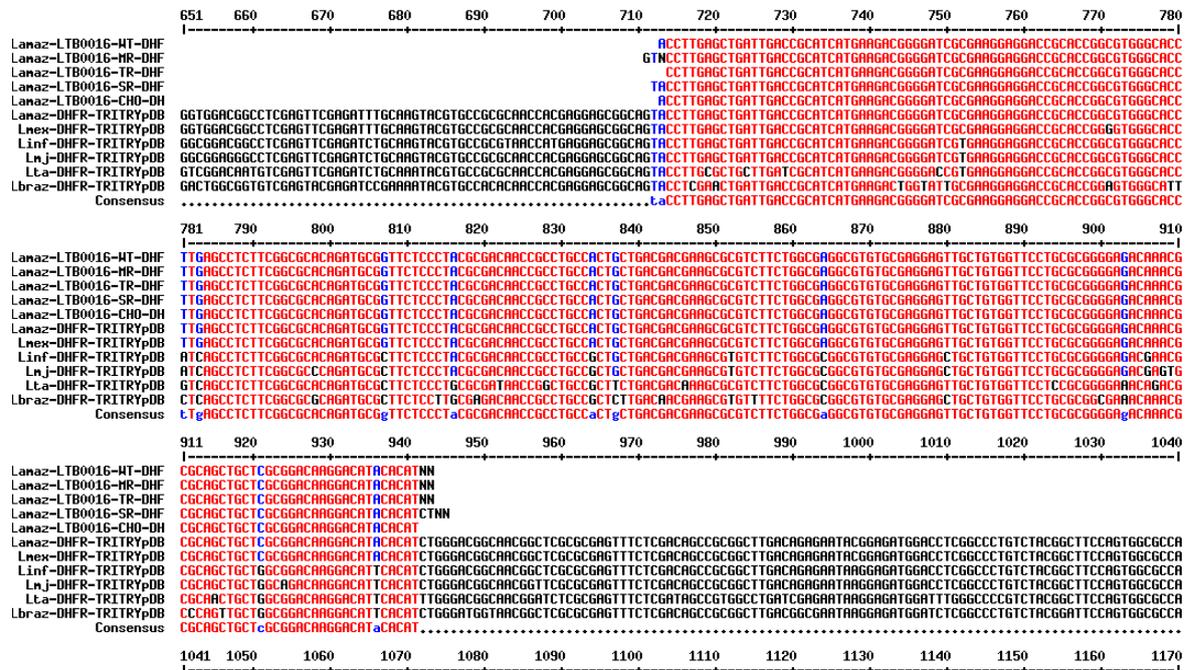


**Figura 15:** Alinhamento das sequências do gene PTR1 de *L. braziliensis* MHOM/BR/1975/M2904 selvagem. O DNA genômico foi isolado de promastigotas de *L. braziliensis* na fase log de crescimento, usando o reagente DNAzol (invitrogen), como descrito pelo fabricante. Reação de PCR foi realizada usando iniciadores direto e inverso do gene PTR1 de *L. braziliensis*. A sequência de PTR1 obtida de *L. braziliensis* foi alinhada com sequências de outras espécies (*L. major*, *L. mexicana*, *L. infantum*)

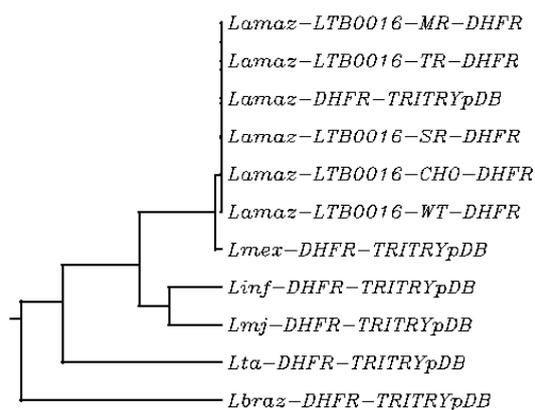




**Figura 18: Análise Filogenética da sequência de PTR1 de *L. guyanensis* MHOM/BR/1975/M4147 selvagem.** As sequências de PTR1 de *L. guyanensis* foram comparadas com as sequências de PTR1 de *L. infantum*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, depositadas no GenBank Database (TriTrypDB).



**Figura 19: Alinhamento das sequências do gene DHFR-TS de *L. amazonensis* MHOM/BR/77/LTB0016 selvagem, resistentes (miconazol, terbinafina e sinvastatina) e sem colesterol.** O DNA gênomico foi isolado de promastigotas de *L. amazonensis* selvagem, resistentes e sem colesterol na fase log de crescimento, usando o reagente DNazol (invitrogen), como descrito pelo fabricante. A reação de PCR foi realizada usando iniciadores direto e inverso do gene DHFR-TS de *L. mexicana*. A sequência de DHFR-TS obtida de *L. amazonensis* foi alinhada com sequências de outras espécies (*L. major*, *L. mexicana*, *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. tarentolae*) depositadas no GeneBank Database (TriTrypDB), usando o programa DNASTAR. Lamaz-LTB0016-WT-DHF (sequência da DHFR-TS de *L. amazonensis* selvagem), Lamaz-LTB0016-MR-DHF (sequência da DHFR-TS de *L. amazonensis* resistente ao miconazol), Lamaz-LTB0016-TR-DHF (sequência da DHFR-TS de *L. amazonensis* resistente a terbinafina), Lamaz-LTB0016-SR-DHF (sequência da DHFR-TS de *L. amazonensis* resistente a sinvastatina), Lamaz-LTB0016-CHO-DHF (sequência da DHFR-TS de *L. amazonensis* cultivada sem colesterol), Lamaz-DHFR-TriTrypDB (sequência da DHFR-TS, GeneBank Database), Lmex-DHFR-TriTrypDB (sequência da DHFR-TS de *L. mexicana*, GeneBank Database), Linf-DHFR-TriTrypDB (sequência da DHFR-TS de *L. infantum*, GeneBank Database), Lmj-DHFR-TriTrypDB (sequência da DHFR-TS de *L. major*, GeneBank Database), Lta-DHFR-TriTrypDB (sequência da gene DHFR-TS de *L. tarentolae*, GeneBank Database), Lbr-DHFR-TriTrypDB (sequência da DHFR-TS de *L. braziliensis*, GeneBank Database).



**Figura 20:** Análise Filogenética da sequência de DHFR-TS de *L. amazonensis* MHOM/BR/77//LTB0016 selvagem, resistentes (miconazol, terbinafina e sinvastatina) e sem colesterol. As sequências de DHFR-TS de *L. amazonensis* das cepas selvagens, resistentes e sem colesterol foram comparadas com as sequências de DHFR-TS de *L. amazonensis*, *L. infantum*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. tarentolae*, *L. braziliensis*, depositadas no GenBank Database (TriTrypDB).

#### 4.8- Indução de resistência aos inibidores da biossíntese de ergosterol em promastigotas de *L. amazonenses*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*.

Para iniciar a indução de resistência, experimentos foram realizados para determinar os valores de IC<sub>50</sub> dos inibidores da biossíntese do ergosterol nas cepas selvagens. A concentração utilizada para iniciar a seleção das cepas resistentes foi a IC<sub>50</sub> de cada inibidor (miconazol 2,7 µM, terbinafina 16,33 µM e sinvastatina 24 µM para *L. amazonensis*, terbinafina 9 µM para *L. braziliensis* e ; miconazol 1,9 µM e sinvastatina 30 µM para *L. guyanensis*). Na Tabela 6 podemos ver a concentração máxima atingida na indução de resistência a cada inibidor. As cepas resistentes selecionadas foram as seguintes: *Leishmania amazonensis* resistente ao miconazol (MicoRes016), *Leishmania amazonensis* resistente a terbinafina (TerbRes0100), *Leishmania amazonensis* resistente a sinvastatina (SimvRes0100), *Leishmania braziliensis* resistente a terbinafina (TerbRes060) e *Leishmania guyanensis* resistente ao miconazol (MicoRes012) e *L. guyanensis* resistente a sinvastatina (SimvRes080).

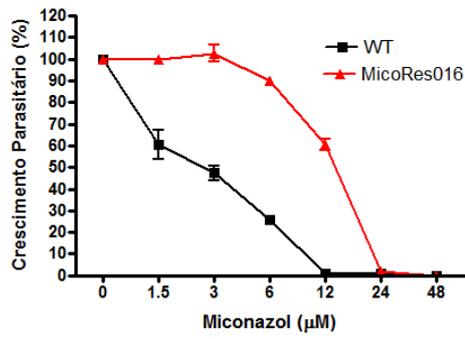
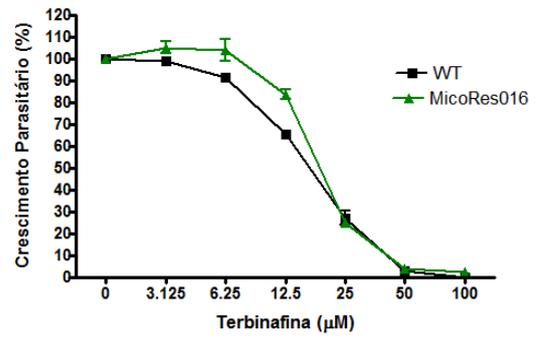
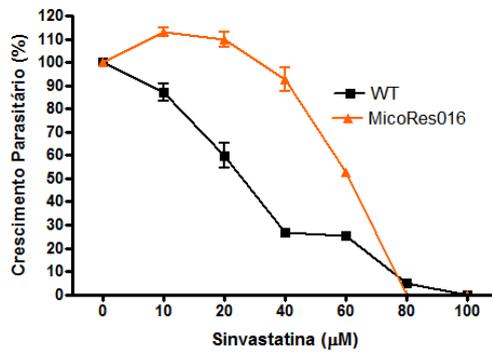
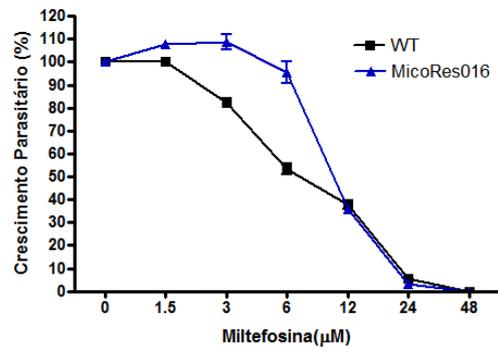
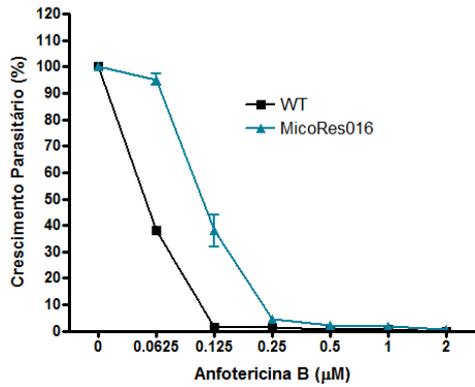
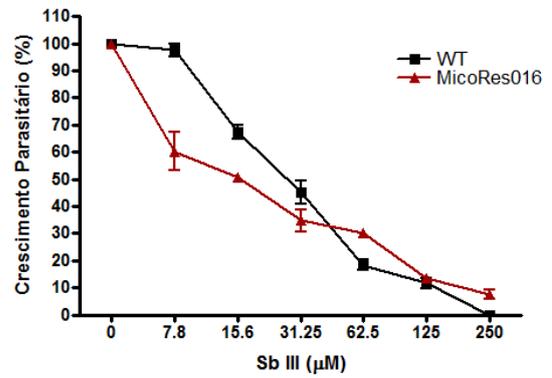
**Tabela 6 : Concentração máxima ( $\mu\text{M}$ ) utilizada na indução de resistência aos inibidores da biossíntese do ergosterol**

|              | <i>L. amazonensis</i> | <i>L. braziliensis</i> | <i>L. guyanensis</i> |
|--------------|-----------------------|------------------------|----------------------|
| Miconazol    | 16                    | 12                     | -                    |
| Terbinafina  | 100                   | 60                     | -                    |
| Sinvastatina | 100                   | -                      | 80                   |

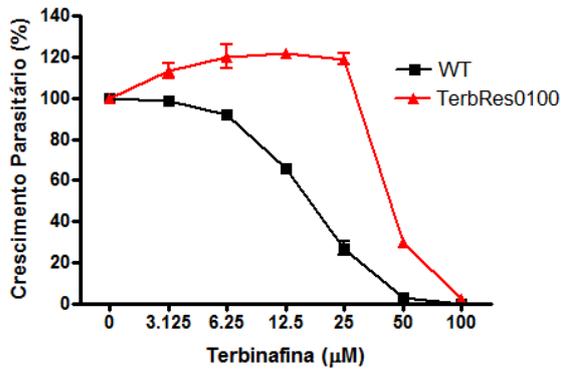
#### **4.9- Atividade leishmanicida dos inibidores da biossíntese de ergosterol em promastigotas de *L. amazonensis* selvagem e resistentes.**

Após a obtenção das cepas resistentes, a atividade antileishmania dos inibidores da biossíntese do ergosterol (miconazol, terbinafina e sinvastatina) foi avaliada nos parasitos resistentes. As cepas resistentes MicoRes016, TerbRes0100 e SimvRes0100 apresentaram  $\text{IC}_{50}$  de 20  $\mu\text{M}$ , 45  $\mu\text{M}$  e 77  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Tabela 7).

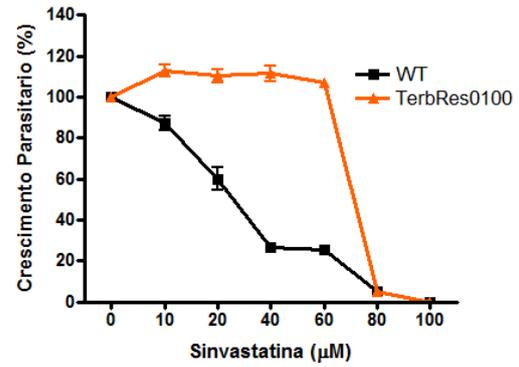
Experimentos de resistência cruzada com fármacos que possuem outros mecanismos de ação foram realizados (miltefosina, anfotericina B e antimônio III (SbIII) (Fig. 21 A-S). As cepas resistentes ao miconazol (MicoRes016) apresentaram resistência cruzada à sinvastatina e anfotericina B e ficaram mais sensíveis ao tratamento com SbIII. As cepas resistentes à terbinafina (TerbRes0100) apresentaram resistência cruzada ao miconazol, sinvastatina, anfotericina B e SbIII e as cepas resistentes à sinvastatina tiveram resistência cruzada à terbinafina, miltefosina, anfotericina B, SbIII e miconazol (Tabela 7).

**A****B****C****D****E****F**

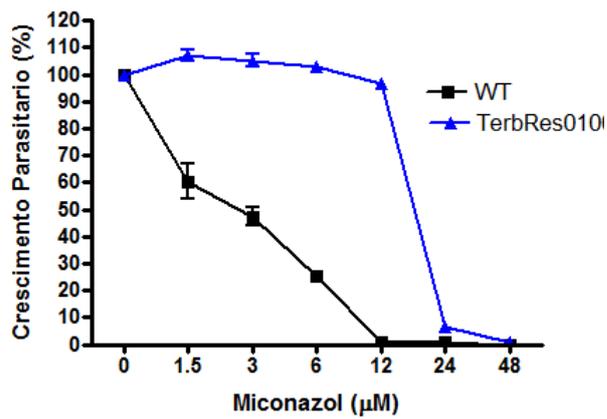
G)



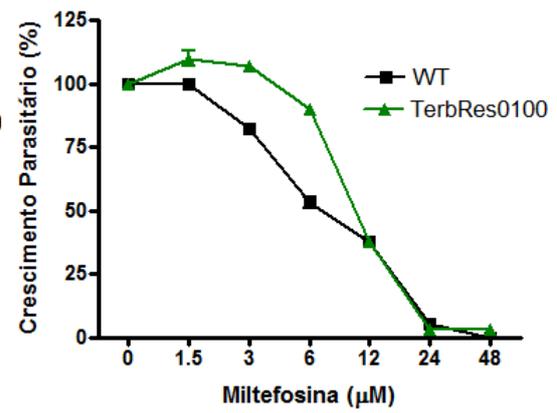
H)



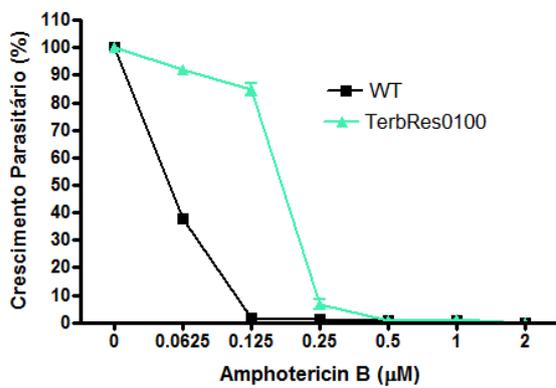
I)



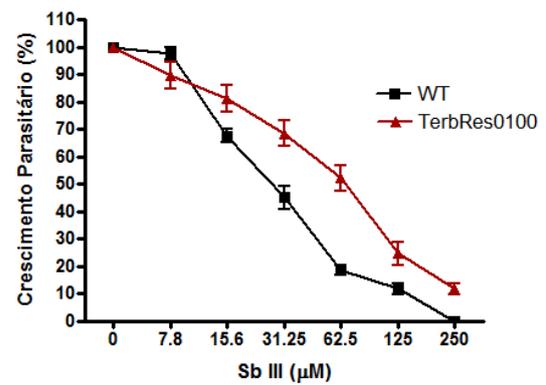
J)

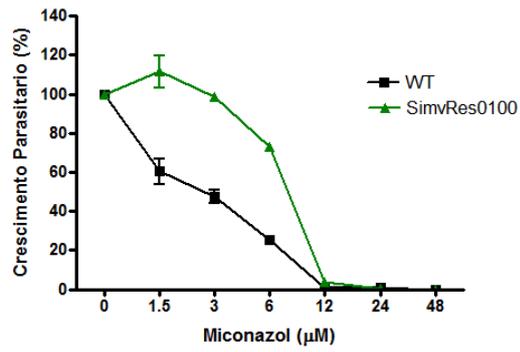
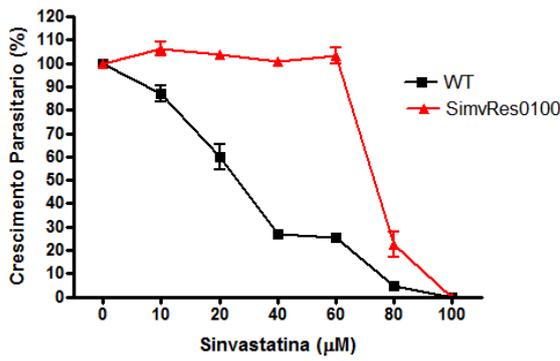


L)

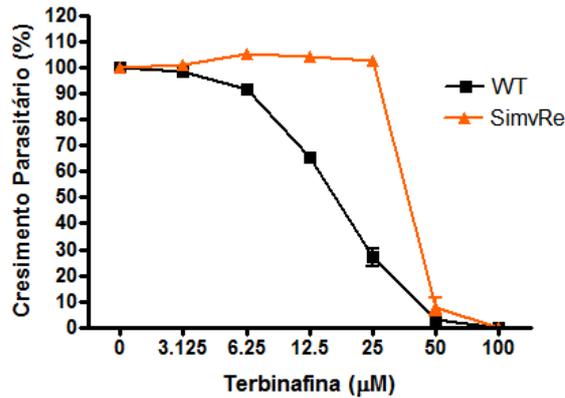


M)

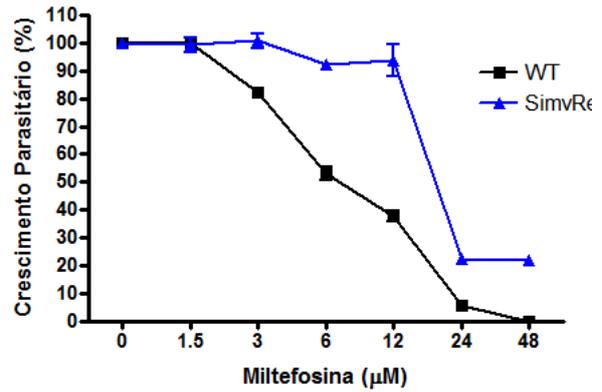




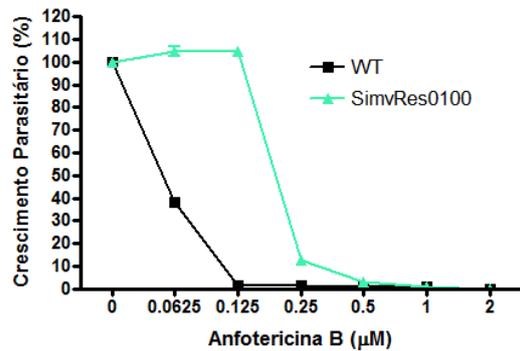
P)



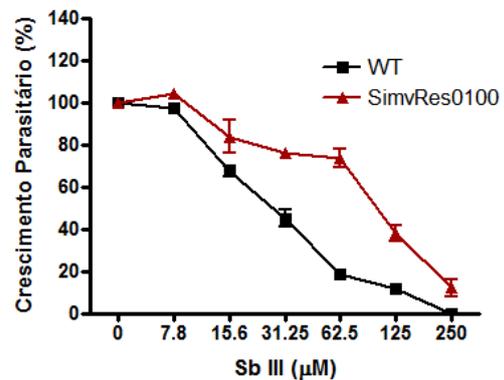
Q)



R)



S)



**Figura 21: Atividade leishmanicida do miconazol, terbinafina, simvastatina, miltefosina, anfotericina B e antimônio III nas cepas de *L. amazonensis* selvagens e resistentes aos inibidores da biossíntese do ergosterol.** Promastigotas de *L. amazonensis* selvagens e resistentes aos inibidores da biossíntese do ergosterol foram incubadas com diversas concentrações de miconazol, terbinafina, simvastatina, miltefosina, anfotericina B e antimônio III por 96 horas a 26°C, em placa de 24 poços. Após o período de incubação a densidade óptica (D.O) foi medida com a utilização de um espectrofotômetro. Os experimentos foram realizados em triplicata.

**Tabela 7: Valores de IC<sub>50</sub> das cepas de *L. amazonensis* selvagens e resistentes aos inibidores da biossíntese do ergosterol.**

|                     | Lamaz WT | Lamaz MicoRes 016 | Lamaz TerbRes 0100 | Lamaz SimvRes 100 |
|---------------------|----------|-------------------|--------------------|-------------------|
| Miconazol (μM)      | 2,7      | 20                | 17,7               | 7                 |
| Terbinafina (μM)    | 16,33    | 19,06             | 45                 | 45                |
| Sinvastatina (μM)   | 24       | 60,37             | 76                 | 77                |
| Miltefosina (μM)    | 7        | 10,72             | 10,62              | 19,13             |
| Anfotericina B (μM) | 0,0625   | 0,8               | 0,2                | 0,2               |
| Sb III (μM)         | 27,85    | 16,74             | 57,16              | 93,48             |

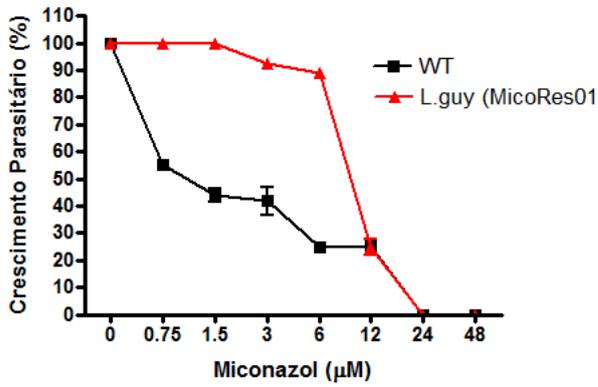
As cores destacam a ocorrência de resistência cruzada

#### 4.10- Atividade leishmanicida dos inibidores da biossíntese de ergosterol em promastigotas de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* resistentes e selvagens.

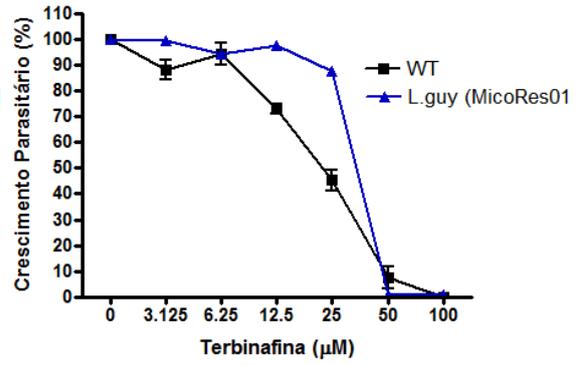
Após a obtenção de promastigotas de resistentes, a atividade leishmanicida dos inibidores da biossíntese do ergosterol (miconazol, terbinafina e sinvastatina) foi avaliada nos parasitos. As cepas de *L. braziliensis* resistentes MicoRes012 e TerbRes060 apresentaram IC<sub>50</sub> de 10 μM e 30μM e a cepa de *L. guyanensis* resistente SimvRes080 apresentou IC<sub>50</sub> de 70 μM (Tabelas 8 e 9).

Experimentos de resistência cruzada com fármacos que possuem outros mecanismos de ação também foram realizados (miltefosina, anfotericina B e antimônio III (SbIII) (Fig. 22 A-S). As cepas resistentes ao miconazol (MicoRes012) apresentaram resistência cruzada a todos os fármacos testados. A cepa resistente à terbinafina (TerbRes060) apresentou resistência cruzada somente à sinvastatina. A cepa de *L. guyanensis* resistente a sinvastatina apresentou resistência cruzada à anfotericina B, ao antimônio III e à miltefosina.

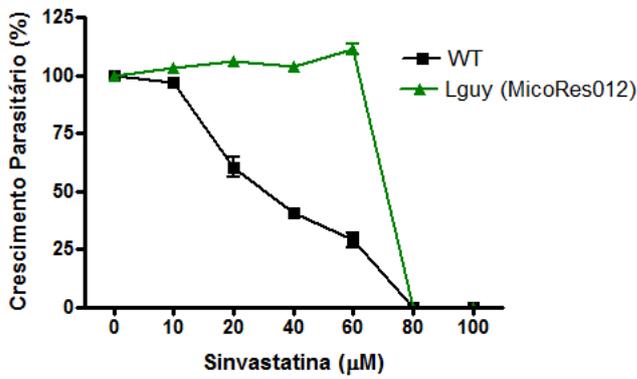
A)



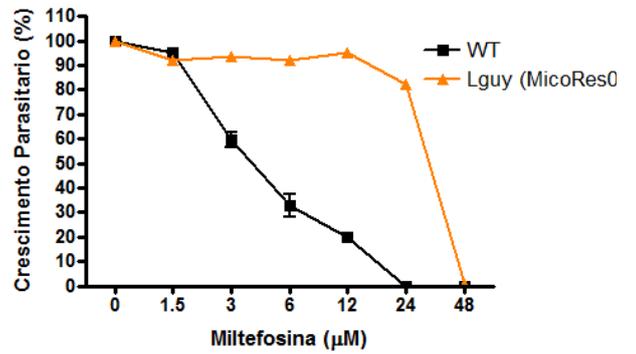
B)



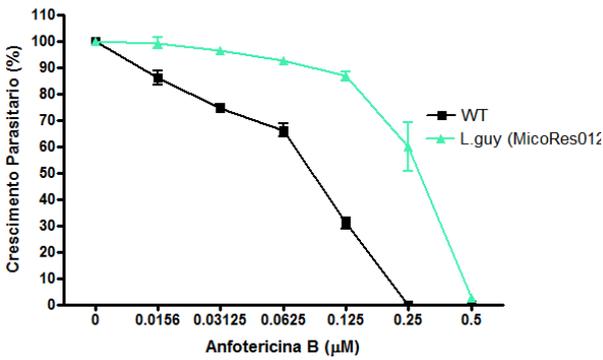
C)



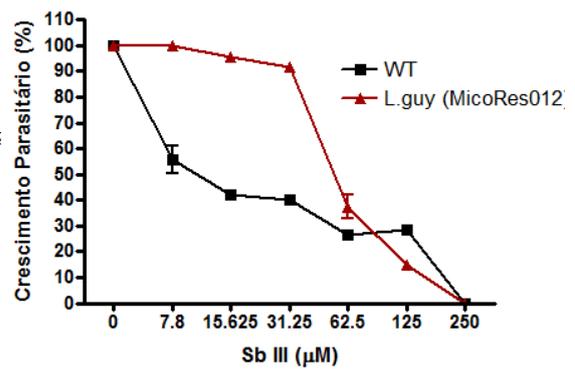
D)



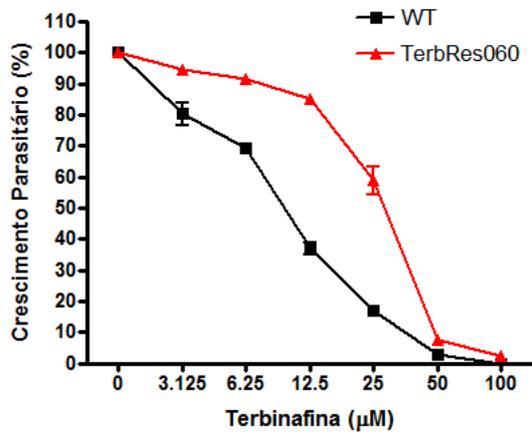
E)



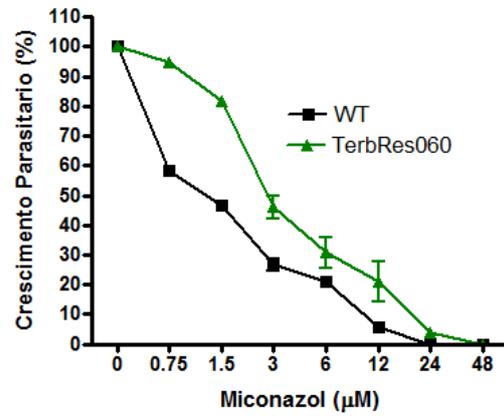
F)



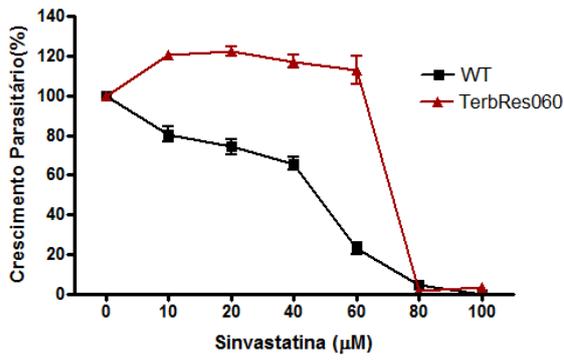
G)



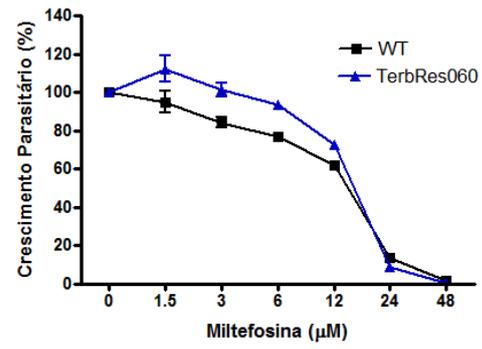
H)



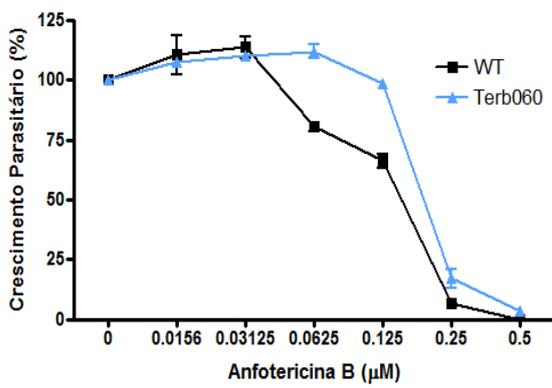
I)



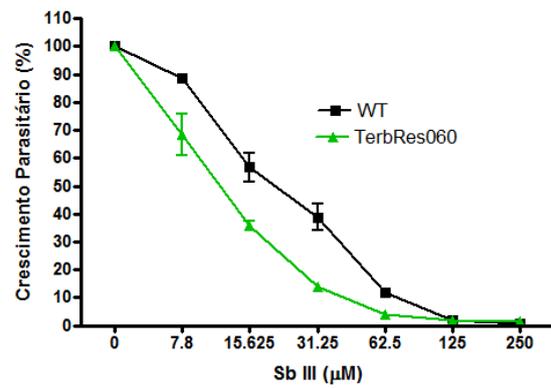
J)



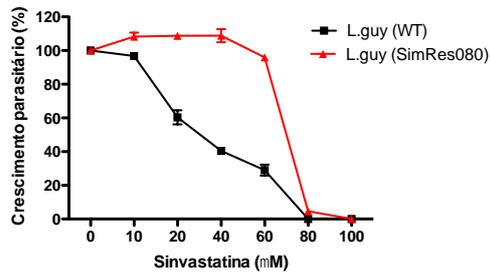
L)



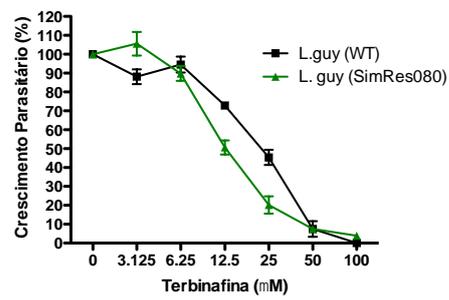
M)



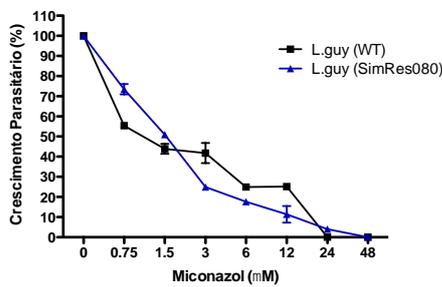
N)



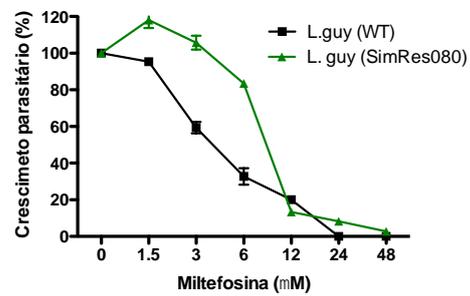
O)



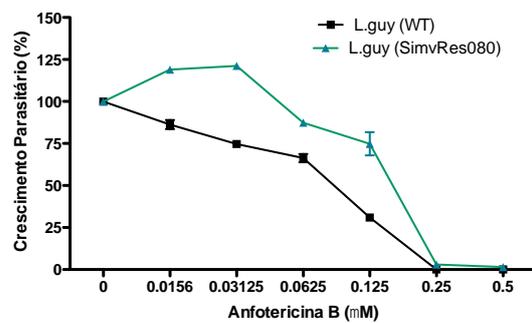
P)



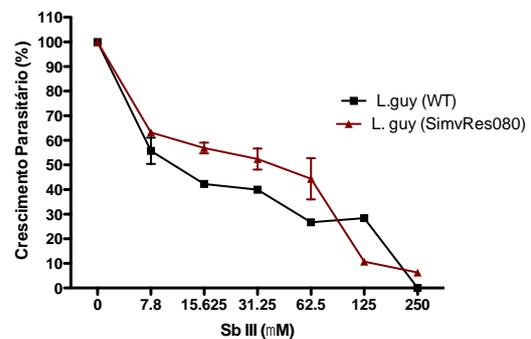
Q)



R)



S)



**Figura 22: Atividade leishmanicida de miconazol, terbinafina, simvastatina, miltefosina, anfotericina B e antimônio III nas cepas de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* selvagens e resistentes aos inibidores da biossíntese do ergosterol.** Promastigotas de *L. amazonensis* selvagens e resistentes aos inibidores da biossíntese do ergosterol foram incubadas com diversas concentrações de miconazol, terbinafina, simvastatina, miltefosina, anfotericina B e antimônio III por 96 horas a 26°C, em placa de 24 poços. Após o período de incubação a densidade óptica (D.O) foi medida com a utilização de um espectrofotômetro. Os experimentos foram realizados em triplicata. Legenda: A-F cepa de *L. guyanensis* resistente ao miconazol; G-M cepa de *L. braziliensis* resistente a terbinafina; N-S: cepa de *L. guyanensis* resistente a simvastatina.

**Tabela 8 : Valores de IC<sub>50</sub> das cepas de *L. braziliensis* selvagens e resistentes aos inibidores da biossíntese do ergosterol.**

|                    | Lbraz WT | Lbraz TerbRes 060 |
|--------------------|----------|-------------------|
| Miconazol (μM)     | 1,7      | 3,6               |
| Terbinafina(μM)    | 9        | 30                |
| Sinvastatina(μM)   | 40       | 76,42             |
| Miltefosina(μM)    | 11,7     | 14,7              |
| Anfotericina B(μM) | 0,2      | 0,2               |
| Sb III(μM)         | 21,4     | 11,64             |

As cores destacam a ocorrência de resistência cruzada

**Tabela 9: Valores de IC<sub>50</sub> das cepas de *L. guyanensis* selvagens e resistentes aos inibidores da biossíntese do ergosterol.**

|                    | Lguy WT | Lguy Mico 012 | Lguy SimRes 080 |
|--------------------|---------|---------------|-----------------|
| Miconazol (μM)     | 1,9     | 10            | 2               |
| Terbinafina(μM)    | 20,45   | 30            | 13,7            |
| Sinvastatina(μM)   | 30      | 70            | 75              |
| Miltefosina(μM)    | 4,2     | 28            | 8,3             |
| Anfotericina B(μM) | 0,1     | 0,4           | 0,2             |
| Sb III(μM)         | 14      | 56            | 25              |

As cores destacam a ocorrência de resistência cruzada

#### **4.11- Modulação da via de biossíntese de esteróis e utilização de colesterol exógeno pelas cepas resistentes aos inibidores da biossíntese do ergosterol.**

Para avaliar o mecanismo de resistência das cepas resistentes aos inibidores da biossíntese do ergosterol, a expressão das principais enzimas da via foi analisada por PCR quantitativo e o perfil de esteróis avaliado por TLC.

As enzimas avaliadas por PCR quantitativo foram HMGCoA redutase (inibida pela sinvastatina), esqualeno epoxidase (inibida pela terbinafina), lanosterol sintetase, lanosterol C-14 desmetilase (inibida pelo miconazol), farnesiltransferase, esqualeno sintase, esqualeno monooxigenase ou esterol 24-metiltransferase (Fig. 23).

A cepa de *L. amazonensis* resistente a sinvastatina apresentou aumento da concentração de transcritos de mRNA da HMGCoA redutase de 4,5 vezes, da lanosterol sintetase 2 vezes e diminuição na expressão da lanosterol C-14 desmetilase de 2 vezes. As enzimas farnesiltransferase, esqualeno monooxigenase e esterol 24-metiltransferase não tiveram alteração significativa. O perfil de esteróis da cepa resistente também foi alterado, com diminuição da banda ND2 (esterol com esqueleto ergostano) e um pequeno aumento de colesterol (Fig 24).

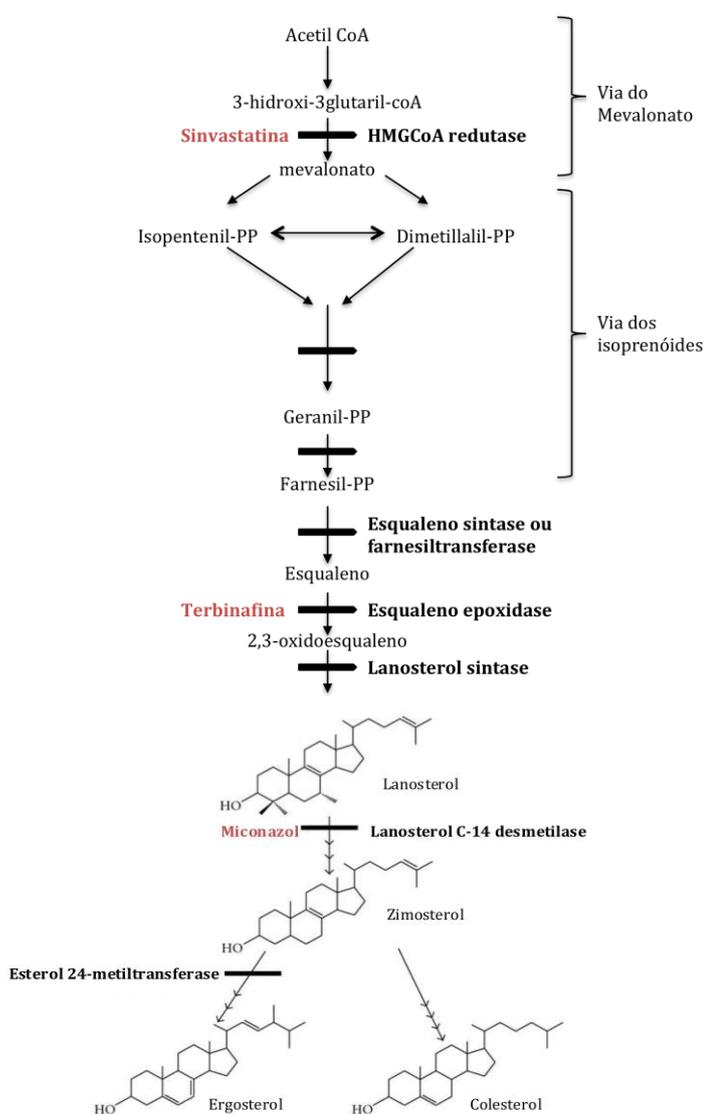
As enzimas avaliadas na cepa de *L. amazonensis* resistente ao miconazol foram HMGCoA redutase e lanosterol C-14 desmetilase. A enzima que é inibida pelo miconazol, a lanosterol C-14 desmetilase, surpreendentemente não apresentou alteração significativa. A enzima HMGCoA redutase apresentou diminuição na expressão de mRNA de 24 vezes. O perfil de esteróis também foi alterado, mostrando uma diminuição das bandas ND2 e ergosterol (ERG) e um pequeno aumento de lanosterol e um grande aumento de colesterol. O colesterol provavelmente está sendo usado em substituição a diminuição as esteróis com esqueleto ergostano, podendo estar relacionado ao mecanismo de resistência (Fig 25).

A cepa de *L. amazonensis* resistente a terbinafina apresentou pequena diminuição na expressão da HMGCoA redutase e aumento de 2 vezes na esqualeno monooxigenase, enzima que é inibida pela terbinafina. O perfil de esteróis também foi alterado, mostrando diminuição da banda ND2, e aumento de colesterol, lanosterol, ND1 e ergosterol. (Fig. 26).

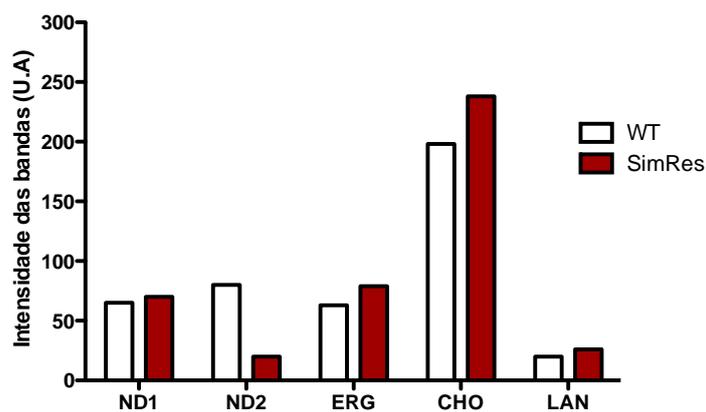
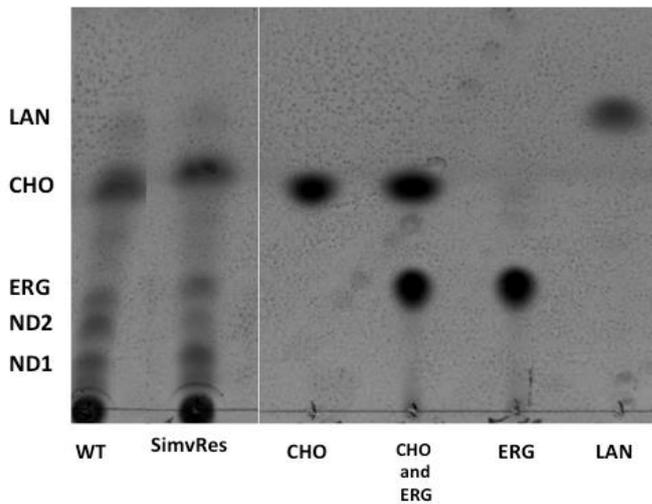
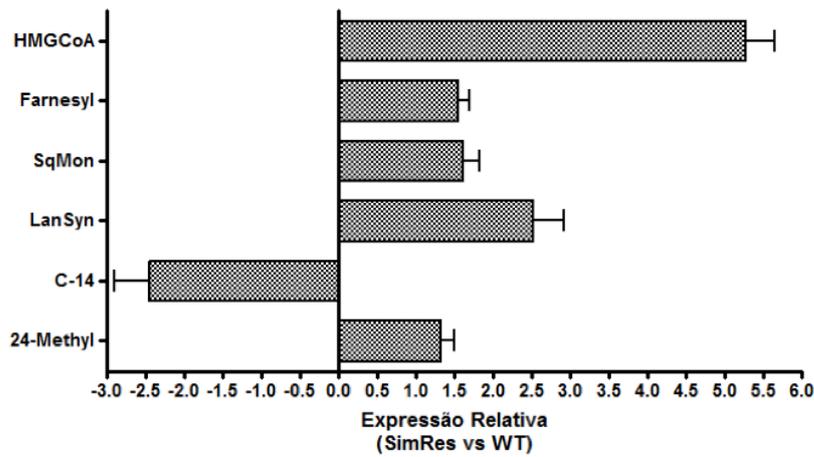
A cepa de *L. braziliensis* resistente a terbinafina apresentou pequeno aumento na expressão da lanosterol C-14 desmetilase, aumento de 4 vezes na expressão da esqualeno monooxigenase e de 10 vezes na HMGCoA redutase. Esse aumento da HMGCoA pode explicar a resistência cruzada apresentada a sinvastatina. O perfil de

esteróis também foi alterado, mostrando uma diminuição da banda ND2 e ergosterol (ERG) e um aumento de lanosterol ou outro esterol similar, metilado em 14, com mesmo padrão de corrida cromatográfica (Fig. 27).

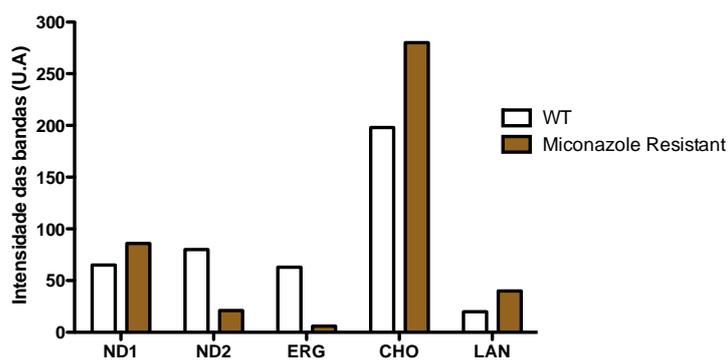
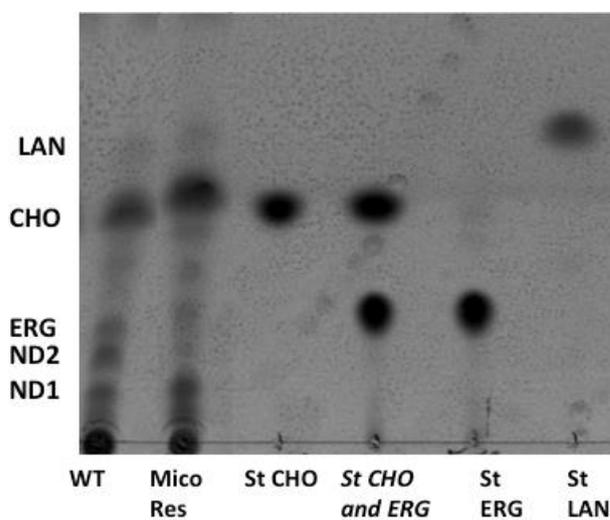
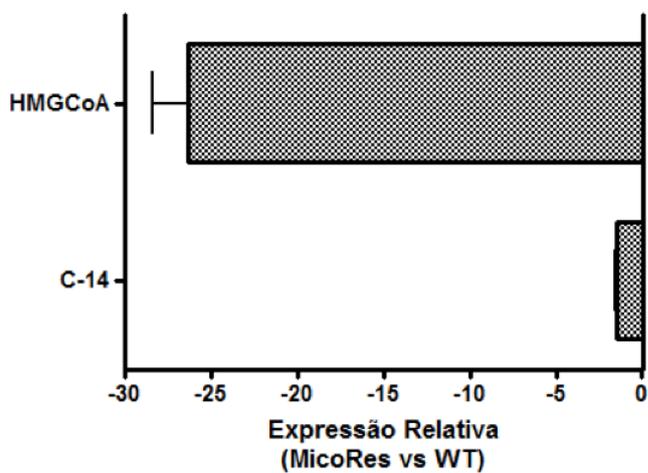
Não foi possível avaliar a expressão das enzimas da *L. guyanensis* resistente ao miconazol por PCR quantitativo, mas essa cepa apresentou diminuição das bandas ND2 e ergosterol (ERG) e acúmulo de colesterol e lanosterol (ou similar) (Fig. 28). Esse acúmulo foi semelhante ao apresentado pela cepa de *L. amazonensis* resistente ao miconazol, mostrando que o colesterol tem um papel importante no mecanismo de ação das cepas resistentes.



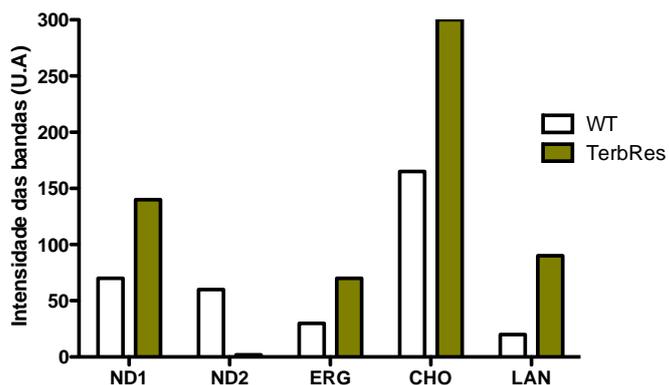
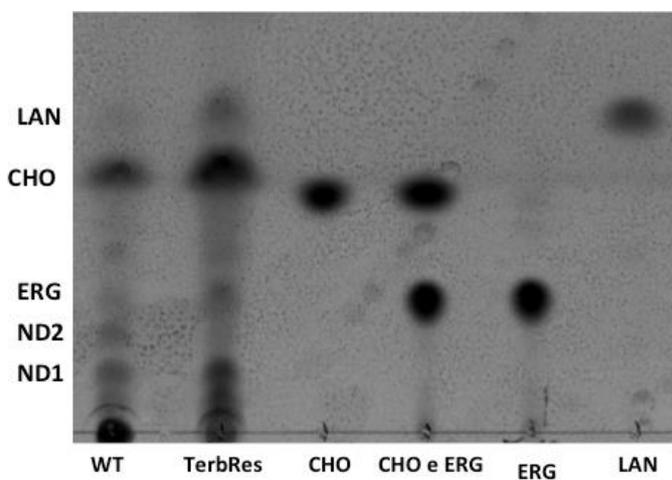
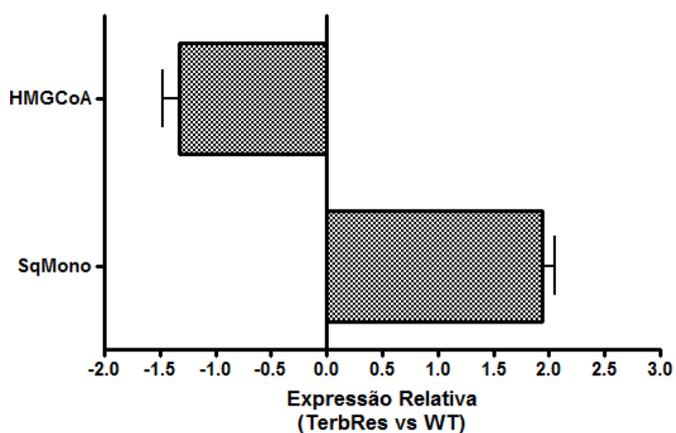
**Figura 23: Esquema da via de biossíntese de esteróis.** As enzimas avaliadas nos experimentos de PCR quantitativo estão representadas em negrito e os fármacos utilizados na indução de resistência estão representados em vermelho. A sinvastatina inibe a HMGCoA redutase, a terbinafina inibe a esqualeno epoxidase (esqualeno monooxigenase), e o miconazol inibe a lanosterol C-14 desmetilase.



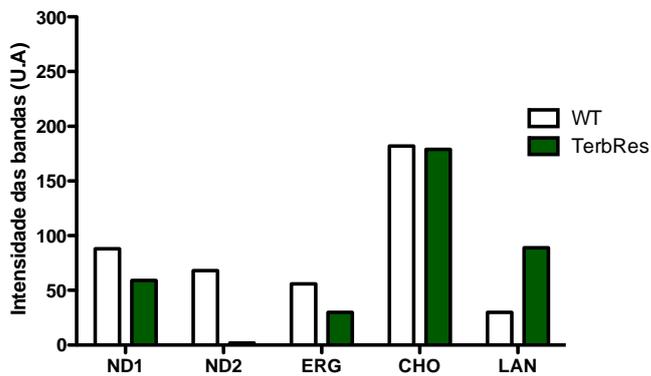
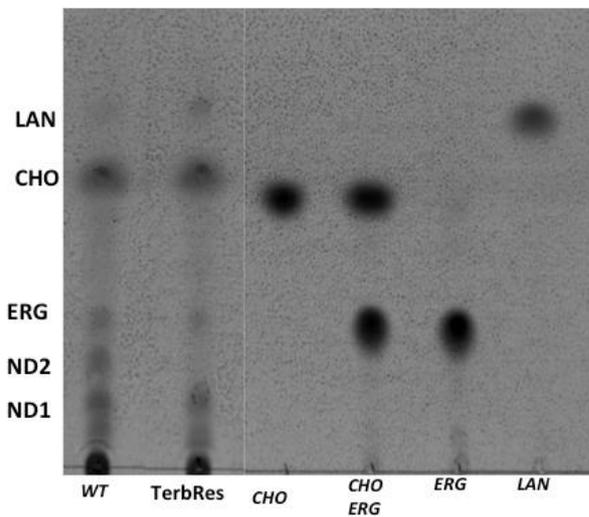
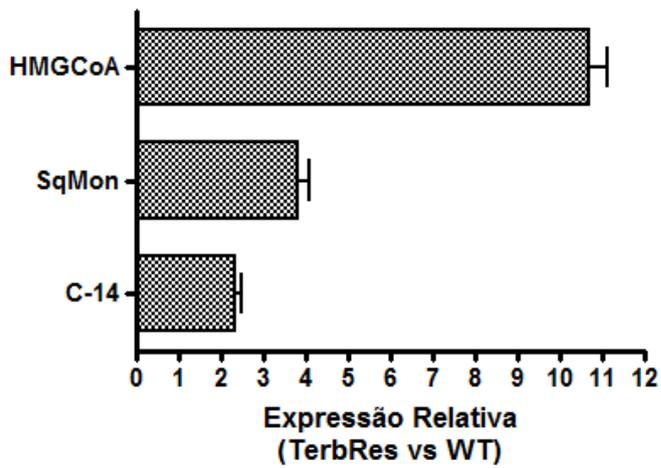
**Figura 24: Alteração da biossíntese do ergosterol na cepa de *L.amazonensis* resistente a simvastatina.** A expressão de mRNA e o perfil de esteróis foram avaliados em promastigota de *L. amazonensis* selvagem (WT) e resistente a simvastatina (SimRes). Legenda:, colesterol (CHO), ergosterol (ERG), lanosterol (LAN), Banda não identificada 1 (ND1), banda não identificada 2 (ND2), (HMGCoA redutase), farnesiltransferase (Farnesyl), squaleno monooxigenase (Sqmon), lanosterol sintetase (LanSyn), lanosterol C-14 desmetilase (C-14), esterol 24-metiltransferase (24-Methyl).



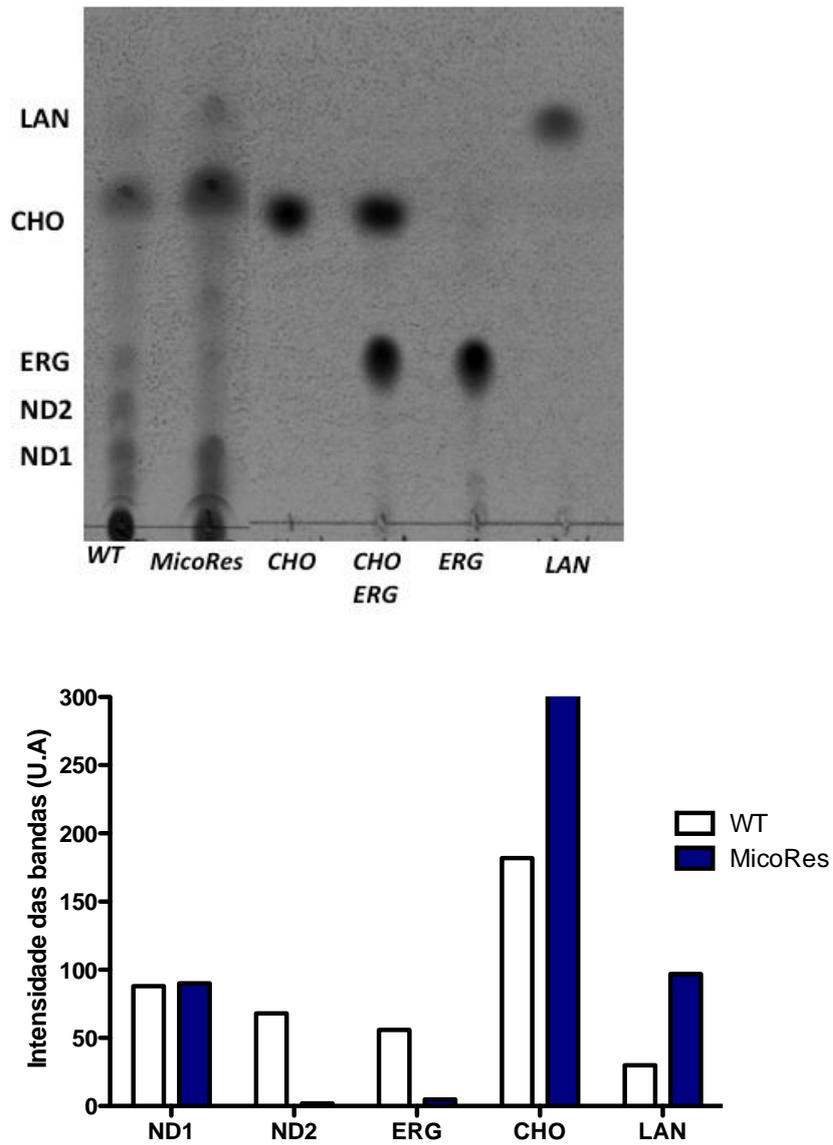
**Figura 25: Alteração da biossíntese do ergosterol na cepa de *L. amazonensis* resistente ao miconazol.** A expressão de mRNA e o perfil de esteróis foram avaliados em promastigota de *L. amazonensis* selvagem (WT) e resistente a miconazol (MicoRes). Legenda:, colesterol (CHO), ergosterol (ERG), lanosterol (LAN), Banda não identificada 1 (ND1), banda não identificada 2 (ND2), (HMGCoA redutase), lanosterol C-14 desmetilase (C-14).



**Figura 26: Alteração da biossíntese do ergosterol na cepa de *L.amazonensis* resistente a terbinafina.** A expressão de mRNA e o perfil de esteróis foram avaliados em promastigota de *L. amazonensis* selvagem (WT) e resistente a terbinafina (TerbRes). Legenda: colesterol (CHO), ergosterol (ERG), lanosterol (LAN), Banda não identificada 1 (ND1), banda não identificada 2 (ND2), (HMGCoA redutase), esqualeno monooxigenase (Sqmon).



**Figura 27: Alteração da biossíntese do ergosterol na cepa de *L. braziliensis* resistente a terbinafina.** A expressão de mRNA e o perfil de esteróis foram avaliados em promastigota de *L. braziliensis* selvagem (WT) e resistente a terbinafina (TerbRes). Legenda:, colesterol (CHO), ergosterol (ERG), lanosterol (LAN), Banda não identificada 1 (ND1), banda não identificada 2 (ND2), (HMGCoA redutase), esqualeno monooxigenase (Sqmon), lanosterol C-14 desmetilase (C-14).



**Figura 28: Alteração da biossíntese do ergosterol na cepa de *L. guyanensis* resistente ao miconazol.** O perfil de esteróis foram avaliados em promastigota de *L. braziliensis* selvagem (WT) e resistente ao miconazol (MicoRes). Legenda:, colesterol (CHO), ergosterol (ERG), lanosterol (LAN), Banda não identificada 1 (ND1), banda não identificada 2 (ND2).

#### 4.12 – Análise do genoma total da cepa de *L. guyanensis* resistente a sinvastatina.

O DNA total da cepa de *L. guyanensis* resistente a sinvastatina foi sequenciado, com o objetivo de buscar alguma amplificação gênica que possa estar relacionado com a resistência apresentada um mecanismo frequentemente observado nos fenômenos de resistência em *Leishmania* spp, (Myler, 2008). Foram sequenciados os 35 cromossomos das cepas selvagem e resistente a sinvastatina (Fig. 29A-G1). Foi obtido um total de 27.809.293 e 15.573.027 “reads” (número de sequências lidas) da cepa selvagem e resistente. Os valores de “reads” podem ser usados para prever as variações no número de cópias, sendo de ampliações ou deleções.

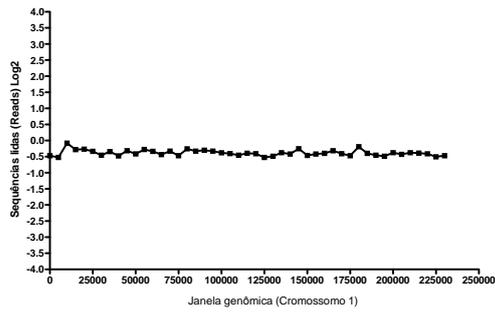
Observamos alterações nos cromossomos 14 e 17. Os cromossomos 14 e 17 apresentaram um número maior de genes amplificados (Figs. 29 O e R), que compreendem a janela genômica de 470.000 até 520.000 para o cromossomo 14 e de 345.000 até 395.000 para o cromossomo 17. No cromossomo 14 foram amplificados 16 genes e no cromossomo 17 foram 10 genes.

Dentre os genes amplificados no cromossomo 14 podemos citar os genes da tirosina fosfatase (LbrM.14.1280), da cinesina k39 (LbrM.14.1310) e da cinesina (Lbr.14.1170), os dois últimas relacionadas à motilidade do parasita. Além desses genes citados acima, 13 genes foram identificados como proteína hipotética. Desse grupo podemos citar os domínios da proteína que é codificada por esse gene, que foram encontradas através de análise de BLASTP: LbrM14.1180 (membro 2 da família da proteína que promove a polimerização da tubulina), Lbr14.1210 (proteína 39A), Lbr14.1260 (mucina-7), LbrM14.1240 (proteína vacuolar SNF8 – complexo ESCRT-II subunidade VPS22), LbrM14.1160 (membro 2 da família da proteína que promove a polimerização da tubulina), LbrM14.1300 (fosfoglicerato desidrogenase).

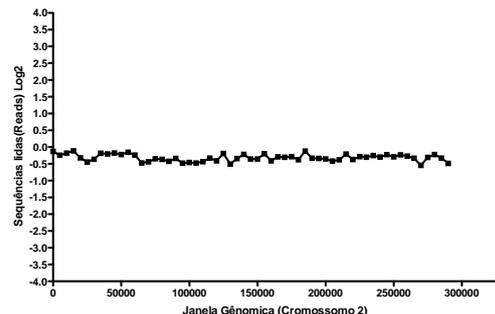
No cromossomo 17 podemos citar os genes da proteína cinase (LbrM17.0900), fosfaditilinositol cinase (LbrM17.0840), “splicing factor 3A” (LbrM17.0860), “DNAJ domain protein” (LbrM.17.0860), queuina RNAt ribosiltransferase (LbrM.17.0880), OSMB-like cinesina (LbrM.17.0810). Além desses genes descritos acima, foram encontrados 4 genes que codificam proteínas hipotéticas. O domínio da proteína que é codificada por esse gene foi encontrado através de análise de BLASTP: LbrM.17.0830 (floculina-11), Lbr.17.0870 (mucina-3), LbrM.17.0820 (adesina rica em serina) e LbrM.17.0850 (mucina-19 e mucina-17). Em conjunto, esses resultados indicam que a

cepa resistente a sinvastatina amplificou alguns genes para sobreviver aos estresse contínuo provocado pela pressão farmacológica. Testes adicionais deverão ser realizados para confirmar essas alterações e identificar o mecanismo envolvido na resistência.

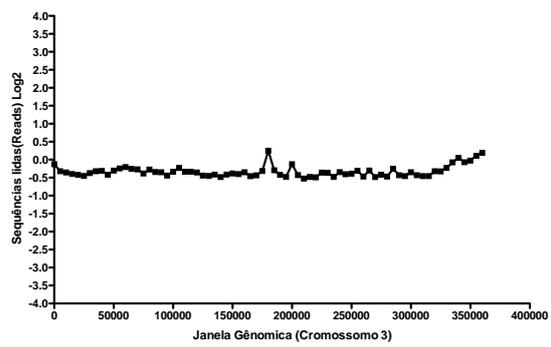
A)



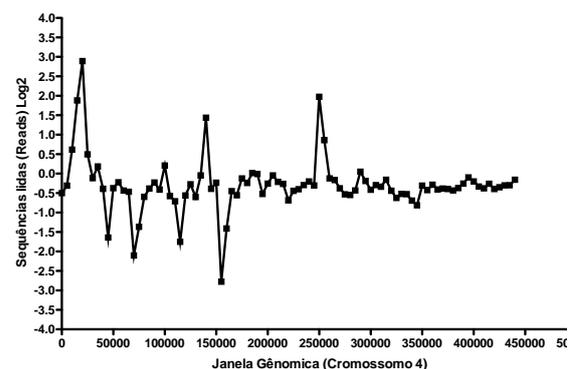
B)



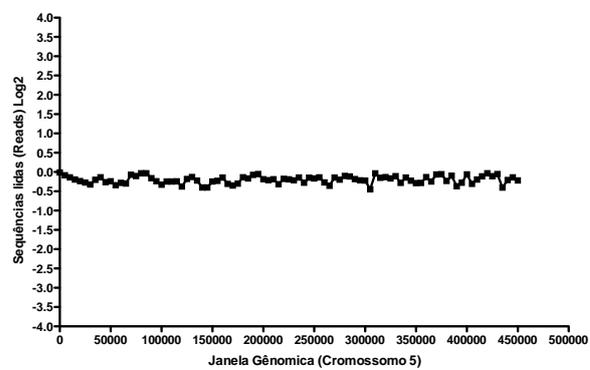
C)



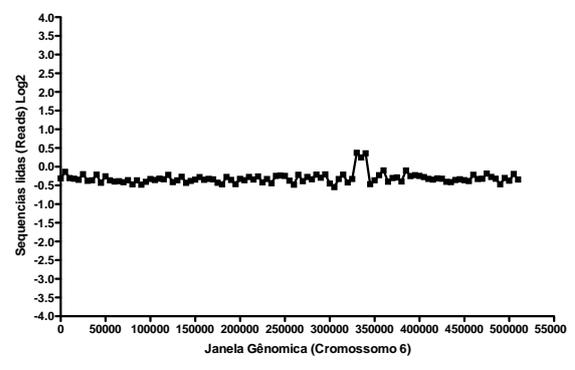
D)



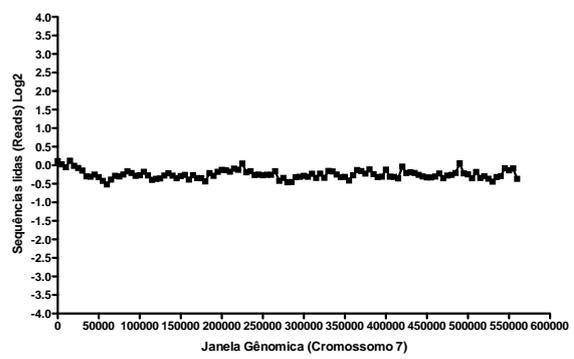
E)



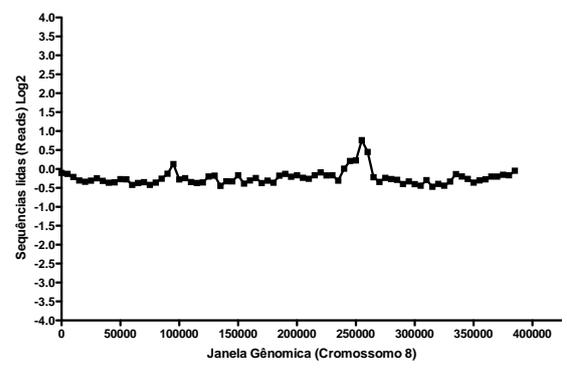
F)



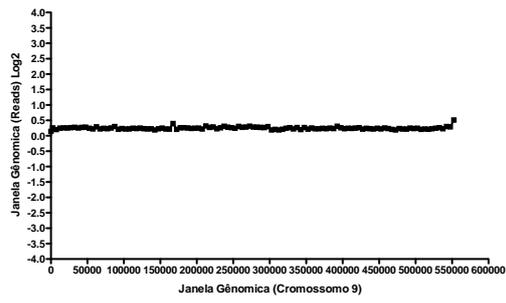
G)



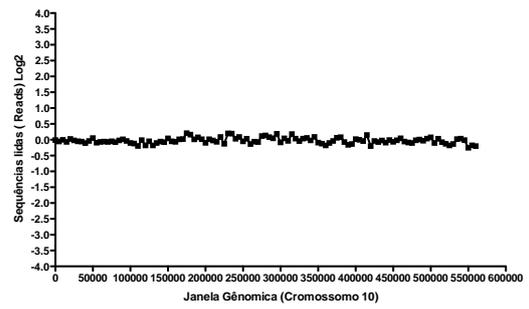
H)



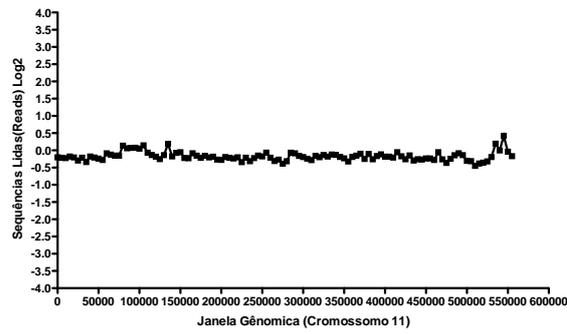
D)



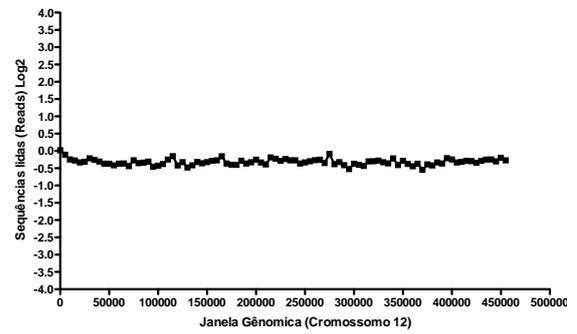
J)



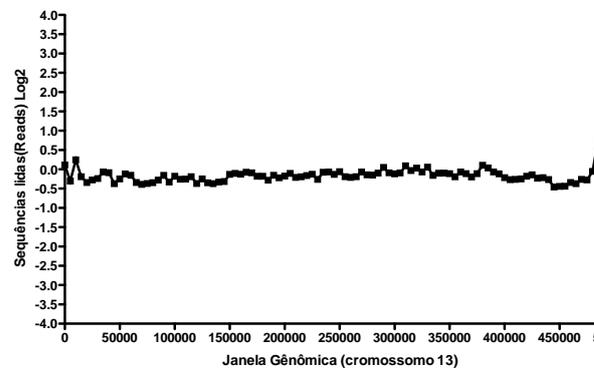
L)



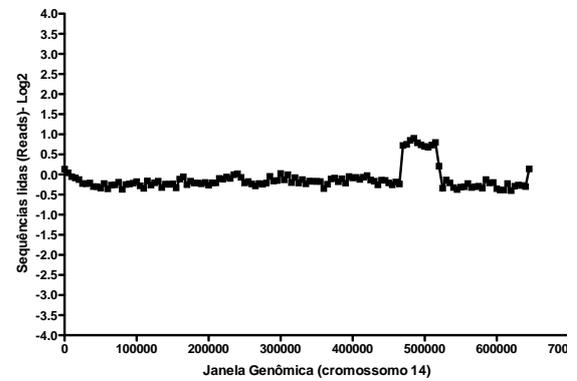
M)



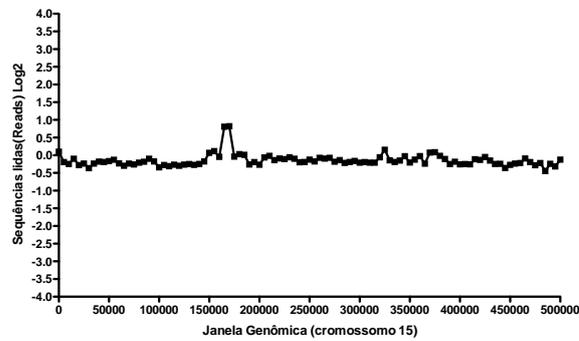
N)



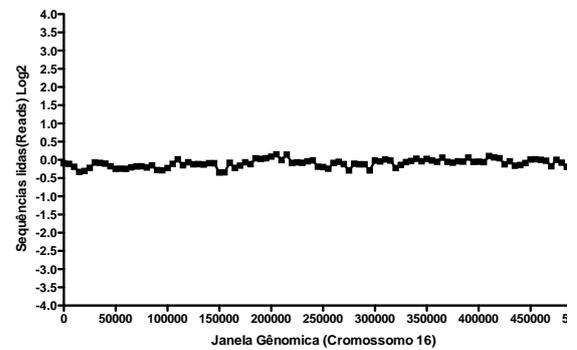
O)



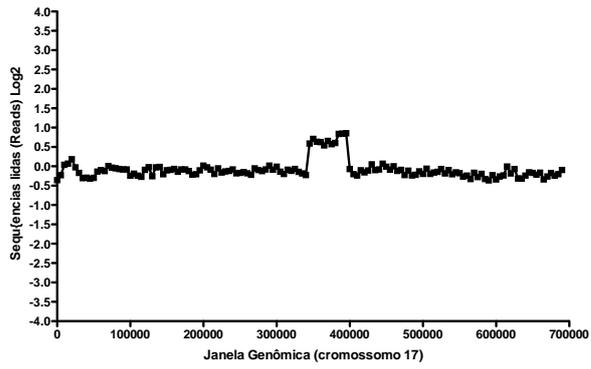
P)



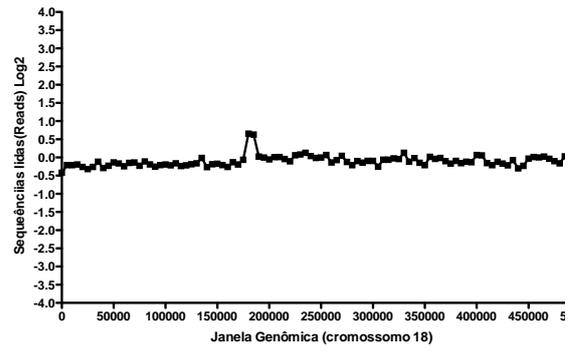
Q)



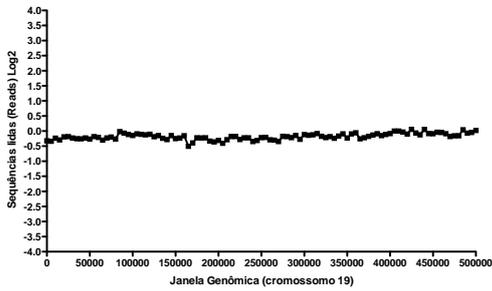
R)



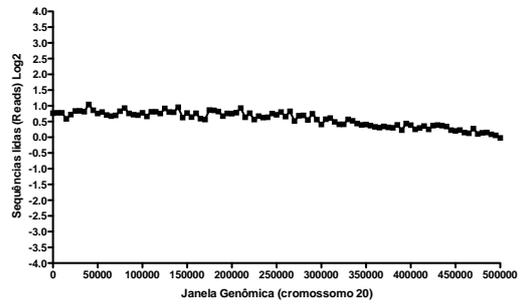
S)



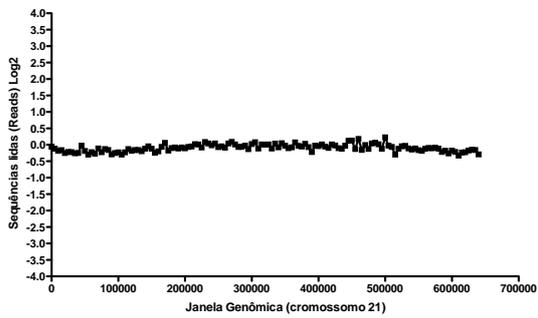
T)



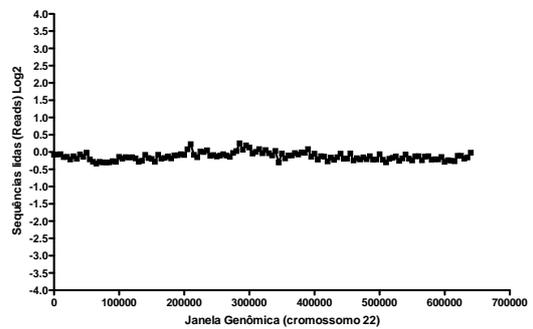
U)



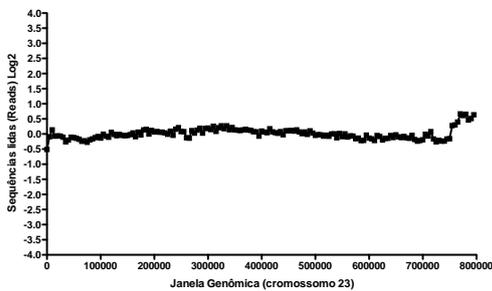
V)



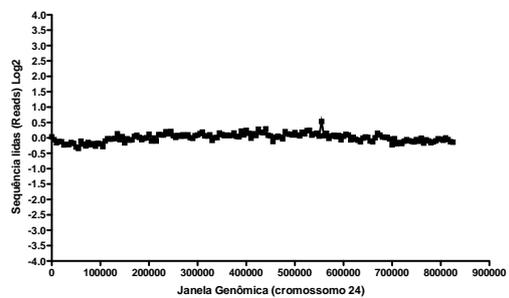
X)



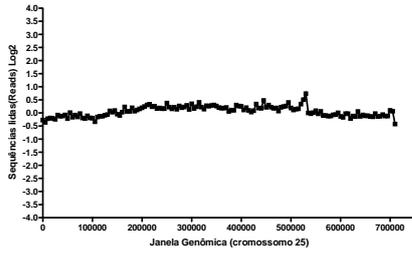
Z)



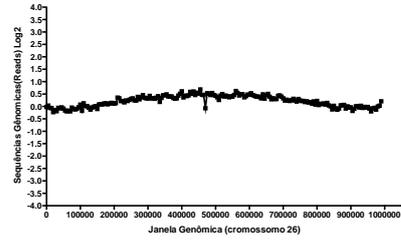
A1)



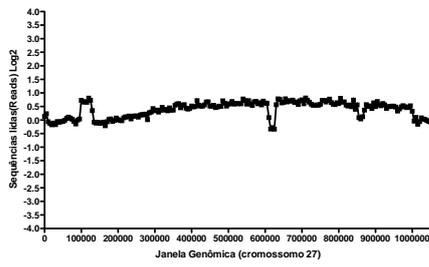
A1)



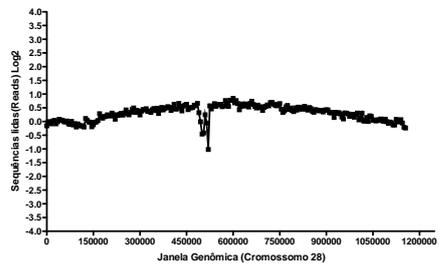
B1)



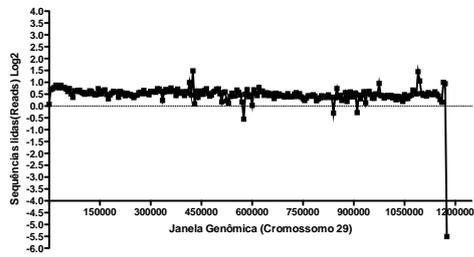
C1)



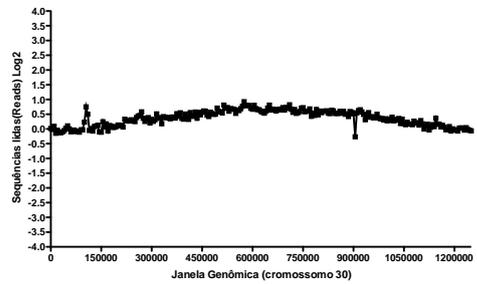
D1)



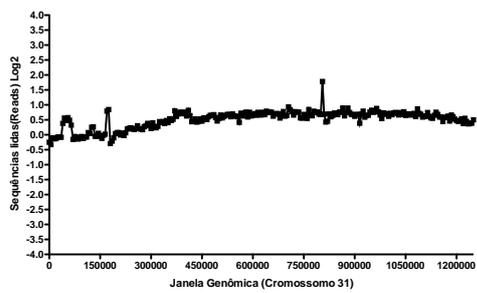
E1)



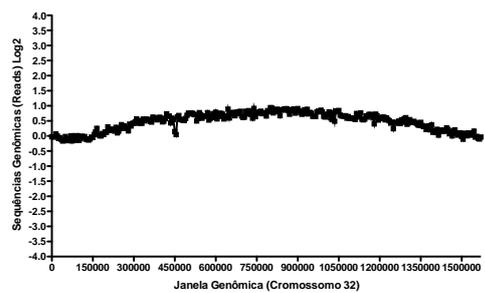
F1)



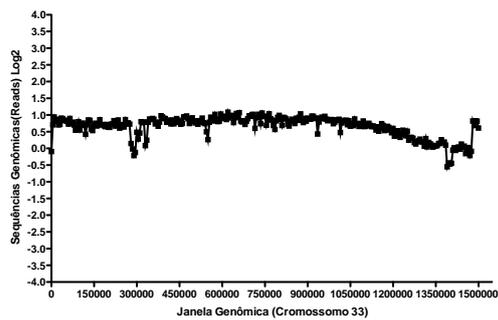
G1)



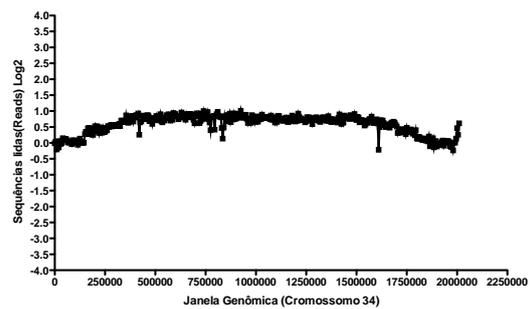
H1)



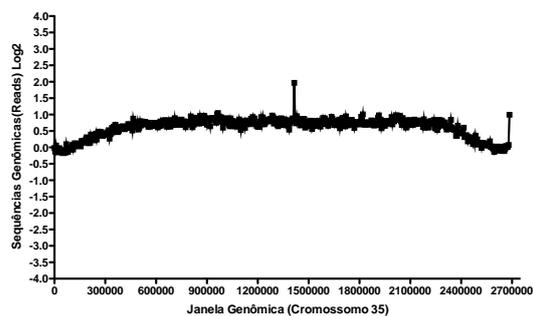
I1)



J1)



L1)



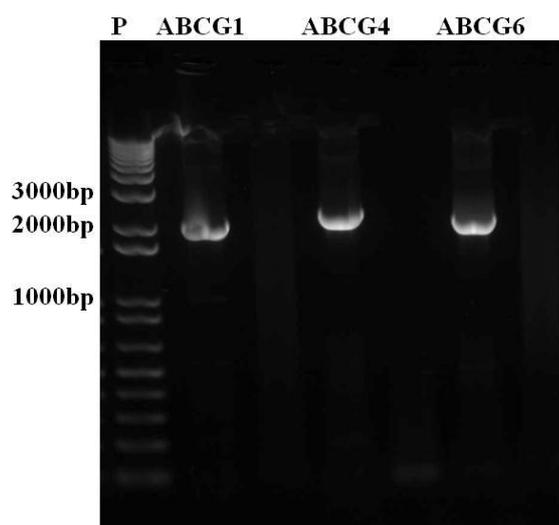
**Figura 29: Análise da variação do número de cópias dos cromossomos *L. guyanensis* resistente a sinvastatina.** O DNA dos parasitos resistentes e selvagens foi extraído e sequenciado (Hiseq). Para o sequenciamento total do DNA as amostras foram preparadas como descrito no item 3.16.. O DNA total da cepa selvagem e resistente foi sequenciado.

#### 4.13 - Clonagem dos transportadores ABCG1, ABCG4 E ABCG6

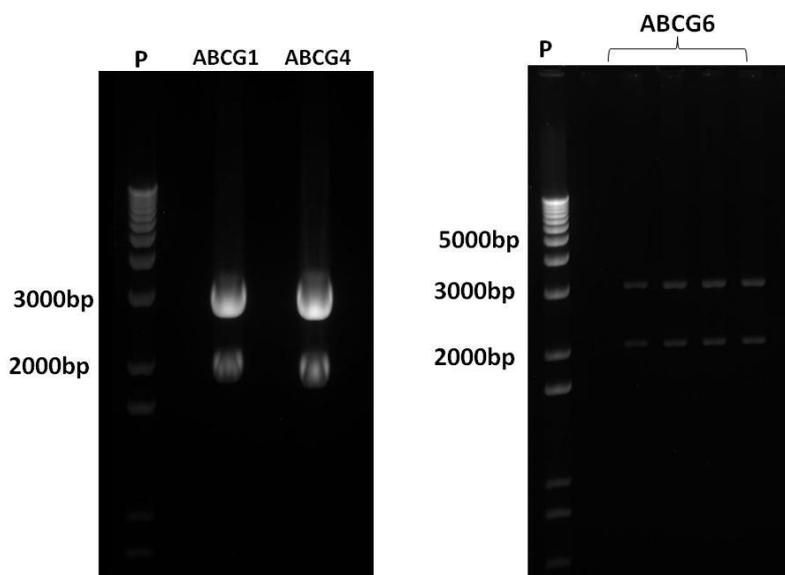
Os transportadores ABC possuem diversas funções nas células de mamíferos, transportando fosfolipídeos e colesterol. Os transportadores ABCG1, ABCG4 e ABCG6 transportam colesterol fosfolipídeos em células de mamíferos. Estes dois últimos já foram descritos em *Leishmania* spp. com a função de transporte de fosfolipídeo.

Para estudar o papel dos transportadores ABC no transporte de esteróis em *Leishmania*, transportadores ABCG1, ABCG4 e ABCG6 foram amplificados e clonados. Na Figura 30 podemos observar a amplificação de cada gene. Na Figura 31 observamos a clonagem de cada gene no vetor de expressão pGemT easy. Observamos duas bandas na figura, uma correspondente ao vetor PGemT (3015 pb) e o inserto de cada gene (ABCG1: 1974 bp; ABCG4: 2232 bp; ABCG6: 2043 bp). As bandas de cada inserto foram purificadas e uma alíquota foi enviada para o sequenciamento. Nas Figuras 32, 33 e 34 podemos ver o alinhamento das sequências dos transportadores ABCG1, ABCG4 e ABCG6, respectivamente. Um BLAST também foi realizado para

confirmar as sequências. As sequências dos transportadores ABCG1, ABCG4 e ABCG6 de *L. amazonensis* apresentaram 98% de homologia com os transportadores de *L. mexicana* (Genebank Database). Após a clonagem, os genes foram subclonados em vetor psp72 $\alpha$ NEO $\alpha$  e transfectados em promastigotas de *L. amazonensis* (Figs. 35, 36, 37) . No final da transfecção, conseguimos obter 3 mutantes, cada um superexpressando cada transportador ABC.



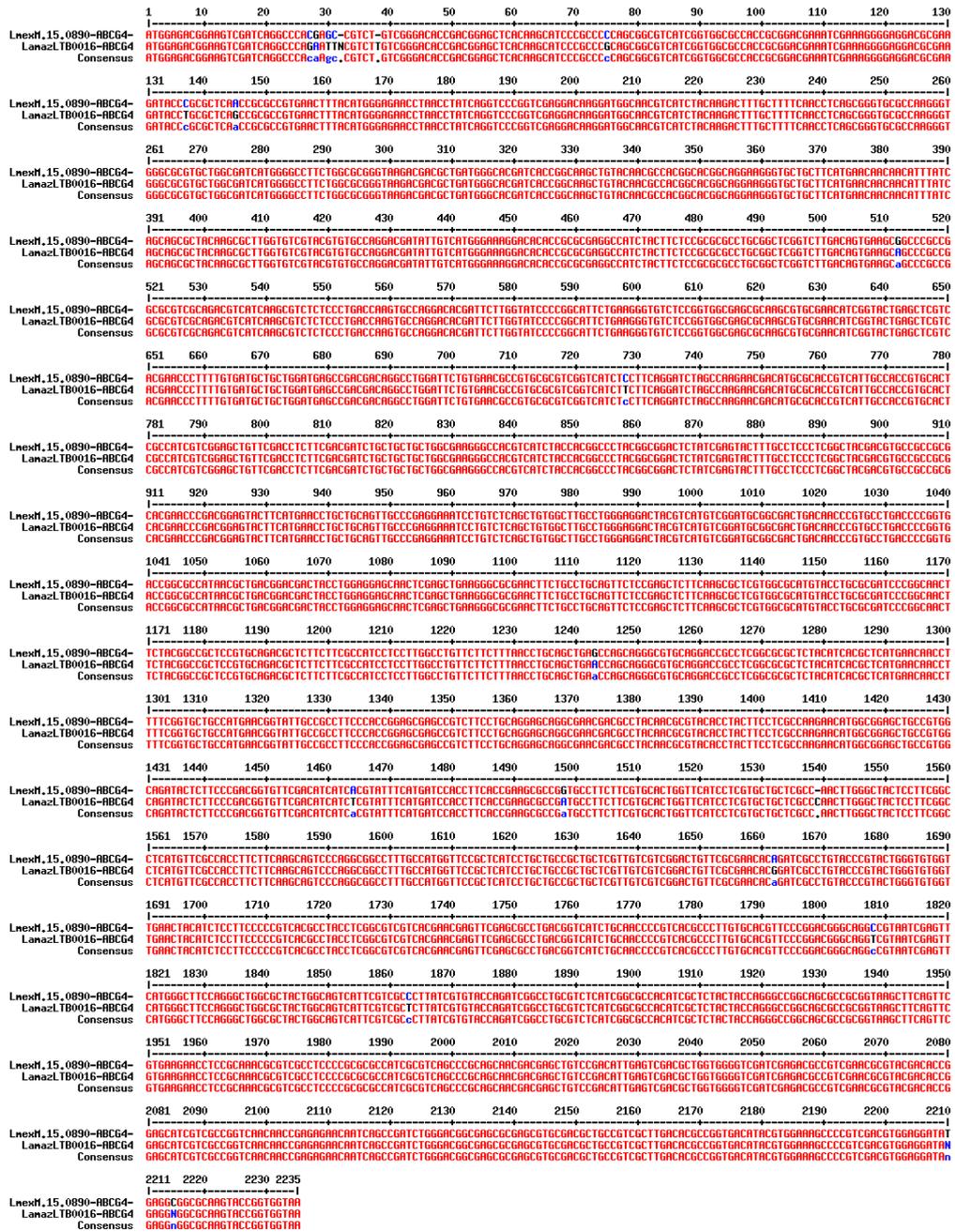
**Figura 30 : Amplificação dos transportadores ABCG1, ABCG4 e ABCG6.** As sequências gênicas dos transportadores ABCG1, ABCG4 e ABCG6 foram amplificadas do DNA genômico de *L. amazonensis* por PCR usando os primers senso e antisenso de cada gene. Tamanho da sequência de cada gene: ABCG1: 1974 bp; ABCG4: 2232 bp; ABCG6: 2043 bp. Legenda: P (padrão de peso molecular – DNA leader).



**Figura 31: Clonagem dos transportadores ABCG1, ABCG4 e ABCG6 no vetor de clonagem pGemT easy.** Transportadores ABCG1, ABCG4 e ABCG6 foram clonados em vetor de expressão pGEM T easy usando bactérias competentes DH5 $\alpha$ . A sequência de cada gene foi liberada do pGEM T, usando as enzimas de restrição XbaI e HindIII. Tamanho do vetor pGemT: 3015pb. Legenda: P (padrão de peso molecular – DNA leader).

|                      |            |              |          |          |           |        |            |        |              |         |            |        |         |          |           |      |
|----------------------|------------|--------------|----------|----------|-----------|--------|------------|--------|--------------|---------|------------|--------|---------|----------|-----------|------|
|                      | 1          | 10           | 20       | 30       | 40        | 50     | 60         | 70     | 80           | 90      | 100        | 110    | 120     | 130      |           |      |
| Lnex#06_0080-ABCG1-T | CGATACGGAG | CCAGAGGAAAT  | CAAGCA   | CGACGGT  | CACAGCCAT | TTCCCT | TGGCAGCGT  | RAACCC | CGGCTGCACGGT | CCATCAT | TGAATTC    | CGATCC | CGAAGCC | CCGAGGGT | AGACAGCGT | CGCC |
| LamazLTB0016-ABCG1   | CGA---GAGG | AGCCAGAGAAAT | CAAGCA   | CGACGGT  | CACAGCCAT | TTCCCT | TGGCAGCGT  | RAACCC | CGGCTGCACGGT | CCATCAT | TGAATTC    | CGATCC | CGAAGCC | CCGAGGGT | AGACAGCGT | CGCC |
| Consensus            | CGA...GaaG | AGCCAGAGAAAT | CAAGCA   | CGACGGT  | CACAGCCAT | TTCCCT | TGGCAGCGT  | RAACCC | CGGCTGCACGGT | CCATCAT | TGAATTC    | CGATCC | CGAAGCC | CCGAGGGT | AGACAGCGT | CGCC |
| Lnex#06_0080-ABCG1-T | 131        | 140          | 150      | 160      | 170       | 180    | 190        | 200    | 210          | 220     | 230        | 240    | 250     | 260      |           |      |
| LamazLTB0016-ABCG1   | ARCAGCTACT | CGCTGCCCT    | TGCTATG  | CGCAGGCT | TGCTG     | ACAGCT | CGCAGAGGCT | GCATCT | GTGAC        | AGGCT   | TGACGGGAGT | TGCGT  | TCCGGG  | CGATCGCT | CGCGT     |      |
| Consensus            | ARCAGCTACT | CGCTGCCCT    | TGCTATG  | CGCAGGCT | TGCTG     | ACAGCT | CGCAGAGGCT | GCATCT | GTGAC        | AGGCT   | TGACGGGAGT | TGCGT  | TCCGGG  | CGATCGCT | CGCGT     |      |
| Lnex#06_0080-ABCG1-T | 261        | 270          | 280      | 290      | 300       | 310    | 320        | 330    | 340          | 350     | 360        | 370    | 380     | 390      |           |      |
| LamazLTB0016-ABCG1   | CGAAGCAGC  | GTCTCTG      | AGCCGATC | TGCAC    | CGAC      | TAGCGT | TGGCGG     | TAGCTG | AGCT         | TGAC    | CGGAGG     | CGCCAG | CTGG    | CGCAGT   | TTTC      |      |
| Consensus            | CGAAGCAGC  | GTCTCTG      | AGCCGATC | TGCAC    | CGAC      | TAGCGT | TGGCGG     | TAGCTG | AGCT         | TGAC    | CGGAGG     | CGCCAG | CTGG    | CGCAGT   | TTTC      |      |
| Lnex#06_0080-ABCG1-T | 391        | 400          | 410      | 420      | 430       | 440    | 450        | 460    | 470          | 480     | 490        | 500    | 510     | 520      |           |      |
| LamazLTB0016-ABCG1   | CGAAGCAGC  | ATCATCT      | CGCCGCT  | TGCG     | CGCC      | TGAC   | CGCCGCT    | TGTTGG | TTCC         | CGT     | TGGC       | CGCC   | CGCCG   | CGGAC    | CGCT      |      |
| Consensus            | CGAAGCAGC  | ATCATCT      | CGCCGCT  | TGCG     | CGCC      | TGAC   | CGCCGCT    | TGTTGG | TTCC         | CGT     | TGGC       | CGCC   | CGCCG   | CGGAC    | CGCT      |      |
| Lnex#06_0080-ABCG1-T | 521        | 530          | 540      | 550      | 560       | 570    | 580        | 590    | 600          | 610     | 620        | 630    | 640     | 650      |           |      |
| LamazLTB0016-ABCG1   | CGGCACTG   | CTGGC        | CGCAGAG  | GTGG     | CGAT      | TTCC   | CGCCT      | TGAG   | GGCTGG       | GGCT    | TGCT       | TGGT   | GGG     | CGC      | AGC       |      |
| Consensus            | CGGCACTG   | CTGGC        | CGCAGAG  | GTGG     | CGAT      | TTCC   | CGCCT      | TGAG   | GGCTGG       | GGCT    | TGCT       | TGGT   | GGG     | CGC      | AGC       |      |
| Lnex#06_0080-ABCG1-T | 651        | 660          | 670      | 680      | 690       | 700    | 710        | 720    | 730          | 740     | 750        | 760    | 770     | 780      |           |      |
| LamazLTB0016-ABCG1   | CGTCTGG    | CTGGACT      | CGGTG    | ACATC    | TGCG      | AGG    | TGGT       | GCAC   | CTGCT        | GGC     | CGAC       | TGTC   | CGG     | CGG      | CG        |      |
| Consensus            | CGTCTGG    | CTGGACT      | CGGTG    | ACATC    | TGCG      | AGG    | TGGT       | GCAC   | CTGCT        | GGC     | CGAC       | TGTC   | CGG     | CGG      | CG        |      |
| Lnex#06_0080-ABCG1-T | 781        | 790          | 800      | 810      | 820       | 830    | 840        | 850    | 860          | 870     | 880        | 890    | 900     | 910      |           |      |
| LamazLTB0016-ABCG1   | GATGCTG    | ATGAC        | CGAGG    | CGCAT    | TGCT      | ATCC   | AGG        | AGT    | GGCT         | GGCT    | CGC        | AG     | AGT     | AGG      | AGT       |      |
| Consensus            | GATGCTG    | ATGAC        | CGAGG    | CGCAT    | TGCT      | ATCC   | AGG        | AGT    | GGCT         | GGCT    | CGC        | AG     | AGT     | AGG      | AGT       |      |
| Lnex#06_0080-ABCG1-T | 911        | 920          | 930      | 940      | 950       | 960    | 970        | 980    | 990          | 1000    | 1010       | 1020   | 1030    | 1040     |           |      |
| LamazLTB0016-ABCG1   | GACAGCTG   | AGCAG        | CAATG    | CTCAT    | AGC       | GTGG   | CGC        | AGT    | AGT          | AGT     | AGT        | AGT    | AGT     | AGT      |           |      |
| Consensus            | GACAGCTG   | AGCAG        | CAATG    | CTCAT    | AGC       | GTGG   | CGC        | AGT    | AGT          | AGT     | AGT        | AGT    | AGT     | AGT      |           |      |
| Lnex#06_0080-ABCG1-T | 1041       | 1050         | 1060     | 1070     | 1080      | 1090   | 1100       | 1110   | 1120         | 1130    | 1140       | 1150   | 1160    | 1170     |           |      |
| LamazLTB0016-ABCG1   | ATGCTAC    | ATGCG        | AGTTC    | CGC      | AGCT      | TGCG   | AGT        | TGTC   | AGC          | TAG     | CGT        | CGC    | CGC     | CGC      |           |      |
| Consensus            | ATGCTAC    | ATGCG        | AGTTC    | CGC      | AGCT      | TGCG   | AGT        | TGTC   | AGC          | TAG     | CGT        | CGC    | CGC     | CGC      |           |      |
| Lnex#06_0080-ABCG1-T | 1171       | 1180         | 1190     | 1200     | 1210      | 1220   | 1230       | 1240   | 1250         | 1260    | 1270       | 1280   | 1290    | 1300     |           |      |
| LamazLTB0016-ABCG1   | CGTCTGT    | TAG          | CGCTG    | ATCT     | TTC       | TG     | AC         | GTG    | CG           | AG      | CA         | TAT    | AG      | CG       |           |      |
| Consensus            | CGTCTGT    | TAG          | CGCTG    | ATCT     | TTC       | TG     | AC         | GTG    | CG           | AG      | CA         | TAT    | AG      | CG       |           |      |
| Lnex#06_0080-ABCG1-T | 1301       | 1310         | 1320     | 1330     | 1340      | 1350   | 1370       | 1380   | 1390         | 1400    | 1410       | 1420   | 1430    |          |           |      |
| LamazLTB0016-ABCG1   | ARCARTG    | CGCTG        | CCG      | GTTC     | ATG       | CGT    | GAG        | CGA    | AGCT         | TGG     | CGT        | ACT    | CGC     | CGT      |           |      |
| Consensus            | ARCARTG    | CGCTG        | CCG      | GTTC     | ATG       | CGT    | GAG        | CGA    | AGCT         | TGG     | CGT        | ACT    | CGC     | CGT      |           |      |
| Lnex#06_0080-ABCG1-T | 1431       | 1440         | 1450     | 1460     | 1470      | 1480   | 1490       | 1500   | 1510         | 1520    | 1530       | 1540   | 1550    | 1560     |           |      |
| LamazLTB0016-ABCG1   | TTTACTG    | AGCGG        | TGGG     | CTG      | ATCAT     | CC     | GGCT       | CTCT   | TCT          | ACT     | TT         | GGT    | GAT     | TG       |           |      |
| Consensus            | TTTACTG    | AGCGG        | TGGG     | CTG      | ATCAT     | CC     | GGCT       | CTCT   | TCT          | ACT     | TT         | GGT    | GAT     | TG       |           |      |
| Lnex#06_0080-ABCG1-T | 1561       | 1570         | 1580     | 1590     | 1600      | 1610   | 1620       | 1630   | 1640         | 1650    | 1660       | 1670   | 1680    | 1690     |           |      |
| LamazLTB0016-ABCG1   | AGTTCTG    | GCAC         | CCGAT    | CGTCT    | TTAT      | CTG    | TG         | CT     | TAG          | CGG     | TG         | GC     | AT      | CG       |           |      |
| Consensus            | AGTTCTG    | GCAC         | CCGAT    | CGTCT    | TTAT      | CTG    | TG         | CT     | TAG          | CGG     | TG         | GC     | AT      | CG       |           |      |
| Lnex#06_0080-ABCG1-T | 1691       | 1700         | 1710     | 1720     | 1730      | 1740   | 1750       | 1760   | 1770         | 1780    | 1790       | 1800   | 1810    | 1820     |           |      |
| LamazLTB0016-ABCG1   | CTCGTGC    | GC           | CAAT     | GAC      | TAC       | CAAT   | GTC        | AC     | CAAT         | GTC     | GC         | CAAT   | GTC     | GC       |           |      |
| Consensus            | CTCGTGC    | GC           | CAAT     | GAC      | TAC       | CAAT   | GTC        | AC     | CAAT         | GTC     | GC         | CAAT   | GTC     | GC       |           |      |
| Lnex#06_0080-ABCG1-T | 1821       | 1830         | 1840     | 1850     | 1860      | 1870   | 1880       | 1883   |              |         |            |        |         |          |           |      |
| LamazLTB0016-ABCG1   | ATCCG      | AGT          | CGC      | AGT      | GTG       | TAC    | ATG        | TGG    | TG           | TG      | TG         | TG     | TG      | TG       |           |      |
| Consensus            | ATCCG      | AGT          | CGC      | AGT      | GTG       | TAC    | ATG        | TGG    | TG           | TG      | TG         | TG     | TG      | TG       |           |      |

Figura 32 : Sequenciamento do transportador ABCG1. Legenda: 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).



**Figura 33: Sequenciamento do transportador ABCG4.** Legenda: Lmex.06.0080-ABCG4 (sequência de *L. mexicana* do transportador ABCG4 depositada no Gene bank Database), Lamaz.LB0016-ABCG4 (sequência de *L. amazonensis* LTB0016 do transportador ABCG4 amplificada).

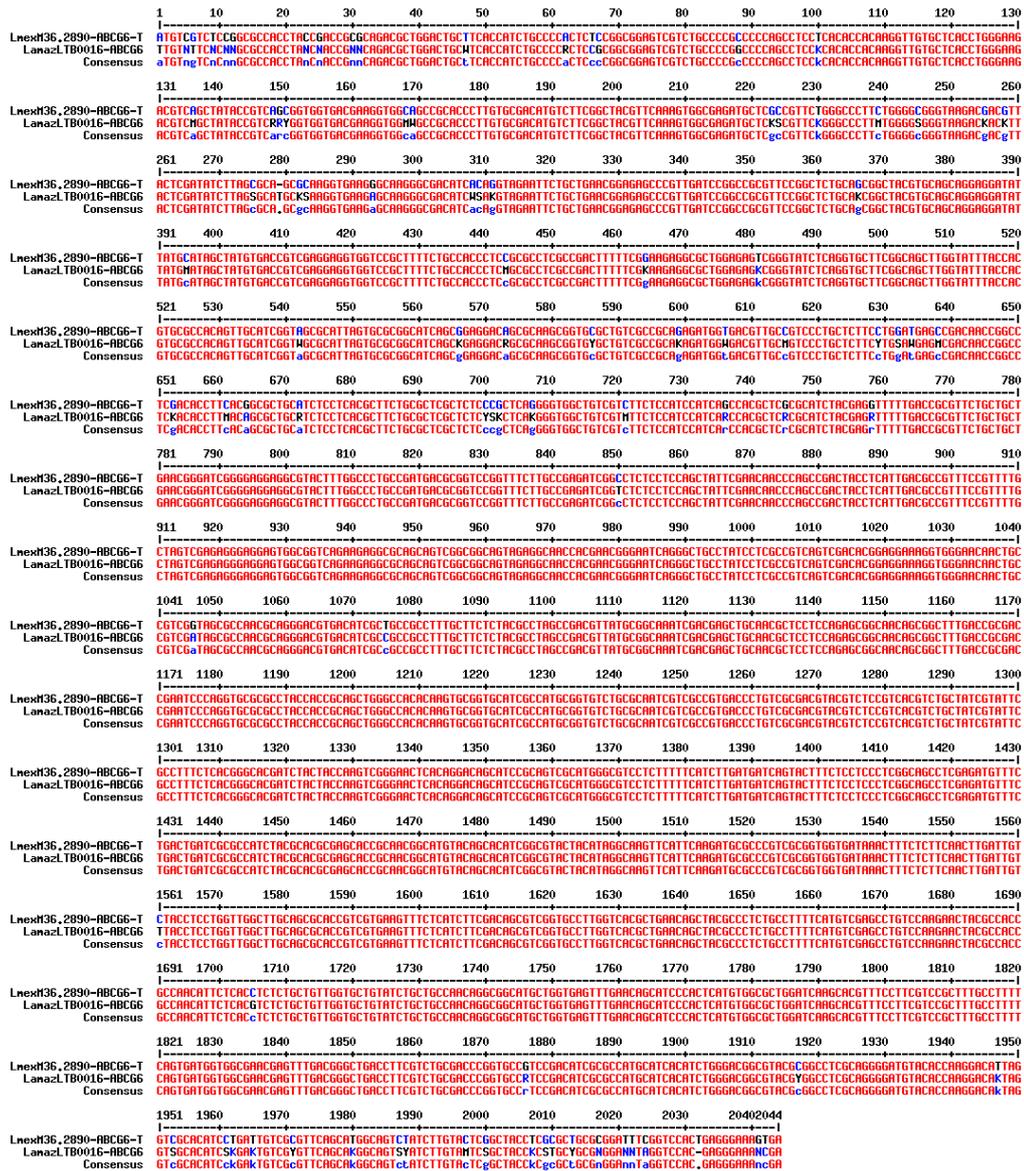
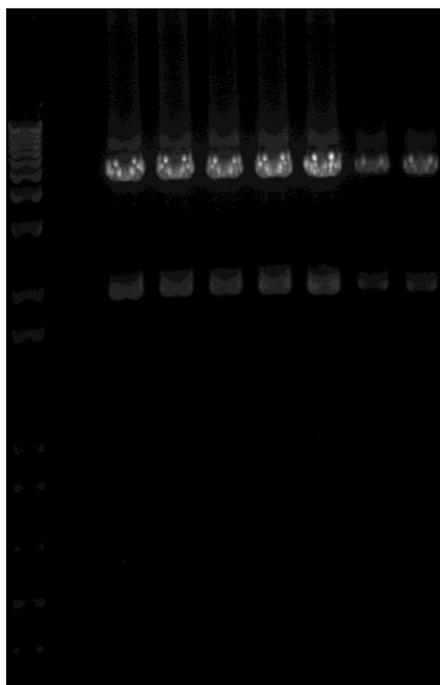


Figura 34: Sequenciamento do transportador ABCG6. Legenda: Lmex.06.0080-ABCG6 (sequência de *L. mexicana* do transportador ABCG6 depositada no Gene bank Database), LamazLTB0016-ABCG6 (sequência de *L. amazonensis* LTB0016 do transportador ABCG6 amplificada).

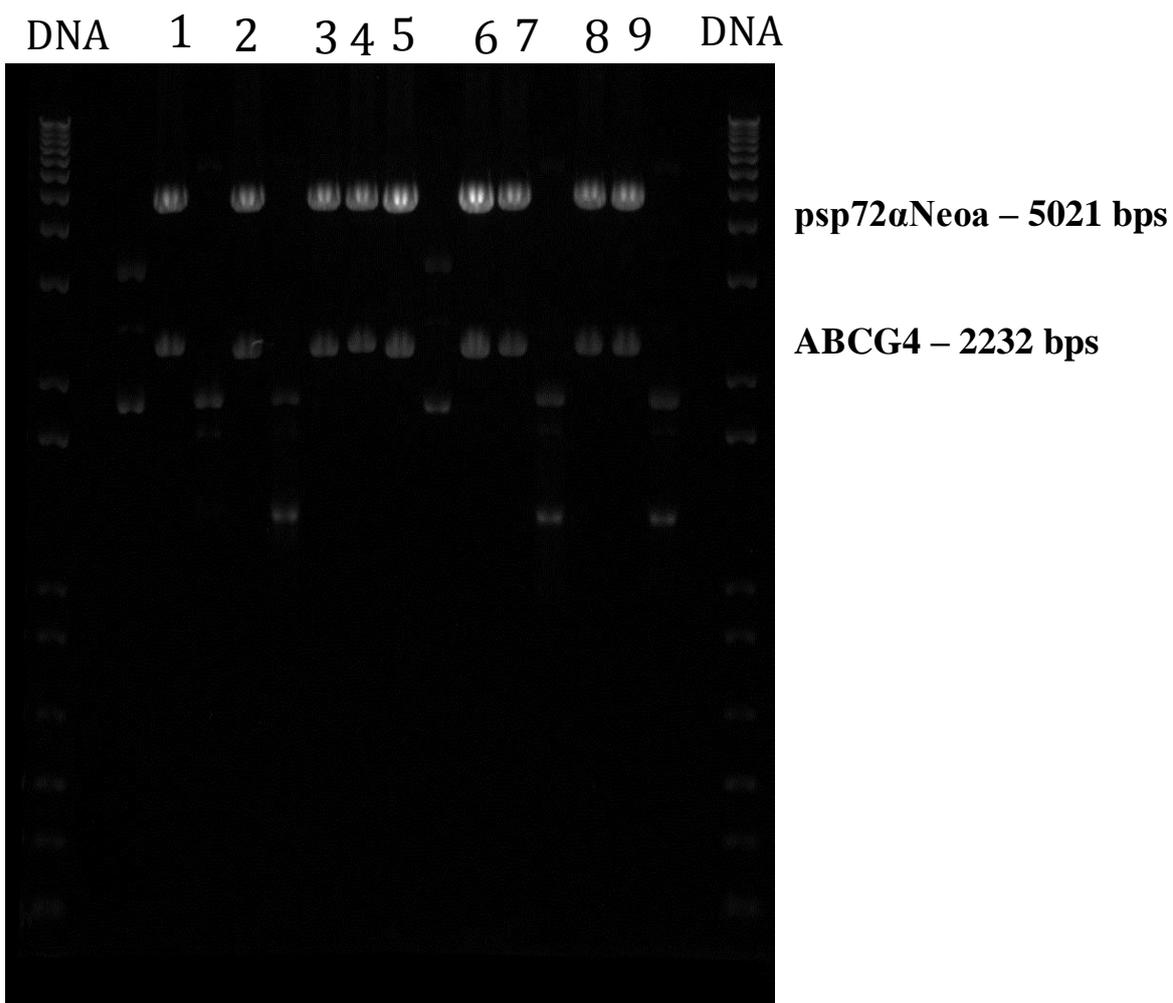
DNA    ABCG1 + psp72aNeoa



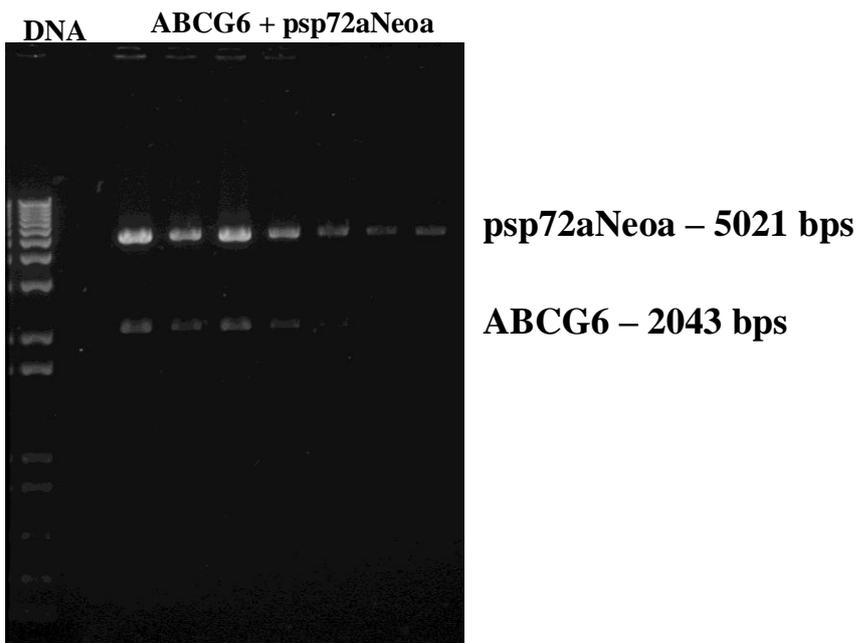
psp72aNeoa – 5021 bps

ABCG1 – 1974 bps

**Figura 35: Subclonagem do transportador ABCG1 no vetor psp72aNEOa.** Transportador ABCG1 foi subclonado em vetor de expressão psp72aNEOa usando bactérias competentes DH5 $\alpha$ . A sequência de cada gene foi liberada do plasmídeo, usando as enzimas de restrição XbaI e HindIII. Tamanho do vetor psp72aNEOa : 5021pb. Legenda: DNA (padrão de peso molecular – DNA leader).



**Figura 36: Subclonagem do transportador ABCG4 no vetor psp72aNEOa.** Transportador ABCG1, foi subclonado em vetor de expressão psp72aNEOa usando bactérias competentes DH5 $\alpha$ . A sequência de cada gene foi liberada do plasmídeo, usando as enzimas de restrição XbaI e ndeI. Tamanho do vetor psp72aNEOa : 5021pb. Legenda: DNA (padrão de peso molecular – DNA leader). Clone de 1-9, positivos.



**Figura 37: Subclonagem do transportador ABCG6 no vetor psp72aNEOa.** Transportador ABCG1 foi subclonado em vetor de expressão psp72aNEOa usando bactérias competentes DH5 $\alpha$ . A sequência de cada gene foi liberada do plasmídeo, usando as enzimas de restrição XbaI e HindIII. Tamanho do vetor psp72aNEOa : 5021pb. Legenda:DNA (padrão de peso molecular – DNA leader).

## **5- DISCUSSÃO**

A atividade dos inibidores da biossíntese do ergosterol em *Leishmania* spp. tem sido amplamente estudada por diversos autores (Beach et al. 1988; Berman et al. 1986; Berman et al. 1984; Goad et al. 1985; Hart et al. 1989; Medina et al. 2012; Roberts et al. 2003; Vannier-Santos et al. 1999), mostrando-se como um excelente alvo para a quimioterapia das leishmanioses. Alguns desses trabalhos mostram que o tratamento com cetoconazol, inibidor da C14 desmetilase, leva a um aumento do colesterol exógeno na *Leishmania*, mas o mecanismo como isso ocorre, a importância desse colesterol em sua membrana e a utilização do colesterol por amastigotas intracelulares ainda não estão claros.

Promastigotas de *L. amazonensis* aumentam a captação de LDL e o seu conteúdo de colesterol com o tratamento com os inibidores da biossíntese do ergosterol. Além disso, as promastigotas ficam mais sensíveis a esses inibidores quando incubadas em soro deslipidado, sugerindo que fontes de colesterol exógeno possam ser importantes para a sobrevivência dos parasitos quando submetidos a uma condição de pressão farmacológica.

A LDL é o maior carreador extracelular de colesterol, tendo um papel fisiológico importante para a função celular e regulação de vias metabólicas. Os macrófagos possuem receptores de LDL, endocitando em condições normais essas partículas. Em condições patológicas, como o caso de hiperlipidemias, desordens genéticas e estresse oxidativo, componentes específicos da LDL são oxidados, aumentando a captação de LDL (Tsimikas & Miller, 2011).

Visto que a principal célula afetada na infecção por *L. amazonensis* é o macrófago e este possui receptores para LDL, avaliamos se as amastigotas poderiam utilizar partículas de LDL. Nas Figuras 6 e 7, imagens por microscopia confocal e microscopia eletrônica de transmissão indicam que a LDL está disponível para a amastigota no interior do macrófago, sugerindo que a amastigota poderia utilizar o colesterol proveniente da LDL, uma vez, que essas partículas estão em contato com o parasito. Nos resultados de microscopia confocal, podemos observar que as partículas de LDL (vermelho) estão bem próximas das amastigotas intracelulares, provavelmente dentro do vacúolo parasitóforo. O vacúolo parasitóforo (VP) possui proteínas que podem transportar nutrientes tanto do VP para o citoplasma quanto o transporte inverso. Além desse transporte ativo de nutrientes, vesículas intracelulares, como aquelas formadas por endocitose de LDL, podem se fundir com o VP descarregando o seu conteúdo intravesicular. O *Toxoplasma gondii*, que necessita utilizar exclusivamente o

colesterol para sua sobrevivência, aumenta as lesões de aterosclerose pelo acúmulo de LDL oxidada dentro da célula hospedeira. Esse acúmulo é acompanhado pela diminuição da colesterolemia (Portugal et al. 2004). Relatos de hipocolesterolemia em pacientes com leishmaniose visceral também são observados, podendo ser indicativos de que o parasito esteja consumindo a LDL ou interferindo com o controle da homeostasia da célula hospedeira (Lal et al. 2007, Liberopoulos et al. 2002). Resultados recentemente publicado por Fernandes e colaboradores (2013), mostram que a infecção por *L. major* aumenta a migração de células inflamatórias para as lesões ateroscleróticas e promovem aterogênese. Esse aumento é acompanhado por um processo de colesterolemia. Esses efeitos são consequência do estímulo no sistema imune pela infecção por *L. major* que estimula componentes inflamatórios da aterosclerose, que são ativados pelos parasitos nos macrófagos. Existem alguns resultados controversos em relação a modulação da homeostasia do colesterol do hospedeiro, mas parece não haver dúvida que realmente a infecção por *Leishmania* altera o metabolismo de colesterol da célula hospedeira.

Macrófagos infectados tem seu 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 et al, 2012; Fortéa et al, 2009). Este colesterol pode ser utilizado de alguma forma pelo parasito, uma vez que já foi demonstrada a presença do colesterol em amastigotas (Hart et al. 1989, Berman et al. 1986). Na Figura 8 observamos que a enzima HMGCoA redutase pode ser regulada pela quantidade de colesterol exógeno disponível, sugerindo que o colesterol exógeno encontrado nos parasitos pode regular a expressão de enzimas da via de biossíntese do ergosterol.

Além da utilização da LDL, a amastigota pode utilizar o colesterol produzido pelo próprio macrófago, uma vez que na Figura 9 (painel A) observamos um aumento do crescimento parasitário na ausência de colesterol proveniente de LDL. Com a diminuição de colesterol extracelular, proveniente da LDL, o macrófago aumenta a expressão de HMGCoA redutase, enzima limitante para a biossíntese de colesterol, para suprir as necessidades da célula. Esse colesterol pode ser usado pela *Leishmania* em maior quantidade, aumentando a sua multiplicação, assim como o *T. gondii*, que utiliza o colesterol do hospedeiro para sua sobrevivência (Nishikawa et al. 2011, Nishikawa et al. 2005). Amastigotas intracelulares foram mais sensíveis ao cetoconazol, miconazol e sinvastatina quando incubados no soro ausente de colesterol (Fig. 9 –Painel C, D e E,

respectivamente), sugerindo que mesmo no ambiente intracelular a *Leishmania spp* utilizaria o colesterol para substituir o ergosterol. Macrófagos infectados também foram tratados com 24-OH colesterol, que inibe tanto a endocitose de LDL quanto a biossíntese de colesterol pela célula hospedeira. O tratamento diminuiu o índice de infecção, na presença ou ausência do colesterol. Esse resultado é semelhante ao observado nos experimentos com *T. gondii*, que também tem o seu crescimento inibido pela ausência completa de colesterol endógeno e exógeno (Sehgal et al. 2005)

Além do *T. gondii*, várias bactérias utilizam o colesterol para sua sobrevivência. A bactéria *Coxiella burnetti*, por exemplo, é um patógeno intracelular obrigatório que necessita do metabolismo de colesterol celular para sua replicação (Howe & Henzen, 2005, Howe & Heinzen, 2006). Para estudar a influência do colesterol, são utilizados inibidores da biossíntese do colesterol do macrófago associados com inibidores de translocação do colesterol, como progesterona e imipramina (Coppens & Courtoy, 2000, Howe & Henzen 2005). A progesterona e a imipramina bloqueiam a liberação do colesterol dos lisossomos, principalmente proveniente da endocitose de partículas de LDL, não permitindo que o mesmo seja distribuído para a utilização da célula. No nosso trabalho nós utilizamos também o fármaco experimental LBqT01, que diminui a entrada de colesterol na célula. Interessantemente, a associação entre inibidores da biossíntese de esteróis com inibidores da utilização do colesterol proveniente da LDL mostrou efeito sinérgico na maioria das combinações em promastigotas e amastigotas intracelulares (Figs. 10 e 12). Esse efeito de diminuição no crescimento parasitário também foi observado com o tratamento com progesterona e imipramina em *T. gondii* e *C. burnetti*. O parasito *T. gondii* e a bactéria *C. burnetti* necessitam do colesterol para o seu crescimento, pois não sintetizam seus próprios esteróis, e o uso desses inibidores bloqueia a liberação do colesterol lisossomal, conseqüentemente diminuindo seu crescimento (Nishikawa et al. 2011, Nishikawa et al. 2005, Howe & Henzen 2005). *Leishmania*, ao contrário de *T. gondii* e *C. burnetti*, possui sua maquinaria própria de biossíntese de esteróis com esqueleto ergostano, além de possuir uma quantidade significativa de colesterol na sua membrana. Então, aliado ao uso dos inibidores da utilização do colesterol, também utilizamos inibidores da biossíntese do ergosterol, bloqueando assim todas as fontes de esteróis do parasito, biossíntese endógena e fonte exógena. Os experimentos foram realizados em ambas as formas, promastigota e amastigota, com o objetivo de avaliar o efeito direto dos inibidores da utilização do

colesterol nos parasitos e avaliar a ausência de fonte de colesterol exógeno para as amastigotas intracelulares, associados aos inibidores da biossíntese do ergosterol.

A inibição da utilização do colesterol associado com a inibição da biossíntese do ergosterol apresentou excelente atividade leishmanicida, tanto em promastigotas quanto em amastigotas, sem afetar o macrófago, corroborando o resultado de inibição do crescimento parasitário de promastigotas tratadas com cetoconazol e miconazol em soro deslipidado.

Os inibidores da utilização do colesterol apresentaram excelente atividade anti-promastigota, mostrando que possuem um efeito direto nos parasitos. Promastigotas tratados com progesterona, imipramina e LBqT01 apresentaram uma alteração morfológica, com a maioria dos parasitos em uma forma oval (dados não mostrados). Para avaliar uma possível interferência desses fármacos no metabolismo endógeno de esteróis do parasito, lipídeos neutros de promastigotas tratados e não tratados foram extraídos e analisados por (CG/MS).

Na Figura 13 e na tabela 5 observamos alterações no perfil de esteróis dos parasitos tratados com os inibidores da biossíntese do ergosterol (cetoconazol, miconazol e terbinafina) e com os inibidores da utilização do colesterol (LBqT01, progesterona e imipramina). Além da alteração no perfil de esteróis endógenos observamos um aumento no conteúdo de colesterol dos parasitos, mostrando que realmente quando os esteróis endógenos são inibidos ocorre um aumento do colesterol exógeno como um mecanismo compensatório.

Nos parasitos tratados com cetoconazol e miconazol, inibidores da C-14 desmetilase, observamos o acúmulo de esteróis metilados. O tratamento com 2 e 8  $\mu\text{M}$  de miconazol e cetoconazol induziu um acúmulo do  $14\alpha$ -metilergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol (**12**) (tabela 5), e de  $4\alpha$ - $14\alpha$ -dimetilergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol, (obtusifoliol) (**13**). Esses esteróis são acumulados normalmente no tratamento com esse inibidores da C-14 desmetilase (Roberts et al. 2003, Beach et al. 1988). Ocorre também um aumento no conteúdo de colesterol (**6**) nos parasitos tratados com 2 e 8  $\mu\text{M}$  de miconazol e com 2  $\mu\text{M}$  de cetoconazol. Esse aumento de colesterol observado foi relatado pelo nosso grupo (Andrade-neto et al, 2011). A falta da biossíntese de esteróis da *Leishmania* ocasiona um aumento de colesterol exógeno, provavelmente através de um mecanismo compensatório, com o objetivo de suprir as necessidades de esteróis. O tratamento com

4 e 8  $\mu\text{M}$  de terbinafina, inibidor da esqueleno epoxidase, apresentou acúmulo de  $4\alpha$ - $14\alpha$ -dimetilergosta-8,24(28)-dien- $3\beta$ -ol, (obtusifoliol) (**13**).

O acúmulo de  $14\alpha$ -metilergosta-8,24(28)-dien- $3\beta$ -ol (**12**) também foi observado no tratamento com 10  $\mu\text{M}$  de LBqT 01, progesterona e 4 $\mu\text{M}$  de imipramina. Os parasitos tratados com 10, 20 e 40  $\mu\text{M}$  de LBqT01 apresentaram um acúmulo de colesterol e lanosterol dose dependente e acúmulo de esteróis metilados, (25)26,26-dimetil-5,23-ergostadieno (**25**) nas três concentrações testadas e de 4-metilcolesta-8,24-dien- $3\beta$ -ol (**26**) na maior concentração. Essas alterações mostram que principalmente o tratamento com LBqT01 está interferindo na biossíntese de esteróis da *Leishmania*. O tratamento com progesterona também altera a biossíntese do ergosterol com acúmulo de esteróis metilados.

A imipramina, que foi utilizada como um bloqueador do colesterol lisossomal, também apresentou atividade na biossíntese do ergosterol. No tratamento com 4  $\mu\text{M}$  de imipramina, observamos uma grande quantidade de ergosta-5,7-dien- $3\beta$ -ol (desidroepisterol) (**7**) (principal esterol encontrado em *L. amazonensis*) (Torres-Santos et al. 2009), mas também verificamos um acúmulo de um esterol dimetilado (**29**), colesta-5,24-dien- $3\beta$ -ol (desmosterol) (**30**) e também o surgimento de três sinais desconhecidas, que não são encontrados no controle. No tratamento com 8  $\mu\text{M}$  observamos um acúmulo maior de esterol dimetilado (**29**) e acúmulo de esqualeno (**1**) menor quantidade de ergosta-5,7-dien- $3\beta$ -ol (desidroepisterol) (**7**) e ausência dos esteróis, ergosta-5,8,22-trien- $3\beta$ -ol (**2**), ergosta-4,7,22-trien- $3\beta$ -ol (**3**), desconhecido (**4**) e ergosta-5,7-dien- $3\beta$ -ol (24 desidroepisterol) (**5**). Baseado nesses dados, concluímos que a imipramina também possui atividade na biossíntese do ergosterol.

Após o estudo do mecanismo de ação dos inibidores da biossíntese do ergosterol e dos inibidores da utilização do colesterol, o cetoconazol e o inibidor (LBqT01) foram testados associados ou não na infecção por leishmaniose cutânea no modelo murino. Como demonstrado na Figura 14, a associação apresentou excelente atividade leishmanicida, com redução do tamanho da lesão.

A resistência clínica para os azóis foi observada em isolados de *Candida albicans*, aumentando o problema mundial de saúde pública, que é pior em pacientes infectados com HIV (Melo et al. 2009, Manzano-Gayosso et al. 2008, Rautemaa et al. 2008). A resistência fúngica parece ser devido ao efluxo da molécula pela superexpressão de transportadores ABC e de vários genes ERG que codificam enzimas

da via de biossíntese de esteróis (Tsao et al, 2009; Croft et al, 2006). Mutações, rearranjos, ampliações de genes dos alvos de moléculas são eventos comuns na resistência e, especificamente em *Leishmania* spp., amplificação gênica após seleção gradual para resistência é um fenômeno bem conhecido (Coderre et al, 1983).

Estudos experimentais sobre superexpressão da C-14 desmetilase em *Tripanosoma cruzi* tratado com inibidores da biossíntese foram publicados (Hankins et al, 2005). A indução de resistência *in vitro* em *Leishmania* spp. e *T. cruzi* tem sido bastante estudada. Por exemplo, indução de resistência para os azóis em *T. cruzi* (Buckner et al, 1999), caracterização de resistência à atovaquona em promastigotas de *L. infantum* (Cauchetier et al, 2002), desenvolvimento e caracterização de promastigotas de *L. donovani* resistentes à paromomicina (Maarouf et al, 1998), demonstrando que o mecanismo de resistência adquirido pelos parasitos. Dentre os mecanismos estudados, temos a superexpressão de transportadores ABC e dos alvos farmacológicos. Alteração na composição lipídica, como aumento no conteúdo de colesterol, é observada em alguns casos de resistência. Surpreendentemente, estudos sobre a resistência adquirida aos azóis em *Leishmania* spp. não têm sido publicados (Croft et al. 2006, Legare et al. 2001a).

Foram geradas três cepas de *L. amazonensis* resistentes ao miconazol, terbinafina e sinvastatina, uma cepa de *L. braziliensis* resistente a terbinafina e duas cepas de *L. guyanensis* resistente ao miconazol e à sinvastatina (Tabela 6). Experimentos de resistência cruzada aos inibidores da biossíntese do ergosterol e à miltefosina, anfotericina B e antimônio foram usados (Fig 21 e 22) (tabela 7, 8 e 9). A expressão gênica das enzimas da biossíntese do ergosterol e o perfil de esteróis das cepas selvagens e resistentes foram avaliados como mecanismo de resistência (Fig.24). A expressão dos genes da biossíntese do ergosterol das cepas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* foi avaliada por PCR quantitativo (PCR tempo real) e o perfil de esteróis foi avaliado por cromatografia em camada delgada (TLC). As enzimas da biossíntese do ergosterol e o perfil de esteróis foram modificados nas cepas resistentes em comparação as cepas selvagens, que acumularam principalmente colesterol exógeno (Figs. 24-28).

Foi observada resistência cruzada aos fármacos relacionados e não relacionados a via de biossíntese do ergosterol. A cepa de *L. amazonensis* resistente ao miconazol apresentou resistência cruzada para sinvastatina e anfotericina B. O nível de expressão da HMGCoA redutase (enzima que é inibida pela sinvastatina) está diminuído, mostrando que o mecanismo de resistência cruzada não está relacionado com o alvo

principal da sinvastatina. A resistência cruzada à anfotericina B pode ser explicada pela diminuição dos esteróis com esqueleto ergostano (ergosterol) e pelo aumento do colesterol exógeno, uma vez que esse fármaco tem mais afinidade pelo ergosterol (Sundar & Chakravarty 2013). A cepa de *L. amazonensis* resistente à terbinafina apresentou resistência cruzada ao miconazol, sinvastatina, anfotericina B, e antimônio III e a cepa resistente a sinvastatina apresentou à terbinafina, miltefosina, anfotericina B e antimônio III.

A cepa de *L. guyanensis* resistente ao miconazol apresentou resistência cruzada à sinvastatina, miltefosina, anfotericina B e antimônio III. Assim como foi observado na cepa de *L. amazonensis* resistente ao miconazol, a resistência cruzada a anfotericina B pode ser explicada pela diminuição dos esteróis com esqueleto ergostano e aumento do colesterol, por questões de baixa afinidade ao colesterol. A cepa de *L. braziliensis* resistente a terbinafina apresentou resistência cruzada somente contra a sinvastatina, que pode ser explicada pelo aumento da expressão da enzima HMGCoA redutase. A cepa de *L. guyanensis* resistente a sinvastatina apresentou resistência cruzada a miltefosina, anfotericina B e antimônio III.

O mecanismo de resistência da cepa de *L. guyanensis* resistente a sinvastatina foi avaliado através do sequenciamento total do DNA (Fig. 29). Os resultados mostram que alguns genes foram amplificados na cepa resistente em comparação com a cepa selvagem. *Leishmania* frequentemente amplifica regiões do genoma em resposta a pressão farmacológica (Coelho *et al*, 2011). O gene da tirosina fosfatase amplificado no cromossomo 14 pode estar relacionado ao mecanismo de resistência, uma vez que atua como um regulador importante no transporte de colesterol e regulação da biossíntese de esteróis, regulando o metabolismo do ácido araquidônico e na reorganização mitocondrial em outros tipos celulares (Cooke *et al*, 2011). Posteriormente, análises mais profundas nos resultados serão realizadas para explicar o mecanismo de resistência.

Os transportadores ABC que transportam fosfolipídeos e colesterol em células de mamíferos foram clonados e superexpressados em promastigotas de *L. amazonensis* para posterior análise do seu papel no transporte de esteróis em *Leishmania*. Os transportadores transfectados foram: ABCG1, ABCG4 e ABCG6 (Kennedy *et al*. 2005, Tarling & Edwards, 2011, Schmitz *et al*, 2001).

Os dados obtidos nesta tese sugerem que amastigotas intracelulares tem acesso ao colesterol proveniente da LDL do hospedeiro e que a inibição desse processo

associado aos inibidores da biossíntese do ergosterol pode ser utilizada como uma alternativa terapêutica para o tratamento da leishmaniose.

Resultados promissores foram apresentados com o tratamento associado da LBqT01 + cetonazol, mostrando que existe uma grande correlação entre a atividade dos inibidores da biossíntese do ergosterol e a utilização do colesterol exógeno. O colesterol também foi importante para o mecanismo de resistência de alguns inibidores da biossíntese do ergosterol, como a apresentada pelas cepas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* resistentes ao miconazol.

Juntos, esses resultados reforçam a importância do colesterol exógeno na interação parasito-hospedeiro e seu possível papel na sobrevivência desse patógeno em condições de estresse metabólico ou farmacológico

## **5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Alvar,J, Aparicio,P, Aseffa,A, Den Boer,M, Canavate,C, Dedet,JP, Gradoni,L, Ter Horst,R, Lopez-Velez,R, Moreno,J. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clinical Microbiology Reviews* 2008; 21: 334-+.
- Alvar,J, Velez,ID, Bern,C, Herrero,M, Desjeux,P, Cano,J, Jannin,J, den Boer,M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *Plos One* 2012; 7.
- 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.
- Ameen,M. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: emerging therapies and progress in disease management. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2010; 11: 557-569.
- Anacleto,C, Abdo,MCB, Ferreira,AVB, Murta,SMF, Romanha,AJ, Fernandes,AP, Moreira,ESA. Structural and functional analysis of an amplification containing a PGPA gene in a glucantime-resistant *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* cell line. *Parasitology Research* 2003; 90: 110-118.
- Anastasis,P, Freer,I, Overton,K, Rycroft,D, Singh,SB. The Role of Leucine in Isoprenoid Metabolism - Incorporation of [3-C-13] Leucine and of [2-H-3,4-C-14]-Beta,Beta-Dimethylacrylic Acid Into Phytosterols by Tissue-Cultures of *Andrographis-Paniculata*. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* 1985; 148-149.
- Andrade-Neto,VV, Cicco,NNT, 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.
- Antinori,S, Cascio,A, Parravicini,C, Bianchi,R, Corbellino,M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. *Lancet Infectious Diseases* 2008; 8: 191-199.
- Araujo-Santos,JM, Parodi-Talice,A, Castanys,S, Gamarro,F. The overexpression of an intracellular ABCA-like transporter alters phospholipid trafficking in *Leishmania*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; 330: 349-355.
- Ashford,RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology* 2000; 30: 1269-1281.
- Azofra,MM, Somovilla,JLP, Porras,MC, Carrillo,LH, Perez,RD. Use of Intralesional Voriconazole for the Treatment of Cutaneous *Scedosporium apiospermum* Infection. *Clinical Infectious Diseases* 2010; 51: 255-257.
- Baier,CJ, Gallegos,CE, Levi,V, Barrantes,FJ. Cholesterol modulation of nicotinic acetylcholine receptor surface mobility. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 2010; 39: 213-227.
- 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: 43-56.

- Beach,DH, Goad,LJ, Holz,GG. Effects of Ketoconazole on Sterol Biosynthesis by Trypanosoma-Cruzi Epimastigotes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1986; 136: 851-856.
- 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.
- Benicio Ede A, Gadelha EP, Talhari A, Silva RM Jr, Ferreira LC, Santos MC, Mira MT, Oliveira CM, Talhari C, Talhari S, Machado PR, Schriefer A. Combining diagnostic procedures for the management of leishmaniasis in areas with high prevalence of Leishmania guyanensis. *An Bras Dermatol* 2011;86(6):1141-4.
- Berman,JD, Goad,LJ, Beach,DH, Holz,GG. Effects of Ketoconazole on Sterol Biosynthesis by Leishmania-Mexicana Mexicana Amastigotes in Murine Macrophage Tumor-Cells. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1986; 20: 85-92.
- 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.
- Beverley,SM, Kapler,J, Cordingley,J. Amplification of the Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthetase Gene of Leishmania-Major. *Journal of Cellular Biochemistry* 1986; 126.
- Blanco,VM, Cossio,A, Martinez,JD, Saravia,NG. Clinical and Epidemiologic Profile of Cutaneous Leishmaniasis in Colombian Children: Considerations for Local Treatment. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2013; 89: 359-364.
- Bligh EG & Dryer MJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol* 1959 37(8): 911-913.
- Blum,JA, Hatz,CF. Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in Travelers 2009. *Journal of Travel Medicine* 2009; 16: 123-131.
- Borroni,V, Barrantes,FJ. Cholesterol Modulates the Rate and Mechanism of Acetylcholine Receptor Internalization. *Journal of Biological Chemistry* 2011; 286: 17122-17132.
- Braga,MV, Magaraci,F, Lorente,SO, Gilbert,I, de Souza,W. Effects of inhibitors of Delta(24(25))-sterol methyl transferase on the ultrastructure of epimastigotes of Trypanosoma cruzi. *Microscopy and Microanalysis* 2005; 11: 506-515.
- Buckner,FS, Griffin,JH, Wilson,AJ, Van Voorhis,WC. Sterol biosynthesis inhibitors with potent activity against Trypanosoma cruzi and Leishmania mexicana. *Journal of Investigative Medicine* 1999; 47: 52A.

- Bukiya,AN, Belani,JD, Rychnovsky,S, Dopico,AM. Specificity of cholesterol and analogs to modulate BK channels points to direct sterol-channel protein interactions. *Journal of General Physiology* 2011; 137: 93-110.
- Butler,JD, Blanchettemackie,J, Goldin,E, Oneill,RR, Carstea,G, Roff,CF, Patterson,MC, Patel,S, Comly,ME, Cooney,A, Vanier,MT, Brady,RO, Pentchev,PG. Progesterone Blocks Cholesterol Translocation from Lysosomes. *Journal of Biological Chemistry* 1992; 267: 23797-23805.
- Campos-Salinas,J, Leon-Guerrero,D, Gonzalez-Rey,E, Delgado,M, Castanys,S, Perez-Victoria,JM, Gamarro,F. LABC2, a New ABC Transporter Implicated in Phosphatidylserine Exposure, Is Involved in the Infectivity and Pathogenicity of *Leishmania*. *Plos Neglected Tropical Diseases* 2013; 7.
- Carrero-Lerida,J, Perez-Moreno,G, Castillo-Acosta,VM, Ruiz-Perez,LM, Gonzalez-Pacanowska,D. Intracellular location of the early steps of the isoprenoid biosynthetic pathway in the trypanosomatids *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. *International Journal for Parasitology* 2009; 39: 307-314.
- Cauchetier,E, Loiseau,PM, Lehman,J, Rivollet,D, Fleury,J, Astier,A, Deniau,M, Paul,M. Characterisation of atovaquone resistance in *Leishmania infantum* promastigotes. *International Journal for Parasitology* 2002; 32: 1043-1051.
- Champe PC HR. Metabolismo do colesterol e Esteróides. *Bioquímica ilustrada*. 1997: 212-32.
- Cham WJ & Knowles BR. A solvent system for delipidation of plasma or serum without protein precipitation. *J. Lipid Res* 1976 17: 176-181.
- Chang,TY, Chang,CCY, Ohgami,N, Yamauchi,Y. Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2006; 22: 129-157.
- Coderre,JA, Beverley,SM, Schimke,RT, Santi,DV. Overproduction of A Bifunctional Thymidylate Synthetase-Dihydrofolate Reductase and Dna Amplification in Methotrexate-Resistant *Leishmania-Tropica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 1983; 80: 2132-2136.
- Coelho,AC, Boisvert,S, Mukherjee,A, Leprohon,P, Corbeil,J, Ouellette,M. Multiple Mutations in Heterogeneous Miltefosine-Resistant *Leishmania major* Population as Determined by Whole Genome Sequencing. *Plos Neglected Tropical Diseases* 2012; 6.
- Cooke,M, Mele,P, Maloberti,P, Duarte,A, Poderoso,C, Orlando,U, Paz,C, Maciel,FC, Podesta,EJ. Tyrosine phosphatases as key regulators of StAR induction and cholesterol transport: SHP2 as a potential tyrosine phosphatase involved in steroid synthesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2011; 336: 63-69.
- Coombs GH NM. Lipid biochemistry of trypanosomatids. *Biochemical Protozoology* . 1991: 312-28.

- Coppens,I, Courtoy,PJ. Exogenous and Endogenous Sources of Sterols in the Culture-Adapted Procyclic Trypomastigotes of Trypanosoma-Brucei. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1995; 73: 179-188.
- Coppens,I, Courtoy,PJ. The adaptative mechanisms of trypanosoma Brucei for sterol homeostasis in its different life-cycle environments. *Annual Review of Microbiology* 2000; 54: 129-156.
- 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: 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 Dec;49(4):357-64
- Croft,SL, Sundar,S, Fairlamb,AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews* 2006; 19: 111-+.
- da Cunha-Júnior EF, Pacienza-Lima W, Ribeiro GA, Netto CD, do Canto-Cavalheiro MM, da Silva AJ, Costa PR, Rossi-Bergmann B, Torres-Santos E Effectiveness of the local or oral delivery of the novel naphthopterocarpanquinone LQB-118 against cutaneous leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother.* 2011 ;66(7):1555-9.
- Dadhich,S, Maharjan,M, Chatterjee,M, Mukherjee,A, Madhubala,R. Identification of Potential Biomarkers for Antimony Susceptibility/Resistance in Leishmania Donovanii. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2009; 81: 10-11.
- Daneshbod,Y, Oryan,A, Davarmanesh,M, Shirian,S, Negahban,S, Aledavood,A, Davarpanah,MA, Soleimanpoor,H, Daneshbod,K. Clinical, Histopathologic, and Cytologic Diagnosis of Mucosal Leishmaniasis and Literature Review. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2011; 135: 478-482.
- de Brito ME, Andrade MS, Dantas-Torres F, Rodrigues EH, Cavalcanti Mde P, de Almeida AM, Brandão-Filho SP. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012 45(4):425-9.
- 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 Apr;130(4):330-40.
- 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, 27-29 June 2012. *Parasites & Vectors* 2013; 6.
- do Monte-Neto,RL, Coelho,AC, Raymond,F, Legare,D, Corbeil,J, Melo,MN, Frezard,F, Ouellette,M. Gene Expression Profiling and Molecular Characterization of

- Antimony Resistance in *Leishmania amazonensis*. *Plos Neglected Tropical Diseases* 2011; 5.
- Ejazi,SA, Ali,N. Developments in diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis during the last decade and future prospects. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 2013; 11: 79-98.
- El Fadili,K, Messier,N, Leprohon,P, Roy,G, Guimond,C, Trudel,N, Saravia,NG, Pavadopoulou,B, Legare,D, Oullette,M. Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005; 49: 1988-1993.
- Ennes-Vidal V, Menna-Barreto RF, Santos AL, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM. MDL28170, a calpain inhibitor, affects *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis, ultrastructure and attachment to *Rhodnius prolixus* midgut. *PLoS One* 2011; 4;6(4):e18371
- Fernandes LR, Ribeiro AC, Segatto M, Santos LF, Amaral J, Portugal LR, Leite JI. *Leishmania major* Self-Limited Infection Increases Blood Cholesterol and Promotes Atherosclerosis Development. *Cholesterol*. 2013;2013:754580.
- Fortéa JO, Llave EL, Regnault B, Coppée JY, Milon M, Lang T and Prina E. Transcriptional signatures of BALB/c mouse macrophages housing multiplying *Leishmania amazonensis* amastigotes.. *BMC Genomics* 2009;10:119:1-11.
- Fraga J, Veland N, Montalvo AM, Praet N, Boggild AK, Valencia BM, Arévalo J, Llanos-Cuentas A, Dujardin JC, Van der Auwera G. Accurate and rapid species typing from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions of the New World. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012 ;74(2):142-50.
- Ginger,ML, Chance,ML, Goad,LJ. Carbon sources for fatty acid and sterol biosynthesis in *Leishmania* species. *Biochemical Society Transactions* 1996; 24: S434.
- Ginger,ML, Chance,ML, Goad,LJ. Elucidation of carbon sources used for the biosynthesis of fatty acids and sterols in the trypanosomatid *Leishmania mexicana*. *Biochemical Journal* 1999; 342: 397-405.
- Goad,LJ. The Effects of Antifungal Compounds on Growth and Sterol-Metabolism in Plants and Protozoa. *Biochemical Society Transactions* 1994; 22: 629-635.
- Goad,LJ, Holz,GG, Beach,DH. Sterols of *Leishmania* Species - Implications for Biosynthesis. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1984; 10: 161-170.
- Goad,LJ, Holz,GG, Beach,DH. Sterols of Ketoconazole-Inhibited *Leishmania-Mexicana-Mexicana* Promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1985; 15: 257-279.

- 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. J Lipid Res 2012;53(12):2560-72.
- Ghosh J, Bose M, Roy S, Bhattacharyya SN. *Leishmania donovani* targets Dicer1 to downregulate miR-122, lower serum cholesterol, and facilitate murine liver infection. Cell Host Microbe 2013;13;13(3):277-88
- Granthon,AC, Braga,MV, Rodrigues,JCF, Cammerer,S, Lorente,SO, Gilbert,IH, Urbina,JA, de Souza,W. Alterations on the growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* induced by squalene synthase inhibitors. Veterinary Parasitology 2007; 146: 25-34.
- Grondin,K, Kundig,C, Roy,G, Ouellette,M. Linear amplicons as precursors of amplified circles in methotrexate-resistant *Leishmania tarentolae*. Nucleic Acids Research 1998; 26: 3372-3378.
- Gros,L, Lorente,SO, Jimenez,CJ, Yardley,V, Rattray,L, Wharton,H, Little,S, Croft,SL, Ruiz-Perez,LM, Gonzalez-Pacanowska,D, Gilbert,IH. Evaluation of azasterols as anti-parasitics. Journal of Medicinal Chemistry 2006; 49: 6094-6103.
- Guerra JA, Prestes SR, Silveira H, Coelho LI, Gama P, Moura A, Amato V, Barbosa Md, Ferreira LCM Mucosal Leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* in the Brazilian Amazon. PLoS Negl Trop Dis 2011 8;5(3):e980.
- Hallander HO, Dornbusch K, Gezelius L, Jacobson K, Karlsson I. Synergism Between Aminoglycosides and Cephalosporins with Antipseudomonal Activity - Interaction Index and Killing Curve Method. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1982 22(5):743-752.
- Hankins,EG, Gillespie,JR, Aikenhead,K, Buckner,FS. Upregulation of sterol C14-demethylase expression in *Trypanosoma cruzi* treated with sterol biosynthesis inhibitors. Molecular and Biochemical Parasitology 2005; 144: 68-75.
- Hart,DT, Lauwers,WJ, Willemsens,G, Vandenbossche,H, Opperdoes,FR. Perturbation of Sterol Biosynthesis by Itraconazole and Ketoconazole in *Leishmania-Mexicana-Mexicana* Infected Macrophages. Molecular and Biochemical Parasitology 1989; 33: 123-134.
- Haughan,PA, Chance,ML, Goad,LJ. Synergism In vitro of Lovastatin and Miconazole As Antileishmanial Agents. Biochemical Pharmacology 1992; 44: 2199-2206.
- Haughan,PA, Chance,ML, Goad,LJ. Effects of An Azasterol Inhibitor of Sterol 24-Transmethylation on Sterol Biosynthesis and Growth of *Leishmania-Donovani* Promastigotes. Biochemical Journal 1995; 308: 31-38.
- Hayat, M.A. Colloidal gold: A cytochemical marker for light and fluorescent microscopy and for transmission and scanning electron microscopy. Scanning Electron Microsc 1981;11:9-31.

- Holz,GG, Goad,LJ, Galvaoquintao,L, Keithley,JS, Beach,DH. Leishmania Amastigotes Incorporate and Transform Macrophage Host-Cell Sterols. *Journal of Cellular Biochemistry* 1986; 162.
- Hoover-Plow,J, Huang,MG. Lipoprotein(a) metabolism: Potential sites for therapeutic targets. *Metabolism-Clinical and Experimental* 2013; 62: 479-491.
- Howe,D, Heinzen,RA. Coxiella burnetii inhabits a cholesterol-rich vacuole and influences cellular cholesterol metabolism. *Cellular Microbiology* 2006; 8: 496-507.
- Howe,D, Henzen,RA. Replication of Coxiella burnetii is inhibited in CHOK-1 cells treated with inhibitors of cholesterol metabolism. *Rickettsioses: from Genome to Proteome, Pathobiology, and Rickettsiae As An International Threat* 2005; 1063: 123-129.
- Jimenez-Jimenez,C, Carrero-Lerida,J, Sealey-Cardona,M, Perez,LMR, Urbina,JA, Pacanowska,DG. Delta(24(25))-sterol methenyltransferase: Intracellular localization and azasterol sensitivity in Leishmania major promastigotes over expressing the enzyme. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2008; 160: 52-59.
- Kendall,SL, Burgess,P, Balhana,R, Withers,M, ten Bokum,A, Lott,JS, Gao,C, Uhia-Castro,I, Stoker,NG. Cholesterol utilization in mycobacteria is controlled by two TetR-type transcriptional regulators: kstR and kstR2. *Microbiology-Sgm* 2010; 156: 1362-1371.
- Kennedy,MA, Barrera,GC, Nakamura,K, Baldan,A, Tarr,P, Fishbein,MC, Frank,J, Francone,OL, Edwards,PA. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metabolism* 2005; 1: 121-131.
- Kovacs,WJ, Krisans,S. Cholesterol biosynthesis and regulation: Role of peroxisomes. *Peroxisomal Disorders and Regulation of Genes* 2003; 544: 315-327.
- Kovacs,WJ, Olivier,LM, Krisans,SK. Central role of peroxisomes in isoprenoid biosynthesis. *Progress in Lipid Research* 2002; 41: 369-391.
- Kovacs,WJ, Tape,KN, Shackelford,JE, Duan,XY, Kasumov,T, Kelleher,JK, Brunengraber,H, Krisans,SK. Localization of the pre-squalene segment of the isoprenoid biosynthetic pathway in mammalian peroxisomes. *Histochemistry and Cell Biology* 2007; 127: 273-290.
- Kumar,D, Singh,R, Bhandari,V, Kulshrestha,A, Negi,NS, Salotra,P. Biomarkers of antimony resistance: need for expression analysis of multiple genes to distinguish resistance phenotype in clinical isolates of Leishmania donovani. *Parasitology Research* 2012; 111: 223-230.
- Kundig,C, Haimeur,A, Legare,D, Papadopoulou,B, Ouellette,M. Increased transport of pteridines compensates for mutations in the high affinity folate transporter and contributes to methotrexate resistance in the protozoan parasite Leishmania tarentolae. *Embo Journal* 1999; 18: 2342-2351.

- Lagane,B, Gaibelet,G, Meilhoc,E, Masson,JM, Cezanne,L, Lopez,A. Role of sterols in modulating the human mu-opioid receptor function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 33197-33200.
- Lal,CS, Kumar,A, Kumar,S, Pandey,K, Kumar,N, Sinha,PK, Bimal,S, Das,P. Hypocholesterolemia and increased triglyceride in pediatric visceral leishmaniasis. *Clinica Chimica Acta* 2007; 382: 151-153.
- Legare,D, Cayer,S, Singh,AK, Richard,D, Papadopoulou,B, Ouellette,M. ABC proteins of *Leishmania*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 2001a; 33: 469-474.
- Legare,D, Richard,D, Mukhopadhyay,R, Stierhof,YD, Rosen,BP, Haimeur,A, Papadopoulou,B, Ouellette,M. The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 26301-26307.
- Lepesheva,GI, Waterman,MR. CYP51 - the omnipotent P450. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2004; 215: 165-170.
- 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, Ouellette,M. ABC transporters involved in drug resistance in human parasites. *Essays in Biochemistry: Abc Transporters* 2011; 50: 121-144.
- 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.
- Liberopoulos,E, Alexandridis,G, Bairaktari,E, Elisaf,M. Severe hypocholesterolemia with reduced serum lipoprotein(a) in a patient with visceral leishmaniasis. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 2002; 32: 305-308.
- Liendo,A, Visbal,G, Piras,MM, Piras,R, Urbina,JA. Sterol composition and biosynthesis in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1999; 104: 81-91.
- Lindoso,JAL, Barbosa,RN, Posada-Vergara,MP, Duarte,MIS, Oyafuso,LK, Amato,VS, Goto,H. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. *British Journal of Dermatology* 2009; 160: 311-318.
- Linetti,A, Fratangeli,A, Taverna,E, Valnegri,P, Francolini,M, Cappello,V, Matteoli,M, Passafaro,M, Rosa,P. Cholesterol reduction impairs exocytosis of synaptic vesicles. *Journal of Cell Science* 2010; 123: 595-605.
- Lorente,SO, Gomez,R, Jimenez,C, Cammerer,S, Yardley,V, Luca-Fradley,K, Croft,SL, Perez,LMR, Urbina,J, Pacanowska,DG, Gilbert,IH. Biphenylquinuclidines as inhibitors of squalene synthase and growth of parasitic protozoa. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2005; 13: 3519-3529.

- Lorente,SO, Rodrigues,JCF, Jimenez,CJ, Joyce-Menekse,M, Rodrigues,C, Croft,SL, Yardley,V, Luca-Fradley,K, Ruiz-Perez,LM, Urbina,J, de Souza,W, Pacanowska,DG, Gilbert,IH. Novel azasterols as potential agents for treatment of leishmaniasis and trypanosomiasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 48: 2937-2950.
- Lowry, OH, Roserbrough, NJ, Farr, AR. Opperdoes, FR. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry* 1951 193 (1): 265-270.
- Maarouf,M, Adeline,MT, Solignac,M, Vautrin,D, Robert-Gero,M. Development and characterization of paromomycin-resistant *Leishmania donovani* promastigotes. *Parasite-Journal de la Societe Francaise de Parasitologie* 1998; 5: 167-173.
- Maltezou,HC. Drug Resistance in Visceral Leishmaniasis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010.
- Mandal,G, Sarkar,A, Saha,P, Singh,N, Sundar,S, Chatterjee,M. Functionality of drug efflux pumps in antimonial resistant *Leishmania donovani* field isolates. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 2009; 46: 86-92.
- Mandal,S, Maharjan,M, Singh,S, Chatterjee,M, Madhubala,R. Assessing aquaglyceroporin gene status and expression profile in antimony-susceptible and -resistant clinical isolates of *Leishmania donovani* from India. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2010; 65: 496-507.
- Manzano-Gayosso,P, Mendez-Tovar,LJ, Hernandez-Hernandez,F, Lopez-Martinez,R. Antifungal resistance: an emerging problem in Mexico. *Gaceta Medica de Mexico* 2008; 144: 23-26.
- Mcgee,DJ, George,AE, Trainor,EA, Horton,KE, Hildebrandt,E, Testerman,TL. Cholesterol Enhances *Helicobacter pylori* Resistance to Antibiotics and LL-37. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011; 55: 2897-2904.
- Mcgookey,DJ, Anderson,RGW. Morphological Characterization of the Cholesteryl Ester Cycle in Cultured Mouse Macrophage Foam Cells. *Journal of Cell Biology* 1983; 97: 1156-1168.
- McNicoll,F, Drummelsmith,J, Muller,M, Madore,E, Boilard,N, Ouellette,M, Papadopoulou,B. A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. *Proteomics* 2006; 6: 3567-3581.
- Medina,JM, Rodrigues,JCF, De Souza,W, Atella,GC, Barrabin,H. Tomatidine promotes the inhibition of 24-alkylated sterol biosynthesis and mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Parasitology* 2012; 139: 1253-1265.
- Melo,NR, Taguchi,H, Culhari,VP, Kamei,K, Mikami,Y, Smith,SN, Vilela,MS. Oral candidiasis of HIV-infected children undergoing sequential HIV therapies. *Medical Mycology* 2009; 47: 149-156.
- Milovanovic,I, Trbovich,AM, Vujanic,M, Klun,I, Bobic,B, Nikolic,A, Ivovic,V, Djurkovic-Djakovic,O. *Toxoplasma gondii* Infection Induces Lipid Metabolism

- Alterations in the Murine Host. *International Journal of Infectious Diseases* 2008; 12: E172-E173.
- Mittal,MK, Rai,S, Ravinder,A, Gupta,S, Sundar,S, Goyal,N. Characterization of natural antimony resistance in *Leishmania donovani* isolates. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2007; 76: 681-688.
- Mukherjee,A, Boisvert,S, do Monte-Neto,RL, Coelho,AC, Raymond,F, Mukhopadhyay,R, Corbeil,J, Ouellette,M. Telomeric gene deletion and intrachromosomal amplification in antimony-resistant *Leishmania*. *Molecular Microbiology* 2013; 88: 189-202.
- Mukherjee,A, Langston,LD, Ouellette,M. Intrachromosomal tandem duplication and repeat expansion during attempts to inactivate the subtelomeric essential gene GSH1 in *Leishmania*. *Nucleic Acids Research* 2011; 39: 7499-7511.
- Mukherjee,A, Padmanabhan,PK, Singh,S, Roy,G, Girard,I, Chatterjee,M, Ouellette,M, Madhubala,R. Role of ABC transporter MRPA, gamma-glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of *Leishmania donovani*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007; 59: 204-211.
- Muth,S, Fries,A, Gimpl,G. Cholesterol-induced conformational changes in the oxytocin receptor. *Biochemical Journal* 2011; 437: 541-553.
- Myler PJ FN. Leishmaniasis: epidemiological Trends and Diagnosis. *Leishmania - After the genome*. 2008: 1-14.
- Nelson DL CM. Biossíntese de colesterol. *Lehninger- Princípios de Bioquímica* . 2002: 314-67.
- Neuber,H. Leishmaniasis. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 2008; 6: 754-764.
- Nishikawa,Y, Ibrahim,HM, Kameyama,K, Shiga,I, Hiasa,J, Xuan,XN. Host Cholesterol Synthesis Contributes to Growth of Intracellular *Toxoplasma gondii* in Macrophages. *Journal of Veterinary Medical Science* 2011; 73: 633-639.
- Nishikawa,Y, Quittnat,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.
- Odds,FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; 52: 1.
- 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.
- Ortiz-Gomez,A, Jimenez,C, Estevez,AM, Carrero-Lerida,J, Ruiz-Perez,LM, Gonzalez-Pacanowska,D. Farnesyl diphosphate synthase is a cytosolic enzyme in *Leishmania*

- major promastigotes and its overexpression confers resistance to risedronate. *Eukaryotic Cell* 2006; 5: 1057-1064.
- Pan,L, Lezama-Davila,CM, Isaac-Marquez,AP, Calomeni,EP, Fuchs,JR, Satoskar,AR, Kinghorn,AD. Sterols with antileishmanial activity isolated from the roots of *Pentalinon andrieuxii*. *Phytochemistry* 2012; 82: 128-135.
- Papadopoulou,B, Roy,G, Ouellette,M. A Novel Antifolate Resistance Gene on the Amplified H-Circle of *Leishmania*. *Embo Journal* 1992; 11: 3601-3608.
- Parodi-Talice,A, Araujo,JM, Torres,C, Perez-Victoria,JM, Gamarro,F, Castanys,S. The overexpression of a new ABC transporter in *Leishmania* is related to phospholipid trafficking and reduced infectivity. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 2003; 1612: 195-207.
- Patra,P, Guha,SK, Maji,AK, Saha,P, Ganguly,S, Chakraborty,A, Kundu,PK, Sarker,S, Ray,K. Efficacy of oral miltefosine in visceral leishmaniasis in rural West Bengal, India. *Indian Journal of Pharmacology* 2012; 44: 500-503.
- 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.
- Penefsky HS. Reversible Binding of Pi by Beef-Heart Mitochondrial Adenosine-Triphosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 1977 252(9):2891-2899.
- Pérez-Victoria FJ, Gamarro F, Ouellette M, Castanys S. Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. *J Biol Chem.* 2003 Dec 12;278(50):49965-71.
- Pham,TTH, Barratt,G, Michel,JP, Loiseau,PM, Saint-Pierre-Chazalet,M. Interactions of antileishmanial drugs with monolayers of lipids used in the development of amphotericin B-miltefosine-loaded nanocochleates. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 2013; 106: 224-233.
- Portugal,LR, Fernandes,LR, Cesar,GC, Santiago,HC, Oliveira,DR, Silva,NM, Silva,AA, Lannes-Vieira,J, Arantes,RME, Gazzinelli,RT, Alvarez-Leite,JI. Infection with *Toxoplasma gondii* increases atherosclerotic lesion in ApoE-deficient mice. *Infection and Immunity* 2004; 72: 3571-3576.
- Poumay Y, Ronveaux-Dupal MF. Rapid preparative isolation of concentrated low density lipoproteins and of lipoprotein-deficient serum using vertical rotor gradient ultracentrifugation. *J Lipid Res.* 1985 Dec;26(12):1476-80.
- 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-Othman 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
- Ramos,H, Saintpierrechazalet,M, Bolard,J, Cohen,BE. Effect of Ketoconazole on Lethal Action of Amphotericin-B on Leishmania-Mexicana Promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1994; 38: 1079-1084.
- Rautemaa,R, Richardson,M, Pfaller,M, Perheentupa,J, Saxen,H. Reduction of fluconazole susceptibility of *Candida albicans* in APECED patients due to long-term use of ketoconazole and miconazole. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2008; 40: 904-907.
- Reveiz,L, Maia-Elkhoury,ANS, Nicholls,RS, Romero,GAS, Yadon,ZE. Interventions for American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review Update. *Plos One* 2013; 8.
- Rijal,S, Ostyn,B, Uranw,S, Rai,K, Bhattarai,NR, Dorlo,TPC, Beijnen,JH, Vanaerschot,M, Decuyper,S, Dhakal,SS, Das,ML, Karki,P, Singh,R, Boelaert,M, Dujardin,JC. Increasing Failure of Miltefosine in the Treatment of Kala-azar in Nepal and the Potential Role of Parasite Drug Resistance, Reinfection, or Noncompliance. *Clinical Infectious Diseases* 2013; 56: 1530-1538.
- 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.
- Santos,DO, Coutinho,CER, 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. *Parasitology Research* 2008; 103: 1-10.
- Santos LO, Garcia-Gomes AS, Catanho M, Sodre CL, Santos AL, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM. Aspartic peptidases of human pathogenic trypanosomatids: perspectives and trends for chemotherapy *Curr Med Chem* 2013a;20(25):3116-33.
- Santos LO, Vitório BS, Branquinha MH, Pedroso e Silva CM, Santos AL, d'Avila-Levy CM. Nelfinavir is effective in inhibiting the multiplication and aspartic peptidase activity of *Leishmania* species, including strains obtained from HIV-positive patients. *J Antimicrob Chemother* 2013b;68(2):348-53
- Santos LO, Marinho FA, Altoé EF, Vitório BS, Alves CR, Britto C, Motta MC, Branquinha MH, Santos AL, d'Avila-Levy CM. HIV aspartyl peptidase inhibitors interfere with cellular proliferation, ultrastructure and macrophage infection of *Leishmania amazonensis* *PLoS One*. 2009;4(3):e4918.

- Schmitz,G, Langmann,T, Heimerl,S. Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism. *Journal of Lipid Research* 2001; 42: 1513-1520.
- Sehgal,A, Bettiol,S, Pypaert,M, Wenk,MR, Kaasch,A, Blader,IJ, Joiner,KA, Coppens,I. Peculiarities of host cholesterol transport to the unique intracellular vacuole containing *Toxoplasma*. *Traffic* 2005; 6: 1125-1141.
- Sereno,D, Maia,C, Ait-Oudhia,K. Antimony resistance and environment: Elusive links to explore during *Leishmania* life cycle. *International Journal for Parasitology-Drugs and Drug Resistance* 2012; 2: 200-203.
- Simons,K, Toomre,D. Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2000; 1: 31-39.
- Sinai,AP, Webster,P, Joiner,KA. Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *Journal of Cell Science* 1997; 110: 2117-2128.
- Singh S,SR. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Infection and Chemotherapy* 2004; 10: 307-315.
- Singh,AK, Papadopoulou,B, Ouellette,M. Gene amplification in amphotericin B-resistant *Leishmania tarentolae*. *Experimental Parasitology* 2001; 99: 141-147.
- Singh,N, Singh,RT, Sundar,S. Novel mechanism of drug resistance in kala azar field isolates. *Journal of Infectious Diseases* 2003; 188: 600-607.
- Smyth AJ, Ghosh A, Hassan MQ, Basu D, De Bruijn MH, Adhya S, Mallik KK, Barker DC. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology*. 1992;105 ( Pt 2):183-92.
- Stancu,C, Sima,A. Statins: mechanism of action and effects. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2001; 5: 378-387.
- Stockdale,L, Newton,R. A Review of Preventative Methods against Human Leishmaniasis Infection. *Plos Neglected Tropical Diseases* 2013; 7.
- Strazzulla,A, Cocuzza,S, Pinzone,MR, Postorino,MC, Cosentino,S, Serra,A, Cacopardo,B, Nunnari,G. Mucosal Leishmaniasis: An Underestimated Presentation of a Neglected Disease. *Biomed Research International* 2013.
- Stuart,K, Brun,R, Croft,S, Fairlamb,A, Gurtler,RE, McKerrow,J, Reed,S, Tarleton,R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *Journal of Clinical Investigation* 2008; 118: 1301-1310.
- Sundar,S, Chakravarty,J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2013; 14: 53-63.
- Tarling,EJ, Edwards,PA. ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1) is an intracellular sterol transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108: 19719-19724..

- 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.
- Torres-Santos,EC, Sampaio-Santos,MI, Buckner,FS, Yokoyama,K, Gelb,M, Urbina,JA, Rossi-Bergmann,B. Altered sterol profile induced in *Leishmania amazonensis* by a natural dihydroxymethoxylated chalcone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009; 63: 469-472.
- Trainor,EA, Horton,KE, Savage,PB, Testerman,TL, Mcgee,DJ. Role of the HefC Efflux Pump in *Helicobacter pylori* Cholesterol-Dependent Resistance to Ceragenins and Bile Salts. *Infection and Immunity* 2011; 79: 88-97.
- Tsao,S, Rahkhoodae,F, Raymond,M. Relative Contributions of the *Candida albicans* ABC Transporters Cdr1p and Cdr2p to Clinical Azole Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009; 53: 1344-1352.
- Tsimikas,S, Miller,YI. Oxidative Modification of Lipoproteins: Mechanisms, Role in Inflammation and Potential Clinical Applications in Cardiovascular Disease. *Current Pharmaceutical Design* 2011; 17: 27-37.
- Urbina,JA. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology* 1997; 114: S91-S99.
- Urbina,JA, Concepcion,JL, Rangel,S, Visbal,G, Lira,R. Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2002; 125: 35-45.
- van Griensven,J, Diro,E. Visceral Leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics of North America* 2012; 26: 309-+.
- van Griensven,J, Diro,E, Lopez-Velez,R, Boelaert,M, Lynen,L, Zijlstra,E, Dujardin,JC, Hailu,A. HIV-1 protease inhibitors for treatment of visceral leishmaniasis in HIV-co-infected individuals. *Lancet Infectious Diseases* 2013; 13: 251-259.
- Vanaerschot,M, De Doncker,S, Rijal,S, Maes,L, Dujardin,JC, Decuypere,S. Antimonial Resistance in *Leishmania donovani* Is Associated with Increased In Vivo Parasite Burden. *Plos One* 2011; 6.
- Vannier-Santos,MA, Martiny,A, Lins,U, Urbina,JA, Borges,VM, de Souza,W. Impairment of sterol biosynthesis leads to phosphorus and calcium accumulation in *Leishmania acidocalcisomes*. *Microbiology-Sgm* 1999; 145: 3213-3220.
- Vanniersantos,MA, Urbina,JA, Martiny,A, Neves,A, Desouza,W. Alterations Induced by the Antifungal Compounds Ketoconazole and Terbinafine in *Leishmania*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 1995; 42: 337-346.
- Xiong,QM, Lin,MQ, Rikihisa,Y. Cholesterol-Dependent *Anaplasma phagocytophilum* Exploits the Low-Density Lipoprotein Uptake Pathway. *Plos Pathogens* 2009; 5.
- Zakai,HA, Zimmo,SK. Effects of itraconazole and terbinafine on *Leishmania major* lesions in BALB/c mice. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 2000; 94: 787-791.

Zampetti,A, Gnarra,M, Feliciani,C, Giurdanella,F, Caposiena,D, De Simone,C, Capizzi,R. Atopic-like dermatitis as expression of post-kala-azar dermal diffuse leishmaniasis in HIV infection. *Immunology* 2012; 137: 513-514.

World Health Organization (WHO) 2013. <http://apps.who.int/tdr/publications/tdr-image-library?idNumber=00061046>. Acessado em 30 de julho de 2013.

World Health Organization 2010 (OMS/WHO). <http://apps.who.int/tdr/publications/tdr-image-library?idNumber=00061043>. Acessado em 30 de julho de 2013.