

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**Avaliação da utilização de colesterol exógeno por
Leishmania amazonensis como possível alvo farmacológico**

VALTER VIANA DE ANDRADE NETO

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz visando a obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia e Imunologia

RIO DE JANEIRO
2009

**Avaliação da utilização de colesterol exógeno por
Leishmania amazonensis como possível alvo farmacológico**

VALTER VIANA DE ANDRADE NETO

Orientador:

Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos

Dissertação apresentada ao curso de mestrado em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de concentração: Farmacologia e Imunologia

Rio de Janeiro
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Andrade Neto, Valter Viana.

Avaliação da utilização de colesterol exógeno por *Leishmania amazonensis* como possível alvo farmacológico.
Rio de Janeiro: FIOCRUZ, Instituto Oswaldo Cruz, 2009.

xiii, 92p. il.

Dissertação: Mestre em Ciências

1-*Leishmania amazonensis* 2-LDL

3-Azóis 4-Colesterol

5-Esteróis 6-Tratamento

I. Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz, Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular.

II. Título

VALTER VIANA DE ANDRADE NETO

**Avaliação da utilização de colesterol exógeno por
Leishmania amazonensis como possível alvo farmacológico**

Orientador:

Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos

Dissertação apresentada ao curso de mestrado em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de concentração: Farmacologia e

Aprovada em, ____/____/____

EXAMINADORES:

Dra. Claudia Masini d'Ávila Levy
IOC/FIOCRUZ

Dra. Georgia Correa Atella –
UFRJ

Dra. Bartira Rossi Bergmann –
UFRJ

SUPLENTES:

Dra. Marilene Marcuzzo do Canto Cavalheiro - IOC/FIOCRUZ

Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral - IOC/FIOCRUZ

Rio de Janeiro
2009

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

DEDICATÓRIA

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.
- 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.
- 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 Dra. Georgia Correa Atella, do Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ, por ter me dado todo o apoio na realização de vários experimentos.
- À Dra. Bartira Rossi Bergmann do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ por ter me recebido no seu laboratório no período de obras, que foi importantíssimo para o término de alguns experimentos.
- À Dra. Claudia Masini d'Avila Levy por aceitar ser a revisora desta dissertação e o quanto foi atenciosa.
- Ao Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral pelo apoio durante essa dissertação e pelos momentos de alegria que seu time me proporciona.
- Ao meu amigo Edézio pelo apoio e na ajuda em muitos experimentos desta dissertação. Essa dissertação 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.

- Aos meus amigos Wallace e Herbert pela amizade e ajuda em muitos experimentos dessa dissertação.

- Às minhas amigas Mariela e Grazielle, por todo o apoio e ajuda durante vários momentos dessa dissertação, 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.

O aspecto mais triste da vida atual é que a
Ciência ganha em conhecimento mais
rapidamente que a sociedade em sabedoria

(Issac Asimov, 1920-1992)

LISTA DE ABREVIATURAS

ACAT	Acil-CoA colesterol aciltransferase
CoA	Coenzima A
COL	Colesterol
CYP51	Citocromo P450
DIPE	Éter diisopropílico
DMSO	Dimetilsulfoxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
ERG	Ergosterol
ERGOST	Esteróis com o esqueleto ergostano
FAD	Food and Drugs Administration
FICI	Índice da Concentração Inibitória Fracional
GTP	Guanosina trifosfato
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HMG-CoA	β -hidroxi- β -metilglutaril- CoA
HMGR-CoA	3-hidroxi- 3- metil glutaril Co redutase
HPC	Hexadecilfosfocolina
IC50	Concentração inibitória correspondente a 50% dos parasitos
IDL	Lipoproteína de Densidade Intermédia
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
LAN	Lanosterol
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutâneo- Difusa
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDPC	Leishmaniose Dérmica Pós Calazar
LM	Leishmaniose Mucosa
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
MTT	Sal de Tetrazólio
MVAC	Mevalonato Cinase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PM	Peso Molecular
SEO	Esqualeno 2,3 epoxidase
SFB	Soro Fetal Bovino
SMT	Δ^{24} Esterol metiltransferase
Th	Linfócitos T auxiliares
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
14-DM	C-14 desmetilase

RESUMO

Todos os fármacos atualmente em uso para o tratamento da leishmaniose apresentam restrições, como toxicidade, graves efeitos colaterais, custo elevado, administração parenteral ou teratogenicidade. Desta forma, o desenvolvimento de fármacos mais eficazes e seletivos é de suma importância e a identificação de vias metabólicas exclusivas do parasito que possam ser usadas como alvo pode ser um ponto de partida interessante. Acredita-se que a leishmania não dependa da utilização do colesterol exógeno para sua sobrevivência, uma vez que sintetiza seus próprios esteróis. Porém, apesar disso, um percentual expressivo de colesterol é encontrado em suas membranas sendo, em alguns casos, o esterol majoritário indicando um papel biológico para essa molécula. O presente trabalho visa estudar a importância para *Leishmania. amazonensis* da utilização do colesterol proveniente do soro, em diversas situações, avaliando o potencial desse sistema como um possível alvo farmacológico. A atividade dos inibidores da biossíntese do ergosterol (cetoconazol, miconazol, terbinafina e sinvastatina) foi avaliada, na presença de soro normal ou deslipidado. Foi observada que a privação das lipoproteínas do soro potencializa o efeito dos inibidores do ergosterol. Os promastigotas tratados com esses inibidores mostraram diferenças na sua composição lipídica, com acúmulo de colesterol nas células tratadas, principalmente, com cetoconazol e miconazol, indicando um possível mecanismo de compensação da leishmania, para suprir a inibição do ergosterol. Experimentos com LDL- I^{125} , no qual tanto a leishmania tratada com cetoconazol, quanto a tratada com sinvastatina, que inibe o início da via de biossíntese de ergosterol, aumentaram a captação da LDL. A suramina, um inibidor da captação de LDL, mostrou uma diminuição do conteúdo de colesterol da leishmania e, em associação com a sinvastatina, obteve um efeito sinérgico, mostrando que o conteúdo da LDL, principalmente colesterol, pode estar envolvido na manutenção da integridade da membrana da célula. Em adição, a resistência ao cetoconazol induzida *in vitro* foi estudada. Foi observada uma relação direta entre o aumento da expressão gênica da C14-desmetilase com o nível de resistência induzido em promastigotas de *L. amazonensis*, sugerindo que esse seja o principal mecanismo de resistência a essa classe de fármacos. De uma maneira geral, a análise dos resultados como um todo sugere que o colesterol desempenhe um importante papel na atividade dos inibidores da biossíntese do ergosterol e que o bloqueio da sua utilização pode ser um possível alvo farmacológico.

ABSTRACT

All drugs currently in use for the treatment of leishmaniasis present restrictions, such as toxicity, serious side effects, high cost, parenteral administration or teratogenicity. Thus, the development of more effective and selective drugs is a priority and the identification of exclusive metabolic pathways of the parasite that can be used as a target could be an interesting starting point. It is believed that leishmania is not dependent on the use of exogenous cholesterol for survival, since it synthesizes its own sterols. But, nevertheless, a significant percentage of cholesterol is found in its membranes and, in some cases, as the major sterol, indicating a biological role for this molecule. This work aims to study the importance for *L. amazonensis* of the use of cholesterol from the serum in various situations, assessing the potential of this system as a possible drug target. The activity of the ergosterol biosynthesis inhibitors (ketoconazole, miconazole, terbinafine and simvastatin) was evaluated in the presence of normal or delipidated serum. It was observed that the deprivation of the serum lipoprotein potentiates the effect of inhibitors of ergosterol. The promastigotes treated with these inhibitors showed differences in their lipid composition, with accumulation of cholesterol in treated cells, mainly with ketoconazole and miconazole, suggesting a compensation mechanism in leishmania, which may overcome ergosterol inhibition. Experiments with LDL-I¹²⁵, indicated an increased uptake of LDL in leishmania treated with either ketoconazole or simvastatin, the latter inhibits an early step in the ergosterol biosynthetic pathway. Suramine, an inhibitor of the uptake of LDL, showed a decrease in cholesterol content of the leishmania and in combination with simvastatin, had a synergistic effect, showing that content of LDL, especially cholesterol, could be involved in maintaining the cell membrane integrity. In addition, resistance to ketoconazole induced *in vitro* was studied. There was a direct relationship between increased gene expression of C14-desmetilase and the level of resistance induced in promastigotes of *L. amazonensis*, suggesting that this is the main mechanism of resistance to this class of drugs. Taken together, these results suggest that cholesterol plays an important role in the activity of ergosterol inhibitors biosynthesis and that the blocking of its use by leishmania may be a possible drug target.

Sumário

1- INTRODUÇÃO	1
1.1 - Leishmaniose	1
1.2 - Tratamento	10
1.3 - Biossíntese de Esteróis	17
1.4 - Inibidores da Biossíntese do Ergosterol	28
1.5 - Captação do colesterol	32
2 - OBJETIVOS	38
3- METODOLOGIA	39
3.1 - Manutenção e cultivo dos parasitos	39
3.2 - Avaliação da atividade dos inibidores da biossíntese do ergosterol	39
3.3 – Extração de Lipídeos	40
3.4 – Cromatografia em Camada Fina	40
3.5 - Análise dos lipídeos neutros de <i>L. amazonensis</i> por Cromatografia em Camada Fina (CCF/TLC)	41
3.6 – Dosagem dos esteróis totais	41
3.7 – Deslipidação do Soro Fetal Bovino (SFB)	41
3.8 – Purificação da Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL)	42
3.9 – Ensaio de captação de LDL- ¹²⁵	43
3.10- Indução de resistência ao cetoconazol	43
3.11- Análise da expressão da C14 desmetilase em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	43
4 - RESULTADOS	46
4.1 - Atividade leishmanicida dos inibidores da biossíntese do ergosterol	47
4.2 - Atividade dos inibidores da biossíntese do ergosterol sobre os esteróis	49
4.3 Efeito dos inibidores da biossíntese do ergosterol sobre a endocitose de LDL	56
4.4 - Avaliação do efeito da suramina sobre a incorporação de colesterol	58
4.5 - Efeito da associação de fármacos inibidores da utilização de colesterol com inibidores da biossíntese de ergosterol	62
4.6 - Efeito da privação de colesterol em <i>L. amazonensis</i>	65
4.7 - Atividade leishmanicida dos inibidores da biossíntese do ergosterol na ausência de colesterol	71
4.8 - Análise da resistência ao colesterol induzida in vitro em <i>L. amazonensis</i>	74
5 - DISCUSSÃO	77
6 - CONCLUSÃO	85
7 - REFERÊNCIAS	87

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Leishmaniose

A ordem Kinetoplastida é constituída por um grupo de protozoários que possuem minicírculos de DNA mitocondrial arranjados em uma estrutura muito característica, denominada de cinetoplasto, localizada no interior da mitocôndria única (Stuart e cols, 2008).

Dentre os Kinetoplastidae, a família Trypanosomatidae se destaca pelas severas doenças humanas provocadas por alguns dos seus membros, como a tripanossomíase africana humana causada por duas subespécies de *Trypanosoma brucei*, a doença de Chagas causada por *Trypanosoma cruzi*, e as várias formas de leishmaniose, causadas por diferentes espécies do gênero *Leishmania* (Stuart e cols, 2008) (Fig. 1.1.1).

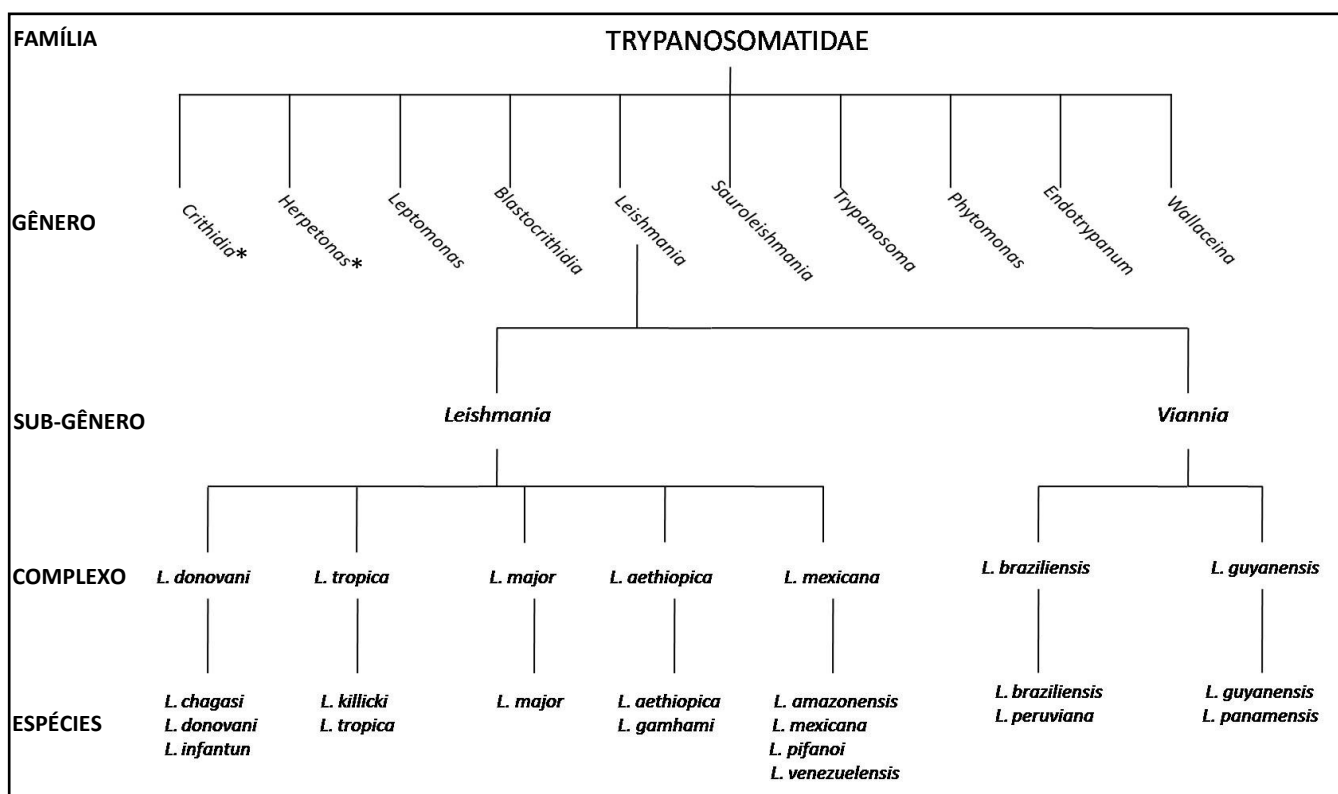


Figura 1.1.1: Taxonomia da família Trypanosomatidae. * A criação de novos gêneros foi sugerida para melhor classificação dos isolados pertencentes a esses gêneros (*Strigomonas* e *Angomonas*) (Cupolillo e cols, 2001; Brandão e cols, 2000; Podlipaev e cols, 2000).

Todas as espécies patogênicas do gênero *Leishmania* são morfologicamente similares e a sua identificação presumível pode ser feita em razão circunstancial, mas análises bioquímicas são requeridas para identificação formal da espécie. Esses parasitos habitam células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente macrófagos, do hospedeiro

vertebrado e o intestino do hospedeiro invertebrado, flebotomíneo (Ashford e cols, 2000). Então, a leishmaniose tem seu ciclo biológico heteroxeno, realizado em dois hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado. Os hospedeiros vertebrados incluem uma grande variedade de mamíferos, incluindo humanos, roedores, cachorros, lobos e raposas. Os hospedeiros invertebrados são pequenos insetos hematófagos, os flebotomíneos (Neuber e cols, 2008).

A leishmaniose 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 e cols, 2008). 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 e cols, 2008). Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam dois estágios evolutivos: a forma promastigota (Fig 1.1.2), extracelular, que é longa, com um núcleo central e cinetoplasto terminal, e a forma amastigota (Fig 1.1.3), intracelular, que tem corpo ovóide, 5 μm de diâmetro no máximo, e um curto flagelo observável apenas ultraestruturalmente. Ambos promastigota e amastigota se dividem repetidamente por divisão binária longitudinal.

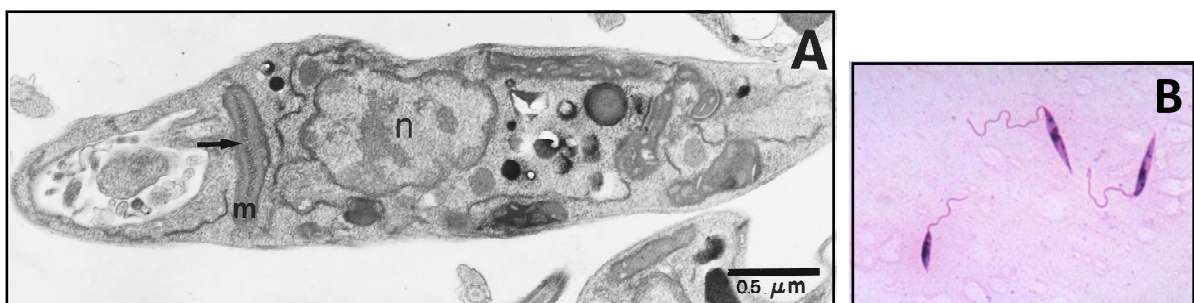


Figura 1.1.2: Forma promastigota. (A) Ultra-estrutura. Seção mostrando o núcleo (n) e a mitocôndria (m) contendo o cinetoplasto (seta) (Torres-Santos e cols, 1999). (B) Morfologia por microscopia ótica (aumento de 40X) (World Health Organization, 2009a).

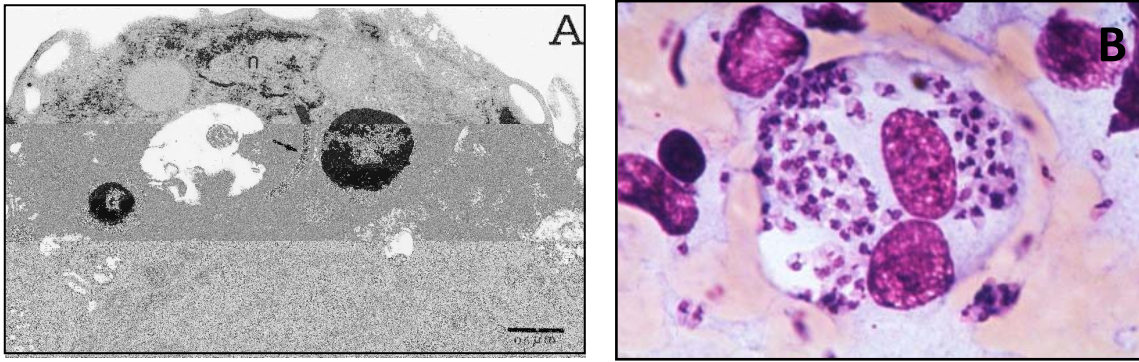


Figura 1.1.3: Forma amastigota. (A) Ultra-estrutura. Amastigota no interior de um macrófago. Seção mostrando o núcleo (n), cinetoplasto (seta) e grânulos eletro-denso (G) (Torres-Santos e cols, 1999). (B) Esfregaço de biópsia de baço, mostrando células infectadas com *L. donovani* (Coloração por Giemsa) (World Health Organization, 2009b).

O ciclo da leishmaniose inicia-se quando um flebotomíneo realiza seu repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, inoculando na pele formas promastigotas do parasito. Os parasitos invadem os macrófagos por endocitose 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 em pH baixo até o rompimento da célula hospedeira. Livres, amastigotas infectam rapidamente células adjacentes. O ciclo prossegue 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 superior do intestino, transformando-se em formas metacíclicas, que são infectivas (Stuart e cols, 2008) (Fig 1.1.4).

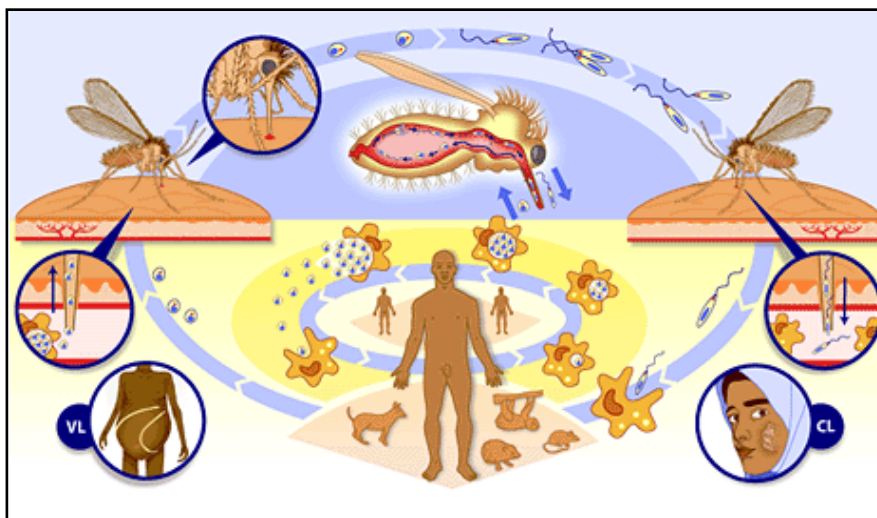


Figura 1.1.4: Ciclo biológico da leishmaniose (World Health Organization, 2004).

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 localizada, mucocutânea ou cutânea difusa, como descrito mais adiante. Vários sintomas dependem da espécie do parasito envolvida e da resposta imune do hospedeiro (Neuber e cols, 2008). As espécies mais importantes no Brasil são *Leishmania amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* (Ministério da Saúde, 2006). As principais formas clínicas da leishmaniose são as seguintes:

- Leishmaniose Cutânea (LC) localizada: 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 uma úlcera de superfície plana com um aumento na margem da lesão. As úlceras são comumente encontradas na pele em lugares descobertos, como mãos, face, ou pernas (Neuber e cols 2008) (Fig 1.1.5), tipicamente causada por *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica*, embora *L. infantum* e *L. donovani* também podem ser implicadas (Neuber e cols, 2008g). Nas Américas, as principais espécies envolvidas são as do complexo *L. mexicana* e do subgênero *Vianna* (Myler e cols, 2008). A cura da doença é observada após 6-12 meses com cicatrização e desfiguração da pele do paciente. A cura espontânea é mais rara, porque tende a ser mais severa (Neuber e cols, 2008).

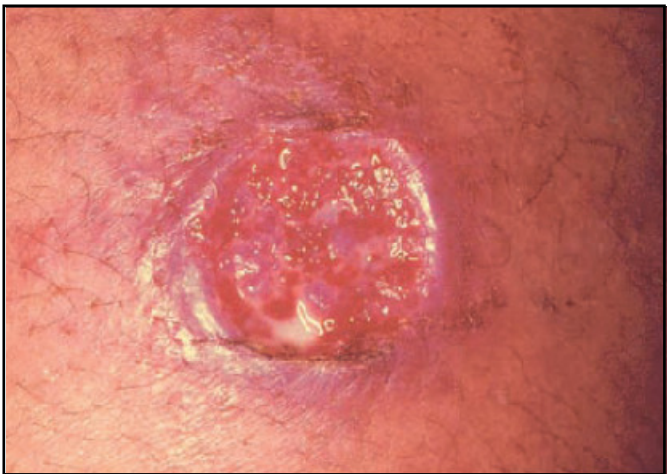


Figura 1.1.5: Leishmaniose cutânea localizada (Ministério da Saúde, 2006).

- Leishmaniose mucosa (LM): causada principalmente por *L. braziliensis*, mas também pode ser ocasionalmente causada por *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis*. Esta forma ocorre devido à disseminação através do sangue ou vasos linfáticos, de amastigotas da pele para a mucosa nasofaríngea, culminando na sua destruição envolvendo o nariz,

boca e garganta (98).(Fig 1.1.6) . Caracterizada por uma forte resposta imune celular, que pode estar envolvida com a destruição tissular (Myler e cols, 2008).



Figura 1.1.6: Leishmaniose mucosa (Ministério da Saúde, 2006).

- Leishmaniose cutâneo-difusa (LCD): Caracteriza-se por apresentar evolução crônica progressiva, com numerosas lesões nodulares não ulceradas disseminadas pelo corpo (Fig 1.1.7a). 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 e cols, 2000). É causada por *L. aethiopica* e principalmente por *L. amazonensis* (Myler e cols, 2008).



Figura 1.1.7: Leishmaniose Cutânea Difusa (A) e Leishmaniose visceral (B) (Ministério da Saúde, 2006; World Health Organization, 2004).

- Leishmaniose visceral ou calazar (LV): É a forma mais grave da doença, afetando os nódulos linfáticos, baço, fígado, e medula óssea (Neuber e cols, 2008) (Fig 1.1.7b). É causada pelo complexo de *L. donovani* que inclui, *L. donovani* e *L. infantum* no velho mundo e *L. chagasi* no novo mundo. Raramente a *L. tropica* (velho mundo) e *L. amazonensis* (novo mundo) tem sido implicadas nessa forma de leishmaniose (Myler e cols, 2008).

- Leishmaniose dérmica pós calazar (LDPC): É uma manifestação dérmica após a cura do calazar por *L. donivani*, ou seja, é uma complicação da leishmaniose visceral (Fig 1.1.8). Ocasionalmente alguns casos são reportados com nenhum histórico de calazar (Ashford e cols, 2000). 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 e cols, 2008).



Figura 1.1.8: Leishmaniose dérmica pós calazar (World Health Organization, 2009c).

Evidências clínicas e experimentais demonstram que a imunidade específica na leishmaniose é basicamente mediada por células T CD4+. Para dar início à resposta imune específica, células de Langerhans transportam parasitos e seus antígenos aos linfonodos regionais, visando apresentar o antígeno às células T CD4+ que, ao liberarem citocinas, regulam o potencial microbicida dos macrófagos. Vale ressaltar que a produção de IFN- γ parece ser o principal fator de ativação macrofágica. A importância da resposta celular no controle da leishmaniose tem sido demonstrada na literatura ao longo dos últimos anos. Em experimentos com camundongos, infectados com *L. major* pôde-se observar que os linfócitos T auxiliares (Th) CD4+ estão subdivididos em duas subpopulações funcionalmente diferentes no que se refere à secreção de citocinas, diretamente correlacionadas com a

resistência ou a susceptibilidade à infecção por *Leishmania*: o subtipo Th1, que secreta interleucina 2 (IL-2), IFN- γ e TNF- α ; e o subtipo Th2, secretor de interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5) e interleucina 10 (IL-10). Vários fatores têm sido implicados na diferenciação da célula T CD4+ em Th1 ou Th2, como o tipo de célula apresentadora de antígeno, os níveis de citocinas endógenas e a natureza do antígeno reconhecido. O IFN- γ tem papel importante na defesa contra microrganismos intracelulares como a *Leishmania*, ativando macrófagos e estimulando a liberação de outras citocinas como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α). O TNF- α , citocina produzida principalmente por macrófagos ativados, também é responsável pela ativação policlonal de células B. Em decorrência dessa ativação, há considerável indução da resposta humoral com produção de anticorpos anti-*Leishmania* que participam, na interação inicial do parasito, com elementos inespecíficos da resposta inflamatória (Ministério da Saúde, 2006).

O diagnóstico da leishmaniose pode ser dividido em aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais (pesquisa parasitológica e diagnóstico imunológico). O diagnóstico clínico é feito pela análise das características da lesão que o paciente apresenta associada à anamnese, onde os dados epidemiológicos são importantes. Deve ser feito um diagnóstico diferencial de outras doenças que apresentam lesões semelhantes à leishmaniose, tais como: tuberculose cutânea, hanseníase, infecções por fungos, neoplasias e paracoccidioidomicose. O diagnóstico parasitológico é obtido pela demonstração do parasito feita com o material obtido da lesão, através de: exame direto de esfregaços corados, exame histopatológico e cultura (Neves e cols, 2000). Podem ser feitas também aspiração do nodo linfático, medula óssea, esplênica e de outros tecidos, para a detecção do parasito utilizando microscopia ou PCR (Myler e cols, 2008). O diagnóstico imunológico é considerado um método de detecção indireto que consiste na fenotipagem imunológica, detecção de anticorpo (teste imunoenzimático, ELISA, testes de imunofluorescência, IFAT), teste de Montenegro (similar ao teste da tuberculina) (Neuber e cols, 2008).

A leishmaniose está entre as doenças mais negligenciadas do mundo, tendo sido classificada pela OMS na categoria 1 do Programa de Doenças Tropicais (Remme e cols, 2002). Essa categoria agrupa doenças emergentes e fora de controle. Trezentos e cinquenta milhões de pessoas estão em áreas de risco, e o número de casos vem aumentando. É considerada endêmica em 88 países em 4 continentes e estima-se que 12 milhões de casos existam no mundo inteiro com 1,5- 2,0 milhões de novos casos ocorrendo anualmente (World Health Organization, 2004). Em média, são registrados no Brasil cerca de 28.000

casos/ano (Ministério da Saúde, 2008). Na Figura 1.1.9 observamos a distribuição mundial da leishmaniose cutânea e da leishmaniose visceral, atingindo principalmente países em desenvolvimento (World Health Organization, 2004). Nas Figuras 1.1.10 e 1.1.11 vemos o número de casos da leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral no Brasil, de 2000 a 2008 (Ministério da Saúde, 2008). 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, 2006).

A associação entre leishmaniose e Aids é recente e apresenta um número crescente de casos no Brasil e no mundo sobretudo na região mediterrânica da Europa, que compreende Espanha, França, Itália e Portugal (Fig 1.1.12). 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 de 2 a 9% de todos os casos de Leishmaniose visceral em determinados países endêmicos, mas essa proporção tem aumentado drasticamente (Alvar e cols, 2008). O impacto epidemiológico é tão significativo que a OMS cogita introduzir a leishmaniose visceral como doença indicadora da Aids. O Brasil é o epicentro da epidemia de HIV/Aids na América do Sul e representa um terço de todas as pessoas vivendo com o vírus na América do Sul. De 2001 a 2005, 16.210 casos de LV foram notificados no Brasil, 315 casos (2% dos pacientes) foram co-infectados por HIV (Alvar e cols, 2008). Em um estudo de 15 pacientes com AIDS e LTA, foram encontradas manifestações esperadas e não esperadas de leishmaniose, com uma ampla variedade de formas clínicas. Nesse estudo foram observados, com maior frequência, manifestações não usuais. A presença de imunossupressão severa pode modificar as características clínicas da doença, dificultando o diagnóstico da LTA (Lindoso e cols, 2009).

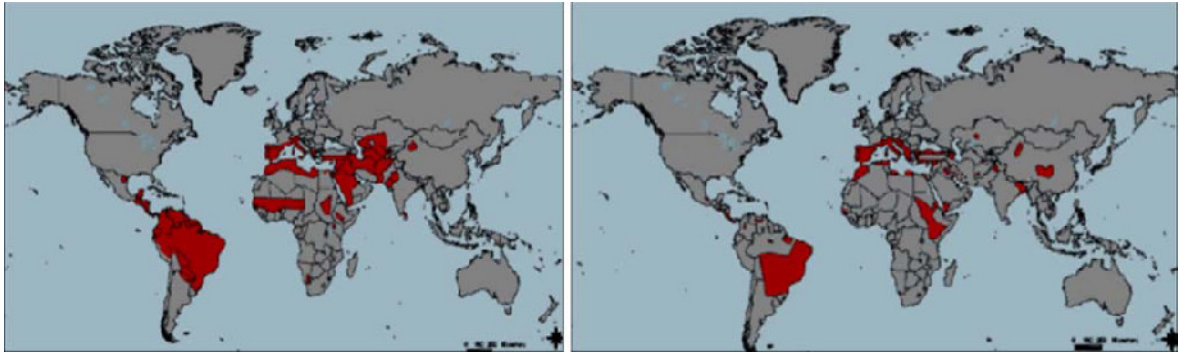


Figura 1.1.9: Distribuição geográfica de Leishmaniose Cutânea (esquerda) e Leishmaniose Visceral (direita) (World Health Organization, 2004).

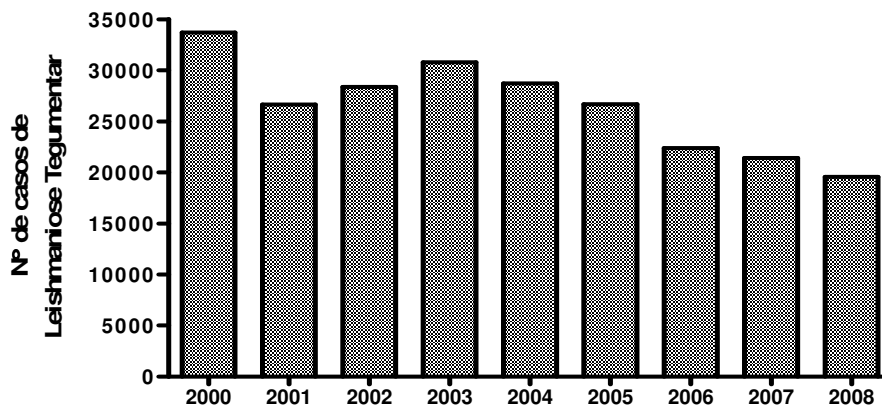


Figura 1.1.10: Número de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Brasil (Ministério da Saúde, 2008).

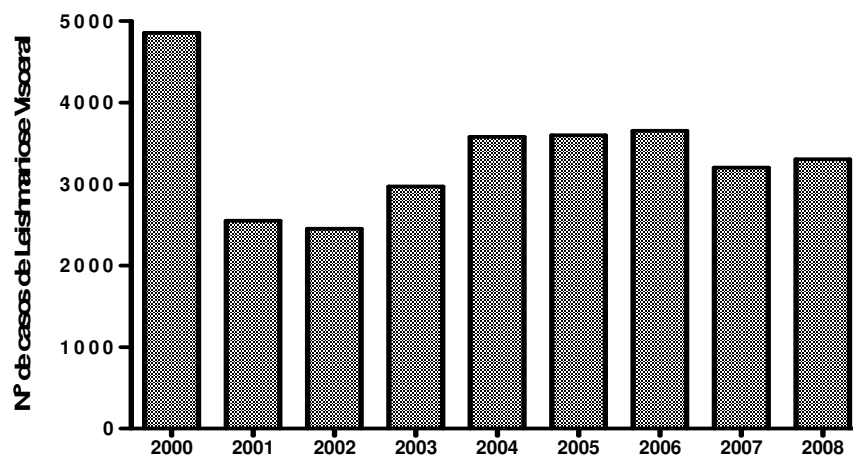


Figura 1.1.11: Número de casos de Leishmaniose Visceral no Brasil (Ministério da Saúde, 2008).

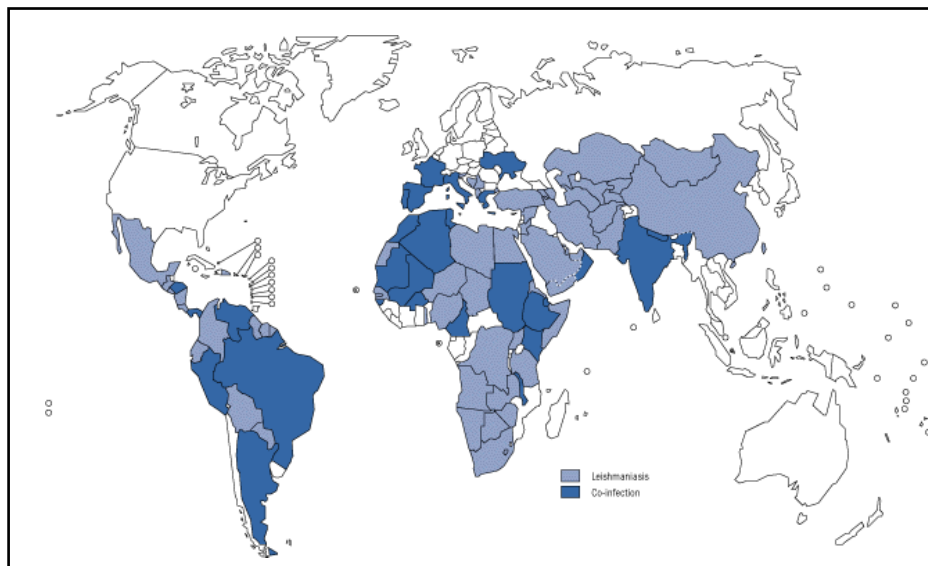


Figura 1.1.12: Distribuição mundial de Leishmaniose e co-infecção *Leishmania*/HIV (World Health Organization, 2004).

1.2: 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 e cols, 2007; Tuon e cols, 2008; Amato e cols, 2007; Blum e cols, 2009; Santos e cols, 2008). 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 dose dependente na formação de adenosina trifosfato (ATP) e guanosina trifosfato (GTP) (Singh e cols, 2004).

Esses fármacos apresentam muitos efeitos tóxicos incluindo toxicidade cardíaca, hepática, pancreática (que é provavelmente a causa de náusea e dor abdominal) e renal, devendo ser utilizados com cautela e sob monitorização clínica e laboratorial, em pacientes com cardiopatia e hepatopatia, que pode levar a redução ou a retirada do tratamento (Santos e cols, 2008). Outros efeitos adversos incluem pancitopenia, neuropatia periférica reversível, mialgias, artralgias, anorexia, cefaléia, dor no local da aplicação (intramuscular-IM) e aumento da diurese por perda transitória da capacidade de concentração urinária (Singh e cols 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 no limite superior da normalidade para a amilase e 15 vezes para a lipase (Ministério da Saúde, 2006).

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. 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, 2006).

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 2.1).

Tabela 1.2.1: Esquema terapêutico de acordo com a OMS (Ministério da Saúde, 2006).

Forma Clínica	Dose	Tempo de Duração
Leishmaniose cutânea	10-20 mg/Sb ⁺⁵ /kg/dia (recomenda-se 15 mg/Sb ⁺⁵ /kg/dia)	20 dias
Leishmaniose cutânea difusa	20 mg/Sb ⁺⁵ /kg/dia	20 dias
Leishmaniose mucosa	20 mg/Sb ⁺⁵ /kg/dia	30 dias

A eficiência terapêutica dos antimoniais pode variar dependendo do país, e protocolos de tratamento são determinados dependendo da área geográfica. Muitos casos de resistência têm sido relatados, dificultando o tratamento (Santos e cols, 2008). 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 no paciente (Santos e cols, 2008).

A pentamidina, uma diamidina, que 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. No 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. Uma 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 e cols, 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 e cols, 2009; Amato e cols, 2007; Tuon e cols, 2008). A resistência a pentamidina tem sido descrita na literatura, dificultando o tratamento (Santos e cols, 2008).

A anfotericina B, um antifúngico poliênico, se liga aos esteróis da membrana plasmática de *Leishmania* spp. preferencialmente ao ergosterol, abrindo poros na sua membrana, com perda do conteúdo intracelular e morte do parasito. Esse fármaco também se liga 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. É utilizada também para o tratamento da leishmaniose mucosa, em um estudo realizado na Bolívia, com 80% de cura (Amato e cols, 2007).

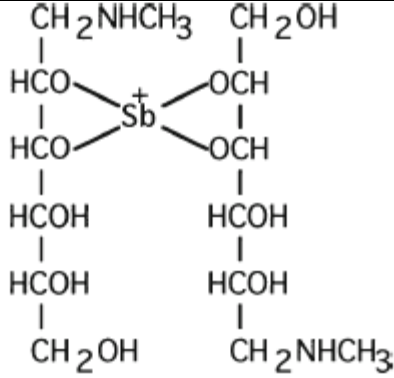
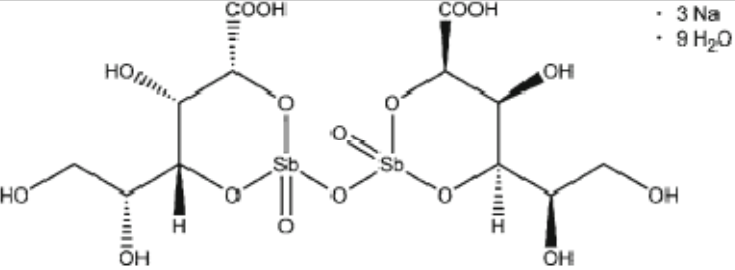
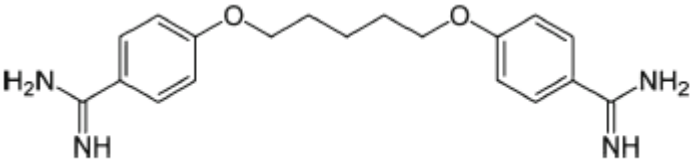
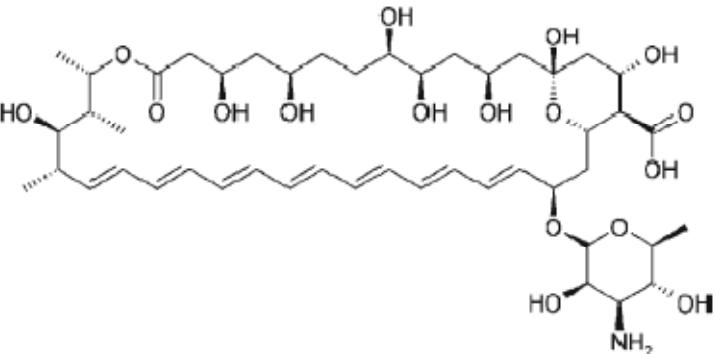
Visando diminuir os efeitos adversos, algumas formulações de anfotericina B vetoriadas por lipídeos foram desenvolvidos (Santos e cols, 2008). Essas formulações de anfotericina como anfotericina B lipossomal (Ambisome®), dispersão coloidal de anfotericina B (Anfocil®) e complexo lipídico de anfoterina B (Abelcet®), provocam menos efeitos colaterais do que o fármaco livre (Blum e cols, 2009; Amato e cols, 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 e cols, 2004). A produção dessas formulações possuem um alto custo, dificultando seu uso em países sub-desenvolvidos. Estudos têm sido realizados, na tentativa de obter métodos de baixo custo para a produção desses fármacos (Santos e cols, 2008).

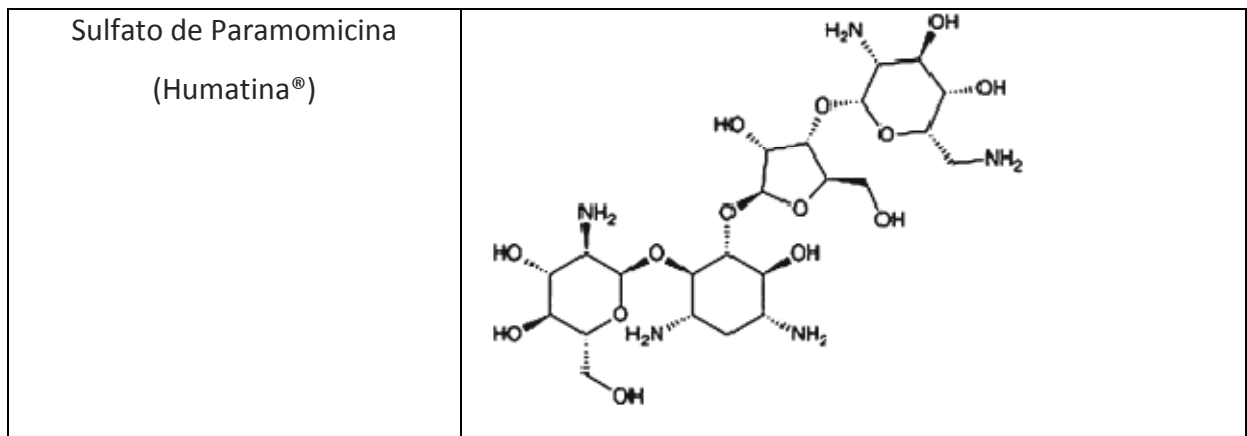
A paramomicina é um aminoglicosídeo usado para o tratamento de doenças bacterianas. No entanto, tem uma vasta atividade antiparasitária que não é compartilhada por outros aminoglicosídeos. Há relatos do seu uso para o tratamento de leishmaniose

visceral e de sua formulação tópica para a leishmaniose cutânea (Blum e cols, 2009; Tuon e cols, 2008; Santos e cols, 2008). A combinação da paramomicina e estibogluconato tem sido usada no tratamento de casos graves de leishmaniose cutânea. Esse fármaco tem um potencial de toxicidade renal e no oitavo nervo craniano (Singh e cols, 2004).

Na Tabela 1.2.2 podemos observar os fármacos mais utilizados no tratamento da leishmaniose

Tabela 1.2.2: Fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose (Singh e cols, 2004).

NOME: QUÍMICO E COMERCIAL	Estrutura Química
<p>Antimoniato de Meglumina (Glucantime®)</p>	
<p>Estibogluconato de Sódio (Pentostam®)</p>	
<p>Isotionato de Pentamidina (Pentamidina®)</p>	
<p>Anfotericina B (Fungizone®)</p>	



Um novo fármaco sintético, a miltefosina (hexadecilfosfocolina ou HPC), é amplamente estudada para o tratamento da leishmaniose, mas foi originalmente desenvolvida para o tratamento do câncer. A miltefosina é o primeiro fármaco oral que é eficaz contra diferentes formas de leishmanioses, no entanto, seu efeito não é igual para todas as espécies de leishmaniose (Blum e cols, 2009). Foi registrada em 2003 na Índia e em 2004 na Alemanha para o tratamento da leishmaniose visceral. Pode ser recomendada para doença visceral na Etiópia, e para a forma cutânea na Colômbia e Bolívia. Para as formas da doença que requerem longos períodos de tratamento como, leishmaniose cutânea difusa e leishmaniose dérmica pós calazar, a miltefosina oral poderá ser provavelmente o tratamento de escolha (Berman e cols, 2008). O mecanismo de ação da miltefosina envolve interação com lipídeos e em particular com fosfolipídios e esteróis da membrana plasmática (Rakotomanga e cols, 2007; Barratt e cols, 2009). Interfere com a funcionalidade de um número de enzimas envolvidas no metabolismo de fosfolípidos, incluindo proteína cinase C e as fosfolipases A2, C e D, e também pode induzir apoptose (Barratt e cols, 2009). Além do seu efeito sobre a síntese e degradação de lipídeos da membrana plasmática, aparentemente, estimula o sistemas hematopoético e imune, com ativação de células T e macrófagos e aumento da produção de interferon- γ , assim ajudando a controlar a infecção por *Leishmania* spp. (Santos e cols, 2008). A farmacocinética da miltefosina é pouco conhecida, mas uma importante característica é o longo tempo de meia vida, de até 7 dias (Dorlo e cols, 2006). Esse fármaco apresenta algumas desvantagens, como efeito teratogênico, o que impede seu uso durante a gravidez, distúrbios gastrointestinais e fácil indução de resistência in vitro (Santos e cols, 2008). Finalmente, o uso de vesículas de fosfolípidos (lipossomos) tem sido utilizado como sistema de vetorização para a miltefosina, reduzindo seus efeitos colaterais (Barratt e cols, 2009).

Outros fármacos que são utilizados para o tratamento da leishmaniose, podem ser citados. Por exemplo, alopurinol, que inibe o anabolismo da purina em *Leishmania* spp. (Tuon e cols, 2008) e a sitamaquina, que foi desenvolvido originalmente para o tratamento da malária, mas que em alguns casos é utilizada no tratamento da leishmaniose visceral. Essas alternativas possuem alguns problemas, efeitos tóxicos e em alguns casos é observado que alguns pacientes não respondem ao tratamento (Singh e cols, 2004).

Novas alternativas vêm sendo utilizadas, como a associação de alguns fármacos vetorizados em lipossomos, com o objetivo de diminuir os efeitos tóxicos, aumentar sua eficácia e a concentração nos tecidos. Podemos citar também o tratamento com algumas citocinas que estimulam o sistema imune, como a utilização de interferon- γ recombinante humano associado com antimônio contra leishmaniose visceral (Tuon e cols, 2008; Santos e cols, 2008).

Os derivados imidazólicos, como cetoconazol, itraconazol, e fluconazol, são inibidores da enzima C-14 desmetilase, agem bloqueando a biossíntese do ergosterol, e tem sido usados em alguns casos na clínica (Blum e cols, 2009). De oito pacientes tratados com cetoconazol (400 mg/dia) por 28 dias com lesões cutâneas causada por *L. major*, 5 foram curados (Kumaresan e cols, 2007). Há outras informações favoráveis sobre a resposta do cetoconazol na leishmaniose cutânea do velho mundo (Alsaleh e cols, 1995). Três pacientes diagnosticados histopatologicamente com leishmaniose cutânea foram tratados com sucesso utilizando cetoconazol no Sul da Índia (Kumaresan e cols, 2007).

Resultados também mostram que o cetoconazol pode ser eficaz no tratamento da leishmaniose visceral, com 80% dos pacientes curados com um regime de 600 mg/dia de cetoconazol por 28 dias (Singh e cols, 2004). O efeito tóxico mais comum observado no tratamento com cetoconazol foi hepatotoxicidade. Esse fármaco também foi utilizado em casos de resistência aos antimoniais ou pentamidina. Outroazol, um triazol, que apresenta atividade na leishmaniose cutânea é o itraconazol. O itraconazol é mais bem tolerado do que o cetoconazol. O itraconazol tem sido utilizado no tratamento da leishmaniose cutânea e mucosa no novo mundo (Consigli e cols, 2006; White e cols, 2006; Firooz e cols, 2006; Calvopina e cols, 2004; Amato e cols, 2007; Siddiqui e cols, 1998). Foi observada também a atividade do fluconazol em pacientes com leishmaniose cutânea, mostrando excelentes resultados (Blum e cols, 2009; Alrajhi e cols, 2002). Um novo composto triazólico, o posaconazol (SCH 56592) mostrou ser eficaz na infecção cutânea por *L. amazonensis* e infecção visceral com *L. donovani* em camundongos BALB/c (Al Abdely e cols, 1999). O

posaconazol mostrou ser efetivo na cura de camundongos com infecção crônica de *T. cruzi* (Buckner e cols, 2008).

Na literatura, inúmeros relatos de falha no tratamento de primeira e segunda escolha têm sido demonstrados, na leishmaniose visceral (Dube e cols, 2005), incluindo pacientes co-infectados com HIV, e na leishmaniose cutânea. Dois casos de leishmaniose dérmica pós calazar (LDPC) foram relatados, após o tratamento com sucesso da leishmaniose visceral com miltefosina (Das e cols, 2009). Em outro caso, foi observada reincidência da doença em um paciente tratado com miltefosina por 28 dias, apresentando diagnóstico de cura para *L. donovani*. Dez meses após o tratamento foram observadas febre, hepatoesplenomegalia e perda de peso (Pandey e cols, 2009). Em relação à co-infecção, há relato de um LDPC ocorrendo após o diagnóstico de leishmaniose visceral em paciente infectado com HIV. As lesões não foram controladas pelo tratamento oral com miltefosina a 100 mg/dia por 5 ciclos de 28 dias, e foi então, tratada com sucesso com anfotericina lipossomal (Guffanti e cols, 2008). Outros estudos indicam que a miltefosina não foi capaz de curar pacientes co-infectados com leishmaniose visceral e HIV (Troya e cols, 2008). Estudos também mostram falhas na terapia com anfotericina B lipossomal (Ambisome®) no tratamento da leishmaniose visceral (Mueller e cols, 2007). Casos de falha no tratamento da leishmaniose cutânea também são observados (Llanos-Cuentas e cols, 2008; Dube e cols, 2005). Essas falhas normalmente estão relacionados a resistência obtida por *Leishmania* spp. frente ao tratamento (Hadighi e cols, 2006; Sharief e cols, 2006).

Desta forma, o desenvolvimento de fármacos mais eficazes e seletivos é de suma importância e a identificação de vias metabólicas exclusivas do parasito que possam ser usadas como alvo pode ser um ponto de partida interessante.

1.3 – 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 a sua estrutura fundamental, que possui 4 anéis hidrocarbonados fundidos, três com seis carbonos e um com cinco possuindo um núcleo quase planar e relativamente rígido (Roberts e cols, 2003) (Fig 1.3.1).

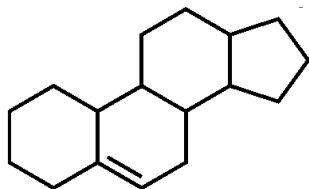


Figura 1.3.1: Estrutura do Ciclopentanoperidrofenantreno.

Os esteróis são lipídeos estruturais e estão presentes nas membranas da maioria das células eucarióticas. Colesterol, o mais importante esteroide dos tecidos animais, é anfipático, com um grupo polar (a hidroxila em C-3) e um corpo hidrocarbônico não-polar (o núcleo de esteróis e uma cadeia lateral hidrocarbonada em C-17) (Fig 1.3.2) (Nelson e cols, 2002).

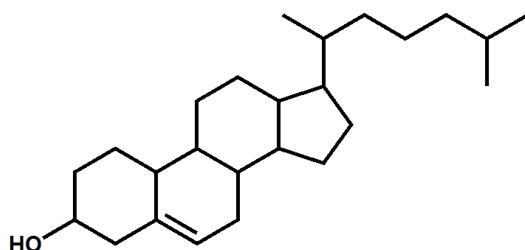


Figura 1.3.2: Estrutura química do colesterol.

O colesterol é o esteroide mais abundante em seres humanos, e realiza uma série de funções, sendo importante para o crescimento e viabilidade das células de mamífero. As células adquirem colesterol através da endocitose de LDL (rica em colesterol) via receptor ou através de síntese de novo (Chang e cols, 2006). Desempenha um papel importante como elemento estrutural e funcional das membranas atuando como modulador de fluidez. Nas células animais, a membrana plasmática é rica em colesterol. 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 estér de colesterol (Chang e cols, 2006).

Durante muito tempo o colesterol foi tido apenas como um componente estrutural da membrana celular. Atualmente, sabe-se que o colesterol desempenha papéis cruciais na organização, dinâmica e funcionalidade das membranas celulares, como a estabilização de receptores transdutores de sinais (Paila e cols, 2009; Kalipatnapu e cols, 2007; Pucadyil e cols, 2006; Gaibelet e cols, 2008; Lagane e cols, 2000). Está envolvido também na entrada de microrganismos patogênicos intracelulares, como a *Leishmania* spp. (Pucadyil e cols, 2004; Pucadyil e cols, 2007) e *T. cruzi* (Fernandes e cols, 2007) e sua depleção em macrófagos infectados por *L. major* pode representar uma estratégia de evasão do sistema imune usada pelo parasito (Rub e cols, 2009).

Os esteróis dos eucariotos são sintetizados a partir de unidades simples de isopreno com cinco átomos de carbono. Todos os átomos são fornecidos por um único precursor, o acetato. As unidades de isopreno, que são intermediários-chave na via do acetato até o colesterol, são precursoras de muitos outros lipídeos naturais e os mecanismos pelos quais essas unidades de isoprenos são polimerizadas são similares em todas as vias.

A biossíntese do colesterol envolve diversas enzimas e um complexo integral de proteínas de membrana SCAP/SREBP, localizadas no reticulo endoplasmático que controlam a expressão de muitos genes envolvidos na biossíntese (Chang e cols, 2006). A biossíntese que começa a partir do acetil-CoA, tem 4 estágios, sendo realizado, no reticulo endoplasmático e no citosol. No estágio 1 as três unidades de acetato se condensam para formar um intermediário com seis carbonos, o mevalonato. O estágio 2 envolve a conversão do mevalonato em unidades de isopreno ativado. O estágio 3 consiste na polimerização das seis unidades com cinco átomos de carbono do isopreno para formar a estrutura linear do esqualeno, com 30 átomos de carbono, e no estágio 4 ocorre a ciclização do esqualeno formando os quatro anéis do núcleo de esteróis e uma série de mudanças posteriores (oxidações, remoção ou migração de grupos metila) levam ao produto final, o colesterol (Nelson e cols, 2002).

ESTÁGIO 1: Síntese do mevalonato a partir do acetato

Duas moléculas de acetil-CoA condensam-se, formando acetoacetil-CoA, este se condensa com uma terceira molécula de acetil-CoA para liberar um composto com seis átomos de carbono, o β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Essas duas primeiras reações, catalisadas pela tiolase e pela HMG-CoA sintase, respectivamente, são reversíveis e sua ocorrência não implica o comprometimento definitivo da célula com a síntese do colesterol ou outros compostos isoprenóides. Entretanto, a terceira reação representa esse comprometimento e é o passo decisivo, sem retorno: a redução de HMG-CoA em mevalonato, pela enzima HMG-CoA redutase. Essa proteína integral de membrana do retículo endoplasmático liso é o principal ponto de regulação na via do colesterol, sendo inibida pela quantidade de colesterol intracelular (Fig 1.3.3) (Nelson e cols, 2002).

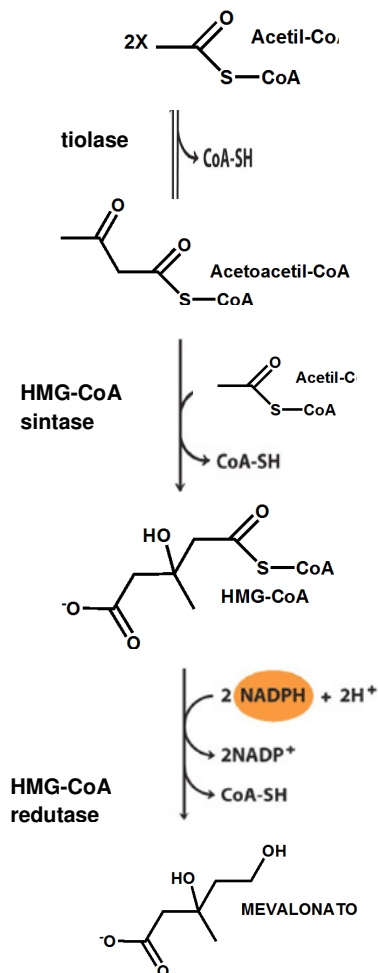


Figura 1.3.3: Formação do mevalonato a partir do acetil-CoA.

ESTÁGIO 2: Conversão do mevalonato em duas unidades de isopreno ativado

No estágio 2, três grupos fosfato são transferidos de três moléculas do ATP para o mevalonato. O fosfato ligado ao grupo hidroxila no C-3 do mevalonato no intermediário 3-fosfo-5-pirofosfomevalonato é um bom grupo abandonador; no próximo passo esse fosfato

e o grupo carboxila próximo saem, deixando uma ligação dupla no produto de cinco átomos de carbono, o pirofosfato de Δ^3 -isopentenila. Este é o primeiro de dois isoprenos ativados centrais na formação do colesterol. A isomerização do pirofosfato de Δ^3 -isopentenila gera o segundo isopreno ativado, o pirofosfato de dimetilalila (Nelson e cols, 2002) (Fig 1.3.4).

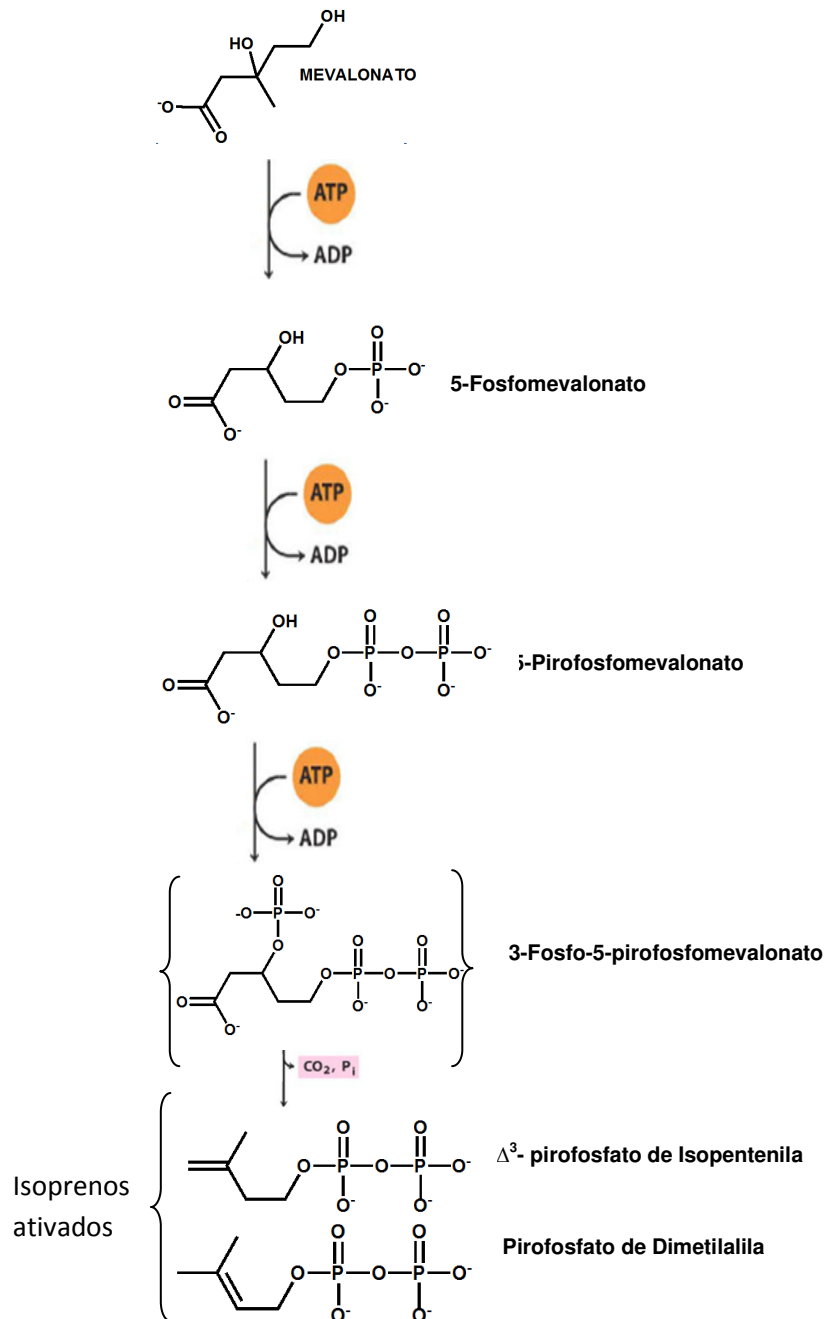


Figura 1.3.4: Conversão do mevalonato em unidades ativadas de isopreno.

ESTÁGIO 3: Condensação de seis unidades de isopreno ativadas para formar o esqualeno.

O pirofosfato de isopentenila e o pirofosfato de dimetilalila sofrem agora uma condensação “cabeça com cauda” na qual um grupo pirofosfato é deslocado e é formada uma cadeia de 10 carbonos, o pirofosfato de geranila, que sofre outra condensação “cabeça

com cauda” com o pirofosfato de isopentenila, liberando o intermediário de 15 carbonos pirofosfato de farnesila. Finalmente 2 moléculas de pirofosfato de farnesila unem-se, com a eliminação dos dois grupos pirofosfato, e ocorre a formação do esqualeno (Fig 1.3.5) (Nelson e cols, 2002).

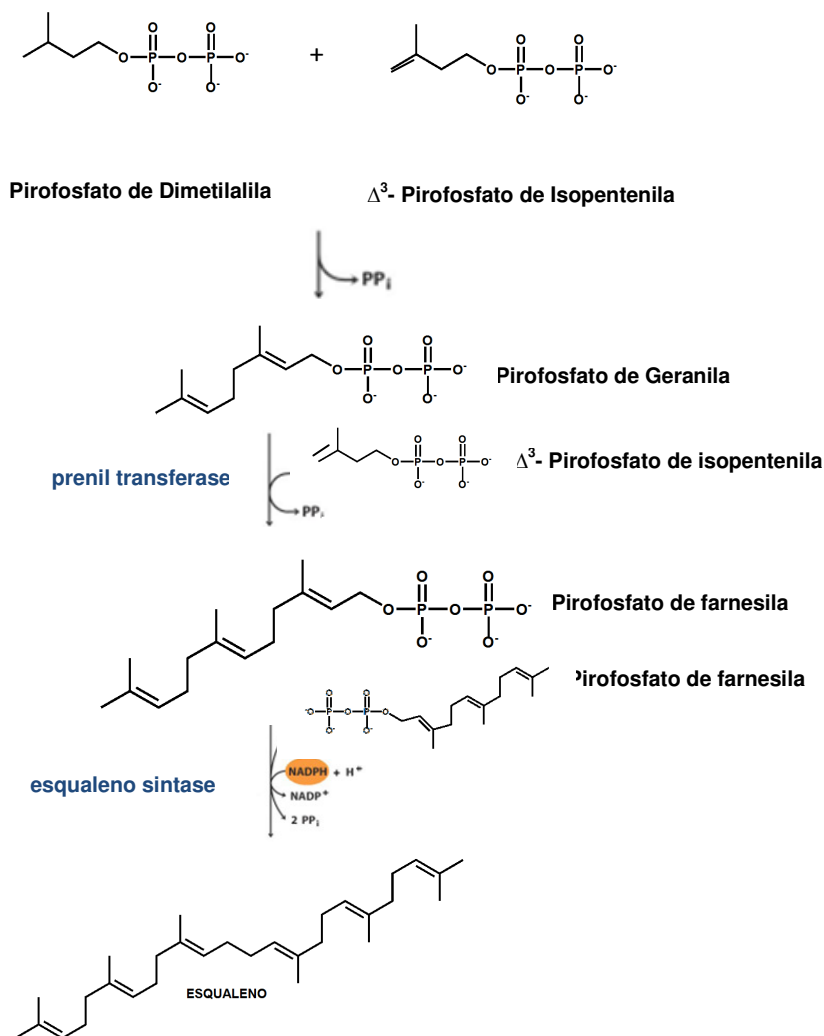


Figura 1.3.5: Formação do esqualeno.

ESTÁGIO 4: Conversão do esqualeno em núcleo de esteróis com quatro anéis.

A ação da esqualeno monoxigenase acrescenta um átomo de oxigênio do O_2 na extremidade da cadeia do esqualeno, formando um epóxido. As ligações duplas do produto, 2,3- epóxido de esqualeno, são posicionadas de tal forma que uma reação concertada pode converter o epóxido de esqualeno linear em uma estrutura cíclica. Nas células de animais, essa ciclização resulta na formação de lanosterol, que contém os quatro anéis característicos do núcleo de esteróis. Finalmente, o lanosterol é convertido em colesterol em uma série de aproximadamente 20 reações (Fig 1.3.5) (Nelson e cols, 2002).

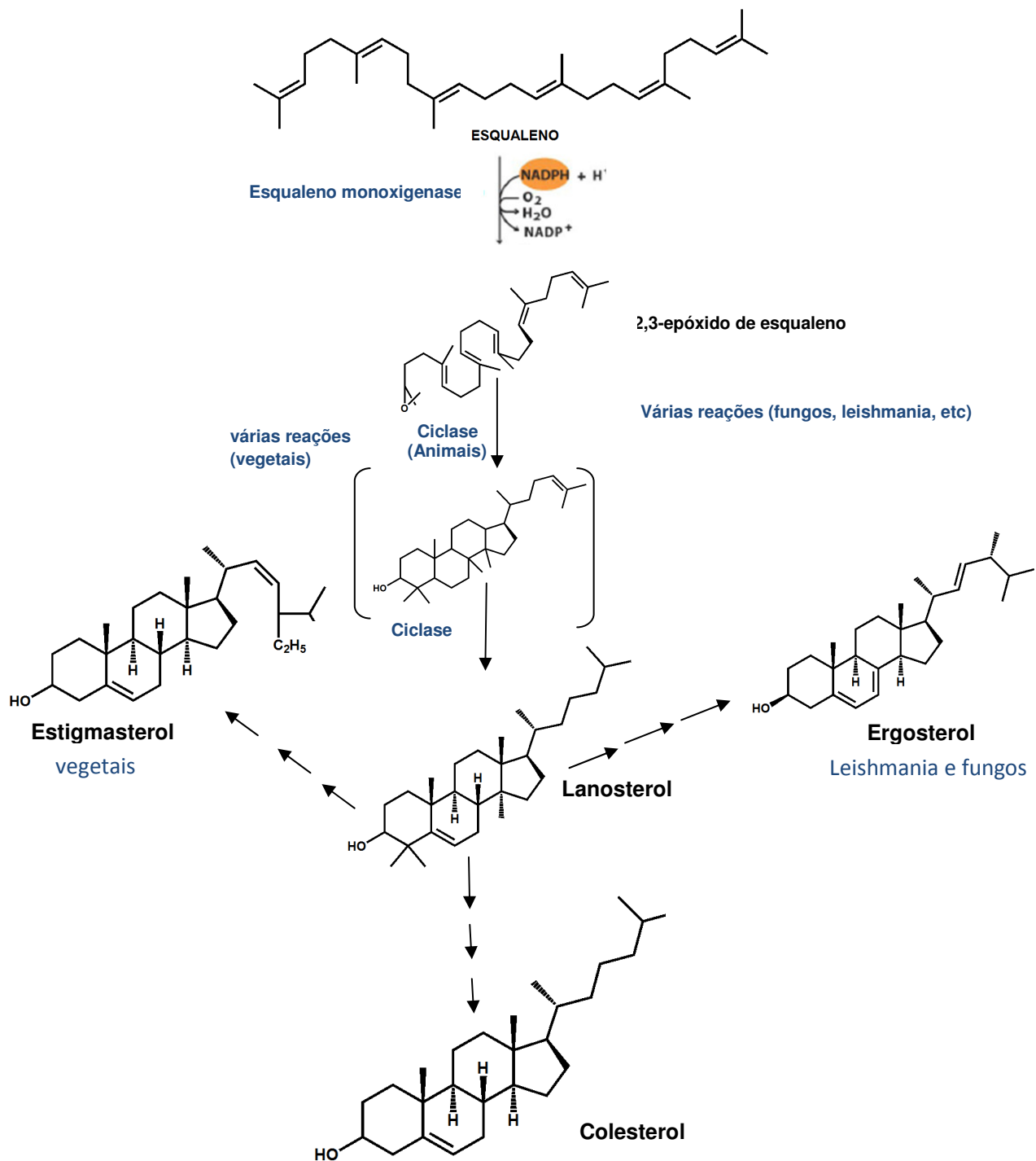


Figura 1.3.6: Conversão do esqualeno no núcleo de esteróis com quatro anéis. Adptado de Nelson e cols, 2002.

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: Inibição por retroalimentação (“feedback”), onde o colesterol é um inibidor retroativo da HMG CoA redutase, diminuindo assim a síntese subsequente de colesterol, regulação hormonal, onde a síntese é ativada por insulina e inibida por glucagon; 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 e cols, 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 e cols, 2003).

Os tripanossomatídeos já foram extensivamente estudados quanto a sua produção de esteróis. Em 1984 foram identificados esqualeno, lanosterol (4,4,14 α -dimetilcolesta-8,24-dieno-3 β -ol, **1**) e dimetil zimosterol (4 α ,14 α -dimetilcolesta-8,24-dieno-3 β -ol, **3**) em várias espécies de *Leishmania* (Fig 1.3.6) (Goad e cols, 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 e cols, 2003).

Os esteróis nos tripanossomatídeos possuem dois papéis no crescimento normal das células. O primeiro é a manutenção da arquitetura da membrana, onde esteróis livres interagem com cadeia de ácidos graxos de fosfolípidios para controlar a fluidez de membrana e assim controlar a continuidade das funções. A segunda é que os esteróis têm um “papel metabólico”, envolvido na regulação e continuidade do desenvolvimento e crescimento normal das células (Coombs e cols, 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 parece que o zimosterol (colesta-8,24-dieno-3 β -ol, **7**) pode ser o maior substrato para esta reação (Fig 1.3.6) (Coombs e cols, 1991). Em espécies de *Leishmania* os esteróis baseados no esqueleto ergostano são os mais abundantes tanto em, amastigotas e promastigotas, predominando o 5-desidroepisterol (ergosta-5,7,24(24¹)-trieno-3 β -ol, **12**) (Goad e cols, 1984) embora o ergosterol (ergosta-5,7,22-trieno-3 β -ol, **13**) predominante nos fungos, esteja em pequenas quantidades. Os esteróis de esqueleto relacionados ao

estigmastano (**14**, **15**, **17**) representam 5% do total de esteróis de promastigotas de *Leishmania* spp. mas, na forma amastigota, em algumas espécies, podem chegar a 20% do total, sugerindo que esses esteróis podem ter um papel importante quando residem na célula hospedeira (Roberts e cols, 2003).

Os esteróis de amastigotas de *L. mexicana* que foram crescidas em uma linhagem celular de macrófago (J-774) são diferentes dos esteróis de promastigotas. O principal esterol é o episterol (ergosta-7,24(24¹)-dieno-3 β -ol, **10**) em vez de desidroepisterol (**12**) enquanto que desmosterol (colesta-5,24-dieno-3 β -ol, **18**), ergosta-5,24(24¹)-dieno-3 β -ol (**19**), estigma-7,24(24¹)-dieno-3 β -ol (**14**) e estigma-5,7,24(24¹)-trieno-3 β -ol (**15**) são adicionais ao perfil de esteróis das formas promastigotas. A presença do esterol **19** (Fig 1.3.6) 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 Δ^5 não é vista em promastigotas, porque possivelmente essas formas flageladas perdem a habilidade de dessaturação da ligação Δ^7 , possuindo somente $\Delta^{5,7}$ e Δ^7 , assim como nos fungos (Coombs e cols, 1991). Essa informação sugere que os esteróis Δ^5 são produzidos em amastigotas a partir do desmosterol, absorvidos de células do hospedeiro, macrófagos (Coombs e cols, 1991). O mesmo esterol tem sido identificado em amastigotas de *L. braziliensis* (Holz e cols, 1986).

As quantidades de esteróis predominantes diferem entre os tripanosomatídeos. 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 observados 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 β -ol que juntos, formam aproximadamente 40% do total de esteróis, e uma apreciável quantidade, aproximadamente 30%, de estigma-5,7-dieno-3 β -ol (**16**) e 7-desidroporiferasterol (estigma-5,7,22-trieno-3 β -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 e cols, 2003).

Nas espécies de *Leishmania* o 7-desidroporiferasterol 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 e cols, 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(24¹)-dieno-3 β -ol, **10**), ergosta-7-eno-3 β -ol e 24-etildinocolesta-7eno-3 β -ol (**14**), indicando ausência de atividade da Δ^5 dessaturase (Roberts e cols, 2003; Liendo e cols, 1999). A via de biossíntese dos esteróis em *Leishmania spp.* e *T. cruzi* está representada na Figura 1.3.7.

A via biossintética de esteróis de *Leishmania spp* e *T. cruzi* tem sido deduzida por análises de seus constituintes de esterois secundários, por estudos com [¹⁴C]-acetato e [¹⁴C] 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 α ,4 β ,14 α -trimetilesteróis, 4 α ,14 α -dimetilesteróis e 14 α -metilesteróis (Coombs e cols, 1991).

As enzimas que produzem os esteróis e outros isoprenóides são distribuídas em diferentes compartimentos subcelulares em eucariotos multicelulares. Estudos em humanos têm indicado que as etapas iniciais da via de biossíntese ocorrem predominantemente nos peroxisomos (Kovacs e cols, 2002; Kovacs e cols, 2003; Kovacs e cols, 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 e cols, 2004). Outra enzima da biossíntese, o difosfato de farnesila sintase, que junto com outras enzimas é responsável pela síntese de isoprenoides, foi localizada no citosol em *L. major* (Ortiz-Gomez e cols, 2006). Foi descrito também a caracterização e localização da $\Delta^{24(25)}$ esterois 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 e cols, 2008). A análise da localização da HMG CoA sintase e da mevalonato cinase (MVAC) em formas promastigotas de *L. major* e formas pro-cíclicas e sanguíneas de *T. brucei* foi realizada. Os resultados mostram que a biossíntese é distribuída em múltiplos compartimentos intracelulares. Evidências mostram que 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 e cols, 2009).

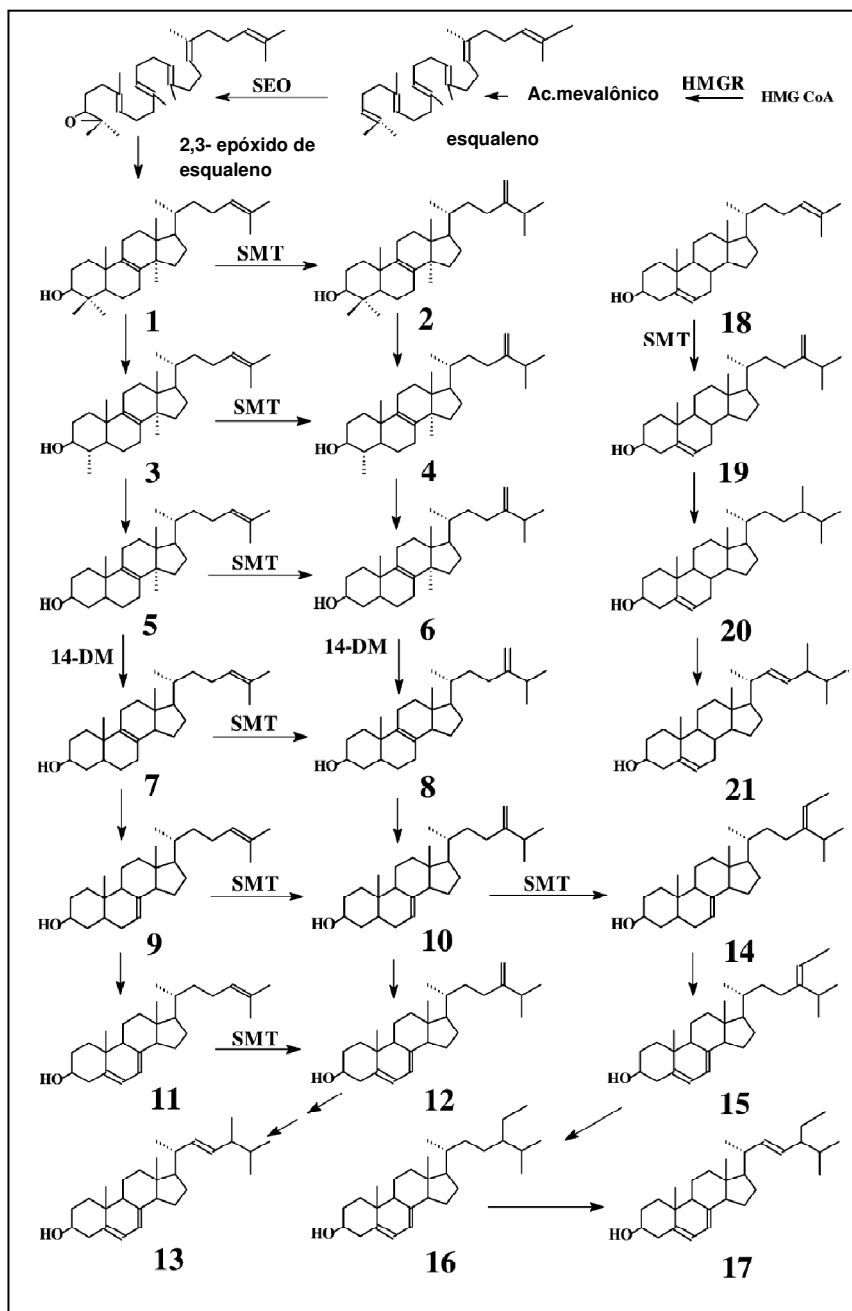


Figura 1.3.7: Via de biossíntese dos esteróis em *Leishmania* spp. e *T. cruzi*. **1:** Lanosterol (4,4,14 α -dimetilcolesta-8,24-dieno-3 β -ol); **2:** (24-metilenodesidrolanosterol); **3:** Dimetilzimosterol (4 α ,14 α -dimetilcolesta-8,24-dieno-3 β -ol); **4:** obtusofoliol (4 α ,14 α -dimetilergosta-8,24 (24¹)-dieno-3 β -ol); **5:** metilzimosterol (14 α -metilcolesta-8,24-dieno-3 β -ol); **6:** 4-desmetilesterol (14 α -metilergosta-8,24 (24¹)-dieno-3 β -ol); **7:** zimosterol (colesta-8,24-dieno-3 β -ol); **8:** fecosterol (ergosta-8,24(24¹)-dieno-3 β -ol); **9:** colesta-7,24-dieno-3 β -ol; **10:** episterol (ergosta-7,24(24¹)-dieno-3 β -ol); **11:** colesta-5,7,24-dieno-3 β -ol; **12:** desidroepisterol (ergosta-5,7,24(24¹)-trieno-3 β -ol); **13:** Ergosterol (ergosta-5,7,22-trieno-3 β -ol); **14:** estigma-7,24(24¹)-dieno-3 β -ol ou ergota-7-eno-3 β -ol e 24-etilidino-ergosta-7-eno-3 β -ol; **15:** estigmasta-5,7,24(24¹)-trieno-3 β -ol; **16:** estigmasta-5,7-dieno-3 β -ol; **17:** 7-desidroporiferasterol (estigma-5,7,22-trieno-3 β -ol); **18:** desmosterol (colesta-5,24-dieno-3 β -ol); **19:** ergosta-5,24(24¹)-dieno-3 β -ol; **20:** ergosta-5-eno-3 β -ol; **21:** estigmasterol (ergosta-5,22-dieno-3 β -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:** Δ^{24} esterol metiltransferase.

As fontes de carbono para a biossíntese dos esteróis no tripanosomatídeos têm sido estudadas. O aminoácido leucina tem sido relatado como um precursor potencial na biossíntese de isoprenóides (Anastasis e cols, 1985). Foi demonstrado que a administração de leucina para formas promastigotas de *L. mexicana* é prontamente incorporada nos esteróis. Os resultados mostram que a leucina é utilizada como a principal fonte de carbono para a biossíntese de esteróis e pode ser encontrado em mais de 80% dos esteróis sintetizados (Ginger e cols, 1996). Estudos similares têm demonstrado que a leucina é a maior fonte de carbono para a produção de esteróis em várias espécies de *Leishmania* (Ginger e cols, 1999).

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 e cols, 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 e cols, 2000; Coppens e cols, 1995). No entanto, formas procíclicas podem realizar a biossíntese *de novo* e o gene para uma enzima chave, 2,3-epóxido de esqualeno ciclase, que produz lanosterol, já foi clonada (Roberts e cols, 2003).

Além das formas sanguíneas de *T. brucei* que dependem criticamente da presença de partículas de LDL, que contém 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 vacuolo parasitóforo (PV). Esse parasito é incapaz de sintetizar vários metabólitos, inclusive seus próprios esteróis, sendo considerados auxotróficos (Coppens e cols, 2000). Eles trocam nutrientes através da membrana do vacúolo parasitóforo, com o objetivo de garantir sua sobrevivência e propagação (Sinai e cols, 1997). A membrana do PV 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 as 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 e cols, 2000; Sehgal e cols, 2005). Corroborando com esses dados de utilização do colesterol pelo *T. gondii*, um estudo mostra que a infecção por esse parasito induz alterações no metabolismo lipídico da célula hospedeira (Milovanovic e cols, 2008).

1.4 - Inibidores da biossíntese do ergosterol

Uma vez que os tripanossomatídeos não sintetizam o colesterol e sim esteróis com o esqueleto ergostano (Roberts e cols, 2003), fármacos que atuam na biossíntese do ergosterol possuem interessante atividade leishmanicida e tripanossomicida, 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 e fluconazol) e azasteróis, respectivamente (Rodrigues e cols, 2002; Haughan e cols, 1992; Beach e cols, 1988; Berman e cols, 1984)

Na Figura 1.4.1 podemos observar a estrutura química de alguns inibidores da biossíntese do ergosterol.

A alilamina terbinafina é um potente inibidor da esqualeno-2,3-epoxidase e tem efeito em *Leishmania* spp. e *T. cruzi* (Vanniersantos e cols, 1995; Urbina e cols, 1997). O tratamento de promastigotas e amastigotas de *L. mexicana* com terbinafina resulta no acúmulo de 3 a 4 vezes de esqualeno e uma diminuição na quantidade de esteróis C-29 e C28 endógenos (Roberts e cols, 2003). Foi demonstrada a atividade dessa molécula em *L. major* e *L. donovani* (Zakai e cols, 2000). O efeito sobre o crescimento tem sido atribuído pelo efeito na diminuição de esteróis das estruturas de membrana celulares e parece não estar relacionado ao excesso de esqualeno (Roberts e cols, 2003).

Moléculas naturais têm mostrado excelente atividade leishmanicida, como, por exemplo, as chalconas. A chalcona 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone (DMC) possui potente atividade leishmanicida atuando na biossíntese e composição de esteróis da leishmania (Torres-Santos e cols, 2009).

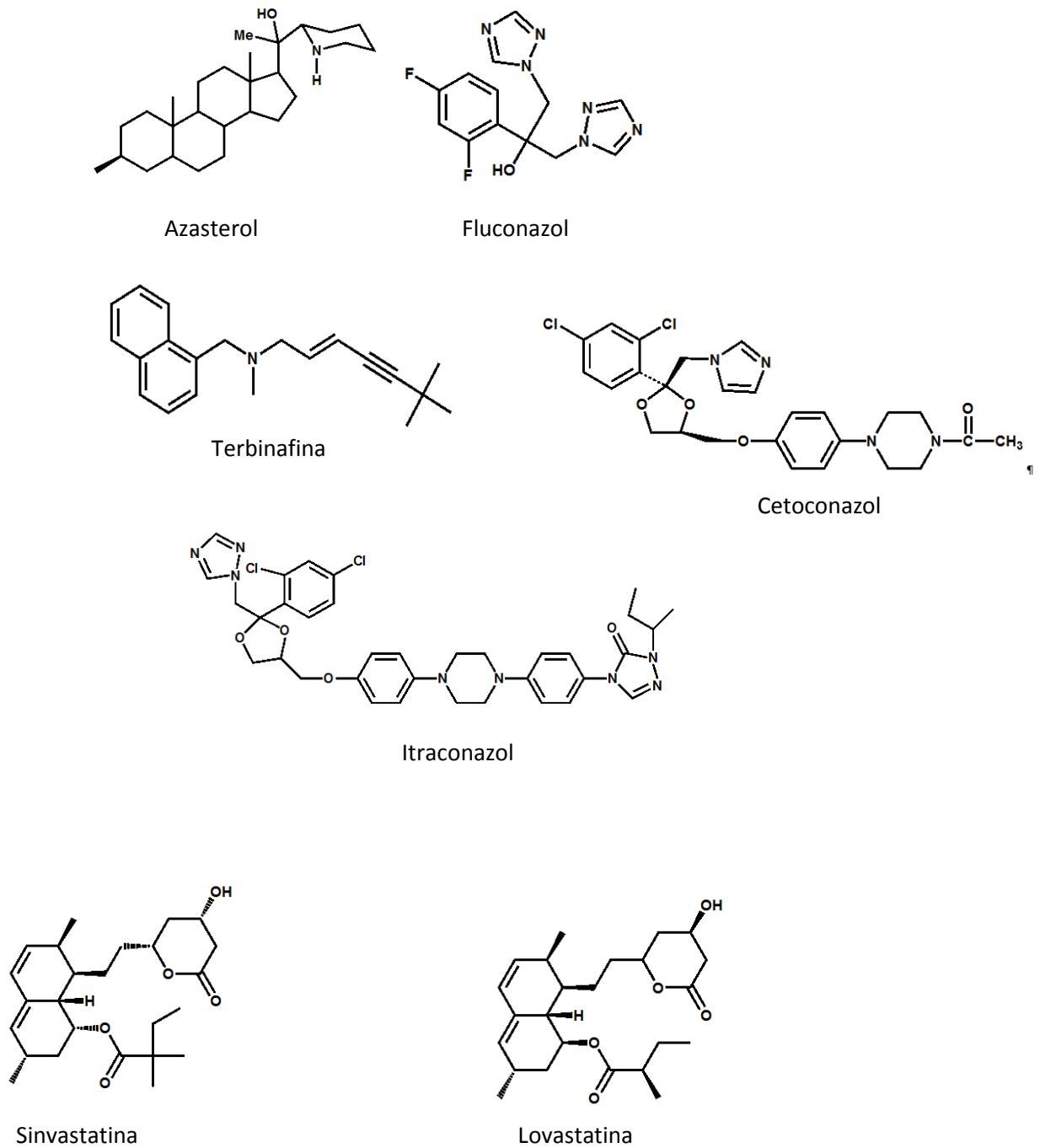


Figura 1.4.1: Estruturas químicas dos inibidores da biossíntese do ergosterol (Roberts e cols, 2003).

Os antifúngicos imidazólicos e triazólicos possuem uma alta atividade na inibição da biossíntese de esteróis e no crescimento de várias espécies de *Leishmania*. (Ramos e cols, 1994; Goad e cols, 1985; Berman e cols, 1986; Beach e cols, 1988; Goad e cols, 1994) e *T. cruzi* (Beach e cols, 1986; Liendo e cols, 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 α . Novas isoformas de CYP51 são encontradas nos protistas, *T. brucei*, *T. vivax*, *T. cruzi*, e *Leishmania spp.* A seqüência de aminoácidos dessa enzima possui 74-86% de identidade entre eles 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 e cols, 2004). Nosso grupo de pesquisa comparou a identidade proteica da CYP51 e da HMGCo-A redutase das diferentes espécies de *Leishmania* com as de humano, por P-BLAST. Em relação a C-14 desmetilase, *L. major*, *L. braziliensis* e *L. infantum* apresentam 34% de homologia proteica e *L. amazonensis* possui 33%. No caso da HMG-CoA redutase, *L. braziliensis*, *L. infantum*, *L. major*, possuem 53%, 52% e 51%, respectivamente de identidade proteica com a enzima de humanos (dados não mostrados).

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 e cols, 2003).

Amastigotas cultivadas em linhagem de macrófagos (J774) e promastigotas de *L. mexicana* em cultura, quando expostos ao cetoconazol, têm a biossíntese de seus esteróis normais majoritários, 5-desitroepisterol (**12**), ergosterol (**13**) e episterol (**10**), foram prejudicadas e ocorre acúmulo de dimetilzimosterol (**3**) e obtusofoliol (**4**) (Berman e cols, 1986; Goad e cols, 1985). O efeito de itraconazol, cetoconazol e fluconazol sobre a biossíntese de esteróis de promastigotas de várias espécies também foi avaliado. Esse trabalho mostrou que promastigotas de *L. aethiopica*, *L. donovani*, e subespécies de *L. mexicana* crescidas por longo período na presença de concentrações de azóis causam a diminuição dos esteróis majoritários reduzidos, e a substituição desses por 14 α metil esteróis endógenos e colesterol exógeno em grande quantidade (Beach e cols, 1988).

A perturbação da biossíntese de esteróis pelo itraconazol e cetoconazol também foi analisada em amastigotas de *L. mexicana*. Foi mostrado que as amastigotas são consideravelmente mais sensíveis 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 foi visto em formas promastigotas (Hart e cols, 1989).

Em epimastigotas e amastigotas de *T. cruzi* tratadas com os azóis, o acúmulo de 14 α -metilesteróis foi 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 e cols, 2003). O tratamento com o miconazol causou a diminuição de esteróis $\Delta^{5,7}$ de epimastigotas de *T. cruzi* (Coombs e cols, 1991).

O miconazol e um inibidor da HMG CoA redutase (Stancu e cols, 2001), a lovastatina foram usadas em combinação para avaliar sua potencia 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 e cols, 1992).

O efeito do azasterol, um inibidor da Δ^{24} - esterol metiltransferase, que inibe a alquilação do C-24 tem sido estudado em *Leishmania* spp e *T. cruzi* (Haughan e cols, 1995; Jimenez-Jimenez e cols, 2008; Rodrigues e cols, 2002; Lorente e cols, 2004; Gros e cols, 2006). A atividade do azasterol sobre o crescimento, e composição de esteróis foi avaliada em *L. donovani*. Os experimentos mostraram o declínio de 24-alkil esteróis e acúmulo de colest-5,7,24-trieno-3 β -ol (**11**) , colest-7,24-dieno-3 β -ol (**9**) e colesterol. O trabalho também mostra que os 24 alkil esteróis não são absolutamente necessários para a sobrevivência e crescimento de *L. donovani* e que o parasita pode ser capaz de usar os esteróis endógenos acumulados e o colesterol captado do meio de cultura (Haughan e cols, 1995).

Os inibidores da esqualeno sintase têm sido utilizados como alvo para quimioterapia em *Leishmania* spp. e *T. cruzi* inibindo assim a formação do esqualeno e o seu crescimento (Granthon e cols, 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 e cols, 2002; Lorente e cols, 2005).

Leishmania spp. embora sintetizem 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 e

cols, 1996), indicando que esse processo possa ser relevante para a sobrevivência do parasito em determinadas situações.

1.5 – 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. 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.

Na Tabela 1.5.1 podemos ver a quantidade do principal lipídeo e da apolipoproteína correspondente a sua lipoproteína.

Tabela 1.5.1: Classes de lipoproteínas e características gerais.

Lipoproteínas	Principais Lipídeos (%)	Apoproteína (%)
Quilomícron	TG: 90%	2%
VLDL	TC: 55%	5 a 8%
LDL	Colesterol: 45%	20-24%
HDL	Fosfolípídeos: 30%	50%

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 (Fig 1.5.1). 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 e cols, 1996), localizado na bolsa flagelar, e indica que o colesterol obtido por esse parasito seja proveniente da captação e metabolização da LDL.

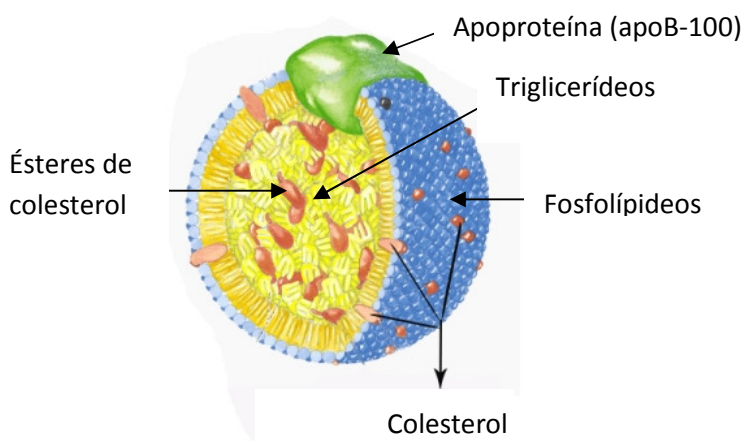


Figura 1.5.1: Estrutura da LDL.

O processo de aquisição do colesterol pelo *T. brucei* tem sido bastante estudado. O receptor de LDL é essencial para o ótimo crescimento das suas formas sanguíneas, fornecendo colesterol e outros lipídeos que são carregados pela LDL (Coppens e cols, 1995). Após a endocitose de partículas de LDL na bolsa flagelar, via receptor de LDL (que é reciclado depois da liberação da LDL), essas partículas se acumulam em estruturas endocíticas e a apolipoproteína é rapidamente degradada por tiol proteases em pH ácido.

As formas sanguíneas do *T. brucei* desenvolveram um mecanismo seletivo de endocitose de proteínas, como transferrina e LDL, que estão em baixas concentrações no soro. A captação ávida e seletiva e a degradação da LDL, combinada com a reciclagem do receptor, conduz a uma utilização eficiente de lipídeos derivados do hospedeiro por essas formas sanguíneas. Formas procíclicas de *T. brucei*, que realizam biossíntese de novo de esteróis, também demonstraram endocitose de LDL mediada por receptor (Lee e cols, 1999; Liu e cols, 2000). Os insetos possuem lipoproteína chamada de lipoforina, que possui uma notável similaridade com a estrutura tridimensional da apoproteína E. No entanto, ainda não está claro se o mesmo receptor de LDL pode reconhecer lipoforinas, equivalente a LDL do inseto (Lee e cols, 1999).

O *T. brucei* é incapaz de sintetizar colesterol “de novo” a partir de fontes exógenas ou metabólicas como glicose, treonina, acetato, mevalonato, e esqualeno (Coppens e cols, 2000). Como conseqüência, as formas sanguíneas dependem crucialmente do fornecimento exógeno de colesterol e ácidos graxos. A aquisição de fosfolipídeos (ex, esfingomielina) e ésteres de colesterila (ex, oleato de colesterila) dependem da captação mediada por receptor e da degradação da LDL (Fig 1.5.2). A esfingomielina e oleato de colesterila são liberados e podem ser metabolizados sob a degradação lisossomal da apoB-100. Esses lipídeos permanecem intactos quando os parasitos são incubados com leupeptina e cloroquina, que previnem a proteólise da LDL. A esfingomielina é clivada pela esfingomielinase (hidrolase ácida lisossomal), que produz ceramida; e esta é dividida em esfingosina e ácidos graxos. Os dois produtos formados podem ser incorporados em fosfatidilcolina, em triacilglicerois, ou em ésteres de colesterila. Similarmente o oleato de colesterila pode ser hidrolisado (lipase lisossomal) em colesterol livre, que é capaz de atravessar a membrana do lisossomo (Coppens e cols, 2000).

O colesterol obtido da LDL pode ser reesterificado com ácidos graxos, como oleato, sugerindo que existe nas formas sanguíneas do *T. brucei* uma acil-coenzima A: colesterol aciltransferase, onde o substrato é fornecido pela LDL-colesterol. Tanto nas formas

sanguíneas como nas procíclicas a exigência de síntese de membrana é totalmente preenchida, o excesso de colesterol é estocado na forma de ésteres de esterila. Essas formas de tripanosomas comportam-se de forma semelhante às células de mamífero, em que a ligação de LDL no seu receptor inicia e regula um processo celular levando a esterificação do colesterol derivado de LDL exógena para estocagem (Coppens e cols, 2000).

Embora a LDL seja a fonte predominante, outras fontes exógenas contribuem para a entrada de lipídeos. A existência de ambos sítios de ligação de alta e de baixa afinidade para partículas de HDL tem sido demonstrada. Após a ligação da HDL, formas sanguíneas são capazes de internalizar e concentrar esta lipoproteína em vacúolos ácidos intracelulares (Coppens e cols, 2000).

A aquisição de LDL mediada por receptor pode ser hipoteticamente bloqueada em vários estágios: (1) inibindo a ligação da LDL com o receptor, utilizando anti-LDL-R ou suramina, um composto polianiónico usado no tratamento da tripanossomíase africana; (2) incubação com agentes que prejudicam a acidificação das estruturas endocíticas (ex: cloroquina) inibindo, assim, a degradação da LDL endocitada e o conseqüente aproveitamento do colesterol; (3) inibição da degradação da apoproteína-B, com um inibidor de tiol-proteases, como a leupeptina (Fig 1.5.2) (Coppens e cols, 2000).

A suramina é um poliânion orgânico com seis grupos ácidos sulfônicos que são desprotonados sob condições fisiológicas (Fig 1.5.3). É utilizado para o tratamento da tripanossomíase africana desde 1920, apesar de alta toxicidade (Barrett e cols, 2007). Essa molécula atua na inibição de algumas enzimas essenciais no *T. brucei*, mas o mecanismo molecular de ação e de captação da suramina não está bem claro. A suramina pode formar complexos com uma larga variedade de proteínas, incluindo LDL. Quando a suramina é adicionada em concentrações terapêuticas no soro humano, 15% se liga a LDL. A suramina livre inibe a interação da LDL com receptores de vários tipos celulares (Coppens e cols, 2000). A carga negativa da suramina compete com a carga negativa de resíduos de aminoácidos do receptor, inibindo a ligação da LDL em aproximadamente 50%. Portanto, é possível que um dos mecanismos de ação da suramina seja a inibição da interação da LDL com seu receptor, impedindo a captação eficiente da LDL por *T. brucei*, interferindo na importação de colesterol e ácidos graxos. Assim, a suramina claramente dificulta, mas não anula, a captação mediada por receptor da LDL através da formação de um complexo com LDL, que é um excelente carreador de suramina (Coppens e cols, 2000).

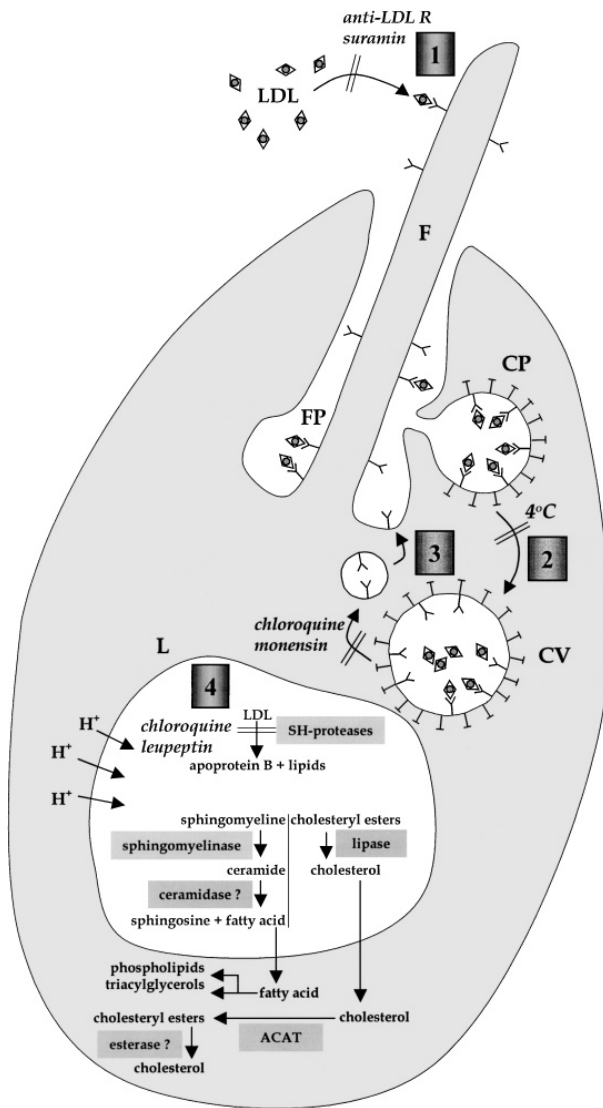


Figura 1.5.2: Vias para aquisição do colesterol e ácidos graxos por *T. brucei* através de endocitose da LDL e alvos para intervenção (Coppens e cols, 2000).

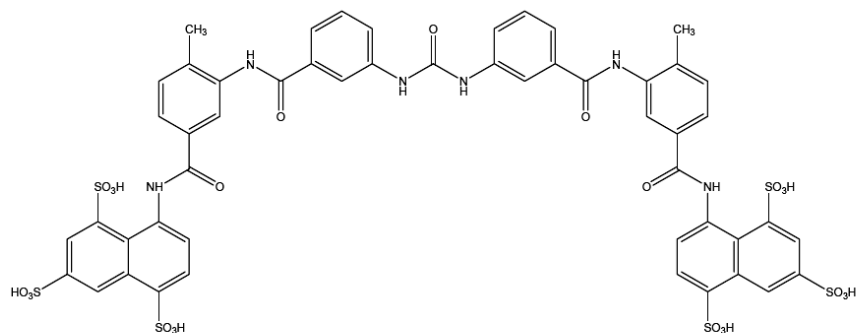


Figura 1.5.3: Estrutura da suramina.

A cloroquina é uma base fraca, representada na Figura 1.5.4 que, pode ser armazenada no vacúolo ácido de *T. cruzi*, diminuindo o crescimento de tripomastigotas in vitro (Coppens e cols, 2000). Esse fármaco também diminui a parasitemia in vivo, prolongando o tempo de sobrevivência de camundongos infectados. A propriedade ácida é necessária para o processamento das macromoléculas carreando nutrientes essenciais como LDL, ao longo do aparelho endocítico e para a estocagem de íons em acidocalcisomas. Assim, a inibição da acidificação das estruturas endocíticas pela cloroquina prejudica a degradação da LDL endocitada e a conseqüente liberação do colesterol e sua utilização pelo parasito (Coppens e cols, 2000).

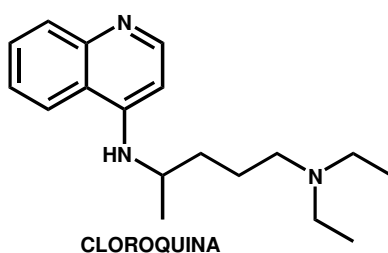


Figura 1.5.4: Estrutura química da cloroquina.

Como foi descrito anteriormente, as leishmanioses são doenças importantes sob o ponto de vista clínico e de saúde pública, para as quais não há vacina licenciada e o tratamento atual é insatisfatório, com altas taxas de toxidez e ineficácia. Então, a identificação de alvos farmacológicos seletivos e vitais para o parasito é uma premissa para o desenvolvimento racional de novos fármacos.

A leishmania, embora sintetize esteróis endogenamente, obtém colesterol exógeno através de endocitose de LDL via receptor em grande quantidade, indicando que esse processo possa ser relevante para a sobrevivência do parasito em determinadas situações. Embora o receptor de LDL esteja caracterizado, poucos estudos têm abordado sua relevância para a sobrevivência do parasito, em condições normais de cultura ou sob pressão farmacológica.

2 - OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Estudar a importância para a *Leishmania amazonensis* do sistema de captação de colesterol exógeno, em diversas situações, avaliando o potencial desse sistema na homeostasia do parasito em situações de estresse metabólico ou farmacológico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Estudar o efeito dos fármacos inibidores da biossíntese de ergosterol na utilização de colesterol exógeno pela *L. amazonensis*;
- 2- Avaliar o efeito de inibidores da utilização do colesterol exógeno no crescimento parasitário e no conteúdo de colesterol do parasito;
- 3- Avaliar o efeito da privação do colesterol no crescimento de *L. amazonensis*, com ou sem pressão de fármacos inibidores da biossíntese do ergosterol;
- 4- Induzir resistência *in vitro* ao cetoconazol em *L. amazonensis*;
- 5- Estudar o mecanismo da resistência induzida ao cetoconazol em *L. amazonensis*

3 - METODOLOGIA

3.1) Manutenção e cultivo dos parasitos

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (cepa MHOM/BR/77/LTB 0016) foram mantidas a 26° C no meio Schneider's insect ou M199 (Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA) suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 g/mL de estreptomicina, e 100 U/mL de penicilina. Para manutenção dos parasitos foi feito repiques duas vezes por semana até a décima passagem. Os parasitos foram obtidos de lesão de camundongos BALB/c.

3.2) Avaliação da atividade dos inibidores da biossíntese do ergosterol, sinvastatina, cetoconazol, miconazol e terbinafina sobre a taxa de proliferação de *L. amazonensis*

Para avaliar a atividade dos inibidores do ergosterol, promastigotas de *L. amazonensis* foram mantidos em garrafas a 26°C em meio Schneider (Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA) ou M199 (Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (normal ou deslipidado) e 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina. No caso do meio M199, houve complementação com 20% de hemina. As células foram monitoradas microscopicamente e os experimentos foram feitos com um mesmo número de passagens.

Os testes foram realizados em placa de 96 poços, com uma concentração inicial de $1,0 \times 10^6$ leishmania/mL e com as concentrações das moléculas variando de 0 a 48 µM para cetoconazol (PM: 531,43), miconazol (PM: 479,1) e terbinafina (PM: 327,89), de 0 a 100 µM de sinvastatina (PM: 418), de 0 a 40 µM cloroquina (PM: 515,87) e de 0 a 200 µM suramina (PM: 1429), todos da sigma-aldrich. A placa de 96 poços foi incubada a 26°C por 72 horas. Após esse período o crescimento parasitário foi avaliado por ensaio colorimétrico com sal de tetrazólio (MTT). Foi adicionada a placa/poço 22 µL de MTT (5 mg/mL) e incubado a 37°C por 1 hora. Após esse período foi acrescentado 80 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), com o objetivo de dissolver os cristais de formazan formados pela reação do MTT na mitocôndria da leishmania, e analisados no espectrofotômetro no comprimento de onda igual a 570 nm. No experimento com o meio M199 depois do tempo da incubação com o MTT a placa foi centrifugada, o sobrenadante descartado e os cristais de formazan dissolvidos com DMSO para realização da leitura. Os gráficos e os valores de IC50 foram obtidos no programa

Graphpad Prism 4. Nos experimentos de associação da sinvastatina com suramina ou cloroquina foi calculado o índice da concentração inibitória fracional (FICI) para análise do sinergismo. A fórmula utilizada para calcular o FICI foi a seguinte (Hallander e cols, 1982): $FICI = IC50 \text{ de A em combinação} / IC50 \text{ de A sozinha} + IC50 \text{ de B em combinação} / IC50 \text{ de B sozinha}$. A interpretação dos resultados de FICI, segundo as diretrizes publicadas por (Odds e cols, 2003) são: $FICI < 0,5$ – sinergismo; $0,5 < FICI < 4$ - sem interação; $FICI \geq 4$ – antagonismo.

3.3) Extração dos lipídeos

Os lipídeos foram extraídos usando o método de Bligh e Dyer (1959). Às amostras foram adicionados 2,0 ml de metanol, 1 ml de clorofórmio e 0,5 ml de 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 adicionados com a mesma mistura de solventes, seguindo-se agitação de 5 em 5 minutos por 1 hora, e nova centrifugação. Os sobrenadantes foram unificados e a eles adicionados 1,0 ml de água destilada e 1,0 ml de clorofórmio. Após 40s 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 reação (ependorfs) novos, resistentes a solventes orgânicos (Axygen Scientific Inc., Union city, CA, USA). O solvente foi evaporado por arraste de nitrogênio gasoso (N₂).

3.4) Cromatografia em Camada Fina (CCF/TLC)

Os lipídeos extraídos foram analisados por cromatografia em camada fina (TLC) em placa de sílica (Silica Gel, 60F₂₅₄, Merck KGaA, Frankfurt, DS, Alemanha) após ressuspensão em 500µl 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 C-C. Foram utilizadas duas corridas com uma combinação diferente de solventes. A primeira corrida foi feita até a metade da placa utilizando os seguintes 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). 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).

3.5) Análise dos lipídeos neutros de *L. amazonensis* por Cromatografia em Camada Fina (CCF/TLC).

Promastigotas de *L. amazonensis* foram incubados em garrafas a 26°C em meio Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino (normal ou deslipidado) na presença de variadas concentrações dos fármacos por 72 h. As concentrações utilizadas foram as seguintes: cetoconazol e miconazol (4 e 6 µM), terbinafina (10 e 20 µM) e sinvastatina (12,5 e 25 µM), todos inibidores da biossíntese do ergosterol e suramina (200 e 400 µM). No caso dos inibidores do ergosterol, foram feitas duas passagens consecutivas na presença dos fármacos, com análise dos lipídeos neutros a cada passagem. Para a suramina, a análise foi feita após uma única passagem na presença do fármaco.

3.6) Dosagem dos esteróis totais

A concentração dos esteróis totais dos parasitos foi mensurada de acordo com o método descrito por Zlatkis e colaboradores (1953), ligeiramente modificado (método de Liebermann- Burchard). Após extração e ressuspensão dos lipídeos totais, às amostras foram acrescentados 0,75 ml de ácido acético e 0,5 ml de solução de cloreto férrico 2,5% (FeCl₃) preparada previamente: 0,05g de FeCl₃ são diluídos em 2,0 ml de ácido orto-fosfórico 85% (H₃PO₄) e 23,0 ml de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄). Após ligeira agitação e 30 min de reação, a densidade ótica (D.O) de cada amostra foi lida a 550 nm. Colesterol comercial (CHO) (10,0 mg/ml) (Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA) foi usado como padrão.

3.7) Deslipidação do soro fetal bovino (SFB)

Para avaliar o efeito da privação do colesterol no crescimento da leishmania, com ou sem pressão de fármacos inibidores da biossíntese do ergosterol, o 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) (para evitar interação com uma possível quantidade de peróxido), 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 28-30 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, então, esterilizado por filtração em membrana Milex- 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.

3.8) 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 Insetos, 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 com o Poumay and Ronveaux, 1984 modificado. Cerca de 15,0 ml de plasma foram descongelados a temperatura ambiente e centrifugados para a retirada de suspensão celular (3.000 rpm/15min). A estes 15,0 ml foi adicionado brometo de potássio (KBr) com a finalidade de ajustar sua densidade para 1,3. Após o ajuste da densidade, 25 mL de solução salina (NaCl 150mM) suplementado com 1mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) dissódico foi adicionado nos tubos de centrífuga 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 foi adicionado 15 mL do soro fundo do tubo, formando duas fases.

O tubo foi centrifugado em ultracentrífuga Beckman Optima LE 80K a 45.000 rpm por 18 h. Ao final a fração do topo do gradiente, de cor laranja, correspondente a LDL, foi coletada, mantidas a 4°C e dialisadas, segundo Penefsky (1977), antes de sua utilização nos ensaios experimentais. A concentração de proteína da LDL foi quantificada usando o método

descrito por Lowry e colaboradores (1951), modificado, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,5%.

3.9) Ensaios de captação de LDL-I¹²⁵

A LDL-I¹²⁵ foi obtida por idionação com iodeto-I¹²⁵ (CNEN, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), na proporção de 0,2 mCi/MG de proteína, usando 1,3,4,6-tetracloro-3 α -6 α -DI-fenilglicoril, também chamado de iodo-gen (Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA) (0,1 mg/mg de proteína), diluído em clorofórmio, seguindo as instruções do fabricante. O iodo livre foi retirado ao passar esta mistura através de três colunas sequencias de Sephadex G-50 (Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA) em PBS pH 7,4 (Penefsky1977). A radioatividade associada foi mensurada por contagem de raios gamma.

Após a marcação da LDL I¹²⁵ foram feitos experimentos de endocitose. Promastigostas de *L. amazonensis* (10⁷ células/ml) foram lavados duas vezes com com tampão fosfato (PBS) pH 7,4 suplementado com 1% de sacarose, ressuspendidos em meio sem soro e incubados a 4°C ou a 26°C por 5 horas com os fármacos, cetoconazol (10, 20 e 40 μ M), sinvastatina (25, 50 e 100 μ M) e suramina (50 e 100 μ M) na presença de LDL-I¹²⁵ (0,1 mg/ml). Após esse período, as células foram lavadas 3 vezes com PBS suplementado com 1% sacarose, e ressuspendidas em 10 μ L do mesmo tampão. A radioatividade foi medida em contador gama. A contagem a 4° C foi considerada como simples adsorção e descontada do valor a 26° C. 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.

3.10) Indução de resistência ao cetoconazol.

Promastigostas de *L. amazonensis* foram cultivadas em meio Schneider suplementado com 10 % de soro em concentrações crescentes de cetoconazol, começando com a concentração da IC₅₀ (2 μ M) e, sequencialmente, aumentadas para 4, 8, 10 e 16 μ M. As células foram monitoradas e as passagens foram feitas com um inoculo inicial de 1 x 10⁶ promastigotas/mL. As linhagens resistentes com IC₅₀ de 8 e 10 μ M (denominada La8 e La10) foram obtidas após 10 a 12 passagens.

3.11) Análise da expressão da C-14 desmetilase em promastigotas de *L. amazonensis*.

O RNA total foi extraído de aproximadamente 1x10⁸ promastigotas dos parasitas selvagens e resistentes em fase logaritma de crescimento por homogeneização em 1 ml de

reagente trizol (Invitrogen). Para a extração de mRNA, a cada 1 ml de trizol foi adicionado 200 µL de clorofórmio, homogeneizados por 15 segundos e incubados por 3 min a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 20 min a 2000 rpm em microcentrífuga. Da fase aquosa, 550 µL foram removidos de cada tubo e foram adicionados 550 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e homogeneizados e centrifugados por 10 min a 13000 x g. A fase aquosa de cada tubo foi transferida e adicionada de igual volume de clorofórmio, homogeneizada e centrifugada por 10 min a 13000 x g. A fase aquosa de cada tubo foi novamente transferida e o RNA foi precipitado com a adição de 300 µL de isopropanol com de 2.5 M de acetato de amônio, homogeneizada e incubada por 3 min. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 10 min a 13000 x g. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com etanol 70%. O pellet foi praticamente seco, em seguida foi ressuscitado em 50 µL de água (livre de RNase) e quantificado por espectofotometria. A cada preparação foi adicionada 2 unidades de DNase e tampão e incubados por 30 min a 37°C. Em seguida, foram adicionados a cada tubo 2 µL do reagente de inativação, os tubos foram então, incubados por 2 min a temperatura ambiente e em seguida a 70°C por 10 min, sendo centrifugados por 3 min a 13000 x g. A síntese de DNA complementar foi realizada através do kit Superscript Indirect cDNA Labeling (Invitrogen), conforme o manual do fabricante. Na reação foram utilizados 5 µg de RNA por cada síntese. Para realizar o PCR semi-quantitativo, foram desenhados o primer para a região codificantes N- e C-terminais dos genes **C-14 desmetilase** (Primer F-Leish_C14deme:gccggcctggcgctgtacggctgg e Primer R-Leish_C14deme:gtacttcacgcgactggctggccgt) e **actina** (Primer F-Leish_Actin: atggctgacaacgagcagagctcca e Primer R-Leish_Actin: tcagaagcacttgtgtgcacgatg) baseados no consenso das seqüências genômicas de *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*. A reação do PCR foi realizada num volume final de 25µL contendo 2U de TAQ DNA polimerase, 1x de tampão da TAQ, 1.5 mM de MgCl₂, 200 µM de DNTPs e 20 pMol de cada primer (senso e reverso) O programa utilizado foi 1 ciclo a 95°C por 5 min, 35 ciclos repetidos de 1 min a 95°C, 1 min a 65°C (para os primers para o gene de C-14- desmetilase) ou 60°C (para o primers do gene da actina), 2 min a 72°C, seguidos por 15 min a 72°C no final da reação. Todas as reações foram realizadas na máquina de PCR Eppendorf Mastercycler. Os fragmentos amplificados foram resolvidos através de eletroforese em agarose (1%) usando Tampão TBE e visualizados através de brometo de etídio no sistema transluminador da BIO-RAD.

Para confirmar a expressão diferencial da C-14 desmetilase nos parasitas resistentes, foi feito um real-time PCR usando a técnica SYBR Green I. O real-time PCR foi feito usando o sistema Real-time PCR 7500 com um sistema de detecção da “Applied Biosystem”. Primers para os genes C-14 desmetilase (senso: ggccagcacacctcactat e anti-senso: cttgttgcgaggatccatca) e actina (senso: acgctcctcgccacggtt e anti-senso tcatggcctgcatgttcttc) foram desenhados usando Primer Express® Software v2.0. Reações foram feitas usando SYBR® Green PCR Master Mix o padrão recomendado, pela “Applied Biosystems”. No instrumento Real-Time PCR foram feitos 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s e extensão de anelamento extensão a 60°C por 1 minuto. Cada determinação foi feita três vezes. Os resultados foram expressos como diferença de vezes nos parasitas resistentes em comparação com a selvagem. Dados foram normalizados aplicando a expressão endógena como controle (actina). Essa parte do trabalho foi desenvolvida em colaboração com o Dr. Herbert Leonel de Matos Guedes, do Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ.

4 - RESULTADOS

4.1- ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS INIBIDORES DA BIOSÍNTESE DO ERGOSTEROL

Promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivados em meio Schneider ou M199 suplementado com 10% de soro fetal bovino na presença ou ausência de diversas concentrações de cetoconazol, miconazol (inibidores da C-14 desmetilase) e terbinafina (inibidor da esqualeno epoxidase).

Conforme mostrado na Figura 4.1, dentre os inibidores testados em meio Schneider, o miconazol foi o que se mostrou mais potente, com IC50 de 2,0 μM , seguido pelo cetoconazol, com IC50 de 3,0 μM e, finalmente, a terbinafina, com IC50 de 8,5 μM (Tab. 4.1). O cálculo do IC50 foi feito através da equação da curva sigmóide dose-resposta, com as concentrações convertidas para a escala logarítmica.

Para avaliar se há interferência no efeito leishmanicida conforme a disponibilidade de nutrientes, fomos avaliar o efeito dos mesmos fármacos em outro meio de cultura. Ainda na Figura 4.1, é mostrada a atividade do cetoconazol, miconazol e terbinafina em meio M199. Nestas condições o cetoconazol apresentou IC50 de 2 μM , menor do que observado na leishmania cultivada no meio Schneider. O miconazol apresentou atividade menor no meio M199, com valor de IC50 de 3 μM . O efeito mais acentuado na atividade dos inibidores da biossíntese do ergosterol no meio M199 foi observado no tratamento com terbinafina. Esse inibidor apresentou IC50 de 4 μM , mais do que 50% menor do que no meio Schneider. Na Tabela 4.1 são mostrados os diferentes ICs50 para cada fármaco, de acordo com o meio de cultura utilizado.

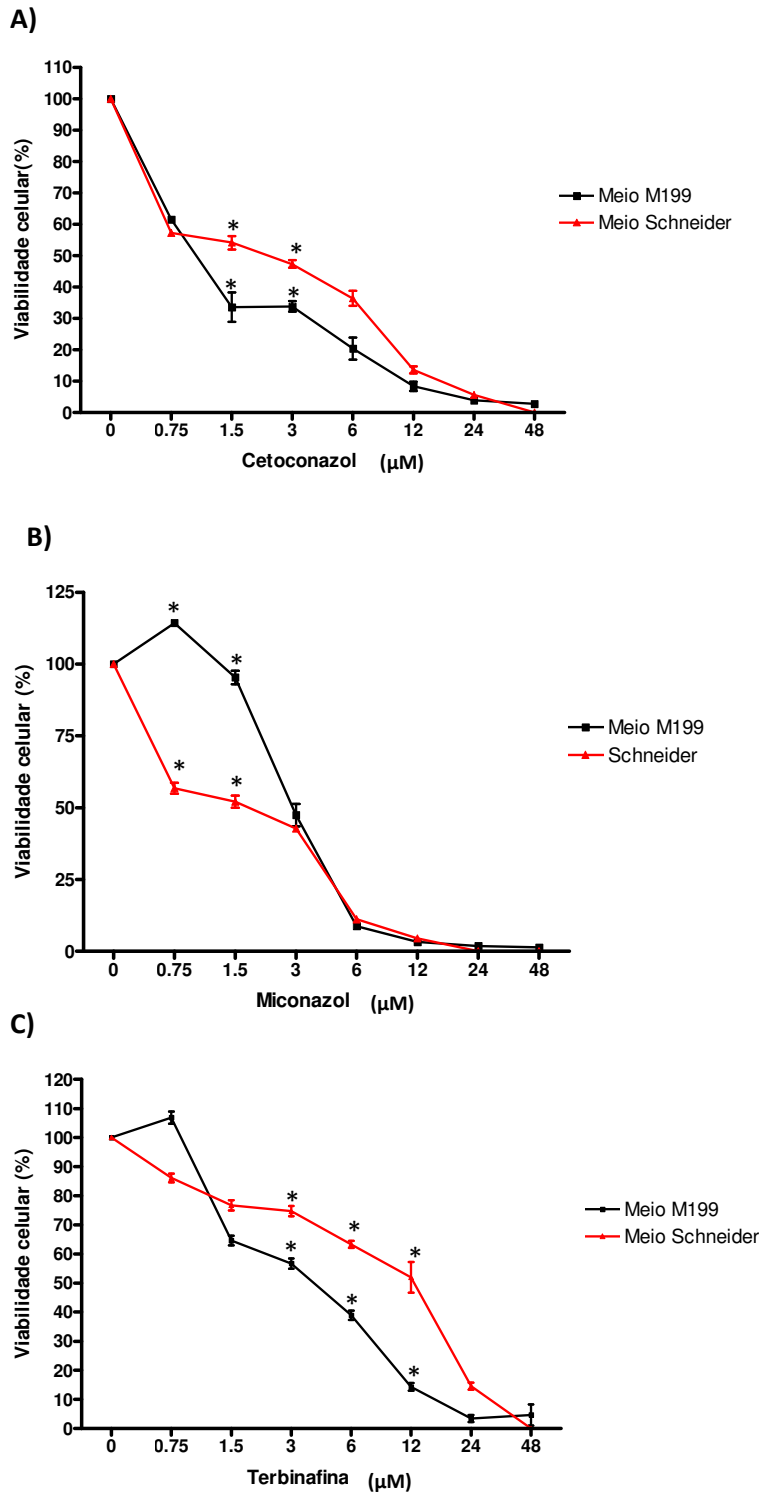


Figura 4.1: Comparação da atividade leishmanicida dos inibidores da biossíntese do ergosterol nos meios Schneider e M199. Promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^6 células/ml) foram incubados na ausência ou presença de várias concentrações (0 a 48 µM) de cetoconazol, miconazol e terbinafina, a 26°C por 72 horas em meio M199 ou Schneider com 10% de SFB. O crescimento parasitário foi avaliado por ensaio colorimétrico com sal de tetrazólio (MTT). Os experimentos foram feitos em triplicata (média±SD), os gráficos e os valores de IC50 foram obtidos no programa Graphpad Prism 4. Teste *t* student, * $p < 0,05$.

Tabela 4.1: Atividade dos inibidores da biossíntese do ergosterol nos diferentes meios de cultura.

	IC50 (μM)	
	Meio Schneider	Meio M199
Cetoconazol	3	2
Miconazol	2	3
Terbinafina	8,5	4

Promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^6 células/ml) foram incubados e tratados conforme descrito na Fig 4.1. Os experimentos foram feitos em triplicata e os valores de IC50 foram obtidos no programa Graphpad Prism 4.

4.2- ATIVIDADE DOS INIBIDORES DA BIOSÍNTESE DO ERGOSTEROL SOBRE OS ESTERÓIS E O ACÚMULO DE COLESTEROL POR PROMASTIGOTAS DE *L. amazonensis*

A atividade dos inibidores da biossíntese do ergosterol, cetoconazol e sinvastatina, sobre os lipídeos neutros de promastigotas de *L. amazonensis* foi avaliada por dosagem dos esteróis totais pelo método de Liebermann-Burchard. Promastigotas de *L. amazonensis* foram incubados a 26°C por 24 horas na presença de cetoconazol ou sinvastatina. Como esperado, na Figura 4.2 é possível observar que o cetoconazol promoveu 55% de redução dos esteróis totais a 10 µM, enquanto que 50 µM de sinvastatina promoveu 42% de inibição.

Como o método de Liebermann-Burchard dosa esteróis totais e a leishmania capta colesterol de fontes exógenas, fomos avaliar o efeito desses inibidores por um método que permitisse distinguir os diferentes esteróis. Foram, então realizadas cromatografias em camada fina (CCF/TLC), seguidas de análise por densitometria de promastigotas de *L. amazonensis* tratados com cetoconazol ou miconazol. A fim de observar algum efeito acumulativo, foram feitos dois tratamentos consecutivos com os fármacos nas concentrações de 4 µM e 6 µM por 72 horas. O segundo tratamento foi feito a partir de um repique da cultura submetida ao primeiro tratamento. Foi possível observar diferenças na composição dos lipídeos neutros entre a leishmania tratada e o controle (CN) nas duas passagens.

As Figuras 4.3 e 4.4 mostram a TLC e a análise por densitometria para a quantificação das bandas. No tratamento com 4 µM e 6 µM de cetoconazol, observamos o bloqueio total na síntese dos esteróis de esqueleto ergostano (ERG) e pequenas alterações não significativas nas bandas ND1, ND3 e ND4. O colesterol (COL) apresentou aumento de 121 % e 125%, na concentração de 4 e 6 µM, respectivamente. A banda ND2, que não foi observada no controle (CN), surgiu na leishmania tratada com cetoconazol nas duas concentrações, com um aumento dose dependente, o que sugere que seja acúmulo de um precursor da via. Em relação ao miconazol, a leishmania tratada com as concentrações de 4 µM e 6 µM apresentou diminuição de ERG em 63% e 70%, respectivamente. Surpreendentemente, a banda ND1 não foi observada no tratamento com 4 µM de miconazol, mas é observada na leishmania tratada com 6 µM, com um aumento de 19%. Assim como na leishmania tratada com cetoconazol, a banda ND2 é observada após o tratamento com as duas concentrações e também com um aumento dose dependente. Interessantemente no tratamento com ambos os fármacos a leishmania apresentou

acúmulo de colesterol dose dependente que foi acompanhada pela diminuição do ergosterol.

As Figuras 4.5 e 4.6 mostram a TLC e a análise por densitometria dos esteróis extraídos de promastigotas de *L. amazonensis* após o segundo tratamento com cetoconazol e miconazol. Assim como foi visto no primeiro tratamento, foram observados diminuição da biossíntese de esteróis com esqueleto ergostano, aumento no acúmulo de colesterol (COL) e de ND2 e alterações pouco significativas de outros esteróis não identificados (ND1, ND3 e ND4) em promastigotas tratados com cetoconazol e miconazol. É interessante notar que além dessas bandas não identificadas, foi observado o aparecimento de uma quinta banda (ND5), ocasionada pelo tratamento sequencial com os inibidores, que, assim como a ND2, apresenta acúmulo dose dependente.

Além do significativo acúmulo de colesterol, dois outros pontos conceituais importantes merecem destaque nessa sequência de resultados: 1- Ao contrário de alguns relatos na literatura (Hart e cols, 1989), o esterol acumulado pelo tratamento com azóis em *L. amazonensis* não é lanosterol, conforme observado pela corrida do padrão nas Figs 4.3 e 4.5; 2- O ergosterol não é o esterol majoritário em *L. amazonensis*, conforme mostrado pela corrida com o padrão nas Fig 4.3 e 4.5. Dados na literatura (Beach e cols, 1988) sugerem que esses esteróis são desidroepisterol e episterol, não disponíveis comercialmente para comparação com nossas amostras.

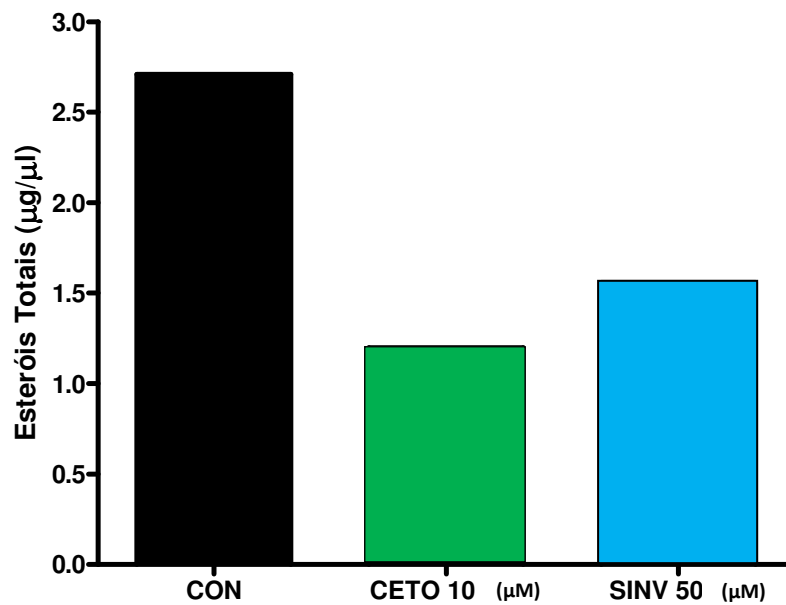


Figura 4.2: Efeito dos inibidores da biossíntese do ergosterol, cetoconazol e sinvastatina, no conteúdo de esteróis em promastigotas de *L. amazonensis*. Promastigotas de *L. amazonensis* foram incubados a 26°C por 24 horas na presença de cetoconazol (CETO 10 µM) e sinvastatina (SINV 50µM). Os esteróis totais foram quantificados pelo método de Liebermann-Burchard.

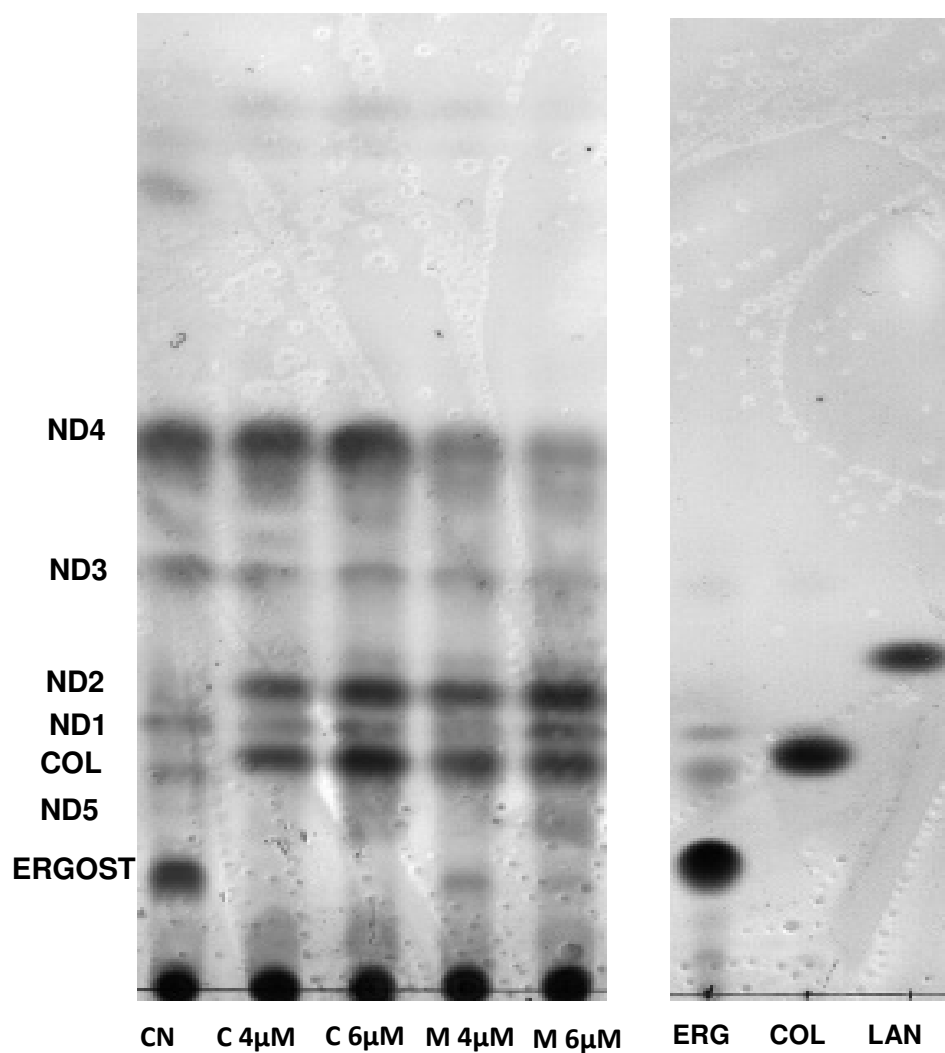


Figura 4.3: Efeito dos inibidores da biossíntese do ergosterol sobre os lipídeos neutros de *L. amazonensis* e na utilização do colesterol exógeno. Promastigotas de *L. amazonensis* foram incubados a 26°C em meio Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino na presença de concentrações de 4 µM e 6 µM, de cetoconazol (C 4µM e C 6µM) e miconazol (M 4µM e M 6µM) por 72 h. Após esse período, os lipídeos neutros foram extraídos e submetidos a TLC.. Controle (CN), esteróis com esqueleto ergostano (ERGOST), colesterol (COL), lanosterol (LAN), bandas não identificadas (ND1, ND2, ND3, ND4 e ND5). A imagem a direita representa a aplicação de padrões: ergosterol (ERG), lanosterol (LAN) e colesterol (COL).

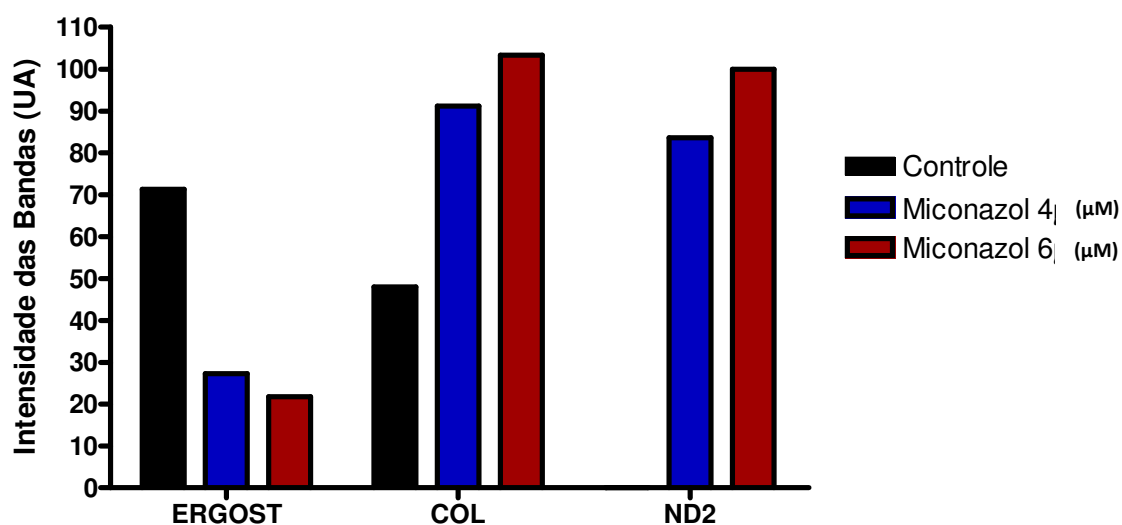
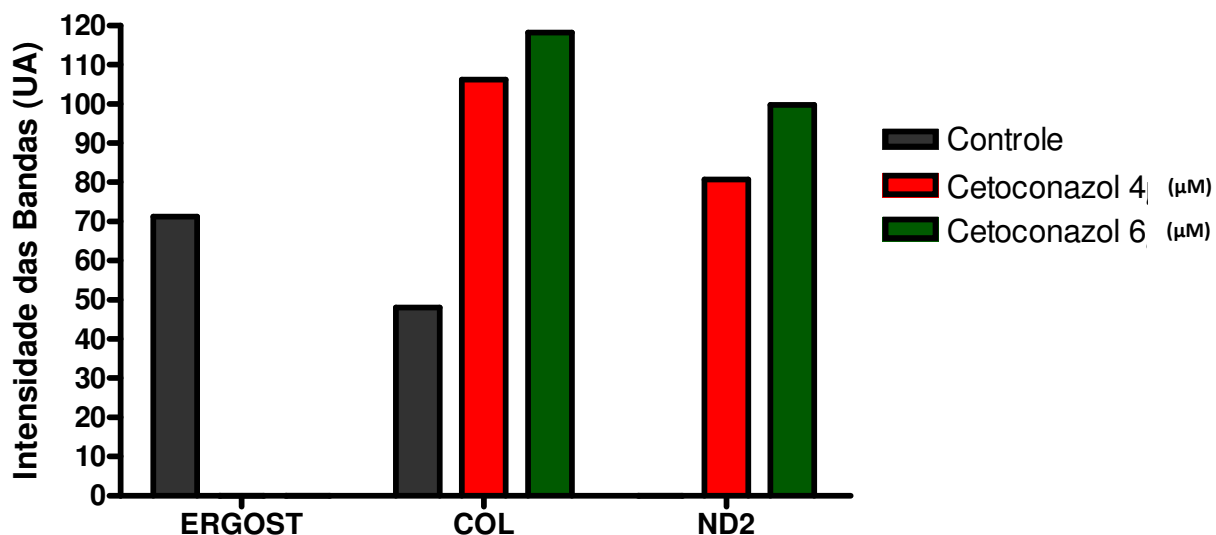


Figura 4.4: Quantificação dos esteróis de promastigotas de *L. amazonensis* tratados com cetozonazol e miconazol. Promastigotas de *L. amazonensis* foram incubados com cetozonazol e miconazol e seus lipídeos neutros foram submetidos a cromatografia em camada fina, conforme descrito anteriormente. A placa mostrada na Fig.4.4 foi, então, submetida a análise por densitometria. A imagem da TLC foi digitalizada e analisada pelo programa “ImageMaster TotalLab v1.11”. (UA – Unidades arbitrárias)

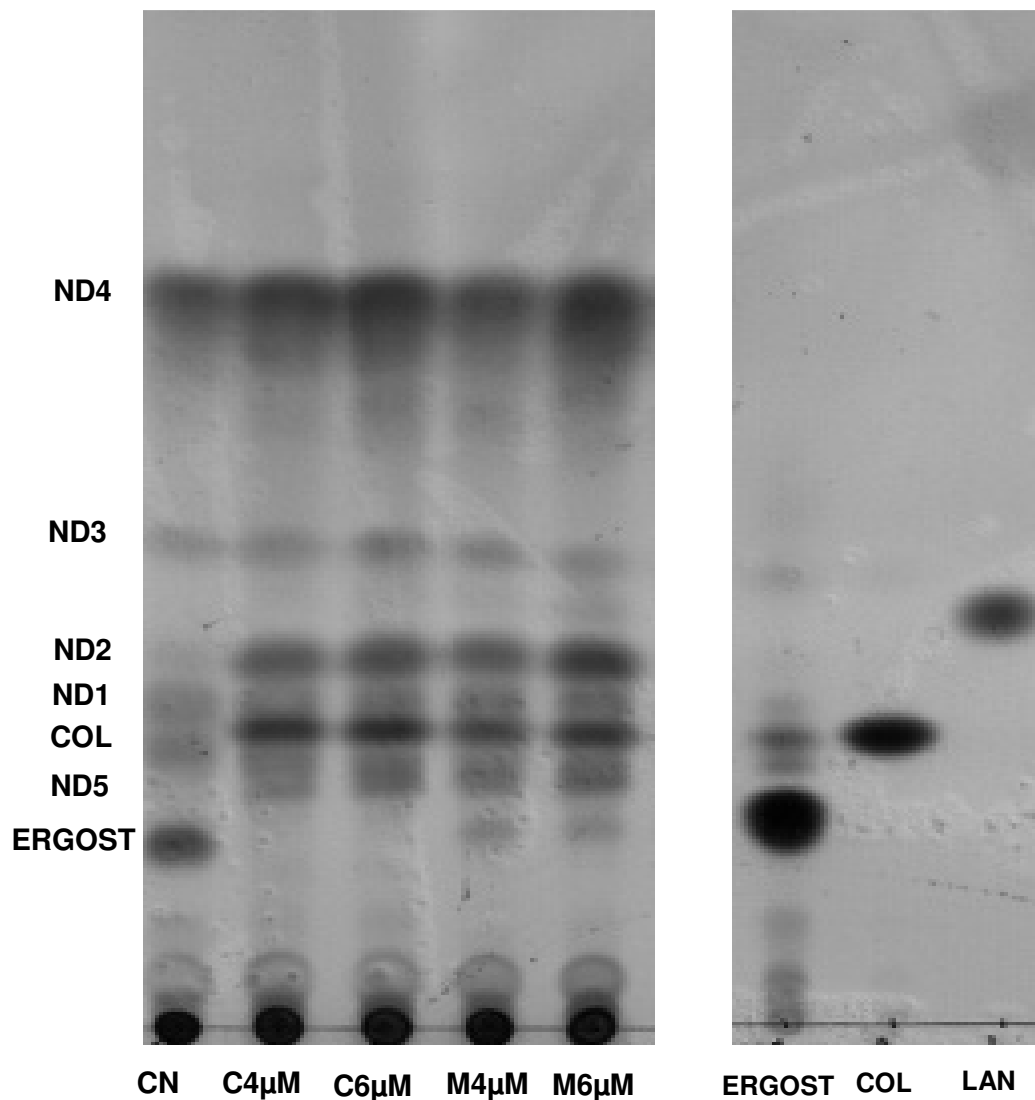


Figura 4.5: Efeito sobre os lipídeos neutros de *L. amazonensis* e utilização do colesterol exógeno após o segundo tratamento com os inibidores da biossíntese do ergosterol. Promastigotas de *L. amazonensis* após o primeiro tratamento (Fig 4.4) foram incubados a 26°C em meio Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino na presença de 4 µM e 6 µM, de cetoconazol (C 4µM e C 6µM) e miconazol (M4µM e M6µM) por 72 h. Após esse período, os lipídeos neutros foram extraídos e submetidos a TLC. Controle (CN) Esteróis com esqueleto ergostano (ERGOST), colesterol (COL), lanosterol (LAN), bandas não identificadas (ND1, ND2, ND3, ND4 e ND5). A imagem a direita representa a aplicação de padrões: ergosterol (ERG), lanosterol (LAN) e colesterol (COL).

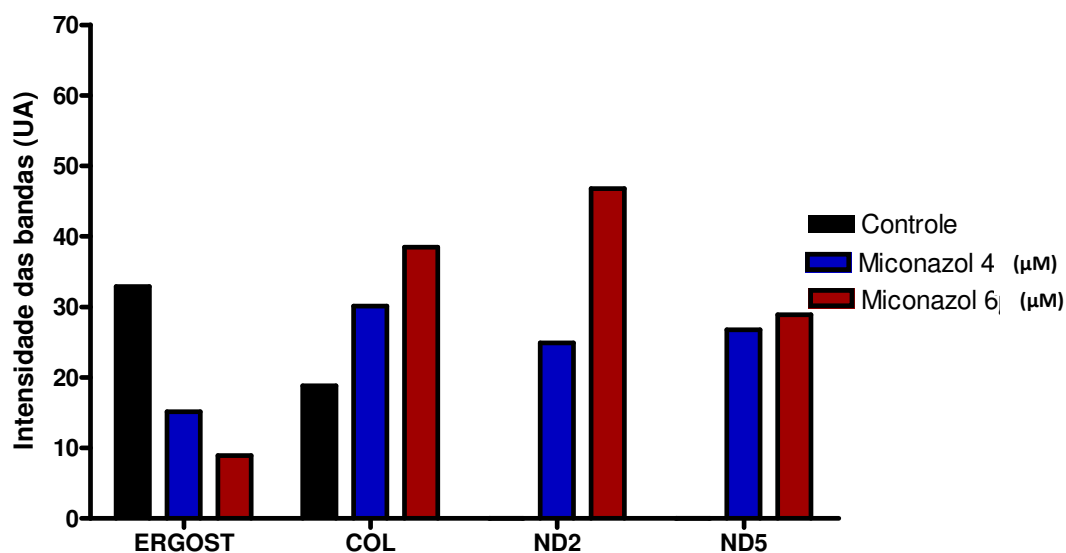
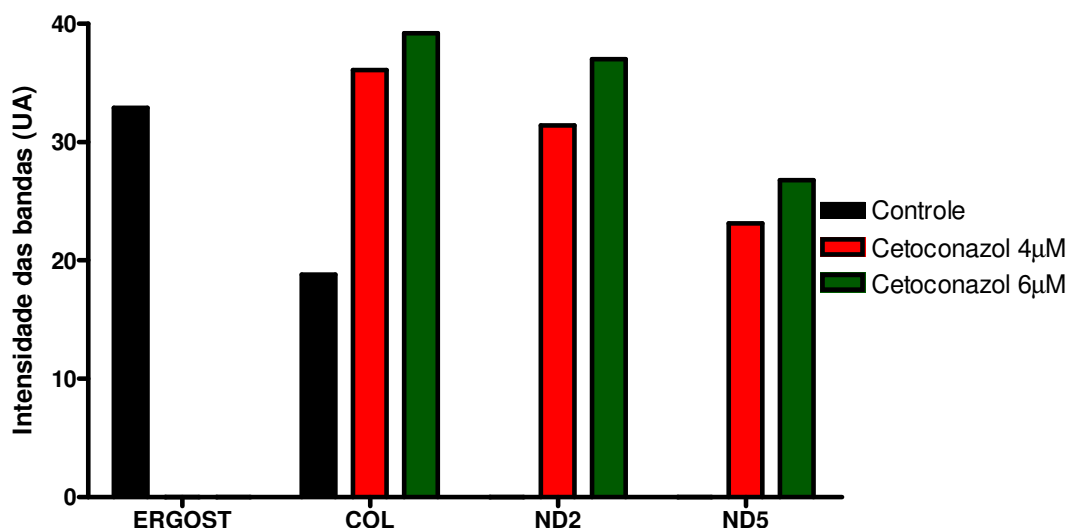


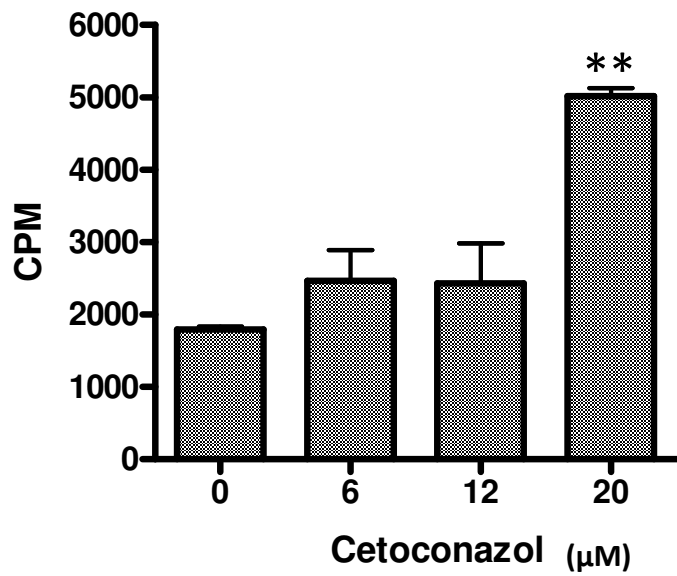
Figura 4.6: Quantificação dos esteróis de promastigotas de *L. amazonensis* tratados com cetoconazol e miconazol. Promastigotas de *L. amazonensis* após o primeiro tratamento foram incubados com cetoconazol e miconazol e seus lipídeos neutros foram submetidos a cromatografia em camada fina, conforme descrito anteriormente. A placa mostrada na Fig. 4.6 foi, então, submetida a análise por densitometria. A imagem da TLC foi digitalizada e analisada pelo programa “ImageMaster TotalLab v1.11”. (UA – Unidades arbitrárias)

4.3- EFEITO DOS INIBIDORES DA BIOSÍNTESE DO ERGOSTEROL SOBRE A ENDOCITOSE DE LDL-I¹²⁵

Uma vez que foi observado consistentemente o acúmulo de colesterol pela leishmania tratada com azóis, o próximo passo foi estudar a endocitose de LDL pelo parasito, sob pressão farmacológica.

Para quantificar a incorporação da LDL sob pressão farmacológica, promastigotas de *L. amazonensis* foram incubados com LDL-I¹²⁵ na presença de cetoconazol e sinvastatina. Os dois fármacos induziram aumento da captação de LDL-I¹²⁵ pelos parasitos. O cetoconazol, nas concentrações de 6 e 12 µM levou a um aumento de 37% e 36%, respectivamente, não havendo diferença significativa. Já na concentração de 20 µM, o aumento foi de 180% em relação ao controle (Fig. 4.7A). No tratamento com sinvastatina, o aumento foi de 6%, 22% e 72%, nas concentrações de 25, 50 e 100µM (Fig. 4.7B).

A)



B)

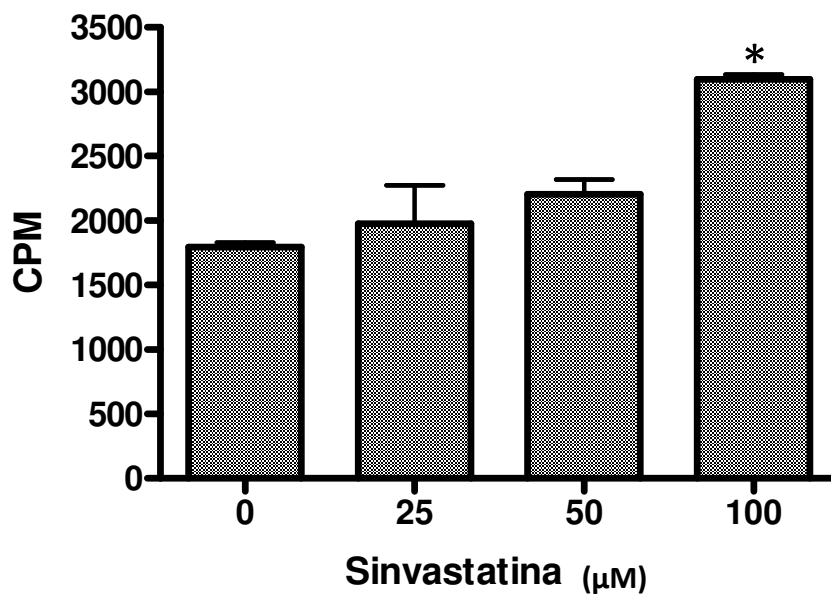


Figura 4.7: Atividade dos inibidores da biossíntese do ergosterol na endocitose de LDL-I¹²⁵. Promastigotas de *L. amazonensis* foram incubados a 4°C e a 26°C por 5 horas com cetoconazol (10 e 20μM) e sinvastatina (25, 50 e 100μM) na presença de LDL-I¹²⁵ em meio sem soro. Após esse período, as células foram lavadas e ressuspendidas em 10μL de tampão. A radioatividade foi medida em contador gama. A contagem a 4° C foi considerada como simples adsorção e descontada do valor a 26° C. A média dos valores a 4°C foi igual a 3783,6 CPM. Teste estatístico (ANOVA), * P<0,05, ** P<0,01 em relação ao controle.

4.4- AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SURAMINA SOBRE A INCORPORAÇÃO DE COLESTEROL POR *L. amazonensis*

Uma vez que há indícios na literatura de que o receptor para LDL é conservado em toda ordem Kinetoplastida (Bastin e cols, 1996) e que a suramina é um inibidor competitivo deste receptor em *T. brucei* (Coppens e cols, 2000), experimentos foram realizados para avaliar o efeito da suramina na incorporação de LDL por *L. amazonensis* e se ocorria uma diminuição do conteúdo de colesterol.

Promastigotas de *L. amazonensis* foram incubados com LDL-I¹²⁵ na presença de diferentes concentrações de suramina e a radioatividade foi utilizada como estimativa da endocitose. Foi possível observar que a suramina foi capaz de inibir em mais de 50% a incorporação de LDL pela leishmania na concentração de 100 µM, que é inferior ao IC50 de 200 µM (Fig. 4.8).

Uma vez demonstrado o efeito da suramina sobre a incorporação de LDL pela leishmania, fomos avaliar as alterações na composição esteroídica do parasito induzidas por esse fármaco, principalmente em relação ao conteúdo de colesterol. A Fig 4.9 mostra a TLC de esteróis de promastigotas de *L. amazonensis* não tratadas (CN) e tratadas com 200 µM e 400 µM de suramina por 24 horas. O tratamento com suramina não alterou a biossíntese de ergosterol, mas diminuiu o conteúdo de colesterol em 40% e 35%, nas concentrações de 200 µM e 400 µM, respectivamente (Fig 4.10).

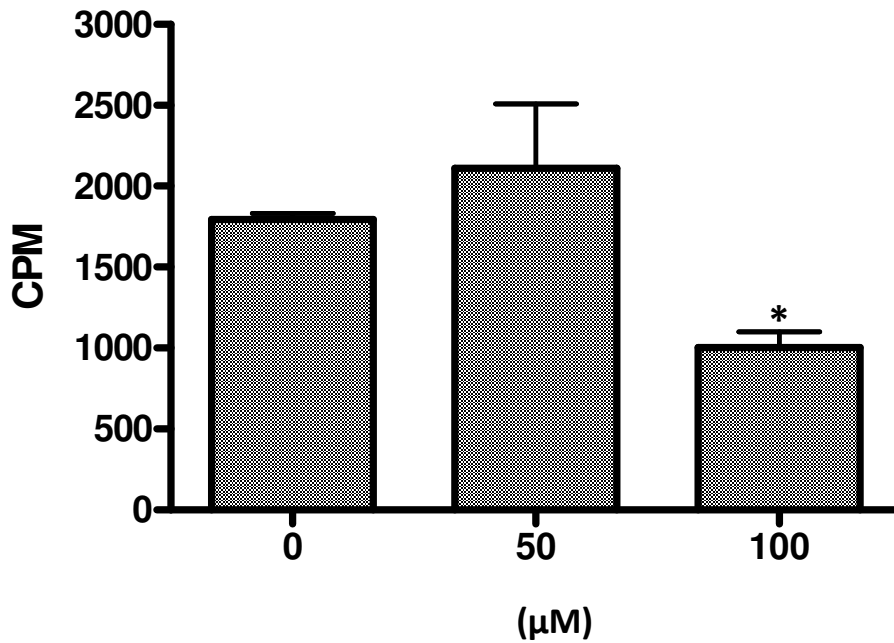


Figura 4.8: Efeito da suramina sobre a endocitose de LDL por *L. amazonensis*. Promastigotas de *L. amazonensis* foram incubados a 4°C e a 26°C por 5 horas sem ou com, 200µM e 400µM de suramina na presença de LDL-¹²⁵ em meio sem soro. Após esse período, as células foram lavadas e ressuspendidas em 10 µL de tampão. A radioatividade foi medida em contador gama. A contagem a 4° C foi considerada como simples adsorção e descontada do valor a 26°C.

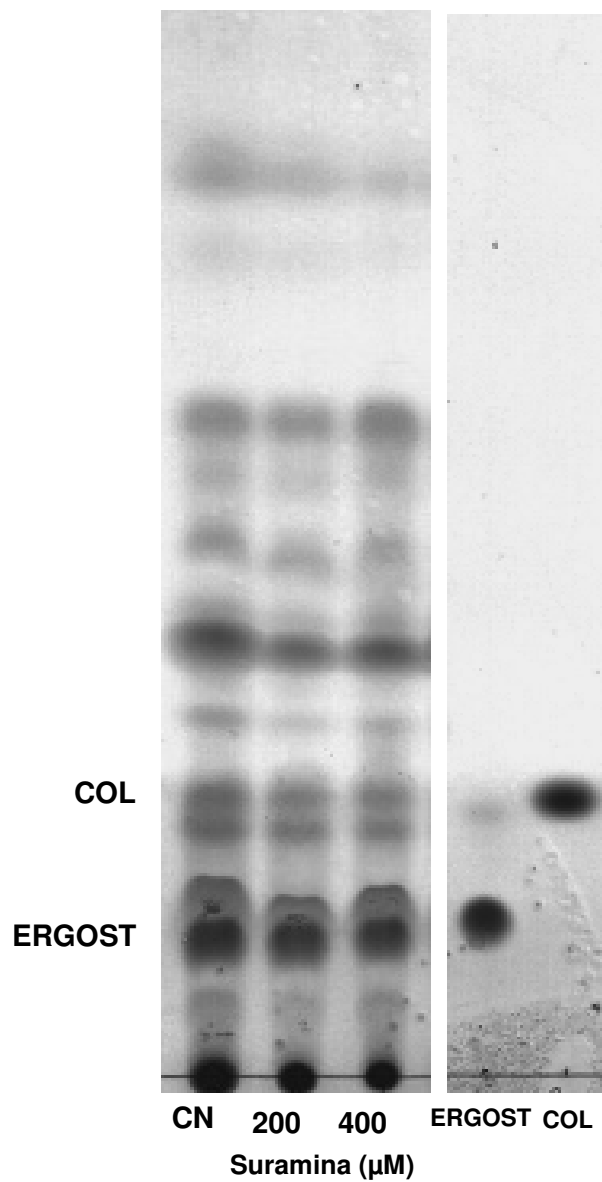


Figura 4.9: Efeito da suramina sobre a composição lipídica de *L. amazonensis*. Promastigotas de *L. amazonensis* tratados com 200 μM e 400 μM de suramina foram incubados a 26°C em meio Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino por 24 h. Após esse período seus lipídeos neutros foram extraídos e submetidos a TLC. Controle (CN) Esteróis com esqueleto ergostano (ERGOST), colesterol (COL).

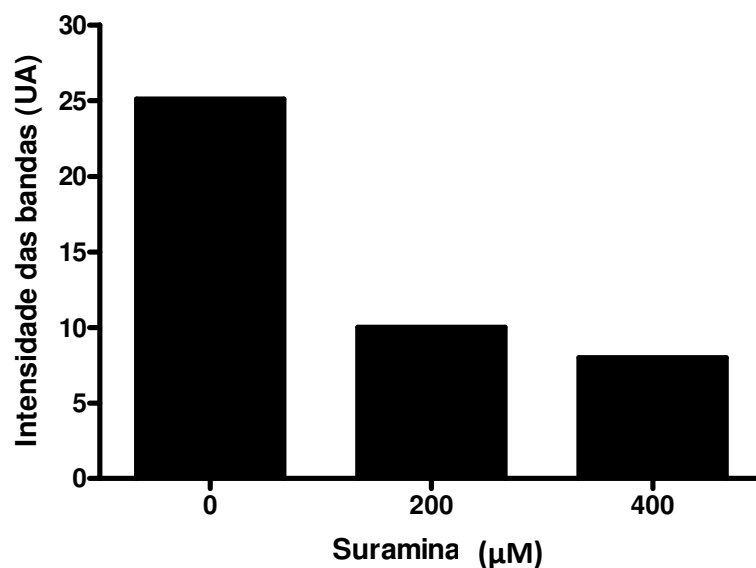


Figura 4.10: Efeito da suramina sobre o conteúdo de colesterol de *L. amazonensis*. Os lipídios extraídos de promastigotas de *L. amazonensis* após o tratamento com 200 μM e 400 μM de suramina por 24 horas foram separados por TLC, conforme mostrado na Fig. 4.11 e analisados por densitometria, sendo sua quantidade relativa expressa em unidades arbitrárias (UA). A imagem da TLC foi digitalizada e analisada pelo programa “ImageMaster TotalLab v1.11”.

4.5- EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE FÁRMACOS INIBIDORES DA UTILIZAÇÃO DE COLESTEROL COM INIBIDORES DA BIOSÍNTESE DE ERGOSTEROL

Com o intuito de avaliar se a incorporação de colesterol exógeno pela leishmania poderia representar um mecanismo de compensação contra a inibição farmacológica da biossíntese de ergosterol, experimentos de associação de fármacos foram realizados. A associação da suramina (inibidor do receptor de LDL) e sinvastatina (inibidor da biossíntese do ergosterol) foi testada em promastigotas de *L. amazonensis*. Conforme ilustrado na Figura 4.11A, essa associação foi eficaz, inibindo cerca de 80% da taxa de proliferação na concentração de 25 μM de sinvastatina associada a 100 μM de suramina, valores menores do que os IC₅₀ individuais que são 40 μM e 200 μM , respectivamente. Para avaliar graficamente a interação, os dados foram representados na forma de isoblograma (Fig. 4.11B) e para estimar se a interação dos efeitos sobre a leishmania seria sinergismo, antagonismo ou neutra (sem interação), foi calculado o Índice da Concentração Inibitória Fracional (FICI).

Conforme as diretrizes sugeridas por (Odds e cols, 2003) o FICI calculado para essa associação (0,56), indica não haver sinergismo. Porém, como o valor ficou muito próximo do limiar (0,5), a possibilidade de haver sinergismo em determinadas condições não deve ser descartada.

Foram realizados, também, experimentos de associação da cloroquina (inibidor da degradação lisossomal, por alcalinização) com a sinvastatina (Fig. 4.12A). O FICI calculado para essa interação foi de 1,13, que de acordo com as diretrizes adotadas, significa interação neutra (neutra). Mas vale ressaltar que com concentrações inferiores ao IC₅₀ dos fármacos individualmente, como 25 μM de sinvastatina (IC₅₀ = 40 μM) associada a 2,5 μM de cloroquina (IC₅₀ = 3,3 μM), foi obtida cerca de 90% de inibição. O isoblograma desta associação está representado na Figura 4.12B.

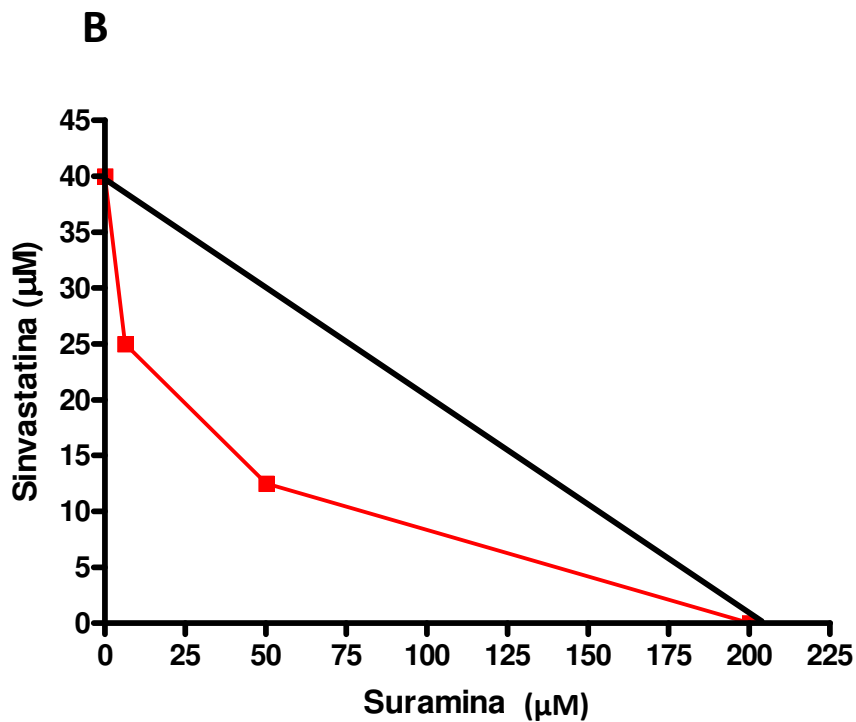
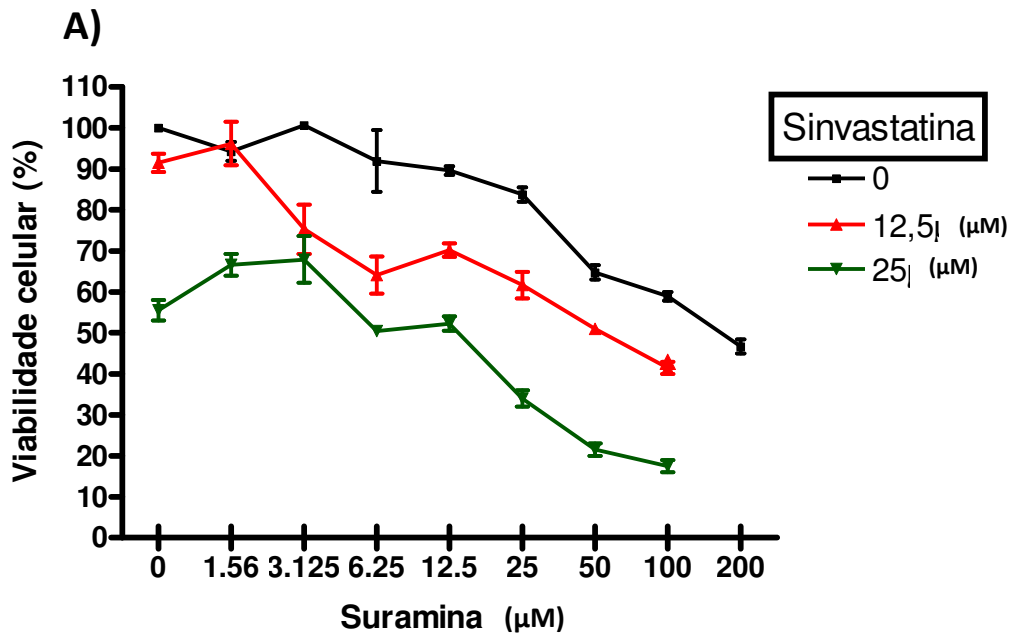


Figura 4.11: Atividade da associação simvastatina/suramina sobre *L. amazonensis*. A) Promastigotas de *L. amazonensis* foram incubados a 26°C em meio Schneider com 10 % de soro, na presença de concentrações de 0 a 200 μM da suramina individualmente ou em associação com simvastatina (0 a 25 μM), por 72 horas. B) Isoblograma da associação da suramina com a simvastatina. Os pontos plotados representam os valores de IC50 para os fármacos, nas concentrações indicadas. A reta representa a linha teórica do efeito neutro (sem interação). Os experimentos foram feitos em triplicata (média \pm SD), os gráficos e os valores de IC50 foram obtidos no programa Graphpad Prism 4.

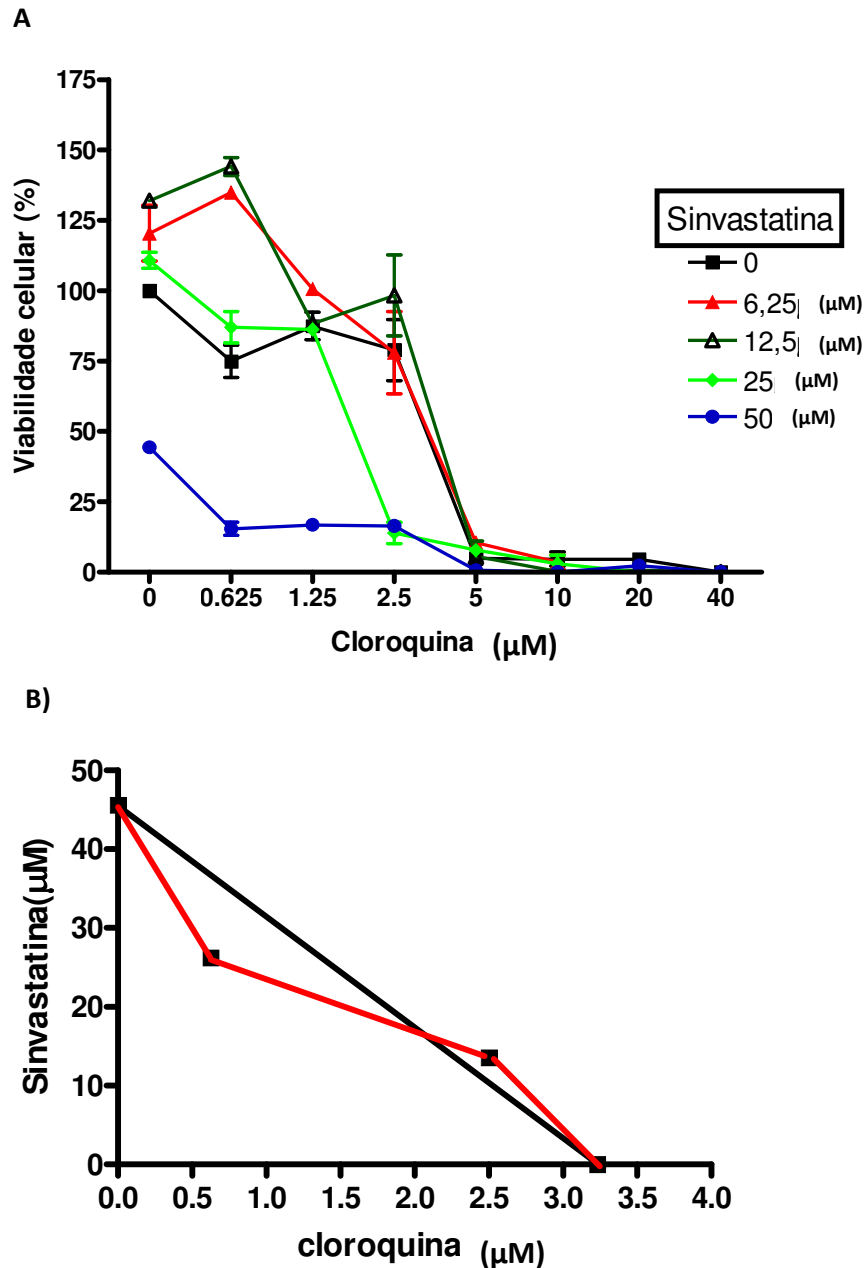


Figura 4.12: Atividade da associação simvastatina/cloroquina sobre *L. amazonensis*. A) Promastigotas de *L. amazonensis* foram incubados a 26°C em meio Schneider com 10 % de soro, na presença de concentrações de 0 a 40μM da cloroquina individualmente ou em associação com simvastatina (0 a 100μM), por 72 horas. B) Isoblograma da associação da suramina com a simvastatina. Os pontos plotados representam os valores de IC50 para os fármacos, nas concentrações indicadas. A reta representa a linha teórica do efeito neutro (sem interação). Os experimentos foram feitos em triplicata (média±SD), os gráficos e os valores de IC50 foram obtidos no programa Graphpad Prism 4.

4.6- EFEITO DA PRIVAÇÃO DE COLESTEROL EM *L. AMAZONENSIS*.

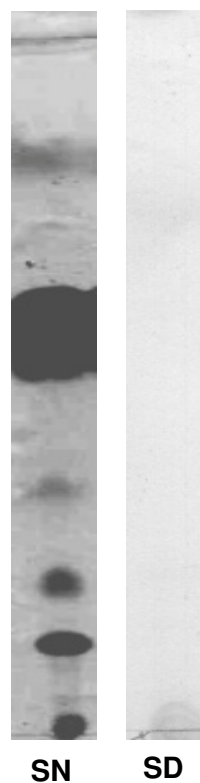
Com o objetivo de avaliar a importância do colesterol para leishmania, a taxa de proliferação celular e o conteúdo de colesterol de promastigotas de *L. amazonensis* na ausência de colesterol foram analisados. Na Figura 4.13 são mostrados dois testes utilizados como controle na depleção do colesterol total do soro. O soro normal (SN) e o soro deslipidado (SD) foram submetidos a cromatografia em camada fina (TLC), para separação dos lipídeos neutros (Fig.4.13A). Como é possível observar, o soro deslipidado não apresentou nenhuma banda, demonstrando a sua completa deslipidação. A Figura 4.13B mostra a dosagem do colesterol dos soros normal e deslipidado, por colorimetria, confirmando a completa ausência do colesterol no soro deslipidado.

A taxa de proliferação celular foi avaliada nos dois meios de cultura, Schneider e M199, suplementados com soro normal ou soro deslipidado. A Figura 4.14A, mostra promastigotas de *L. amazonensis* cultivados no meio schneider com soro normal (Leish SN), soro deslipidado (Leish SD) e sem soro (Leish SS). Promastigotas cultivados no soro deslipidado tiveram aumento de aproximadamente 30% no crescimento, comparado com a leishmania cultivada no soro normal, enquanto a leishmania cultivada sem soro, teve diminuição de 75% no crescimento. Esse aumento no crescimento observado no meio schneider suplementado com soro deslipidado também foi visto com o meio M199 (Fig 4.14B). Promastigotas suplementadas com soro deslipidado tiveram aumento de 40% no seu crescimento.

Adicionalmente, foi realizada a dosagem do colesterol e a análise dos lipídeos neutros de promastigotas cultivados no soro normal e deslipidado por até três passagens. Na Figura 4.15, é possível observar a dosagem do colesterol de *L. amazonensis* cultivada com os soros por uma e três passagens. Em ambos os casos é possível notar diminuição do conteúdo de colesterol da leishmania. Na primeira passagem com o soro deslipidado (Fig. 4.15A) nota-se uma redução de 19% da quantidade de colesterol e na terceira passagem, de 28%.

Uma vez que a dosagem colorimétrica do colesterol pode ter reação cruzada com outros esteróis de leishmania, como o ergosterol, foi feita a análise dos lipídeos neutros por TLC. Nas Figuras 4.16 e 4.17 observa-se a diminuição do colesterol da leishmania na primeira (18%), segunda (42%) e terceira (47%) passagens no soro deslipidado, em relação ao soro normal. Pode-se observar também que os esteróis endógenos não são alterados significativamente com os dois soros

A)



B)

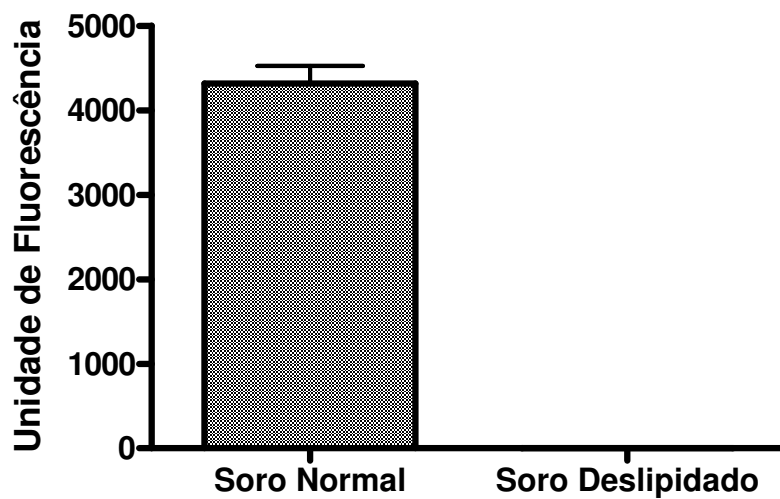
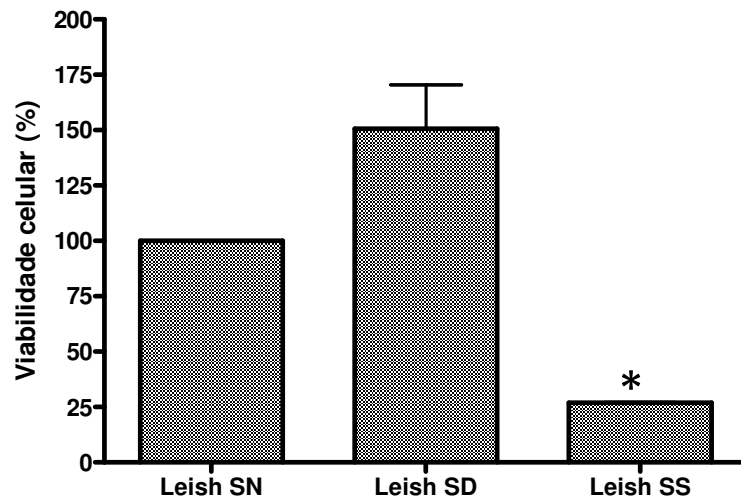


Figura 4.13: Conteúdo de colesterol do soro normal e soro deslipidado. Soro normal e deslipidado foram analisados por TLC e dosagem de colesterol. **A)** Os lipídeos do soro normal e deslipidado foram extraídos com clorofórmio:metanol (1:2) e submetidos a TLC . **B)** O conteúdo de colesterol do soro normal e deslipidado foi dosado por fluorescência.

A)



B)

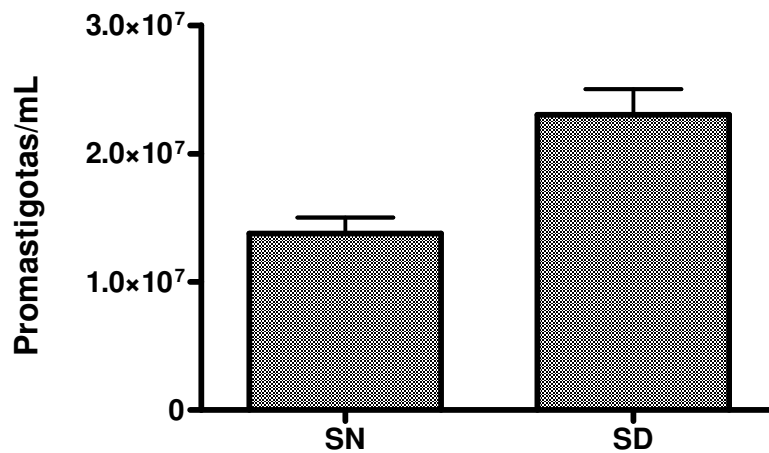


Figura 4.14: Efeito da privação de colesterol no crescimento de *L. amazonensis*. Promastigotas de *L. amazonensis* foram incubados a 26°C por 72 horas em meio Schneider (A) e M199 (B) suplementados com soro normal (Leish SN), soro deslipidado (Leish SD) ou sem soro (Leish SS). O crescimento parasitário foi avaliado por ensaio colorimétrico com sal de tetrazólio (MTT) (A) e por contagem em microscópio óptico (B). Os experimentos foram feitos em triplicata (média±SD), os gráficos foram obtidos no programa Graphpad Prism 4. Teste estatístico (ANOVA). * p<0,05

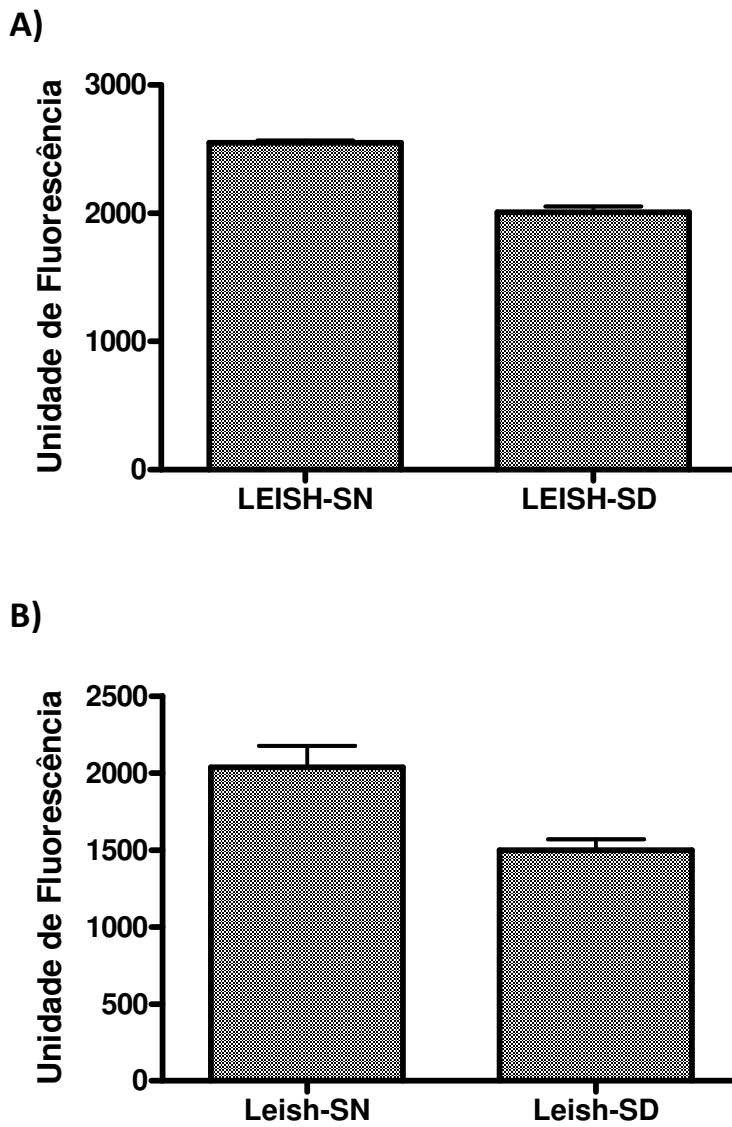


Figura 4.15: Quantificação do colesterol em *L. amazonensis* cultivada com soro deslipidado. Promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivados a 26°C por 72 horas em meio Schneider suplementado com 10% de soro normal (Leish- SN) ou soro deslipidado (Leish-SD), por 1 (A) e 3 (B) passagens. O colesterol dos promastigotas foi quantificado por fluorescência. Os experimentos foram feitos em triplicata (média±SD), os gráficos foram obtidos no programa Graphpad Prism 4.

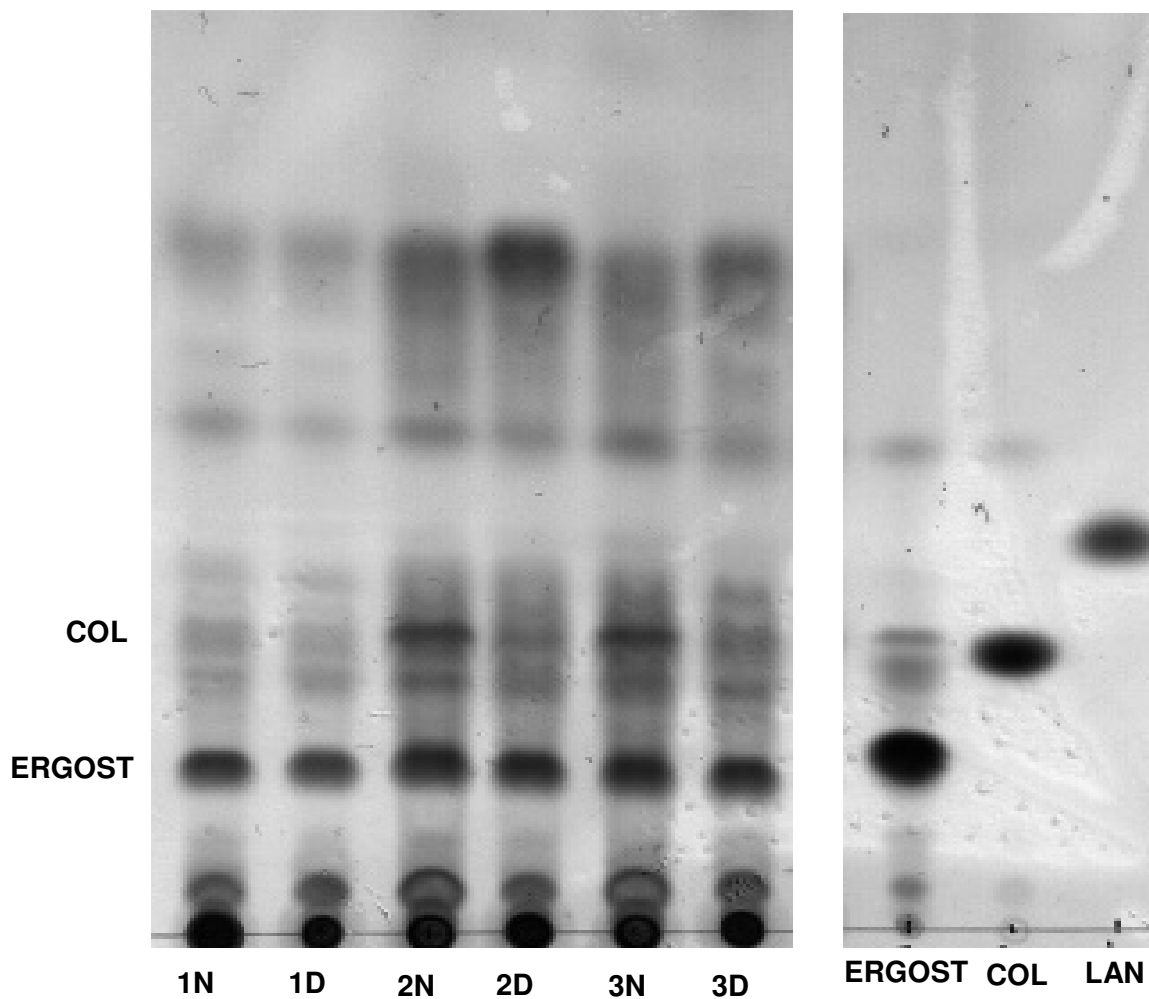
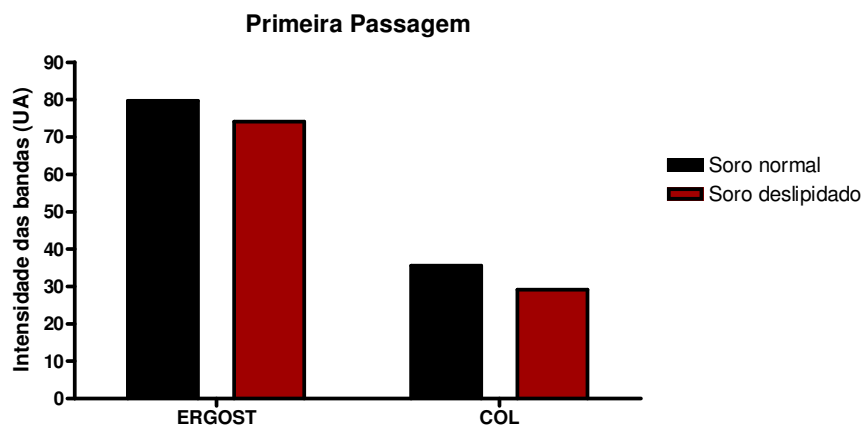
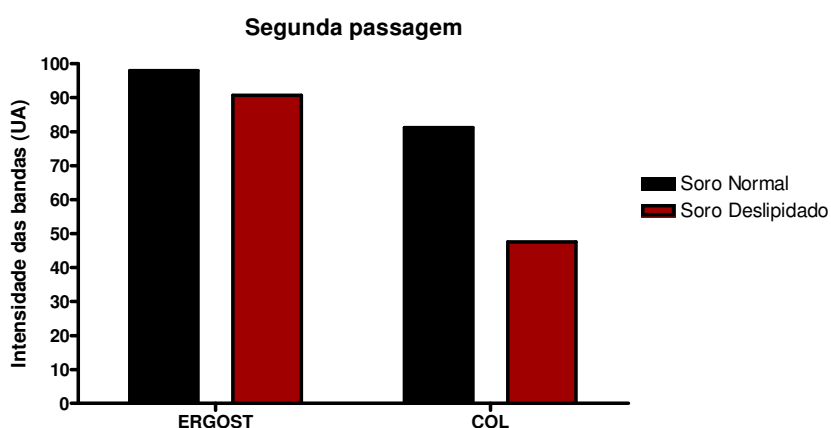


Figura 4.16: Perfil cromatográfico dos lipídeos neutros de promastigotas de *L. amazonensis* cultivados na presença ou ausência de colesterol. Promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivados a 26°C em meio Schneider por 72 horas, suplementados com 10% de soro normal ou soro deslipidado, por 1, 2 e 3 passagens. Os lipídeos neutros dos promastigotas foram extraídos e submetidos a TLC. Esteróis com esqueleto ergostano (ERGOST), colesterol (COL), lanosterol (LAN), *Leishmania* cultivada com soro normal (1N, 2N e 3N), *Leishmania* cultivada com soro deslipidado (1D, 2D, 3D). Quantidade de células: Primeira passagem ($1,0 \times 10^7$), segunda passagem ($1,0 \times 10^8$) e na terceira passagem ($1,0 \times 10^8$).

A)



B)



C)

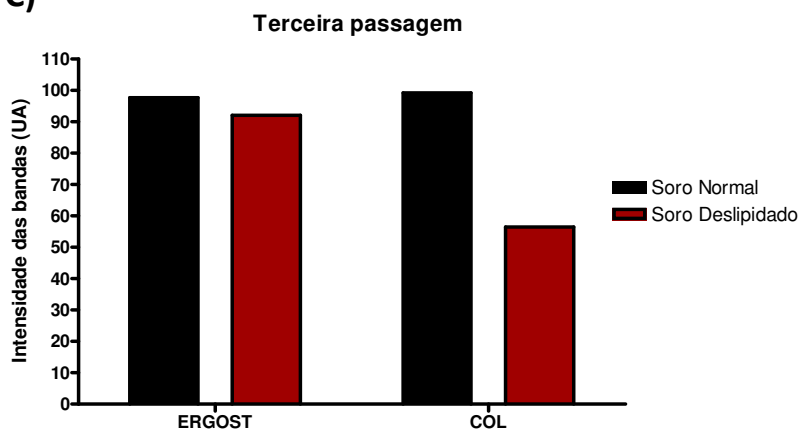
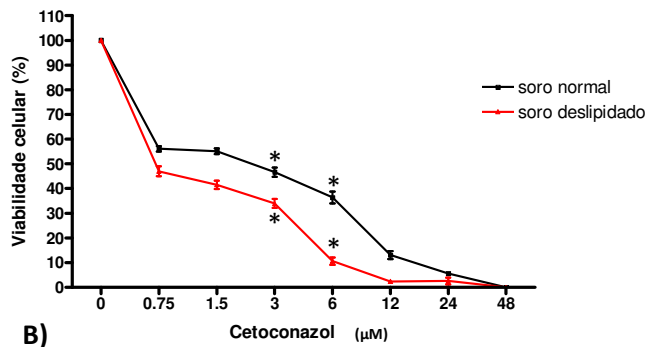


Figura 4.17: Análise por densitometria do perfil esteroídico de *L. amazonensis* cultivados na presença ou ausência de colesterol. Os lipídios extraídos de promastigotas de *L. amazonensis* cultivados no soro normal e deslipidado, conforme mostrado na Fig 4.18 foram separados por TLC e analisados por densitometria, sendo sua quantidade relativa expressa em unidades arbitrárias. A imagem da TLC foi digitalizada e analisada pelo programa “ImageMaster TotalLab v1.11”. Esteróis com esqueleto ergostano (ERGOST), colesterol (COL), Unidades Arbitrárias (UA).

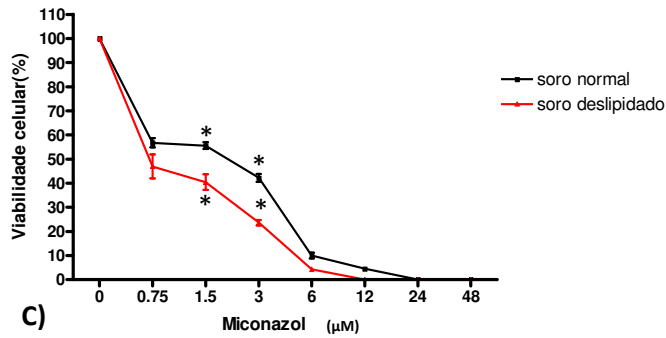
4.7- ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS INIBIDORES DO ERGOSTEROL NA AUSÊNCIA DE COLESTEROL

Para avaliar se o colesterol interfere na atividade leishmanicida dos inibidores do ergosterol, promastigotas de *L. amazonensis* foram incubados com cetoconazol, miconazol, terbinafina ou sinvastatina em meio Scheneider suplementado com soro normal ou deslipidado. Na Figura 4.18A pode-se observar que o IC₅₀ do cetoconazol na presença de soro deslipidado foi menor, cerca de 2 µM, enquanto que no soro normal foi de 3 µM. É possível observar também que nas concentrações de 6 µM e 12 µM o cetoconazol mostrou maior atividade no soro deslipidado, com inibição de 82% e 95%, respectivamente, contra inibição de 60% e 80% da leishmania cultivada no soro normal. A leishmania cultivada no soro deslipidado tratada com miconazol apresentou um IC₅₀ de 1 µM, contra 2 µM no soro normal. Na concentração de 3 µM observamos inibição de 55% e 75%, no soro normal e deslipidado, respectivamente (Fig 4.18B). As maiores diferenças entre os soros normal e deslipidado foram observados com terbinafina e sinvastatina. O valor de IC₅₀ da terbinafina no soro deslipidado foi de 4 µM, enquanto que no soro normal foi de 8 µM. Também foi demonstrado haver inibição de 30% e 75%, no soro normal e deslipidado, na concentração de 6 µM (Fig 4.18C). Promastigotas cultivados no soro deslipidado e tratados com sinvastatina apresentaram IC₅₀ 2 vezes menor quando comparado ao soro normal, 10 µM e 20 µM respectivamente. Na concentração de 12,5 µM, os parasitos cultivados no soro normal apresentaram uma inibição de 45%, enquanto quando cultivados no soro deslipidado apresentaram 80% de inibição (Fig.4.18D). Na Tabela 2 são mostrados os valores de IC₅₀ dos inibidores da biossíntese do ergosterol no soro normal e deslipidado, mostrando que a ausência do colesterol aumenta a atividade de todos esses inibidores (Fig 4.18).

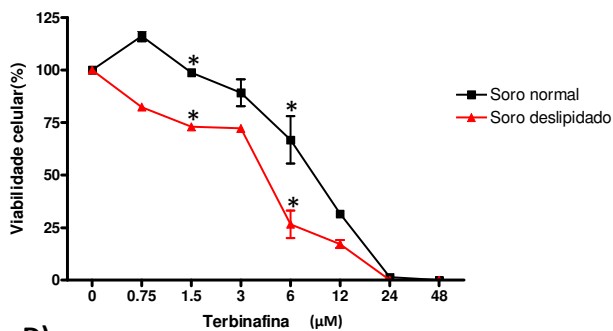
A)



B)



C)



D)

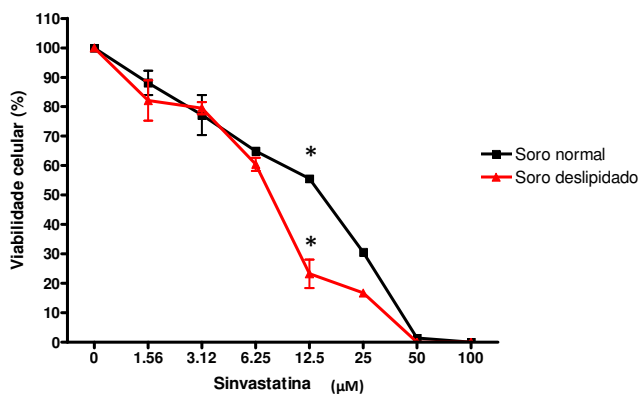


Figura 4.18: Atividade leishmanicida dos inibidores da biossíntese do ergosterol com e sem privação de colesterol exógeno. Promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^6 células/ml) foram incubados na ausência ou presença de várias concentrações de cetoconazol (A), miconazol (B), terbinafina (C) ou sinvastatina (D) a 26°C por 72 horas em meio Schneider com 10% de SFB normal ou deslipidado. O crescimento parasitário foi avaliado por ensaio colorimétrico com sal de tetrazólio (MTT). Os experimentos foram feitos em triplicata (média \pm SD), os gráficos e os valores de IC50 foram obtidos no programa Graphpad Prism 4. Teste *t* student * $p < 0,05$.

Tabela 4.2: Atividade dos inibidores da biossíntese do ergosterol sobre *L. amazonensis* em soro normal ou deslipidado.

	IC50 μ M	
	Soro Normal (SN)	Soro Deslipidado (SD)
Cetoconazol	3	2
Miconazol	2	1
Terbinafina	8	4
Sinvastatina	20	10

Promastigotas de *L. amazonensis* foram tratados conforme descrito na Fig 4.19.

4.8- ANÁLISE DA RESISTÊNCIA AO CETOCONAZOL INDUZIDA *IN VITRO* EM *L. AMAZONENSIS*

Adicionalmente aos estudos da influência do colesterol exógeno sobre a atividade dos inibidores do ergosterol em *L. amazonensis*, estudos sobre a resistência a essa classe de fármacos também foram conduzidos.

Desta forma, promastigotas de *L. amazonensis* foram submetidos a uma seleção gradual de aumento da pressão com cetoconazol. A Figura 4.19 mostra a comparação da atividade do cetoconazol sobre parasitos selvagens e resistentes (La10). O IC50 dos parasitos selvagens e La10 foi calculado como 2 μ M e 10 μ M, respectivamente. Além disso, foi observado que, mesmo com altas concentrações de cetoconazol (24 μ M), que completamente inibe a viabilidade dos parasitos selvagens, mais de 20% dos La10 permanecem viáveis.

Para avaliar a correlação da resistência ao cetoconazol com o aumento da expressão da C-14 desmetilase, uma análise comparativa da expressão gênica foi feita pela extração do RNA total dos promastigotas selvagens e resistentes ambos por RT-PCR qualitativo e por PCR em tempo real quantitativo. Para essa análise foi gerada uma linhagem de *L. amazonensis* com resistência intermediária ao cetoconazol (La8), com IC50 de 8 μ M (dados não mostrados). Foi observado um aumento da expressão de RNAm da C-14 desmetilase nos parasitos La8 e La10 em relação aos parasitos selvagens (Fig. 4.20A), proporcional ao nível de resistência dos parasitos. A quantificação relativa do gene da C-14 desmetilase de La8 e La10 mostra expressão de 6 e 12 vezes maior, respectivamente, do que nos parasitos selvagens (Fig. 4.20B). Esses resultados mostram que o aumento da resistência é diretamente proporcional ao aumento da expressão gênica da C-14 desmetilase.

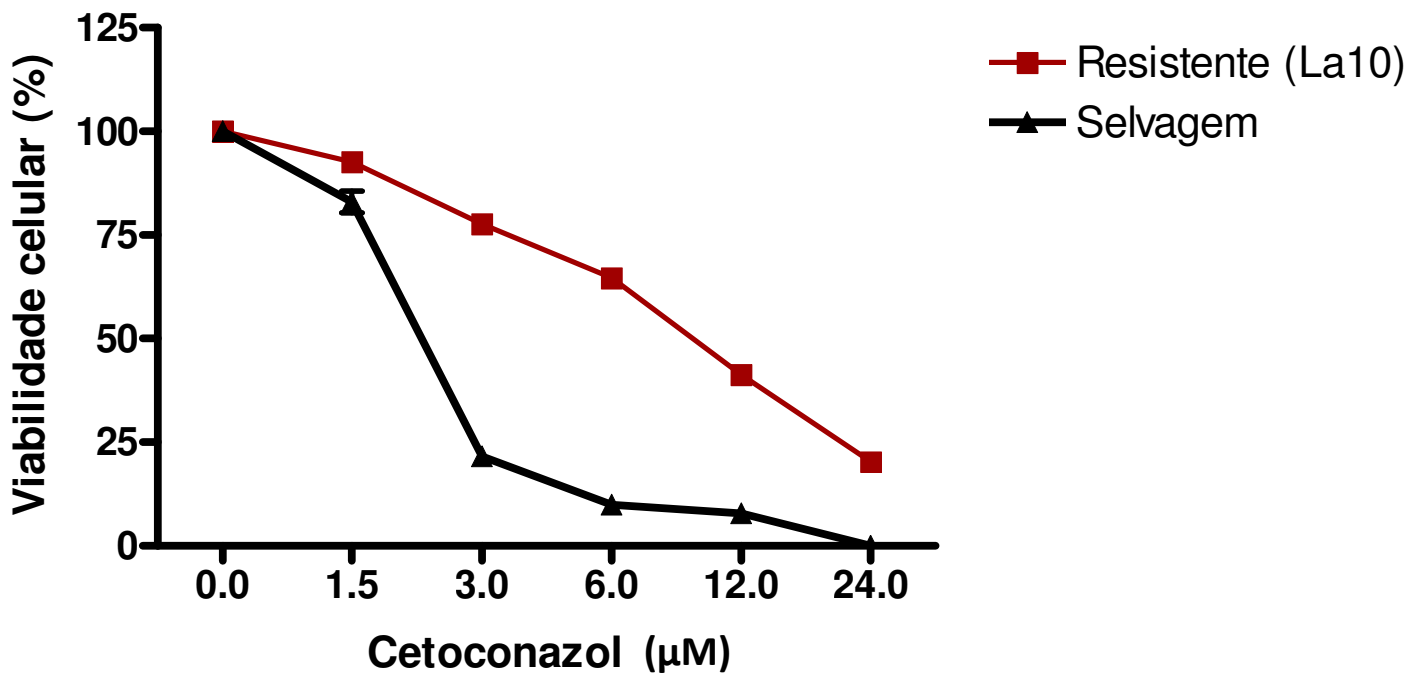


Figura 4.19: Atividade do cetoconazol sobre *L. amazonensis* selvagem e resistente. Promastigotas de *L. amazonensis* selvagens e resistentes (La10) ao cetoconazol foram expostas a concentrações crescentes de cetoconazol, em meio Schneider suplementado com 10% de SFB por 72h. O crescimento parasitário foi avaliado por ensaio colorimétrico com sal de tetrazólio (MTT). Os experimentos foram feitos em triplicata (média±SD), os gráficos e os valores de IC50 foram obtidos no programa Graphpad prism 4.

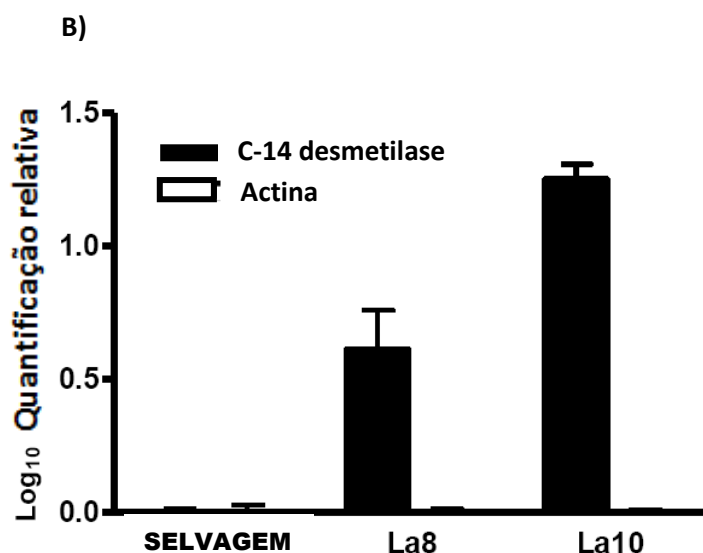
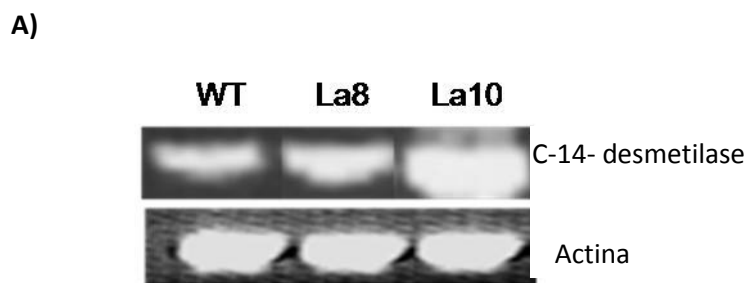


Figura 4.20: PCR semi-quantitativo e quantitativo do mRNA da C-14 desmetilase de *L. amazonensis* selvagens e resistentes ao cetoconazol. Promastigotas selvagens e resistentes a 8 e 10 μ M de cetoconazol (La8 e La10), foram incubados em meio Schneider com 10% de SFB por 72 h a 26°C, lavados e seu mRNA extraído. As linhagens resistentes foram mantidas na presença das concentrações de 8 e 10 μ M, para manter a pressão farmacológica. A) Gel de Agarose do produto da amplificação do cDNA utilizando os primers para os genes C-14 desmetilase (senso: ggccagcacacctccactat e anti-senso: cttgttgcgaggatccatca) e actina (senso: acgctcctcgccacggtt e anti-senso tcatggcctgcatgttcttc) e visualizando com brometo de etídeo. B) Quantificação relativa do mRNA da C-14 desmetilase e actina empregando o sistema Sybr Green e PCR em tempo real. A actina foi utilizada como normalizador.

5 - DISCUSSÃO

A atividade dos inibidores da biossíntese do ergosterol em *Leishmania* spp. tem sido amplamente estudada por diversos autores (Vannier-santos e cols, 1995); (Hart e cols, 1989); (Berman e cols, 1984); (Beach e cols, 1988); (Roberts e cols, 2003) mostrando-se como um excelente alvo para a terapia antileishmania. Os inibidores utilizados, em combinação ou sozinhos, em alguns trabalhos são os azóis, inibidores da C-14 desmetilase (cetoconazol, miconazol e itraconazol), da HMG Co-A redutase (lovastatina), da esqualeno epoxidase (terbinafina), da esqualeno sintase (bifenilquinuclidinas) e da 24-metiltransferase (azasterol) (Haughan e cols, 1995). A inibição do crescimento associada com o bloqueio da biossíntese do ergosterol têm sido mostrada em várias espécies de *Leishmania* e *T. cruzi*. (Beach e cols, 1988; Beach e cols, 1986; Berman e cols, 1984; Lorente e cols, 2005) A extensão desses fenômenos depende de alguns fatores importantes, como espécie do parasito examinada, classe dos inibidores avaliados, a dose, duração do tratamento e condições de cultura (composição do meio, pH, temperatura, tensão de oxigênio (Roberts e cols, 2003).

A inibição da biossíntese do ergosterol pelos azóis causa diminuição dos principais esteróis endógenos, como 5-desidroepisterol, ergosterol e episterol e o acúmulo de 14 α -metil esteróis. A terbinafina, uma alilamina, é um potente inibidor da esqualeno epoxidase, levando ao acúmulo de esqualeno e à diminuição de esteróis endógenos importantes para manter as estruturas de membrana. O tratamento com azóis tem mostrado, dentre os inibidores, um maior efeito inibitório sobre a biossíntese do ergosterol e o crescimento de *Leishmania* e *T. cruzi* (Roberts e cols, 2003; Beach e cols, 1988).

Ao fazer uma análise dos dados na literatura sobre a inibição de várias etapas da biossíntese de ergosterol, é possível observar que praticamente em todos os casos ocorre acúmulo de colesterol pela leishmania. Surpreendentemente, esse dado raramente é considerado e discutido pelos autores (Lorente e cols, 2005; Urbina e cols, 2002; Haughan e cols, 1995). Esse fenômeno é mais observado principalmente com a utilização dos azóis, mas pode ser visto com outros inibidores. Como exemplo podemos citar os inibidores da esqualeno sintase e os inibidores da 24-metiltransferase, que diminuem a quantidade dos esteróis endógenos e aumentam o acúmulo de colesterol (Lorente e cols, 2005; Urbina e cols, 2002; Haughan e cols, 1995). O mecanismo como isso ocorre e a importância desse

colesterol na membrana da leishmania ainda não estão claros. No presente estudo para estudar a utilização do colesterol como possível alvo farmacológico, foram utilizados alguns fármacos que inibem a via do ergosterol, como o cetoconazol, e miconazol, terbinafina e a sinvastatina.

A atividade de alguns inibidores sobre promastigotas de *L. amazonensis* foi avaliada em diferentes condições de cultura, com meio Schneider ou M199. O meio Schneider é complexo, enquanto o M199 é definido e, conseqüentemente, mais pobre em nutrientes.

A principal diferença na composição do Schneider em relação ao M199 é a utilização de extrato de levedura no seu preparo, que pode ser uma interessante fonte de lipídeos. Essa diferença poderia interferir diretamente com a inibição metabólica induzida pelos fármacos. De fato, como mostrado na Tabela 1, o cetoconazol e a terbinafina foram mais potentes no M199, sugerindo que a leishmania poderia estar utilizando esteróis provenientes do extrato de levedura presentes no meio Schneider para compensar parcialmente o efeito dos fármacos. Interessantemente, apesar do miconazol inibir o mesmo ponto da biossíntese do ergosterol que o cetoconazol não houve aumento na potência desse fármaco no meio M199. Isso pode ter acontecido por alguma reação do miconazol com algum componente do meio de cultura.

Para a análise da inibição dos esteróis totais de leishmania, foram escolhidos dois fármacos que atuam em enzimas bem distintas, o cetoconazol, que inibe a C-14 desmetilase, na região mediana da via, e a sinvastatina, que inibe a HMG-CoA redutase, no início da via. É interessante notar que, embora o cetoconazol iniba a via após a ciclização do esqualeno e a formação do núcleo esteroidal, especificamente na C-14 desmetilase, o que conseqüentemente leva a inibição dos produtos finais 5-desidroepisterol, episterol e ergosterol com acúmulo de esteróis intermediários metilados na posição 14, a dosagem global de esteróis totais, incluindo colesterol, foi reduzida em aproximadamente 50% (Fig.4.2). Esse resultado sugere que a inibição pelo cetoconazol pode estar afetando globalmente a síntese dos esteróis, talvez por inibição indireta de outras enzimas iniciais da via pelos intermediários acumulados. Por outro lado, uma redução menor, de aproximadamente 40% foi obtida com a sinvastatina, que inibe a via antes da formação de núcleo esteroidal (Fig. 4.2). Esse fato pode ter sido devido a concentração sub-ótima de 50 μ M utilizada ou ainda devido a uma incorporação maior de colesterol exógeno como mecanismo de compensação.

Para analisar melhor as alterações provocadas pelos inibidores do ergosterol, especificamente o acúmulo de colesterol exógeno, foi empregada a técnica de cromatografia em camada fina (CCD/TLC) impregnada pela prata. A impregnação com nitrato de prata tem como objetivo resolver misturas de substâncias com ligações duplas. Desta forma pode-se separar o colesterol do ergosterol, que possuem estruturas muito semelhantes, e avaliar com relativa precisão a inibição do ergosterol e o acúmulo do colesterol nos parasitos tratados.

O primeiro esterol da biossíntese do ergosterol que acumula em promastigotas de *Leishmania* spp. tratadas com os azóis é o 4 α ,14 α - dimetilzimosterol, mas durante um longo tempo de exposição pode ocorrer metabolização desse intermediário, formando uma alquilação no carbono 24, levando a formação do obtusifoliol. A 4 α -desmetilação do obtusifoliol, formando 14 α -metilfecosterol (Beach e cols, 1988). O obtusifoliol frequentemente acumula significativamente em promastigotas de *Leishmania* spp tratadas com azóis. A substituição de esteróis endógenos, esteróis 14 α - desmetilados, por esteróis 14 α -metilados, ocorre entre 48 e 72 horas de exposição aos azóis (Beach e cols, 1988; Roberts e cols, 2003). Acompanhando essa substituição de esteróis em promastigotas tratados com os azóis é observado também um aumento de colesterol, proveniente do soro fetal bovino, uma vez que a leishmania não sintetiza o colesterol e aparentemente, não o sintetiza por transformação de outros esteróis. Também é observado na literatura que a perda de esteróis 14 α -desmetilados e o acúmulo de esteróis 14 α -metilados e colesterol levando a uma diminuição do crescimento da leishmania estão associados com o tratamento com os azóis ocorre por um processo dose dependente (Beach e cols, 1988; Berman e cols, 1986).

Para confirmar o aumento de colesterol em promastigotas no tratamento com inibidores da biossíntese do ergosterol, foram escolhidos os azóis, miconazol e cetoconazol, que apresentaram maior atividade leishmanicida no meio Schneider e M199. Foram realizados dois tratamentos sucessivos utilizando a mesma leishmania, com o objetivo de avaliar uma maior utilização do colesterol no segundo tratamento e se a leishmania poderia sobreviver frente a uma nova exposição aos inibidores.

O perfil de esteróis de leishmania no primeiro tratamento com 4 μ M e 6 μ M de cetoconazol e miconazol, pode ser vista na (Fig.4.3) e a sua análise por densitometria (Fig.4.4). Podemos observar uma completa inibição da biossíntese dos esteróis 14 α -metilados e um aumento bastante expressivo de colesterol e de outras bandas não

identificadas. A banda ND2 que não está presente no controle pode ser visualizada nas células tratadas. Esse acúmulo da banda ND2 pode ser referente a algum esteroide 14- α metilado, provavelmente obtusifoliol, que é frequentemente acumulado em promastigotas tratados pelos azóis. Então, promastigotas tratados com 4 μ M e 6 μ M de cetoconazol e miconazol estariam acumulando esse esteroide em suas membranas com o decorrer do tratamento, pois também podemos observar essa banda no segundo tratamento com a mesma leishmania utilizada no primeiro tratamento (Fig. 4.5 e Fig. 4.6). Podemos observar também um grande aumento de colesterol, mostrando que a leishmania pode estar tentando compensar a ausência do ergosterol pelo aumento do colesterol proveniente do soro fetal bovino.

Esse processo de aquisição de colesterol parece ser de forma organizada, como uma ação regulatória, uma vez que quando não ocorre a inibição completa do ergosterol, como no caso de promastigotas tratadas com miconazol nos dois tratamentos sucessivos, observamos uma menor quantidade de colesterol. Já no caso de inibição completa do ergosterol com a utilização de cetoconazol, ocorre um acúmulo maior de colesterol, uma vez que a leishmania necessitaria de uma maior quantidade desse esteroide para a manutenção de sua membrana (Figuras. 4.4 e 4.6).

As concentrações utilizadas de 4 μ M e 6 μ M de cetoconazol não foram capazes de inibir o crescimento de todos os parasitos nas condições testadas mesmo com 2 tratamentos sucessivos e bloqueando completamente a síntese de esteróides 14 α desmetilados sugerindo que os esteróides 14 α metilados, juntamente com o colesterol poderiam estar substituindo os esteróides endógenos na manutenção de membrana de uma parcela da população. Trabalhos iniciais na década de 1980 já tinham demonstrado que a substituição de 99% dos esteróides 14 α -desmetilados endógenos pelo colesterol e 14 α -metilados, incluindo o obtusifoliol, podem sustentar o crescimento e reprodução da leishmania (Beach e cols, 1988; Goad e cols, 1985). Os esteróides com o grupo 14 α -metila não são capazes de regular o movimento ordenado das cadeias de ácidos graxos dos fosfolípidos na bicamada lipídica (Bloch e cols, 1983; Yeagle e cols, 1985). No entanto, quantidades apropriadas de colesterol parecem compensar em parte essa deficiência (Beach e cols, 1988). Esse aumento do colesterol pode ser um dos mecanismos de escape da leishmania para tentar manter suas funções frente aos inibidores do ergosterol.

A banda ND1 pode estar relacionada a algum esteroide 14 α -metilado, como o 4 α ,14 α -dimetilzosterol, que já foi relatado estar presente em pequenas quantidades nas células do controle (Beach e cols, 1988) e, com o tratamento, foi observado um ligeiro aumento nas maiores concentrações de cetoconazol e miconazol (Figuras 4.3 e 4.5). Esse aumento pode ser observado nos dois tratamentos sucessivos. Um dado interessante pode ser visto com o aparecimento de uma quinta banda (ND5) apenas após o segundo tratamento, podendo ser acúmulo de algum outro esteroide 14 α -metilado ou um produto de metabolização dos esteróides acumulados inicialmente. Outra possibilidade é que esteja havendo acúmulo de intermediários iniciais por retroalimentação negativa, devido a concentração anormalmente elevada dos substratos da C-14 desmetilase.

Após confirmar o aumento de colesterol devido a inibição da via, o próximo passo foi identificar como esse colesterol estaria sendo incorporado em promastigotas de *L. amazonensis*. Outros tripanosomatídeos adquirem esse colesterol através de partículas de LDL, muito ricas em colesterol e ésteres de colesterol, através de endocitose mediada por receptor. Formas sanguíneas de *T. brucei* não sintetizam esteróides e dependem exclusivamente do colesterol exógeno para sua sobrevivência. O receptor de LDL de *T. brucei* é essencial para o ótimo crescimento de suas formas sanguíneas (Coppens e cols, 2000; Coppens e cols, 1995). O receptor de LDL é marcadamente conservado em toda ordem Kinetoplastidae, que foi descrito como uma glicoproteína que atua na endocitose de partículas de LDL (Bastin e cols, 1996). Então para avaliar se o colesterol observado nas células tratadas com os azóis é proveniente de endocitose de partículas de LDL, promastigotas de *L. amazonensis* foram incubadas com LDL marcada com FITC e com I¹²⁵ e tratadas com cetoconazol e sinvastatina.

O efeito na endocitose da LDL-I¹²⁵, no qual tanto a leishmania tratada com cetoconazol, quanto a tratada com sinvastatina, que inibe o início da via de biossíntese de ergosterol, aumentaram a captação da LDL (Fig. 4.7). Interessantemente, o pico de captação foi observado com 20 μ M, caindo com 40 μ M. Isso pode ter acontecido pela saturação ou internalização do receptor de LDL, não permitindo a entrada da LDL-I¹²⁵.

De uma maneira geral, esses resultados indicam que o tratamento com os inibidores da biossíntese do ergosterol aumentam significativamente a endocitose de LDL e, posteriormente, o conteúdo de colesterol de leishmania, sugerindo então, que o colesterol pode ter um papel importante no mecanismo de escape da leishmania frente à inibição dos seus esteróides endógenos. Para tentar reverter esse fenômeno, foi utilizada suramina, que

hipoteticamente inibiria a interação da LDL com seu receptor, e a cloroquina, que inibe a acidificação das estruturas endocíticas, prejudicando a degradação da LDL endocitada e conseqüente liberação do colesterol e sua utilização pelo parasito (Coppens e cols, 2000; Coppens e cols, 1995).

Esses fármacos foram então associados com sinvastatina, com o objetivo de avaliar o crescimento da leishmania inibindo ambos, colesterol e ergosterol (Figs. 4.11 e 4.12). Inicialmente demonstramos que, de fato, a suramina inibe a endocitose de LDL. A suramina, que é utilizada para inibir a entrada do colesterol via receptor de LDL em *T. brucei* foi capaz de diminuir a captação de LDL-¹²⁵ por *L. amazonensis* (Fig. 4.8) e, conseqüentemente o conteúdo de colesterol (Figuras. 4.9 e 4.10). A suramina foi capaz de inibir significativamente a entrada de LDL na concentração de 100µM, que é bem abaixo do seu IC50 (200 µM), indicando que o mecanismo de morte da leishmania pela suramina não é pela inibição de LDL. Após demonstramos que a suramina é capaz de inibir a utilização do colesterol pela leishmania, os testes de associação foram realizados.

Embora seja observado um aumento significativo da atividade de sinvastatina principalmente quando associada com a suramina, mas também com a cloroquina, de acordo com o calculo de FICI, não houve sinergismo em ambos os casos. Porém, como o valor do FICI na associação com suramina foi muito próximo ao limiar do sinergismo, não podemos descartar a hipótese de haver sinergismo ao se variar as condições limitantes do ensaio.

Outra estratégia utilizada para avaliar a importância do colesterol dentro do contexto do nosso estudo foi privar a *Leishmania* dos lipídeos do soro. Interessantemente, observamos um maior crescimento da leishmania cultivada no soro deslipidado (Fig. 4.15A e 4.15B), que pode ser ocasionado por alguma mudança na regulação do ciclo celular da leishmania nessa situação. Não pode ser descartada a possibilidade de o soro conter algum lipídeo bioativo que module negativamente o crescimento dos promastigotas, que foi perdido durante o processo de deslipidação.

Uma vez confirmado que a leishmania cultivada no soro deslipidado tem seu conteúdo de colesterol diminuído (Figuras 4.16, 4.17, 4.18), fomos avaliar a atividade dos inibidores da biossíntese do ergosterol na leishmania privada de colesterol exógeno. A atividade de todos os inibidores testados, cetoconazol, miconazol, terbinafina e sinvastatina foi maior no soro deslipidado, indicando que o colesterol pode interferir na susceptibilidade da leishmania aos inibidores da biossíntese do ergosterol. Pela análise dos resultados, vemos

também que a diferença de potência da terbinafina e da sinvastatina no soro deslipidado foi maior do que do cetoconazol e do miconazol. Isso pode ter acontecido por que esses fármacos inibem enzimas de etapas iniciais, impedindo a formação e acúmulo de intermediários C-14 α -metilada, que podem ser importantes para a manutenção da membrana da leishmania, tornando-a mais dependente do colesterol.

Com esses resultados demonstramos que o conteúdo de colesterol da leishmania pode interferir na atividade leishmanicida dos inibidores da biossíntese do ergosterol, sugerindo que o colesterol pode ser importante para a leishmania, como é observado em outros parasitos como *T. brucei* e *Toxoplasma gondii* (Sehgal e cols, 2005).

Adicionalmente, fomos investigar o mecanismo de resistência induzida in vitro, em *L. amazonensis* com o objetivo de avaliar a expressão da C-14 desmetilase.

A resistência clínica para os azóis tem sido observada em isolados de *Candida albicans*, aumentando o problema mundial de saúde pública, que é pior em pacientes infectados com HIV (Melo e cols, 2009; Manzano-Gayosso e cols, 2008; Rautemaa e cols, 2008). A resistência fúngica tem sido mostrada 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 e cols, 2009; Croft e cols, 2006). Mutações, rearranjos, ampliações de genes dos alvos de moléculas são um evento comum na resistência e, especificamente em *Leishmania* spp. amplificação gênica após seleção gradual para resistência é um fenômeno bem conhecido (Coderre e cols, 1983).

Estudos experimentais sobre superexpressão da C-14 desmetilase em *T. cruzi* tratado com inibidores da biossíntese têm sido publicado (Hankins e cols, 2005). Em adição, 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 e cols, 1998), caracterização de resistência a atovaquona em promastigotas de *L. infantum* (Cauchetier e cols, 2002), desenvolvimento e caracterização de promastigotas de *L. donovani* resistente a paromomicina (Maarouf e cols, 1998). Esses artigos discutem o mecanismo de resistência adquirido pelos parasitos. Dentre os mecanismos estudados, podemos citar a superexpressão de transportadores ABC e dos alvos das moléculas, alteração na composição lipídica, assim com o aumento no conteúdo de colesterol é observado em alguns casos de resistência. Surpreendentemente estudos sobre a resistência adquirida aos azóis em *Leishmania* spp. não têm sido publicados (Croft e cols, 2006).

Neste estudo, a resistência ao cetoconazol *in vitro* pode envolver mais de um mecanismo de ação. O aumento da expressão gênica da C-14 desmetilase observado no RT-PCR e no PCR quantitativo demonstra um dos prováveis mecanismos de resistência, promovendo o aumento da transcrição, o que pode levar a um aumento da tradução com conseqüente aumento da concentração da enzima, promovendo maior resistência ao cetoconazol. O conteúdo de colesterol e a análise de bombas de efluxo serão posteriormente avaliados, podendo indicar que a superexpressão da enzima C-14 desmetilase não seria o único mecanismo de resistência da leishmania.

6- CONCLUSÃO

Os tripanossomatídeos possuem um elaborado sistema de utilização de colesterol de fontes exógenas, que envolve endocitose de LDL mediada por receptor, processamento da lipoproteína e tráfego intracelular de lipídeos liberados. No caso das formas sanguíneas de *T. brucei*, a relevância desse sistema é bastante evidente, uma vez que especificamente nesse estágio evolutivo não há síntese *de novo* de esteróis. Por outro lado, apesar dos grandes avanços no entendimento da biossíntese do ergosterol em *T. cruzi* e *Leishmania* spp. o estudo da utilização do colesterol exógeno por esses parasitos tem sido negligenciado. Essa lacuna no conhecimento talvez seja fruto do fato de que o colesterol, a princípio não seria um metabólico essencial para a sobrevivência desses organismos em condições padrões de laboratório. Porém, pouco se sabe da relevância desse sistema nos parasitos submetidos a condições extremas de estresse metabólico e/ou farmacológico.

O presente estudo visou estudar as possíveis alterações no sistema de captação de colesterol exógeno de *L. amazonensis* sob o efeito de fármacos inibidores da biossíntese do ergosterol e suas implicações farmacológicas. Desta forma, foi demonstrado que o tratamento com esses inibidores leva a um aumento da captação de LDL com conseguinte incremento do conteúdo de colesterol de forma dose dependente nos parasitos. Os dados também sugerem que quanto menor é a quantidade de esteróis endógenos na leishmania, mais ativa fica o sistema de captação de colesterol exógeno. Em adição, foi demonstrado que os parasitos se tornam mais susceptíveis à morte pelos inibidores do ergosterol quando privados de fontes exógenas de colesterol, sugerindo que esse sistema possa de fato ser um mecanismo de compensação da homeostasia dos parasitos em caso de estresse. Em relação ao mecanismo de resistência aos azóis, foi demonstrada a superexpressão da C-14 desmetilase após indução de resistência ao cetoconazol *in vitro*, como esperado, mas não foi possível, neste estudo, correlacionar a resistência à utilização do colesterol exógeno.

Em conjunto, os dados aqui contidos sugerem a participação do sistema de utilização de colesterol exógeno de *L. amazonensis* em mecanismos compensatórios do parasito sob efeito de inibidores do ergosterol, tornando-o um potencial alvo farmacológico. Estudos adicionais são necessários para estender esses achados ao parasito intracelular durante a

infecção e entender quais pressões evolutivas de sobrevivência levaram à conservação dessa sofisticada via ao longo da evolução.

7-REFERÊNCIAS

- Al Abdely HM, Graybill JR, Loebenberg D, Melby PC. Efficacy of the triazole SCH 56592 against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania donovani* in experimental murine cutaneous and visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1999 43(12):2910-2914.
- Alrajhi AA, Ibrahim EA, De Vol EB, Khairat M, Faris RM, Maguire JH. Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. *New England Journal of Medicine* 2002 346(12):891-895.
- Alsaleh QA, Dvorak R, Nanda A. Ketoconazole in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in Kuwait. *International Journal of Dermatology* 1995 34(7):495-497.
- Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Canavate C, Dedet JP et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clinical Microbiology Reviews* 2008 21(2):334-+.
- 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(2):266-274.
- Ameen M. Cutaneous leishmaniasis: therapeutic strategies and future directions. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2007 8(16):2689-2699.
- 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(3):148-149.
- Antinori S, Cascio A, Parravicini C, Bianchi R, Corbellino M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. *Lancet Infectious Diseases* 2008 8(3):191-199.
- Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology* 2000 30(12-13):1269-1281.
- Barratt G, Saint-Pierre-Chazalet M, Loiseau PM. Cellular Transport and Lipid Interactions of Miltefosine. *Current Drug Metabolism* 2009 10(3):247-255.
- Bastin P, Stephan A, Raper J, SaintRemy JM, Opperdoes FR, Courtoy PJ. An M(r) 145000 low-density lipoprotein (LDL)-binding protein is conserved throughout the Kinetoplastida order. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1996 76(1-2):43-56.
- Beach DH, Goad LJ, Holz GG. Effects of Ketoconazole on Sterol Biosynthesis by *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1986 136(3):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(2):149-162.
- Berman J. Treatment of leishmaniasis with miltefosine: 2008 status. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 2008 4(9):1209-1216.

- 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(1):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):1-13.
- Bligh EG & Dryer MJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol* 1959 37(8): 911-913.
- Bloch KE. Sterol Structure and Membrane-Function. *Crc Critical Reviews in Biochemistry* 1983 14(1):47-92.
- Blum JA, Hatz CF. Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in Travelers 2009. *Journal of Travel Medicine* 2009 16(2):123-131.
- Brandão AA MADWSMA. The heterogeneity of choanomastigote-shaped trypanosomatids as analyzed by their kDNA minicircle size: taxonomic implicaitons. *Parasitology Research* 2000 86(10):809-812.
- Buckner FS. Sterol 14-demethylase inhibitors for *Trypanosoma cruzi* infections. *Drug Targets in Kinetoplastid Parasites* 2008 625:61-80.
- Buckner FS, Wilson AJ, White TC, Van Voorhis WC. Induction of resistance to azole drugs in *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1998 42(12):3245-3250.
- Calvopina M, Guevara AG, Armijos RX, Hashiguchi Y, Davidson RN, Cooper PJ. Itraconazole in the treatment of New World mucocutaneous leishmaniasis. *International Journal of Dermatology* 2004 43(9):659-663.
- 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(3):307-314.
- Cauchetier E, Loiseau PM, Lehman J, Rivollet D, Fleury J, Astier A et al. Characterisation of atovaquone resistance in *Leishmania infantum* promastigotes. *International Journal for Parasitology* 2002 32(8):1043-1051.
- Cham WJ & Knowles BR. A solvent system for delipidation of plama or serum without protein precipitation. *J. Lipid Res* 1976 17: 176-181.
- Champe PC HR. Metabolismo do colesterol e Esteróides. *Bioquímica ilustrada*. 1997: 212-232.
- 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(8):2132-2136.
- Consigli J, Danielo C, Gallerano V, Papa M, Guidi A. Cutaneous leishmaniasis: successful treatment with itraconazole. *International Journal of Dermatology* 2006 45(1):46-49.

- Coombs GH NM. Lipid biochemistry of trypanosomatids. *Biochemical Protozoology* . 1991: 312-328.
- Coppens I, Courtoy PJ. The adaptative mechanisms of *Trypanosoma brucei* for sterol homeostasis in its different life-cycle environments. *Annual Review of Microbiology* 2000a 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(11):5736-5741.
- Coppens I, Sinai AP, Joiner KA. *Toxoplasma gondii* exploits host low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition. *Journal of Cell Biology* 2000 149(1):167-180.
- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews* 2006 19(1):111-+.
- Cupolillo E, Alves FA, Brahim LRN, Naiff MF, Pereira LOR, Oliveira-Neto MP et al. Recent advances in the taxonomy of the New World leishmanial parasites. *Medical Microbiology and Immunology* 2001 190(1-2):57-60.
- Das VNR, Pandey K, Verma N, Lal CS, Bimal S, Topno RK et al. Short Report: Development of Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis (PKDL) Miltefosine-Treated Visceral Leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2009 80(3):336-338.
- Dorlo TP ETBJDVP. Miltefosine: a new remedy for leishmaniasis. *Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde* 2006 150(49):2697-2701.
- Dube A, Singh N, Sundar S, Singh N. Refractoriness to the treatment of sodium stibogluconate in Indian kala-azar field isolates persist in in vitro and in vivo experimental models. *Parasitology Research* 2005 96(4):216-223.
- Fernandes MC, Cortez M, Yoneyama KAG, Straus AH, Yoshida N, Mortara RA. Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: Implication of cholesterol and host cell microdomains. *International Journal for Parasitology* 2007 37(13):1431-1441.
- Firooz A, Khatami A, Dowlati Y. Itraconazole in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *International Journal of Dermatology* 2006 45(12):1446-1447.
- Gaibelet G, Millot C, Lebrun C, Ravault S, Sauliere A, Andre A et al. Cholesterol content drives distinct pharmacological behaviours of mu-opioid receptor in different microdomains of the CHO plasma membrane. *Molecular Membrane Biology* 2008 25(5):423-435.
- Ginger ML, Chance ML, Goad LJ. Carbon sources for fatty acid and sterol biosynthesis in *Leishmania* species. *Biochemical Society Transactions* 1996 24(3):S434.
- Goad LJ, Holz GG, Beach DH. Sterols of *Leishmania* Species - Implications for Biosynthesis. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1984 10(2):161-170.
- Goad LJ, Holz GG, Beach DH. Sterols of Ketoconazole-Inhibited *Leishmania mexicana mexicana* Promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1985 15(3):257-279.
- Granthon AC, Braga MV, Rodrigues JCF, Cammerer S, Lorente SO, Gilbert IH et al. Alterations on the growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* induced by squalene synthase inhibitors. *Veterinary Parasitology* 2007 146(1-2):25-34.

- Gros L, Lorente SO, Jimenez CJ, Yardley V, Rattray L, Wharton H et al. Evaluation of azasterols as anti-parasitics. *Journal of Medicinal Chemistry* 2006 49(20):6094-6103.
- Guffanti M, Gaiera G, Bossolasco S, Ceserani N, Ratti D, Cinque P et al. Case Report: Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis in an HIV-1-Infected Woman: Recovery after Amphotericin B Following Failure of Oral Miltefosine. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2008 79(5):715-718.
- Hadighi R, Mohebbali M, Boucher P, Hajjarian H, Khamesipour A, Ouellette M. Unresponsiveness to glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. *Plos Medicine* 2006 3(5):659-667.
- 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 C-14-demethylase expression in *Trypanosoma cruzi* treated with sterol biosynthesis inhibitors. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2005 144(1):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(2):123-134.
- Haughan PA, Chance ML, Goad LJ. Synergism In vitro of Lovastatin and Miconazole As Antileishmanial Agents. *Biochemical Pharmacology* 1992 44(11):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.
- 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.
- 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(1):52-59.
- Kalipatnapu S, Chattopadhyay A. Membrane organization and function of the serotonin(1A) receptor. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2007 27(8):1097-1116.
- 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(5):369-391.
- Kovacs WJ, Tape KN, Shackelford JE, Duan XY, Kasumov T, Kelleher JK et al. Localization of the pre-squalene segment of the isoprenoid biosynthetic pathway in mammalian peroxisomes. *Histochemistry and Cell Biology* 2007 127(3):273-290.
- Kumaresan M, Kumar P. Localized cutaneous leishmaniasis in South India: Successful treatment with ketoconazole. *Indian Journal of Dermatology Venereology & Leprology* 2007 73(5):361-362.

- 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(43):33197-33200.
- Lee MGS, Yen FT, Zhang YH, Bihain BE. Acquisition of lipoproteins in the procyclic form of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1999 100(2):153-162.
- Liendo A, Visbal G, Piras MM, Piras R, Urbina JA. Sterol composition and biosynthesis in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1999 104(1):81-91.
- Lindoso JAL, Barbosa RN, Posada-Vergara MP, Duarte MIS, Oyafuso LK, Amato VS et al. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. *British Journal of Dermatology* 2009 160(2):311-318.
- Liu JY, Qiao XG, Du DY, Lee MGS. Receptor-mediated endocytosis in the procyclic form of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry* 2000 275(16):12032-12040.
- Llanos-Cuentas A, Tulliano G, Araujo-Castillo R, Miranda-Verastegui C, Santamaria-Castrellon G, Ramirez L et al. Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. *Clinical Infectious Diseases* 2008 46(2):223-231.
- Lorente SO, Gomez R, Jimenez C, Cammerer S, Yardley V, Luca-Fradley K et al. Biphenylquinuclidines as inhibitors of squalene synthase and growth of parasitic protozoa. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2005 13(10):3519-3529.
- 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(2):167-173.
- 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(1):23-26.
- Melo NR, Taguchi H, Culhari VP, Kamei K, Mikami Y, Smith SN et al. Oral candidiasis of HIV-infected children undergoing sequential HIV therapies. *Medical Mycology* 2009 47(2):149-156.
- Milovanovic I, Trbovich AM, Vujanic M, Klun I, Bobic B, Nikolic A et al. *Toxoplasma gondii* Infection Induces Lipid Metabolism Alterations in the Murine Host. *International Journal of Infectious Diseases* 2008 12:E172-E173.
- Ministério da Saúde. Diagnóstico Clínico e Diferencial. Atlas de Leishmaniose Tegumentar americana 2006 1(1):1-119.
- Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. <http://www.saude.gov.br/svs.htm>. Acessado em 2 de julho 2009.
- Mueller M, Ritmeijer K, Balasegaram M, Koummuki Y, Santana MR, Davidson R. Unresponsiveness to AmBisome in some Sudanese patients with kata-azar. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2007 101(1):19-24.
- Myler PJ FN. Leishmaniasis: epidemiological Trends and Diagnosis. *Leishmania - After the genome*. 2008: 1-14.

- Nelson DL CM. Biosíntese de colesterol. Lehninger- Princípios de Bioquímica . 2002: 314-367.
- Neuber H. Leishmaniasis. Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft 2008 6(9):754-764.
- Neves PD MAGOLP. Leishmaniose Tegumentar Americana. Parasitologia Humana. 2000: 36-53.
- Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2003 52(1):1.
- 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(7):1057-1064.
- Paila YD, Tiwari S, Chattopadhyay A. Are specific nonannular cholesterol binding sites present in G-protein coupled receptors? Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes 2009 1788(2):295-302.
- Pandey BD, Pandey K, Kaneko O, Yanagi T, Hirayama K. Short Report: Relapse of Visceral Leishmaniasis after Miltefosine Treatment in a Nepalese Patient. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 2009 80(4):580-582.
- Pena-Diaz J, Montalvetti A, Flores CL, Constan A, Hurtado-Guerrero R, de Souza W et al. Mitochondrial localization of the mevalonate pathway enzyme 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase in the trypanosomatidae. Molecular Biology of the Cell 2004 15(3):1356-1363.
- Penefsky HS. Reversible Binding of Pi by Beef-Heart Mitochondrial Adenosine-Triphosphatase. Journal of Biological Chemistry 1977 252(9):2891-2899.
- Podlipaev SA FA. The phylogeny of the Trypanosomatidae: the molecular and morphological approaches. Parazitologija 2000 34(3):169-182.
- Pucadyil TJ, Chattopadhyay A. Role of cholesterol in the function and organization of G-protein coupled receptors. Progress in Lipid Research 2006 45(4):295-333.
- Rakotomanga M, Blanc S, Gaudin K, Chaminade P, Loiseau PA. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2007 51(4):1425-1430.
- 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(11-12):904-907.
- Remme JHF, Blas E, Chitsulo L, Desjeux PMP, Engers HD, Kanyok TR et al. Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective. Trends in Microbiology 2002 10(10):435-440.
- 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(2):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(2):487-499.

- Rub A, Dey R, Jadhav M, Kamat R, Chakkaramakkil S, Majumdar S et al. Cholesterol depletion associated with *Leishmania major* infection alters macrophage CD40 signalosome composition and effector function. *Nature Immunology* 2009 10(3):273-280.
- Santos DO, Coutinho CER, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, Nascimento SB et al. Leishmaniasis treatment - a challenge that remains: a review. *Parasitology Research* 2008 103(1):1-10.
- Sehgal A, Bettiol S, Pypaert M, Wenk MR, Kaasch A, Blader IJ et al. Peculiarities of host cholesterol transport to the unique intracellular vacuole containing *Toxoplasma*. *Traffic* 2005 6(12):1125-1141.
- Sharief AH, Khalil EAG, Theander TG, Kharazmi A, Omer SA, Ibrahim ME. *Leishmania donovani*: An in vitro study of antimony-resistant amphotericin B-sensitive isolates. *Experimental Parasitology* 2006 114(4):247-252.
- Siddiqui MA, Al Mofadhi AM, Al Reshaid A, Al Rakban A, Al Jarba A, Kahtani H et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis with itraconazole. *Journal of Dermatological Treatment* 1998 9(4):235-238.
- 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(6):307-315.
- Stancu C, Sima A. Statins: mechanism of action and effects. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2001 5(4):378-387.
- Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gurtler RE, McKerrow J et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *Journal of Clinical Investigation* 2008 118(4):1301-1310.
- Torres-Santos EC, Moreira DL, Kaplan MAC, Meirelles MN, Rossi-Bergmann B. Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1999a 43(5):1234-1241.
- Torres-Santos EC, Sampaio-Santos MI, Buckner FS, Yokoyama K, Gelb M, Urbina JÁ, Rossi-Bermann B. Altered sterol profile induced in *Leishmania amazonensis* by a natural dihydroxymethoxyated chalcone. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009 63(3): 469-72.
- Troya J, Casquero A, Refoyo E, Fernandez-Guerrero ML, Gorgolas M. Long term failure of miltefosine in the treatment of refractory visceral leishmaniasis in AIDS patients. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2008 40(1):78-80.
- Tsao S, Rahkhoodaee F, Raymond M. Relative Contributions of the *Candida albicans* ABC Transporters Cdr1p and Cdr2p to Clinical Azole Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009 53(4):1344-1352.
- Tuon FF, Amato VS, Graf ME, Siqueira AM, Nicodemo AC, Neto VA. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis - a systematic review with a meta-analysis. *International Journal of Dermatology* 2008 47(2):109-124.
- 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* 2002c 125(1-2):35-45.
- 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(1-2):35-45.
- 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* 1995b 42(4):337-346.
- 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* 1995a 42(4):337-346.
- White JML, Salisbury JR, Jones J, Higgins EM, Vega-Lopez F. Cutaneous leishmaniasis: Three children with *Leishmania major* successfully treated with itraconazole. *Pediatric Dermatology* 2006 23(1):78-80.
- WHO. Division of control of Tropical Diseases. World Health Organization , <http://www.who.int/tdr/disease/leish/diseasesinfo.htm>. 2004. 2009.
- World Health Organization (WHO) 2009a. <http://apps.who.int/tdr/publications/tdr-image-library?idNumber=00061046>. Acessado em 30 de junho de 2009.
- World Health Organization 2009b (OMS/WHO). <http://apps.who.int/tdr/publications/tdr-image-library?idNumber=00061043>. Acessado em 30 de junho de 2009.
- World Health Organization 2009c (OMS/WHO). <http://apps.who.int/tdr/publications/tdr-image-library?idNumber=9706927>. Acessado em 30 de junho de 2009.
- Yeagle PL. Lanosterol and Cholesterol Have Different Effects on Phospholipid Acyl Chain Ordering. *Biophysical Journal* 1985 47(2):A105.
- 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(8):787-791.
- Zlatkis A, Zak, B & Boyle AJ. A new method for the direct determination of serum cholesterol. *J. Lab. Clin* 1953 41(3): 486-492.