CRISTIANA DE MELO TRINCONI

INVESTIGAÇÃO SOBRE A ATIVIDADE DE CERAMIDA SINTASE EM *Leishmania amazonensis*

Dissertação apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2011

CRISTIANA DE MELO TRINCONI

INVESTIGAÇÃO SOBRE A ATIVIDADE DE CERAMIDA SINTASE EM *Leishmania amazonensis*

Dissertação apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração:
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora:
Profª. Drª. Silvia Reni Bortolin Uliana

Versão original

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Trinconi, Cristiana de Melo.
Investigação sobre a atividade de Ceramida Sintase em *Leishmania amazonensis* / Cristiana de Melo Trinconi. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Silvia Reni Bortolin Uliana.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Bioquímica e Biologia Molecular de *Leishmania*.

Versão do título para o inglês: Investigation of the Ceramide Synthase activity in *Leishmania amazonensis*

Descritores: 1. *Leishmania* 2. Ceramida Sintase 3. Ceramida 4. Esfingolipídios 5. Tamoxifeno 6. I. Uliana, Silvia Reni Bortolin II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0140/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Cristiana de Melo Trinconi.

Título da Dissertação: Investigação sobre a atividade de Ceramida Sintase em *Leishmania amazonensis.*

Orientador(a): Silvia Reni Bortolin Uliana.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011)3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Decl. CEEA.060.09

D E C L A R A Ç Ã O

Em adendo ao Certificado 33/07/CEEA datado de 27.03.07, por solicitação da Profa. Dra. Silvia Reni Bortolin Uliana, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Cristiana de Melo Trinconi** ao projeto de pesquisa *"Estudo de novas abordagens quimioterápicas para o tratamento de leishmaniose"*, uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 14 de setembro de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador -CEEA- ICB/USP

Dedico esta Dissertação de Mestrado aos meus pais, José Luis e Rita,
pela confiança, apoio e amor verdadeiro que me encorajam
e às minhas irmãs, Camila e Carolina,
amigas verdadeiras e muito fiéis.

Dedico ainda este trabalho ao meu esposo, Victor, por me incentivar a
crescer a cada dia e mostrar que o amor verdadeiro existe.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Professora Silvia Uliana. Agradeço imensamente todo o carinho, dedicação e paciência dispensados à minha formação. Os ensinamentos adquiridos neste período são de imensa valia, tanto no sentido profissional quanto pessoal. Gostaria de enfatizar aqui a minha admiração por você. Tenho diversos motivos para isto, mas os principais são a sua sabedoria, confiança, respeito e simplicidade. Obrigada por me ensinar o quanto a ciência é mágica e divertida.

Aos colegas de bancada Vivian e Alessandro, por estarem sempre ao meu lado me apoiando e ajudando nos momentos difíceis. Agradeço muito pelo pensamento positivo e por acreditarem que as minhas reações enzimáticas iriam dar certo. E também pelos momentos de descontração animados com direito a músicas temáticas às *Leishmanias* e muito mais. Por tudo isto, sou muito grata à vocês.

Agradeço pela acolhida e apoio do Danilo e da Jenicer que me auxiliaram no desenvolvimento desta dissertação e pela convivência ao longo destes anos.

À Marinete, pelo carinho e pelo trabalho constante. Fico grata pelos ensinamentos muito importantes sobre a vida e o amor de uma família. Adoro poder conversar e aprender com você. Agradeço também à Maria, um exemplo de garra, dedicação e alegria.

Ao Prof. Carlos Winter, que se mostrou disponível e empenhado em me ajudar em todos os momentos. Obrigada pelo ensinamento constante e pelo bom humor contagiante. Gostaria de agradecer muito ao Manuel pela disponibilidade em me ajudar e paciência.

Ao Prof. Alejandro Katzin, por disponibilizar não só seu laboratório e equipamentos, mas seus conhecimentos e experiências.

Ao laboratório da Profa. Tania Katzin, em especial ao Alexandre Moura, pela disponibilidade de ajudar e ceder seu laboratório em todos os momentos que precisei.

Aos laboratórios das Profas. Marta Teixeira e Silvia Alfieri, cujos membros sempre foram muito receptivos. Um obrigado especial à Zuleima, Omar, Charlotte, Paola, Luciana, Flávia e Herakles!

Ao laboratório do Prof. Ariel, em especial à Beth, Lisvane e Brian, pela disposição em ajudar tanto na parte técnica como intelectual do projeto.

Ao laboratório do Prof. Mario Barros, em especial ao Prof. Ribamar, Cleverson e Fernando, que me ensinaram tudo o que sei sobre leveduras e sempre disponibilizaram todos os equipamentos, materiais e reagentes do laboratório para o desenvolvimento deste projeto. Obrigada pelos momentos de trabalho sério e de descontração.

Ao Prof. Norton Heise, pelo auxílio intelectual nas reações enzimáticas e pelas discussões fantásticas sobre esfingolipídios durantes suas visitas à USP.

À Profa. Carla Columbano e alunos, pelas análises no leitor Storm e pelos empréstimos de reagentes.

À Fapesp, pelo apoio financeiro por meio da bolsa de mestrado e da reserva técnica.

Às minhas melhores amigas Juliana Andreo e Ana Paula Ielo, que, por diferentes formas, tornaram a minha vida mais divertida e interessante.

Aos meus amigos especiais para todos os momentos: Carol, Bia, André, Thaís, Eliane, JP, Léo, Renatinha, Lívia, Raquel, Cristiane, Mônica, Zé Pieticher, Luciana, Leandro,Fernanda, Renata, Albano, Lucélia, Cida, Edu, Odamir, Ana Maria, Márcia, Sérgio, Márcia, Porquito.

Alguns longe, outros perto, mas todos sempre presentes e fiéis. Obrigado por mostrar sempre o verdadeiro sentido da vida.

Ao Pe. Toninho, que entrou em minha vida de forma muito especial. Agradeço pelo amor e carinho dedicado a mim e minha família e por acreditar fielmente que Deus existe e está ao nosso lado. Isso me trás muita paz!

Ao meu esposo, Victor. Muito obrigada por me apoiar, confiar na minha competência e sempre me incentivar a aceitar novos desafios. Graças a você e aos meus pais esta dissertação existe. Obrigada!

Aos meus pais, José Luiz e Rita, minha fortaleza! Meu amor e admiração por vocês são incondicionais. Não existem palavras capazes de expressar o quanto sou grata por tudo o que vocês fizeram por mim. Espero poder retribuir tudo o que fizeram por muitos e muitos anos!

Às minhas irmãs Camila e Carol, que cuidam de mim e me protegem até os dias de hoje. Fico grata pelo carinho, amor e dedicação. Unidas pelo amor de nossos pais e pela benção de Deus, nunca iremos nos separar.

À minha familia de um modo geral: Cacau, Márcia, Marlene, Edma, Roberto, Pedro, Dodó, Rei Rei, Hugo, Lívia, Vó Nicolaza (em memória), Vô Zé Trinconi (em memória), Vó Aparecida, Marcelina, Carlos, Andrezza, Luis Felipe, Francisca, Leocádia, Guto, Clarissa e todos os demais da família Trinconi, Melo, Isaac e Tronco. Obrigado por torcerem por mim em todos os momentos e me darem o exemplo de lealdade, força, determinação, união e amor verdadeiro.

“As invenções são o resultado de um trabalho teimoso”

Santos Dumont

RESUMO

Trinconi CM. Investigação sobre a atividade de ceramida sintase em *Leishmania amazonensis*. [dissertação (Mestrado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

A leishmaniose é uma doença tropical mundialmente distribuída, causada por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, cuja transmissão para o homem envolve vetores da família Psychodidae. Os medicamentos utilizados atualmente no tratamento da leishmaniose cutânea e visceral tem apresentado múltiplos problemas, sendo o resultado frequentemente imprevisível e insatisfatório. Devido a este fato, iniciou-se a busca por novas alternativas quimioterápicas em nosso laboratório. O principal candidato é o tamoxifeno que se mostrou eficaz contra várias espécies de *Leishmania in vitro* e *in vivo*. A partir disso, desenvolvemos estratégias experimentais para investigar possíveis mecanismos de ação do tamoxifeno capazes de explicar seu efeito leishmanicida. Baseados em dados da literatura e em experimentos preliminares identificamos a ceramida sintase (CerS) como possível alvo do tamoxifeno. Essa enzima é responsável pela síntese de ceramida, que constitui o esqueleto de todos esfingolipídios. Assim sendo, propusemo-nos a investigar a atividade de CerS em *L. amazonensis* e a interferência do tamoxifeno na atividade desta enzima. Identificamos, no genoma de *L. amazonensis*, uma fase aberta de leitura que codifica uma proteína putativa similar à enzima CerS de *Saccharomyces cerevisiae*. A composição da proteína traduzida a partir do gene de *L. amazonensis*, com 460 aminoácidos, sugere a presença de seis domínios transmembrana e possui uma sequência com alta similaridade com o motivo Lag1 que contem os aminoácidos essenciais para a atividade de CerS. A organização genômica do gene CerS putativo de *L. amazonensis* foi verificada através da técnica de Southern Blot, observando-se um padrão compatível com gene de cópia única. A estratégia experimental utilizada para caracterizar funcionalmente o gene de *L. amazonensis* foi a de complementação em leveduras deficientes para os genes endógenos que codificam CerS. Não foi possível demonstrar a atividade funcional da sequência através dessa metodologia devido a possíveis eventos de recombinação na levedura que levaram à incorporação do gene *LAC1* de *S. cerevisiae* pela célula transformada com o gene putativo de

Leishmania. Com a finalidade de investigar se o tamoxifeno interfere na atividade da CerS de *L. amazonensis*, ensaios enzimáticos foram padronizados. Determinamos que a CerS de *L. amazonensis* reconhece tanto esfingosina quanto esfinganina como base esfingóide podendo, portanto, participar das vias de síntese *de novo* e de salvação. Uma caracterização parcial sobre os doadores de grupo acil indicou que tanto palmitoil CoA como miristoil CoA podem ser utilizados como doadores para síntese de ceramida *in vitro*. Mostramos que a atividade de CerS em *L. amazonensis* não é sensível à fumonisina B2, inibidor clássico da CerS em mamíferos. Observamos também que tamoxifeno não foi capaz de inibir a atividade *in vitro* de CerS de *L. amazonensis*. Isto indica que o mecanismo leishmanicida de tamoxifeno não está relacionado à inibição da enzima CerS. Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que a atividade de CerS em *L. amazonensis* apresenta peculiaridades em relação a outros organismos e sua caracterização completa poderá fornecer dados valiosos sobre o metabolismo de esfingolipídeos nestes protozoários.

Palavras-chave: *Leishmania.* Ceramida Sintase. Ceramida. Esfingolipídios. Tamoxifeno.

ABSTRACT

Trinconi CM. Investigation of the ceramide shynthase activity in *Leishmania amazonensis*. [Masters thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas de São Paulo; 2011.

Leishmaniasis is a tropical disease of worldwide distribution, caused by more than 20 species of protozoa of the *Leishmania* genus and transmited to humans through insects of the Psychodidae family. Current treatments for cutaneous and visceral leishmaniasis often show unpredictable and unsatisfactory results. In this context, our lab is searching for new chemotherapeutic agents to be used as alternatives in leshimaniasis treatment. The most promising candidate is tamoxifen which was shown to be effective against several species of *Leishmania in vitro* and *in vivo*. Therefor, we have developed experimental strategies to investigate possible mechanisms of action of tamoxifen that could explain its leishmanicidal effect. Based on literature data and preliminary experiments we identified ceramide synthase (CerS) as a possible target for tamoxifen. This enzyme is responsible for the synthesis of ceramide, which constitutes the backbone of all sphingolipids. Therefore, the aim of this study was to investigate the activity of CerS in *L. amazonensis* and the interference of tamoxifen on its activity. An open reading frame that encodes a protein similar to the *Saccharomyces cerevisiae* CerS was identified in the *L. amazonensis* genome. The sequence of the translated protein, with 460 aminoacids, suggests the presence of six transmembrane domains and possesses a sequence with high similarity to the Lag1 motif containing aminoacids that are essential for the CerS activity. The genomic organization of the *L. amazonensis* CerS putative gene was verified by Southern Blot, showing a pattern consistent with a single copy gene. The experimental strategy used to functionally characterize the *L. amazonensis* gene was complementation of yeast strains deficient for the endogenous CerS encoding genes. It was not possible to demonstrate the functional activity of the sequence through this strategy because of possible recombination events within the cells transformed with the putative gene of *Leishmania* that led to the incorporation of the *S. cerevisiae LAC1* gene. Enzymatic assays were standardized in order to investigate whether tamoxifen interferes with CerS activity in *L. amazonensis*. It was determined that *L.*

amazonensis CerS can use both sphingosine and sphinganine as the sphingoid base, and thus can participate in both the *de novo* and salvage pathways. A partial characterization of acyl group donors indicated that both palmitoyl CoA as well as miristoil CoA can be used as donors for ceramide synthesis *in vitro*. We showed that CerS activity in *L. amazonensis* is not sensitive to fumonisin B2, a classical inhibitor of CerS in mammals. We also observed that tamoxifen was not able to inhibit the *in vitro* activity of *L. amazonensis* CerS. This indicates that the leishmanicidal activity of tamoxifen is not related to the inhibition of CerS. The results obtained in this study indicate that the activity of CerS in *L. amazonensis* presents peculiarites in relation to other organisms and its full characterization may provide valuable data on the metabolism of sphingolipids in these protozoa.

Keywords: *Leishmania*. Ceramide Synthase. Ceramide. Sphingolipids.Tamoxifen.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ade	Adenina
AmB	Anfotericina B
APS	Persulfato de amônio
ATP	Adenosina Trifosfato
Blast	Blasticidina
BSA	Albumina de soro bovino
BSD	Blasticidina S deaminase
C-1	Carbono 1
C-2	Carbono 2
C-3	Carbono 3
CerS	Ceramida Sintase
CerSLa	Ceramida Sintase de *L. amazonensis*
CerSLm	Ceramida Sintase de *L. major*
CoA	Coenzima A
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAg	DNA genômico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatos
DTM	Domínio Transmembrana
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
FB1	Fumonisina B1
FB2	Fumonisina B2
g	aceleração da gravidade
g	Grama
Gal	Galactose
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GSL	Glicoesfingolipídio
h	Hora
His	Histidina
HPTLC	Cromatografia em camada delgada de alta performance
IFN-γ	Interferon gama
IL-2	Interleucina 2
IPC	Inositolfosforilceramida
Kb	Quilo base
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilo Dalton
L	Litro
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
Leu	Leucina
LiAc	Acetato de lítio

LMC	Leishmaniose mucocutânea
LV	Leishmaniose visceral
M	Molar
MAPP	(1S,2R)-D-eritro-2-(N-miristoilamino)-1-fenil-1-propanol
mg	Miligrama
$MgCl_2$	Cloreto de Magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
$MnCl_2$	Cloreto de manganês
mRNA	RNA mensageiro
N_2	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NBD	Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol
NBD-Cer	NBD-Ceramida
NBD-ESF	NBD-esfingosina
NBD-ESFn	NBD-esfinganina
ORF	Fase aberta de leitura
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PDMP	D-treo 1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-1-propanol
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Fosfatidilinositol
PKC	Proteína quinase C
PMSF	Fenilmetanosulfonilfluoruro
PSL	Fosfoesfingolipídios
RE	Retículo endoplasmático
R*f*	Fator de retenção
RNA	Ácido ribonucleico
Sb^{III}	Antimônio trivalente
Sb^{v}	Antimônio pentavalente
SD	Meio sintético mínimo para o crescimento de leveduras com glicose
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS – PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SERM	Modulador seletivo do receptor de estrógeno
SG	Meio sintético mínimo para o crescimento de leveduras com galactose
SLs	Esfingolipídios
SPT	Serina Palmitoil Transferase
TE	tampão Tris-EDTA
TEMED	*N*,*N*,*N'*,*N'*-tetrametiletilenodiamina

TES	Tampão Tris/EDTA/SDS
TGF-β	Fator de crescimento tumoral beta
TM	Transmembrana
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
Tris	Tris (hidroximetilaminometano)
Trp	Triptofano
U/mL	Unidades por mililitro
Ura	Uracila
UTR	Região não traduzida
v/v	Volume/volume
YPD	Meio rico para o crescimento de leveduras com glicose
β-CD	Beta metilciclodextrina
%	Porcentagem
Δ	Deleção
°C	Graus Celsius
µCi	Micro Curie
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
5-FOA	Ácido 5-fluoroorótico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **19**

1.1 A DOENÇA **20**

1.1.1 Leishmaniose Visceral *20*

1.1.2 Leishmaniose Cutânea *21*

1.1.3 Coinfecção Leishmania x HIV *22*

1.2 CICLO DE VIDA **23**

1.3 PREVENÇÃO E CONTROLE **23**

1.4 TRATAMENTO **24**

1.4.1 Antimoniais Pentavalentes (Sb^{v}) *24*

1.4.2 Anfotericina B *26*

1.4.3 Pentamidina *27*

1.4.4 Miltefosina *27*

1.4.5 Paromomicina *28*

1.4.6 Outras alternativas *29*

1.5 TAMOXIFENO **30**

1.6 OS ESFINGOLIPÍDIOS **32**

1.6.1 A via de biossíntese de ceramida *35*

1.6.2 Papel das Ceramidas *39*

1.6.3 O efeito do Tamoxifeno na Via das Ceramidas *40*

1.7 CERAMIDA SINTASE **41**

2 OBJETIVOS **44**

2.1 OBJETIVO GERAL **45**

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS **45**

3 MATERIAIS E MÉTODOS **46**

3.1 MATERIAIS **47**

3.1.1 Organismos: *47*

3.1.1.1 Bactérias 47

3.1.1.2 Leishmania sp 47

3.1.1.3 Leveduras 47

3.1.2 Plasmídios *48*

3.1.2.1 pCR2.1-Topo 48

3.1.2.2 pYES6/CT/lacZ 48

3.1.1 Oligonucleotídeos *48*

3.1.4 Antibiótico de seleção *49*

3.1.4.1 Blasticidina S HCl 49

3.1.5 Enzimas de restrição *49*

3.1.6 Reagentes *49*

3.1.6.1 Ácido 5-Fluorótico ("5-fluorouracil-6-carboxylic acid monohydrate: 5-FOA") 49

3.2 MÉTODOS **50**

3.2.1 Extração de DNA Genômico de Tripanosomatídeos *50*

3.2.2 Purificação de DNA Genômico de Leishmania em Pequena Escala *50*

3.2.3 Purificação de DNA Genômico e plasmidial de Saccharomyces cerevisiae *51*

3.2.4 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) *51*

3.2.5 Eletroforese de DNA *52*

3.2.6 Southern Blot *52*

3.2.7 Reações de Hibridização *53*

3.2.8 Clonagem Molecular *53*

3.2.9 Preparação da Bactéria Competente *54*

3.2.10 Transformação e Plaqueamento *54*

3.2.11 Extração de DNA plasmidial *54*

3.2.12 Sequenciamento de DNA *55*

3.2.13 Análise das Seqüências de Nucleotídeos *55*

3.2.14 Teste de Confirmação de Cepa de Leveduras *55*
3.2.15 Teste de Sensibilidade à Blasticidina *56*
3.2.16 Complementação em Leveduras *56*
3.2.17 Purificação de Microssomos de Fígado de Camundongo *57*
3.2.18 Purificação de Microssomos de Trypanossoma cruzi *57*
3.2.19 Purificação de Microssomos de Leishmania *58*
3.2.20 Quantificação de Proteína *59*
3.2.21 Ensaio para Detecção de Atividade da Enzima Ceramida Sintase *59*
3.2.22 Detecção do produto marcado *62*

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO **63**

4.1 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A CERS DE L. AMAZONENSIS **64**
4.2 ORGANIZAÇÃO DO GENE CERS EM L. AMAZONENSIS **74**
4.3 COMPLEMENTAÇÃO DE LEVEDURA COM O GENE CERS DE L. AMAZONENSIS **75**
4.4 ENSAIO ENZIMÁTICO DA CERS IN VITRO **87**

5. CONCLUSÕES **102**

REFERÊNCIAS **104**

1 INTRODUÇÃO

1.1 A doença

A leishmaniose é uma doença tropical mundialmente distribuída afetando 12 milhões de pessoas. Estima-se incidência de 1,5 a 2 milhões de novos casos de leishmaniose e 70 mil mortes a cada ano (Reithinger et al., 2007). A Organização Mundial de Saúde (World Health Organization, WHO) considera a leishmaniose como um dos maiores problemas de saúde pública na atualidade (Ashford, 1997). Múltiplos problemas como a epidemia do vírus da imunodeficiência humana (HIV), aumento de viagens internacionais, a ausência de uma vacina eficaz, dificuldades no controle de vetores, conflitos internacionais e o desenvolvimento de resistência à quimioterapia são fatores capazes de elevar o número de casos desta doença (revisado em Sereno, 2007).

A leishmaniose é classificada como uma das "doenças mais negligenciadas" (Yamey e Torreele, 2002) com base nos limitados recursos investidos em diagnóstico, tratamento, controle e sua grande associação com a pobreza. Entre todas as doenças tropicais, a leishmaniose está em segundo lugar em mortalidade e em quarto em morbidade no mundo (Mathers et al., 2007). Trata-se de uma enfermidade com manifestações clínicas complexas dividida em duas principais formas: leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose cutânea (LC), sendo a última subdividida em formas localizada (LCL), difusa (LVD) e mucocutânea (LMC).

A leishmaniose é causada por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, cuja transmissão para o homem envolve vetores da família Psychodidae, conhecidos como flebotomíneos.

1.1.1 Leishmaniose Visceral

A LV é usualmente causada pelas espécies *Leishmania donovani*, *L. infantum* e *L. infantum chagasi* e é caracterizada por febre progressiva, perda de peso, esplenomegalia, hipergamaglobulinemia e pancitopenia (Camargo-Neves et al., 2006). Complicações incluem imunossupressão e infecção bacteriana secundária, hemorragia e anemia (Bern et al., 2008). A LV é letal em praticamente todos os casos não tratados (Desjeux, 1996) e em pacientes tratados os níveis de fatalidade estão entre 10% ou mais. Os sinais associados com alto risco de mortalidade são icterícia, debilidade, anemia severa e co-infecção com HIV (Bern et al., 2004; Collin et al., 2004; Rey et al., 2005).

A LV é endêmica em 70 países, com alta incidência no Sul da Ásia, onde foram estimados 300 mil casos no ano de 2006. A incidência de LV relatada no Brasil dobrou de 1.500 casos por ano em 1980 para mais de 3.000 casos entre 2000 e 2005. Em 2006 chegou a 4.000 casos relatados, representando o país com a terceira maior concentração de casos de LV (revisado em Alvar, 2008). No ano de 2009, a região nordeste contabilizou 47% dos casos brasileiros, com destaque para o estado do Ceará apresentando 629 casos (Brasil, 2010a). Atualmente, esta enfermidade ocorre em áreas urbanas, periurbanas e rurais como o Oeste do estado de São Paulo e Sul do Mato Grosso do Sul, em adição ao tradicional endêmico nordeste (Camargo-Neves et al., 2006).

1.1.2 Leishmaniose Cutânea

A LC é mais frequentemente causada por *L. major e L. tropica* no velho mundo e *L. braziliensis, L. mexicana* e espécies relacionadas no novo mundo (revisado em Reithinger et al., 2007). A cicatrização espontânea da lesão pode ocorrer, mas requer meses ou anos, dependendo da espécie causadora (Bern et al., 2008). A leishmaniose mucocutânea (LMC) usualmente ocorre meses ou anos após a cicatrização da LC primária. Na maioria das áreas endêmicas, 1 a 10% dos pacientes com LCL evoluem para a forma mucosa (revisado em Reinthinger et al., 2007). Esta forma da doença é mais comumente causada pela *L. braziliensis* e pode causar destruição do septo nasal, palato e outras estruturas de mucosa, evoluindo para mutilação facial e, raramente, morte por envolvimento das vias aéreas (Marsden, 1990). Outras formas complicadas incluem a LCD, que consiste em uma doença nodular não-ulcerativa que se dissemina do sítio inicial de infecção para todo o corpo do paciente e a leishmaniose recidivante, localizada em lesões não cicatrizadas com lenta progressão. Ambas são raras, severas e difíceis de tratar (Bern et al., 2008).

A LC está presente em pelo menos 82 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Afeganistão, Argélia, Irã, Arábia Saudita, Síria, Brasil, Colômbia, Peru e Bolívia com incidência estimada de 1,5 milhões de casos anuais (revisado em Desjeux, 2004; Modabber et al., 2007). Nas Américas, a LC ocorre em todos os países, dos Estados Unidos à Argentina, com exceção do Uruguai e Chile (revisado em Bern et al., 2008), sendo que a maior incidência de LC se dá no Brasil com mais de 21.824 casos no ano de 2009 (Brasil, 2010b).

1.1.3 Coinfecção Leishmania x HIV

Um fator que favorece o aumento na incidência de leishmaniose é a associação com quadros de imunossupressão como ocorre em pacientes portadores do HIV que desenvolvem a síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS). O primeiro caso de leishmaniose associada à infecção por HIV foi identificado em 1985 e, desde então, o número de casos tem aumentado significativamente (Alvar et al., 2008). A co-infecção *Leishmania*/HIV está registrada em 35 países (Alvar et al., 2008) de vários continentes - Ásia, África, América do Sul (inclusive o Brasil) e Europa - com aproximadamente 2 mil casos notificados até o ano 2000, a maioria dos quais diagnosticados em países do Sudoeste Europeu como a Espanha, Portugal, França e Itália (Alvar et al., 1997; Camargo-Neves et al., 2006). A infecção por HIV aumenta o número de casos de LV em áreas endêmicas, reduz a probabilidade de resposta à terapia e aumenta as chances de recidiva ao mesmo tempo que a LV promove a progressão clínica da AIDS (Gradoni et al., 1996; Lopez-Velez et al., 1998; Pintado et al., 2001; Rosenthal et al., 1995). A LV e a AIDS exercem um efeito prejudicial sinérgico na resposta imune porque ambas atingem células do sistema imune celular (Olivier et al., 2003; Olivier et al., 2003).

O maior número de casos de co-infecção *Leishmania*/HIV foi reportado na Espanha em 2001 onde 57% dos casos mundiais registrados estavam concentrados (Desjeux e Alvar, 2003). Já no Brasil este percentual se apresenta inferior. Durante o período entre 2001 a 2005 apenas 0,1% dos pacientes com LC e 2% dos pacientes com LV estavam co-infectados com HIV (Maia-Elkhoury et al., 2007). No entanto, a ampliação da área de distribuição geográfica da AIDS e sua expansão para camadas mais pobres da população e a crescente urbanização da LV, faz supor que a prevalência da co-infecção *Leishmania*/HIV venha a aumentar nos próximos anos (Camargo-Neves et al., 2006). No geral, as formas clínicas normalmente encontradas entre os casos de co-infecção estão distribuídas em: 43% LMC, 37% LV e 20% LC (Rabello et al., 2003).

O espectro clínico observado nos pacientes indica a complexidade da leishmaniose: diversas espécies de *Leishmania* podem causar a doença e muitas espécies de flebotomíneos e mamíferos têm sido implicados como vetores e reservatórios, respectivamente (revisado em Reinthinger et al., 2007). Além disso, o estabelecimento da infecção primária por *Leishmania* e o desenvolvimento da doença são dependentes de fatores como linhagem do

parasita, hospedeiro, vetor, dose ou via de inoculação e ativação ou não dos macrófagos (revisado em Basu e Ray, 2005). A patogênese depende de vários fatores relacionados às respostas imunes inata e adquirida do hospedeiro (por exemplo, recrutamento de macrófagos, neutrófilos, células "natural killer", células dendríticas) (Scott, 2005).

1.2 Ciclo de Vida

O ciclo de vida de *Leishmania* é caracterizado por três diferentes formas e múltiplas variações que garantem sua sobrevivência nos hospedeiros. Basicamente, os macrófagos infectados são tomados pelo inseto onde, por lise celular, são liberadas as formas intracelulares conhecidas como amastigotas. No inseto, os parasitas atingem o intestino médio onde se diferenciam nas formas multiplicativas denominadas promastigotas procíclicas. Estas últimas transformam-se nas formas promastigotas metacíclicas, que são infectivas para o hospedeiro mamífero. Esse processo é conhecido como metaciclogênese. Finalmente, durante o repasto sanguíneo os promastigotas são inoculados no hospedeiro mamífero misturados com a saliva do inseto. Uma vez dentro do hospedeiro mamífero, as formas infectivas são fagocitadas pelos macrófagos transformando-se em formas amastigotas, que se multiplicam até a ruptura da célula hospedeira invadindo rapidamente outras células (Bates, 2004; Gossage et al., 2003; Laison e Shaw, 1987).

1.3 Prevenção e controle

O Programa de Controle da Leishmaniose no Brasil é baseado em três principais medidas aplicáveis à transmissão de LV: diagnóstico e tratamento de casos humanos, controle dos vetores com o uso de inseticidas e triagem sorológica com posterior eutanásia de cães positivos para leishmaniose. Estas estratégias de controle permanecem inalteradas desde o ano de 1950 (revisado em Dantas-Torres e Brandão-Filho, 2006) e infelizmente não foram suficientes para reduzir a incidência de casos humanos (Braga et al., 1998; Costa e Vieira, 2001). Ao contrário, a prevalência da leishmaniose tem aumentado a cada ano e a doença tornou-se um sério problema de saúde pública em diversos estados brasileiros.

Em geral, o controle do vetor é uma das mais importantes medidas no controle das doenças transmitidas por vetores, porém seu controle acaba sendo limitado devido a

dificuldade de encontrar seus locais de reprodução e as formas imaturas destes insetos (Dantas-Torres e Brandao-Filho, 2006).

1.4 Tratamento

O tratamento da leishmaniose apresenta múltiplos problemas, com resultados frequentemente imprevisíveis e insatisfatórios (Hepburn, 2000). Atualmente existem aproximadamente 25 compostos e formulações que apresentam efeito anti-leishmânia, mas somente poucos deles tem se mostrado bem sucedidos para uso no tratamento da doença (Monzote, 2011). Devido ao fato dos esquemas terapêuticos atualmente utilizados serem potencialmente tóxicos, de administração parenteral na maioria dos casos obrigatória e/ou caros, a terapia da leishmaniose é ainda uma questão complexa, especialmente para indivíduos imunossuprimidos.

Para a LV a quimioterapia sistêmica é essencial sendo focada na eliminação do parasita uma vez que esta forma da doença é fatal se não tratada. Já para a LC o tratamento sistêmico é geralmente indicado para reduzir o risco de disseminação do parasita para a mucosa ou víscera, reduzir o tempo de cura, limitar a morbidade causada por uma lesão de pele grande ou persistente e reduzir as chances de recidiva. O tratamento intralesional tem sido recomendado para lesões pequenas e únicas (< 5 cm) sem acometimento dos linfonodos causada por espécies que tipicamente não disseminam para a mucosa ou vísceras (como a *L. major*) (Herwaldt e Berman, 1992; Murray et al., 2005).

1.4.1 Antimoniais Pentavalentes (Sb^v)

A Organização Mundial de Saúde recomenda tratar a leishmaniose cutânea e visceral com antimoniais pentavalentes (Sb^v) (p.ex., estibogluconato de sódio ou antimoniato de meglumine – Glucantime®) na dose de 20 mg/kg/dia por 20-28 dias consecutivos (revisado em Reinthinger et al., 2007), evitando ultrapassar o limite de 850 mg de antimônio por dia, devido à sua elevada toxicidade (Balana-Fouce et al., 1998). No entanto, o uso dos Sb^v é limitado pelo alto custo, administração parenteral obrigatória e efeitos adversos, alguns dos quais bastante graves como: arritmias cardíacas, nefro, pancreato e hepatotoxicidade (Kayser et al., 2001). Trata-se de um medicamento contra-indicado para indivíduos com

sensibilidade à droga, determinadas condições crônicas, crianças muito jovens, gestantes e lactantes (revisado em Armijos et al., 2004).

Recentes estudos em modelos animais de leishmaniose incluem o desenvolvimento de formulações de Sb^V associadas a lipossomos e beta-metilciclodextrina (β-CD). O uso de lipossomos tem sido até agora o melhor método para melhorar a atividade do antimonial contra a LV uma vez que resulta no direcionamento da droga para o sítio de infecção (Collins et al., 1993). A β-CD tem sido amplamente utilizada para aumentar a solubilidade e consequentemente a biodisponibilidade oral de certas drogas (Irie e Uekama, 1997). A associação do Glucantime® à β-CD aumentou três vezes a absorção do Sb^v pela via oral, provando ser uma formulação ativa em um modelo murino de LC (Demicheli et al., 2004).

Apesar do uso clínico dos antimoniais por mais de meio século, seu mecanismo de ação ainda não está completamente esclarecido. Goodwin e Page, em 1943, sugeriram que os Sb^v atuam como uma pró-droga sendo convertido a antimônio trivalente (Sb^{III}) no local de ação ou próximo dele (Goodwin e Page, 1943). Porém, até agora, a biomolécula que promove a redução do Sb^v ao Sb^{III} e o local onde esta reação ocorre ainda não foram identificados (Frezard et al., 2001). O Sb^{III} é tóxico para as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* e acredita-se que ele interfere no processo de β-oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasita, levando à depleção dos níveis de ATP intracelular (Balana-Fouce et al., 1998).

A eficiência desses compostos tem-se reduzido significativamente devido à resistência que os parasitas adquiriram nos últimos 15 anos, principalmente no nordeste da Índia. Acredita-se que a resistência surgiu devido ao fato do tratamento ser de longa duração, doloroso e de alto custo, levando os pacientes a interromperem a terapia precocemente. Além disto, nesta região o ciclo do parasita é antroponótico, o que favorece a seleção dos parasitas resistentes (Hadighi et al., 2006). No caso do Brasil, estudos determinaram a eficácia do tratamento com Glucantime®. Em regiões endêmicas de infecção por *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, nos estados da Bahia e Amazonas, respectivamente, a taxa de cura após terapia com Sb^v se apresentou baixa no ano de 2001 com 50,8% de cura nos pacientes do estado da Bahia e apenas 26,3% no Amazonas (Romero et al., 2001). Outro estudo mais atual realizado na região Amazônica mostrou que o tratamento com Glucantime® em pacientes com LC levou a índices de cura inferiores a 55% (Chrusciak-Talhari et al., 2011). Apesar destes fatos, Reinthinger et al. reuniram dados disponíveis na literatura

e concluíram que o Sb^V administrado parenteralmente ou intra-lesionalmente continua sendo o medicamento de primeira escolha no tratamento da leishmaniose (Reithinger et al., 2007). As drogas de segunda escolha no tratamento desta doença incluem anfotericina B e pentamidina.

1.4.2 Anfotericina B

Durante a última década a anfotericina B (AmB) foi amplamente utilizada no tratamento da LV. O principal mecanismo de ação desta droga está relacionado à formação de poros na membrana plasmática do parasita, capazes de alterar o balanço iônico e resultar na morte celular (revisado em Croft e Coombs, 2003; Neumann et al., 2010).

Como o uso da AmB é limitado pela sua toxicidade e reações adversas, várias formulações lipídicas menos tóxicas foram desenvolvidas (por exemplo, AmBisome®, Amphocil®, e Abelcet®). A AmB lipossomal apresenta o melhor índice terapêutico dentre as drogas anti-*Leishmania* atuais (Lachaud et al., 2009) e tem demonstrado sucesso em pacientes com LC e LV, particularmente em áreas onde a resistência aos antimoniais tem sido reportada (Berman, 2005; Desjeux, 2004; Mishra et al., 2007), porém seu alto custo tem restringido seu uso (Nonata et al., 1997). Nestas formulações o desoxicolato foi substituído por lipídios que reduzem a toxicidade da AmB e facilitam sua absorção pelas células do sistema reticuloendotelial aumentando sua eficácia (Berman, 2005; Desjeux, 2004; Mishra et al., 2007). A AmB lipossomal é indicada, ainda que cautelosamente, como tratamento de escolha para pacientes com LV em insuficiência renal devido à sua eliminação extra-renal (Craven et al., 1979) e à ausência de medicamentos mais seguros.

Segundo a Société de Patologie Exotique, na França, a AmB lipossomal é a opção de primeira escolha para a LV em pacientes imunocompetentes e imunossuprimidos (doses acumuladas de 20 mg/kg e 30-40 mg/kg, respectivamente). Para pacientes com forte imunossupressão é recomendada a profilaxia com AmB lipossomal, pentamidina e antimoniato de meglumine por até seis meses até que a imunidade seja restaurada (revisado em Buffet, 2011).

O sucesso do uso da AmB no tratamento da LV não pode necessariamente ser extrapolado para a LC, devido à farmacocinética da AmB lipossomal na doença cutânea não estar bem estabelecida. Embora existam relatos de que o acúmulo da droga na derme seja

insuficiente (Gregoriadis, 1991) a administração intravenosa da AmB lipossomal se mostrou eficaz contra LC experimental (Yardley e Croft, 1997). Um estudo prospectivo não randomizado realizado por Solomon et al. em 2007, comparando a AmB lipossomal com o estibogluconato de sódio para o tratamento da LC causada por *L. braziliensis*, não encontrou nenhuma falha no grupo tratado com AmB lipossomal e poucos efeitos adversos (Solomon et al., 2007). Além disso, outros estudos têm avaliado o uso da AmB lipossomal no tratamento de pacientes imunocompetentes e imunossuprimidos com LC e LMC adquiridas na América do Sul (Bolívia, Peru e Brasil) (Amato et al., 2004; Campos-Munoz et al., 2007; Crofts, 1976; del Rosal et al., 2010; Di Lella et al., 2006; Sampaio et al., 1971).

1.4.3 Pentamidina

A pentamidina (diamidina) é mais tóxica e menos eficaz do que os compostos já mencionados. Durante um curto período de tempo a pentamidina foi utilizada como a droga de segunda linha para pacientes refratários aos Sb^V (Jha et al., 1991). Seu mecanismo de ação leishmanicida inclui inibição da biossíntese de polimerases, interação com a molécula de DNA impedindo a replicação e alteração do potencial de membrana, os quais ainda não estão claramente definidos (revisado em Croft et al., 2006). O uso da pentamidina é reservado apenas aos casos de falha terapêutica das duas drogas anteriormente citadas.

1.4.4 Miltefosina

Diversos estudos tem proposto terapias alternativas para o tratamento da leishmaniose. Dentre estas, talvez a mais promissora refere-se à utilização de miltefosina, uma droga de administração oral que se mostrou eficaz em testes clínicos no tratamento da LV em pacientes indianos (Sundar et al., 2002).

Machado et al. em 2010 realizaram um estudo randomizado e controlado que avaliou a eficácia e segurança de miltefosina *versus* Sb^v para o tratamento da LC em uma área endêmica para *L. braziliensis* na Bahia. Seis meses após o tratamento a taxa de cura do grupo tratado com Sb^v foi de 53.3% e com miltefosina de 75%. A miltefosina foi mais efetiva que o Sb^v para pacientes na faixa etária de 13 a 65 anos (Machado et al., 2010). As razões para a

miltefosina ser mais efetiva que o antimônio nos adultos e ter eficácia similar em crianças não são completamente compreendidas.

O mecanismo de citotoxicidade exato da miltefosina em *Leishmania* spp. ainda não foi determinado, embora muitos grupos tem se interessado e desenvolvido pesquisas sobre este assunto. Verma e Dey (2004) demonstraram que miltefosina causa morte por apoptose em promastigotas de *L. donovani*, assim como em amastigotas extra e intracelulares (Verma e Dey, 2004).

Miltefosina tem sido utilizada na Índia de forma segura e efetiva no tratamento de LV e também vem sendo estudada em pacientes com LC e imunossuprimidos com infecção por HIV (Ritmeijer et al., 2006; Sinermann et al., 2004; Sundar et al., 2002). Apesar deste sucesso, seu uso ainda é limitado devido ao seu potencial teratogênico (Croft e Coombs, 2003); à existência de linhagens de *L. donovani* resistentes à droga (Perez-Victoria et al., 2003) e à sua eficácia variável em diferentes regiões geográficas (Soto et al., 2008).

1.4.5 Paromomicina

Um tratamento alternativo ainda em fase de testes clínicos é o uso de paromomicina por via tópica que se mostrou efetiva contra *L. major* (Armijos et al., 2004). Diversas preparações tópicas de paromomicina foram testadas em associação com cloreto de metilbenzetonio, uréia e gentamicina. Estas formulações tem mostrado resultados variáveis de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida e da situação epidemiológica (Sundar e Chakravarty, 2008).

O mecanismo de ação deste composto parece estar relacionado à interferência na atividade mitocondrial do parasita, por meio da inibição da respiração celular e despolarização da membrana (Croft e Coombs 2003; Croft et al., 2006). Assim como ocorre com miltefosina, a resistência à paramomicina pode ser induzida experimentalmente em promastigotas de *L. donovani in vitro*. A resistência é específica para a paromomicina, estável e seu mecanismo parece estar relacionado à diminuição do acúmulo intracelular da droga (Maarouf et al., 1998). A paromomicina foi descrita como uma alternativa viável para as populações endêmicas com pouco acesso aos antimoniais ou para indivíduos em que o uso de Sb^{v} é contra-indicado.

1.4.6 Outras alternativas

Diferentes estratégias vem sendo desenvolvidas para se pesquisar novas drogas anti-leishmânia como a otimização da terapia com drogas existentes, identificação dos sítios ativos de drogas anti-parasitárias atuais e desenvolvimento de compostos análogos, terapia combinada com drogas convencionais e exploração de produtos naturais (Na-Bangchang e Karbwang, 2009).

Monzote realizou um levantamento sobre todas as drogas leishmanicidas atuais já patenteadas (Monzote, 2011). Além das anteriormente citadas outras drogas já clinicamente utilizadas incluem azois (fluconazol, cetoconazol, itraconazol e posaconazol) (Al-Abdely et al., 1999; Alrajhi et al., 2002), alopurinol (Koutinas et al., 2001) e sitamaquina (Dietze et al., 2001).

Uma nova alternativa é a azitromicina, um antibiótico macrolídeo que possui diversas características favoráveis, como: via de administração oral ou intravenosa; meia-vida longa (Lalak e Morris, 1993); acúmulo nos tecidos, especialmente nos macrófagos (Gladue et al., 1989); ausência de contra-indicação para o uso em crianças e mulheres grávidas e efeitos tóxicos leves (Steigbigel, 1995). Estudos envolvendo *L. major* demonstraram efeitos diretos da droga sobre a viabilidade do parasita (Krolewiecki et al., 2002).

Outros compostos que demonstraram atividade anti-leishmânia e também anti-tripanossoma são os bifosfonatos que atualmente são utilizados no tratamento da osteoporose, doença de Paget e hipercalcemia (Martin et al., 2001). Além disso, inúmeros compostos derivados de partes de plantas ou mesmo de extratos vegetais mostraram-se ativos contra *Leishmania* spp. (revisado em Sen e Chatterjee, 2011). Um exemplo diz respeito à atividade de *Drimys brasiliensis miers* (Winteraceae), mais conhecida como casca-d'anta ou cataia, que já é utilizada na medicina popular brasileira graças às suas propriedades analgésicas e anti-inflamatórias. O extrato hexano bruto desta planta assim como o seu principal derivado, o serquiterpeno poligodial, mostraram-se ativos contra formas promastigostas e amastigotas de várias espécies de *Leishmania in vitro* na faixa entre 22 e 62 µg/ml, sendo que curtos períodos de incubação resultaram em intensos danos ultraestruturais no parasita (Correa et al., 2011).

Outros compostos naturais também vem sendo testados, a exemplo de metabólitos oriundos de organismos marinhos contra variadas espécies de *Leishmania*. Tempone et al.

reuniram diversos dados que demonstram a potente atividade leishmanicida de diversos metabólitos secundários isolados de macro e microorganismos marinhos como peptídios, terpenoides, alcaloides e esteroides (Tempone et al., 2011).

A terapia combinada de medicamentos leishmanicidas já existentes tem sido uma estratégia alternativa interessante que possui certas vantagens teóricas como a possibilidade de sinergismo, toxicidade reduzida, menor tempo de tratamento e menor probabilidade de desenvolvimento de resistência (Pink et al., 2005). Algumas terapias combinadas em estudo são: estibogluconado de sódio com paromomicina (Melaku et al., 2007), com alopurinol (Llanos-Cuentas et al., 1997), com miltefosine (Omollo et al., 2011) e com IFNγ (Sundar et al., 1997) e miltefosine com AmB lipossomal (Omollo et al., 2011).

Apesar do desenvolvimento de novos fármacos e da busca por compostos com atividade leishmanicida, os antimoniais pentavalentes, anfotericina B, pentamidina, paromomicina e miltefosina ainda constituem as principais opções terapêuticas para a leishmaniose. Todas elas possuem diversas desvantagens importantes conforme exposto anteriormente. Desta forma, devido à resistência aos antimoniais já reportada para isolados de *Leishmania* e à ausência de um medicamento ideal para o tratamento da leishmaniose, a busca por novas alternativas quimioterápicas torna-se imprescindível. Com base nessa urgente necessidade, foram iniciadas pesquisas em nosso laboratório com o intuito de verificar o potencial leishmanicida de compostos anticâncer, dentre eles o tamoxifeno ([Z]-2-[4-(1,2-difenil-1-butenil)-fenóxi]-N,N-dimetiletanamina), um conhecido quimioterápico utilizado no tratamento do câncer de mama.

1.5 Tamoxifeno

O tamoxifeno é um modulador seletivo do receptor de estrógeno (SERM) que se tornou o tratamento de escolha para mulheres com câncer de mama responsivo a hormônio em todos os estágios (ambos receptor de estrógeno e/ou progesterona positivos) (Powles, 1997). Inicialmente, na década de 1960, pesquisadores pensavam que à semelhança do que ocorria em ratos (Harper e Walpole, 1967a; Harper e Walpole, 1967b), o tamoxifeno promovesse uma ação contraceptiva em mulheres. No entanto, ocorreu o oposto, ele induziu a ovulação (Klopper e Hall, 1971; Williamson e Ellis, 1973), sendo utilizado até hoje em mulheres sub-férteis com um eixo hipotálamo-pituitária-ovário funcional. O primeiro uso

clínico do tamoxifeno para o carcinoma de mama foi descrito por Kistner e Smith em 1960 (Ward, 1973), sendo aprovado em 1973 como uma opção alternativa para o tratamento hormonal do câncer de mama no Reino Unido. Desde então, ele é o quimioterápico mais prescrito no mundo (Goss et al., 2005). Atualmente nos EUA ele também é utilizado como agente quimioprotetor em mulheres com alto risco de desenvolver câncer de mama, reduzindo a incidência da doença em 50% nas pacientes em pré- ou pós-menopausa (Cuzick et al., 2003; Fisher et al., 1998). O tamoxifeno é usualmente administrado em doses diárias de 20 mg atingindo concentrações teciduais próximas a 30 μM (Altan et al., 1999).

Segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, existe uma significativa associação entre o uso do tamoxifeno e o risco de desenvolvimento de carcinoma endometrial (Williams-Brown, 2011). Em adição, esta droga induz patologias uterinas benignas, como hiperplasia e polipose proliferativa, além de aumentar o risco de eventos trombo-embólicos (Singh et al., 2007). Contudo, o aparecimento destes efeitos é em grande parte descrito em pacientes tratados com tamoxifeno por períodos prolongados (Bergman et al., 2000).

Por causa da sua ação pró-estrogênica em outros tecidos alvo, o uso do tamoxifeno é associado com vários efeitos benéficos, como: manutenção e/ou, até certo ponto, restauração da densidade mineral dos ossos de mulheres na menopausa (Love et al., 1992), redução do colesterol sérico responsável pela redução de infartos agudos do miocárdio e angina (Chang et al., 1996) e indução da ovulação em pacientes com ovário policístico (Steiner et al., 2005).

Além disso, o tamoxifeno possui atividades independentes da interação com o receptor de estrógeno, como: proteção contra a peroxidação lipídica (Wiseman e Halliwell, 1994), modificação da atividade da proteína quinase C (PKC) (Gundimeda et al., 1996), ativação da sinalização de segundos mensageiros lipídicos (Cabot et al., 1995), antagonismo da calmodulina (Rowlands et al., 1990) e redução dos níveis de nucleotídeos cíclicos (Lopes et al., 1990). Além disso, o tamoxifeno influencia vários aspectos do metabolismo de lipídios em células intactas e tecidos por mecanismos ainda não determinados.

Outro efeito do tamoxifeno independente de receptor de estrógeno é a sensibilização de células tumorais resistentes a quimioterápicos. Altan et al. (1999) verificaram que estas células sequestram a adriamicina em organelas ácidas distantes do seu local de ação e que o tamoxifeno promove a redistribuição da droga para o núcleo. A

determinação do pH subcelular mostrou que o tamoxifeno causa alcalinização das organelas acídicas sem afetar significantemente o pH citosólico ou nuclear (Altan et al., 1999).

Estudos prévios em nosso laboratório mostraram que o tamoxifeno é ativo contra várias espécies de *Leishmania in vitro* (Miguel et al., 2007) e *in vivo* (Miguel et al., 2008; Miguel et al., 2009). A partir disso, desenvolvemos estratégias experimentais para investigar possíveis mecanismos de ação do tamoxifeno capazes de explicar seu efeito leishmanicida. Os dados disponíveis na literatura sobre os efeitos do tamoxifeno em células tumorais incluem uma variedade de alvos metabólicos, dentre eles a via de biossíntese das ceramidas (Cabot et al., 1996).

A ceramida constitui o esqueleto de vários esfingolipídios (SLs) de importância biológica presentes em células de mamíferos. Os SLs são componentes essenciais da membrana de eucariotos pluricelulares e unicelulares, incluindo protozoários da família Kinetoplastidae, como *Leishmania* (Sutterwala et al., 2008).

1.6 Os Esfingolipídios

Os esfingolipídios (SLs) atuam como importantes mediadores da sinalização celular, além de participarem em vários aspectos críticos e fundamentais da biologia celular, incluindo endocitose, resposta ao estresse, crescimento, diferenciação, apoptose e oncogênese (Shayman, 2000). Eles são encontrados preferencialmente em membranas plasmáticas do retículo endoplasmático, Golgi e lisossomos, mas também foi demonstrada sua presença em membranas de mitocôndria (Bionda et al., 2004) e do núcleo (Watanabe et al., 2004).

A estrutura característica destas moléculas é uma base esfingoide ou base de cadeia longa constituída, em geral, por 18 a 20 átomos de carbono, contendo grupamentos hidróxi no carbono-1 (C-1) e no carbono-3 (C-3) e um grupamento amino no carbono-2 (C-2), com saturação ou não entre os carbonos 4 e 5 e grupos metila inseridos ao longo da cadeia carbônica (Figura 1). Estima-se mais de 60 diferentes tipos de bases esfingoides, sendo que as principais encontradas em eucariotos são: esfingosina, esfinganina ou dihidroesfingosina e a 4-hidroxiesfingosina ou fitoesfingosina (Figura 1). As bases esfingoides podem ser N-aciladas no grupamento amino livre do C-2 por um ácido graxo, gerando a ceramida (Figura 1). Os ácidos graxos da ceramida variam no tamanho da cadeia (14 a 30 carbonos), grau de

insaturação (mas são principalmente saturados) e presença ou ausência de um grupo hidroxila (revisado em Merril e Sandhoff, 2002).

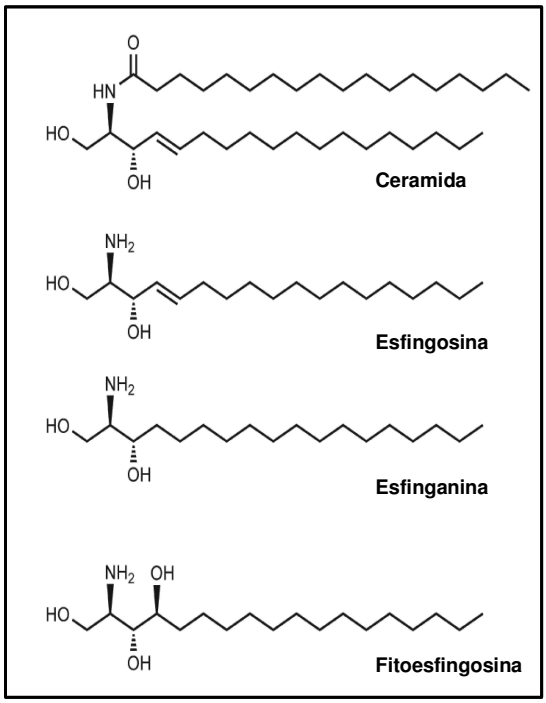


Figura 1. Estrutura de C18-ceramida e de bases esfingóides: esfingosina, esfinganina e fitoesfingosina.

Além disso, componentes polares podem ser adicionados à hidroxila do C-1 por uma ligação fosfodiéster ou glicosídica formando os diferentes SLs (Nelson, 2002). Este grupamento polar divide os SLs em diferentes subclasses: (1) os fosfoesfingolipídios (PSL) [modificados com fosfocolina no grupamento polar formam esfingomielinas, com fosfoetalonamina gerando etalonamina fosforilceramida ou com fosfatidil inositol formando inositolfosforilceramida (IPC)]; (2) os glicoesfingolipídios (GSL) neutros (com açúcares não carregados no grupamento polar como a glicose, galactose, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina e frutose formando os cerebrosídios); (3) os GSL ácidos (com um oligossacarídeo no grupamento polar e com grupos ionizados como o fosfato, sulfato ou ácido siálico formando os gangliosídios); (4) os GSL básicos e (5) os GSL anfipáticos (Merril e Sandhoff, 2002; Nelson, 2002).

O principal PSL em mamíferos é a esfingomielina, embora a etalonamina fosforilceramida também esteja presente. Ao contrário do observado em mamíferos e plantas, os parasitas do gênero *Leishmania* não sintetizam esfingomielina e

glicoesfingolipídios complexos (Kaneshiro et al., 1986). Neste caso, o esfingolipídio predominante é o IPC (Figura 2) que corresponde a cerca de 5 a 10% dos lipídios totais de membrana (Kaneshiro et al., 1986). Já *Trypanosoma cruzi* sintetiza IPC (Figueiredo et al., 2005) e esfingomielina (Oliveira et al., 1977), enquanto que *T. brucei* sintetiza esfingomielina, etalonamina fosforilceramida e IPC (Sutterwala et al., 2008). A abundância de IPC em *Leishmania* e sua ausência em células de mamíferos têm sugerido que esta via pode ser um bom alvo para intervenção terapêutica (Denny et al., 2004).

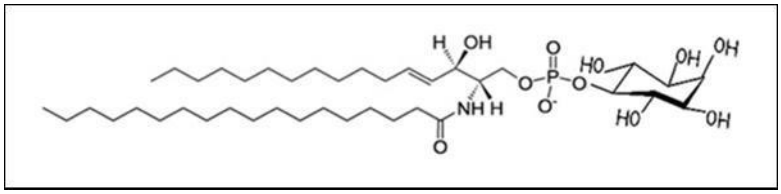


Figura 2. Estrutura de inositolfosforilceramida (IPC).

A glucosilceramida, galactosilceramida e lactosilceramida são os mais comuns GSLs neutros em organismos superiores. Plantas e fungos contém GSLs com carboidratos de estruturas relativamente simples, enquanto que os animais possuem uma grande variedade de GSLs, desde os simples aos mais complexos (revisado em Merril e Sandhoff, 2002).

GSLs neutros tem sido isolados de amastigotas de *L. amazonensis* e parecem exercer papel na invasão do parasita, uma vez que anticorpos monoclonais específicos para os epítopos dos seus carboidratos bloquearam a invasão do amastigota no macrófago (Straus et al., 1993). A origem destes GSLs neutros é desconhecida, uma vez que eles podem ser sintetizados pelo parasita ou resgatados do hospedeiro mamífero.

Os SLs podem se associar com o colesterol e proteínas de membrana plasmática, em particular as proteínas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI), formando microdomínios conhecidos como “lipid rafts” (Brown e London, 1998; Simons e Ikonen, 1997). Em promastigotas de *L. major* estes rafts correspondem a 10% da composição lipídica total (revisado em Zhang e Berveley, 2010). Em eucariotos, esses microdomínios de membrana tem sido implicados em um grande número de funções celulares, incluindo tráfico de proteínas ancoradas por GPI na membrana apical de células epiteliais (Brown e London, 1998), triagem endocítica de proteínas ancoradas por GPI (Chatterjee et al., 2001),

modulação da transdução de sinal da imunoglobulina E em mastócitos e basófilos (Baird et al., 1999) e de receptores de antígenos das células T e B (Magee et al., 2002; Pierce, 2002).

Além disso, os SLs contribuem para a estabilidade de outros tipos de estruturas biológicas, como os corpos lamelares que mantém a permeabilidade da barreira da pele e lipoproteínas. Os SLs são também reconhecidos por vírus, bactérias e toxinas bacterianas como uma forma de se ligar e invadir a célula via membrana plasmática (revisado em Merril e Sandhoff, 2002).

1.6.1 A via de biossíntese de ceramida

Em eucariotos, a síntese *de novo* de ceramida (Figura 3), precursora dos SLs, se inicia com a condensação do palmitoil CoA e serina, formando 3-cetoesfinganina (Brady e Koval, 1958), pela ação da enzima serina palmitoil transferase (SPT). A redução para a formação de esfinganina (dihidroesfingosina) é então catalisada pela 3-cetoesfinganina redutase, a qual é dependente de NADPH (Stoffel et al., 1968). A dihidroceramida (N-acilesfinganina) é formada pela reação de acilação da esfinganina catalizada pela enzima ceramida sintase na presença de acil-CoA. Por fim, a enzima dihidroceramida desaturase promove uma reação de desaturação gerando a ceramida (*N*-acilesfingosina) no retículo endoplasmático, que é então convertida em SLs complexos no aparato de Golgi. Em geral, todas as enzimas associadas com a síntese *de novo* da ceramida estão presentes no retículo endoplasmático (Mandon et al., 1992).

Em *L. major*, a maioria das moléculas de IPC contem uma base esfingoide de 16 carbonos (d16:1), o que sugere que a SPT de *L. major* utilize preferencialmente o miristoil CoA como substrato para a condensação com serina (Hsu et al., 2007). Tal fenômeno difere das células de mamífero e de leveduras (*S. cerevisiae*) que utilizam majoritariamente palmitoil CoA na síntese de seus SLs (Pinto et al., 1992; Williams et al., 1984).

Outro meio para a formação da ceramida é a via de salvação, onde a ceramida pode ser formada pela hidrólise da esfingomielina, dos cerebrosídeos ou a partir de bases esfingoides livres.

Embora as leishmânias não sintetizem esfingomielina, foi demonstrado que promastigotas de *L. major* possuem uma IPC hidrolase (ISC1p) com atividade de esfingomielinase (SMase), sugerindo que o parasita degrade a esfingomielina do hospedeiro,

o que possivelmente auxiliaria na sua sobrevivência no interior do macrófago (Zhang et al., 2009). Quatro anos antes o mesmo grupo sugeriu algo semelhante sobre a importância da via de salvação nestes parasitas baseados no estudo com mutantes de *Leishmania* deletados para a SPT. Como estes amastigotas não possuíam a síntese de novo de SLs e continham quantidades suficientes de IPC, um SL ausente em células de mamífero, provavelmente estas células sejam capazes de adquirir e remodelar os lipídios do hospedeiro em SLs e PLs próprios (Zhang et al., 2005), utilizando a via de salvação para síntese de ceramidas.

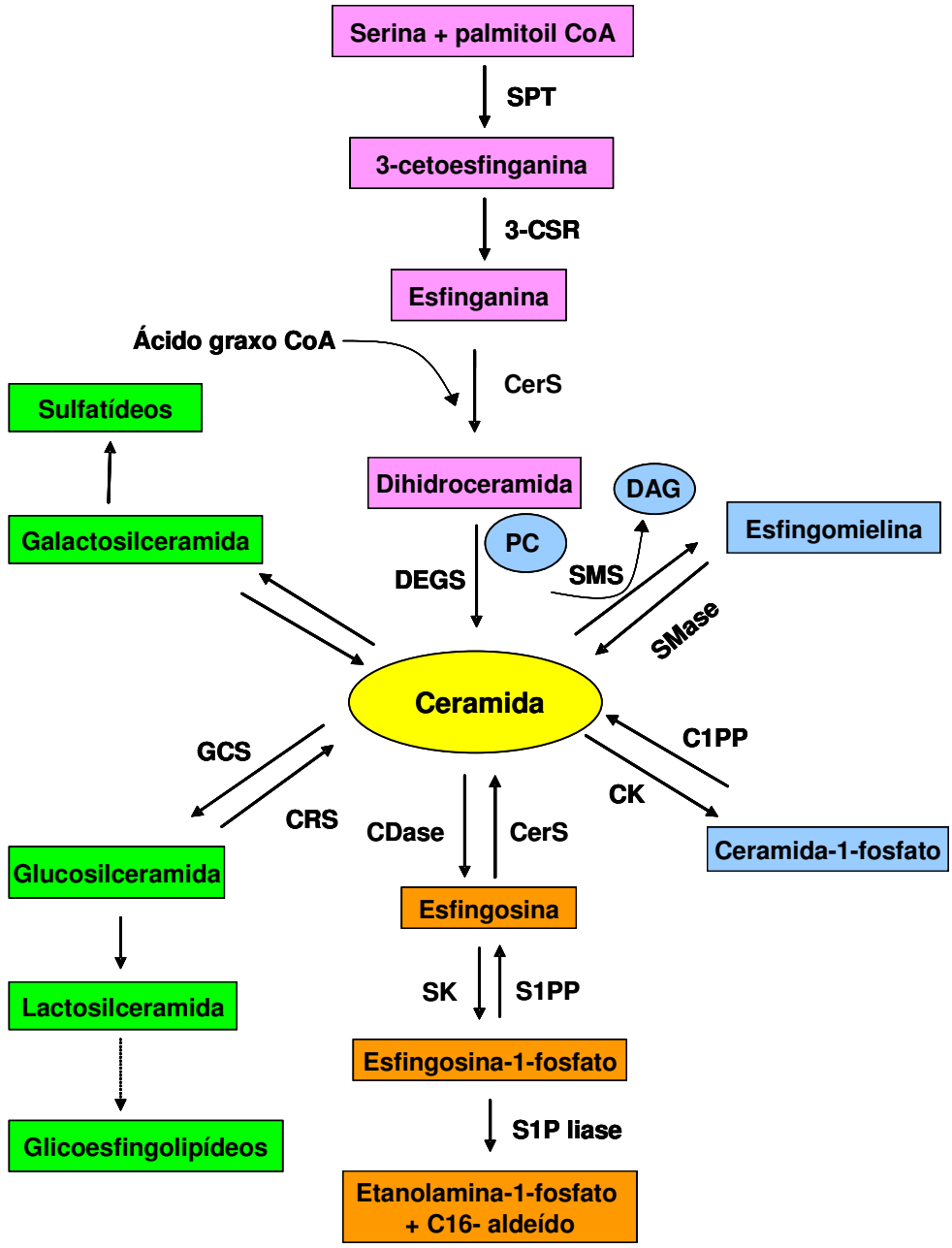


Figura 3. Esquema simplificado da via de biossíntese dos esfingolipídios em mamíferos. A ceramida pode ser formada *de novo* (rosa), pela hidrólise da esfingomielina (azul), dos cerebrosídeos (verde), ou a partir de base esfingóide livre (laranja) e servir como substrato para a síntese de ceramida-1-fosfato, esfingomielina, glicoesfingolipídios ou esfingosina. C1PP: ceramida-1-fosfato fosfatase; CRS: cerebrosidase; CK: ceramida cinase; DAG: diacilglicerol; DES: dihidroceramida desaturase; GCS: glucosilceramida sintase; PC: fosfatidilcolina; S1PP: S1P fosfatase; SMS: esfingomielina sintase; SMase: esfingomielinase; SPT: serina palmitoil transferase; SK: esfingosina cinase; S1Pliase: esfingosina 1 fosfatase liase.

Fonte: Modificado de Ogretmen e Hannun, 2004.

A ceramida também age como precursora de outros lipídios essenciais, sendo convertida a etanolamina fosfato (EtN-P) para uso na via de Kennedy (Zhang et al., 2007) e subsequente síntese de PSLs (SM, EPC e IPC) e GPIs (Sevova et al., 2010). Em *L. major* o metabolismo de SLs e de fosfatidiletalonamina são ligados pela etanolamina fosfato, a qual pode ser gerada pela degradação de bases esfingoides fosforiladas (Zhang e Beverley, 2010).

As enzimas participantes da via de SLs de *Leishmania* que já foram caracterizadas experimentalmente incluem serina palmitoiltransferase (LmjF34.3740 e LmjF35.0320), esfingosina-1-fosfato liase (LmjF30.2350), IPC sintase (LmjF35.4990) e inositol esfingolipidiofosfolipase C-like (LmjF08.0200). Outras enzimas que ainda não foram caracterizadas, porém seus genes putativos já foram identificados no genoma de *L. major* incluem a ceramida sintase, ceramidase e esfingosina cinase (Figura 4) (Zhang e Beverley, 2010).

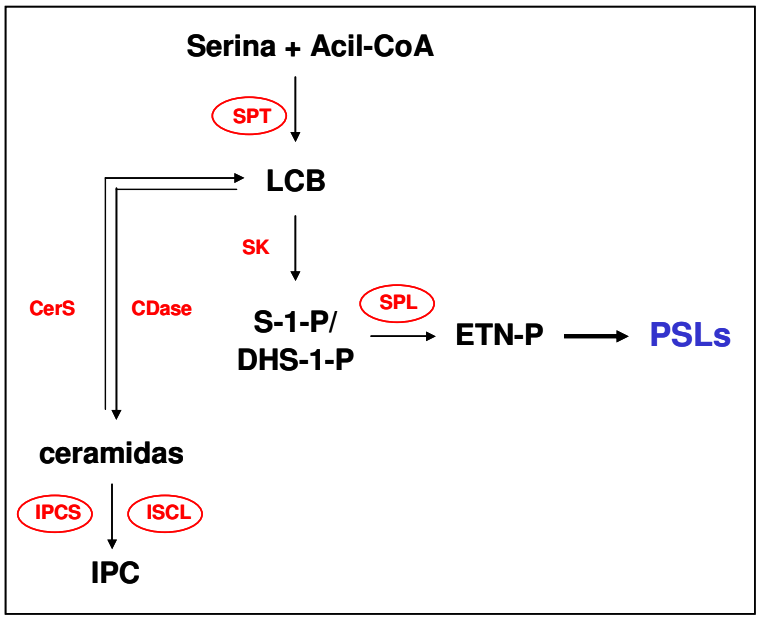


Figura 4. Via de biossíntese de esfingolipídios em *Leishmania*. SPT: serina palmitoil transferase; SK: esfingosina quinase; CerS: ceramida sintase, CDase: ceramidase, IPCS: IPC sintase, ISCL: inositol esfingolipidiofosfolipase C-like, SPL: esfingosina 1 fosfato liase, LCB: base esfingoide de cadeia longa. Fonte: Modificado de Zhang e Beverley, 2010.

A via de biossíntese *de novo* de ceramida em *L. major* foi examinada independentemente por dois grupos (Denny et al., 2004; Zhang et al., 2003). Ambos os estudos demonstraram que a expressão da subunidade 2 da SPT (enzima que participa da primeira etapa da síntese *de novo* da ceramida) é estágio regulada, sendo que a proteína

está normalmente expressa no estágio de promastigota procíclico, pouco expressa no promastigota metacíclico e indetectável no amastigota. Estas informações sugerem que a via de biossíntese *de novo* de ceramida é ativamente reduzida nas formas patogênicas de *Leishmania*. Além disso, parasitas mutantes deletados para o gene que codifica a subunidade 2 da SPT são capazes de infectar um modelo murino (Denny et al., 2004), confirmando que o primeiro passo na via *de novo* de biossíntese de ceramida é desnecessária para a sobrevivência da *Leishmania* no macrófago do hospedeiro e para sua patogênese. Provavelmente o amastigota deve compensar a ausência da síntese *de novo* sequestrando GSLs do hospedeiro *in vivo*, possivelmente como um meio de evasão do sistema imune do mamífero (Winter et al., 1994). Ao contrário das formas infectivas, os promastigotas procíclicos mutantes *spt2*$^-$ são incapazes de se diferenciar eficientemente em metacíclicos infectivos, o que resulta em atraso no estabelecimento da infecção (Denny et al., 2004). Ao contrário do observado por Zhang et al. (2003), os estudos de Denny et al. indicaram que estes promastigotas possuem um transporte de membrana deficiente e expressam quantidades anormais de glicoconjugados, culminando na rápida morte celular. Desta forma, a conclusão mais marcante destes estudos é que a atividade da SPT não é essencial para os amastigotas dentro do macrófago, evidenciando a importância da via de salvação nesta fase do parasita.

Mais recentemente, Zhang et al. demonstraram que a adição de etanolamina à culturas de promastigotas mutantes spt$^-$ reverte o fenótipo. Isto sugere que a etanolamina possa ser um dos principais produtos da via de biossíntese de SLs em *Leishmania* e precursora responsável pela integração desta via à biossíntese de fosfolipídios complexos (Zhang et al., 2007; Zhang et al., 2010).

1.6.2 Papel das Ceramidas

Estudos com células leucêmicas humanas (HL-60) demonstraram o potente efeito anti-proliferativo da ceramida (Okazaki et al., 1990). Posteriormente, Jayadev et al. (1995) demonstraram a relação direta entre o acúmulo intracelular de ceramida e a inibição do ciclo celular em fase G_0/G_1 e apoptose (Jayadev et al., 1995). Diversos outros estudos tem demonstrado estes efeitos relacionados com ceramida de variados tamanhos (C2-, C8- e

C16-) em diferentes linhagens celulares (Jarvis et al., 1994; Obeid et al., 1993; White-Gilbertson et al., 2009).

Vários estímulos extracelulares foram implicados na relação entre aumento da produção de ceramida e inibição do crescimento, diferenciação e senescência celular ou apoptose. Alguns exemplos destes estímulos são TNF-α, TGF-β, IL-2, IFN-γ, progesterona, 1,25-(OH)2 vitamina D3, FAS ligante, radiação ionizante, choque térmico, vincristina, bloqueadores de canal de cálcio, inibidores da PKC e toxinas bacterianas (revisado em Shaymam, 2000). Inversamente, os fatores de crescimento estão sempre associados com um aumento da esfingosina que regula importantes processos celulares como a organização do citoesqueleto de actina, endocitose, ciclo e sobrevida celular (Smith et al., 2000) e esfingosina-1-fosfato que atua na sobrevivência celular, migração e inflamação (Hla, 2004). Estas atividades opostas levaram Cuvilier a propor um modelo "yin yang" (equilíbrio) dos SLs intracelulares como a ceramida e a esfingosina-1-fosfato que possuem papéis opostos. Neste modelo, existe um "reostato" dentro das células, onde o ajuste dos SLs determina se as células sofrerão proliferação ou apoptose (revisado em Shaymam, 2000).

Ratha et al. (2006) estudaram o efeito tumoricida da fração lipídica rica em esfingolipídeos de promastigotas de *L. donovani* em células de melanoma. Essa fração desencadeou diversos eventos intimamente relacionados com a apoptose. Isto indica que um ou mais SLs presentes na fração lipídica de *L. donovani* poderiam ser o agente causal para a indução da apoptose em células de melanoma (Ratha et al., 2006). Ghosh et al. (2001) mostraram que a infecção por *L. donovani* induziu aumento dos níveis de ceramida em macrófagos, que levou à supressão do *burst* respiratório, facilitando a sobrevivência dos parasitas dentro do macrófago (Ghosh et al., 2001). Todos estes fatos contribuem para se pensar na ceramida como um novo alvo terapêutico no futuro.

1.6.3 O efeito do Tamoxifeno na Via das Ceramidas

Cabot et al. (1996) realizaram estudos para verificar se o tamoxifeno seria capaz de atuar na inibição de determinada(s) enzima(s) do metabolismo de ceramida em células neoplásicas resistentes a múltiplas drogas (KB-V-1) e em linhagem celular de melanoma (M10). Estes pesquisadores constataram que o tamoxifeno inibe a atividade da glicosilceramida (GlcCer) sintase, a enzima catalisadora da glicosilação de ceramida (Cabot et

al., 1996). Com base nestas informações, iniciou-se em nosso laboratório a investigação sobre a interferência do tamoxifeno no metabolismo de ceramida em *Leishmania*. Esta abordagem foi escolhida com o intuito de se identificar possíveis mecanismos de ação do tamoxifeno que explicassem sua atividade leishmanicida. A partir de ensaios de cromatografia em camada delgada com extratos totais de lipídios de culturas de *L. amazonensis* marcadas com C_6-NBD-ceramida e submetidas ao tratamento com tamoxifeno, PDMP (D-treo-1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-1-propanol) e MAPP (N-miristoilamino-fenilpropanol-1), inibidores específicos da atividade de GlcCer sintase e de ceramidase, respectivamente, observou-se que o tamoxifeno altera o metabolismo de SLs de promastigotas e amastigotas (Miguel, 2011). A interferência deste fármaco na biossíntese de SLs complexos foi drástica e, a partir destes dados, foi iniciada a investigação da modulação da atividade de diversas enzimas desta rota pelo tamoxifeno.

1.7 Ceramida Sintase

A ceramida sintase (CerS) é uma importante enzima da via das ceramidas. Ela catalisa a acilação tanto da esfinganina (biossíntese *de novo*) como da esfingosina (via de salvação) para formar seus derivados N-acil, os quais são usualmente referidos como dihidroceramida (N-acilesfinganina) e ceramida (N-acilesfingosina), respectivamente (Wang e Merrill, 2000).

A CerS é de interesse científico não só pelo fato de catalisar a síntese de ceramida (principal esqueleto dos lipídios), mas pelo fato de ser alvo de numerosos metabólitos microbianos (Wang e Merrill, 2000), como a fumonisina. A fumonisina B1 (FB_1) produzida pelo *Fusarium moniliforme* inibe a atividade da CerS sendo responsável por intoxicações em animais como leucoencefalomalacia equina (Kellerman et al., 1990), síndrome do edema pulmonar suíno (Harrison et al., 1990), hepatocarcinoma em ratos (Howard et al., 2001) e nefropatia em ratos (Voss et al., 1993) e coelhos (Gumprecht et al., 1995). Esta toxina também está associada com o desenvolvimento do câncer de esôfago em humanos (van der Westhuizen et al., 2010; Wang e Merril, 2000). A toxina alternaria, um análogo da FB1, também possui atividade de inibição da CerS (Merrill et al., 1993). Ambos os inibidores possuem semelhança estrutural em relação à fitoesfingosina, que é a LCB predominante em fungos. Outro composto, a Australifungina, isolada do fungo *Sporormiella australis* (Mandala

et al., 1995), é capaz de inibir a atividade de CerS em leveduras, porém não é um análogo estrutural da fitoesfingosina.

Foi demonstrado que três genes, *LAG1, LAC1 e LIP1*, estão relacionados à atividade de CerS em *Saccharomyces cerevisiae* (Guillas et al., 2001; Vallee e Riezman, 2005). *LAG1 e LAC1* são genes homólogos e codificam proteínas transmembrana do retículo endoplasmático funcionalmente redundantes. Células mutantes com dupla deleção, *lag1*Δ *lac1*Δ, apresentaram redução dos níveis de SLs devido à perda da reação da CerS dependente de CoA (Guillas et al., 2001). A LIP1p forma um complexo heteromérico com LAG1p e LAC1p e é necessária para a síntese de ceramida *in vitro* e *in vivo* em *S. cerevisiae* (Vallee e Riezman, 2005), porém, nenhum homólogo ao *LIP1* em animais ou plantas foi encontrado alinhando-se sequências codificadoras para este gene. No entanto, genes homólogos ao *LAG1* foram encontrados em uma ampla variedade de eucariotos como homem (NM_021267.3), camundongo (NM_172856.3) e *Caenorhabditis elegans* (U42438), sugerindo que LAG1p e LAC1p formem a subunidade catalítica da CerS e LIP1p uma subunidade regulatória do complexo.

O gene *LAG1* ("longevity-assurance gene 1") foi descrito em 1994 com o papel de regular o tempo de vida e envelhecimento de leveduras (D'Mello et al., 1994). Neste estudo foi observado que o *LAG1* é diferencialmente expresso durante o período da vida replicativa da célula, isto é, predominantemente nas células jovens. Além disso, células haplóides deletadas para *LAG1* exibiram aumento do tempo de vida, isto é, um aumento da média de divisões celulares desenvolvida por uma única célula (D'Mello et al., 1994).

O gene *LAC1*, previamente nomeado como gene *DGT1* ("delayed GPI-anchored protein transport") foi descrito em 1999 por Barz e Walter. Devido à semelhança estrutural das proteínas LAGp e LACp com as proteínas da família TRAM estes pesquisadores investigaram se estes genes também estavam envolvidos no sistema de transporte de membrana. Utilizando células deletadas para lag1Δ e lac1Δ, observaram que a LAG1p e LAC1p facilitam, mas não são essenciais para o transporte das proteínas ancoradas em GPI. Desta forma, os autores acreditam que a deleção do *LAG1* e *LAC1* possa prejudicar a biogênese ou viabilidade dos SLs e, portanto, adiar a maturação das proteínas ancoradas por GPI de forma indireta (Barz e Walter, 1999). Em um estudo mais recente, White-Gilbertson et al. (2009) utilizaram RNA de interferência para a CerS 6 humana para estudar sua importância na morte celular programada. Como resultado, obteve-se um específico e

significativo decréscimo do conteúdo de C16-ceramida, o qual foi suficiente para inibir a apoptose. Além disso, observaram que a CerS 6 também inibiu a translocação da caspase 3 ativada para dentro do núcleo, sugerindo um novo mecanismo de interferência dessa enzima na morte celular programada (White-Gilbertson et al., 2009).

Considerando-se portanto os dados preliminares obtidos no laboratório que indicavam que o tamoxifeno é capaz de interferir na biossíntese de SLs de *Leishmania* e tendo em conta o papel essencial da ceramida e a importância da regulação de seus níveis no ambiente intracelular, nos propusemos neste trabalho a caracterizar a atividade de CerS em *L. amazonensis* e investigar a interferência do tamoxifeno na atividade desta enzima bem como as consequências acarretadas na via metabólica dos SLs, com o intuito de melhor esclarecer e compreender seu efeito leishmanicida.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar molecular e funcionalmente o gene que codifica a ceramida sintase de *L. amazonensis* e investigar a possível interferência do tamoxifeno na atividade desta enzima.

2.2 Objetivos Específicos

No que diz respeito à caracterização do gene de CerS de *Leishmania*, propõe-se:

- analisar a sequência gênica e proteica da CerS de *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis in silico*.
- clonar, sequenciar e caracterizar o gene de CerS de *L. amazonensis*.
- expressar o gene putativo em sistema de complementação em *Saccharomyces cereviseae*.

Quanto à investigação da interferência do tamoxifeno na atividade da CerS de *Leishmania amazonensis*, pretende-se:

- padronizar o ensaio enzimático de CerS *in vitro* com extrato microssomal de *L. amazonensis.*
- determinar o perfil da atividade da enzima na presença de tamoxifeno.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Organismos:

3.1.1.1 Bactérias

Escherichia coli /linhagem DH5α (F^-ϕ 80d*lac*Z Δ M15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F) U169 *end*A1 *rec*A1 *hsd*R17 ($r_k^-m_k^+$) *deo*R *thi*-1 *pHo*A *sup*E44 λ^-*gyr*A96 *rel*A1) (Gibco-BRL) cultivada em meio LB (bacto-triptona1%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 0,18 M).

3.1.1.2 Leishmania sp

Promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) foram cultivados em meio M199 (Gibco BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino, HEPES 40mM pH 7,4, adenina 0,1 mM, hemina 0,005% e penicilina/estreptomicina 100 µg/mL e incubados a 25 °C, com repiques semanais.

3.1.1.3 Leveduras

Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* YPK9 (genótipo: ade2-101^{ochie}, his3-Δ200, leu2-Δ1, lys2-801^{amber}, trp1-Δ63, ura3-52) e YPK9 Δlac1 Δlag1 pBM150 LAC1 (genótipo: ade2-101^{ochie}, his3-Δ200, leu2-Δ1, lys2-801^{amber}, trp1-Δ63, ura3-52., lag1::TRP1, lac1::LEU2) com plasmídio pBM150 LAC1 (marcador uracila) foram cultivados em meio rico contendo 2% de glicose ou galactose (YPD e YPGal, respectivamente) ou em meio mínimo contendo 2% de glicose ou galactose (SDaa e SGaa, respectivamente), suplementados com adenina, histidina, leucina, lisina, triptofano e uracila quando necessário; sendo incubadas a 30 °C por 48 horas quando cultivadas em meio sólido e a 30 °C, 160 rpm, O.N. quando cultivadas em meio líquido. Estas cepas foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Andreas Conzelmann do Departamento de Medicina da Universidade de Fribourg, Suíça.

3.1.2 Plasmídios

3.1.2.1 pCR2.1-Topo

Vetor linearizado com uma única desoxitimidina (T) nas extremidades 5' e 3' conferindo um sítio eficiente de clonagem "AT" para produtos de PCR. Possui aproximadamente 3,9 kb e confere resistência a ampicilina.

3.1.2.2 pYES6/CT/lacZ

Vetor de expressão em leveduras de 8.847 bp. Possui o promotor de galactose e confere resistência à blasticidina. Foi gentilmente cedido pelo Prof° Dr. Andreas Conzelmann do Departamento de Medicina da Universidade de Fribourg, Suíça.

3.1.1 Oligonucleotídeos

Oligonucleotídeos	Sequência	TM (◦ C)
CerSL ORF 5'	5'TgC TgC TgA gCA TCA Tgg CgC TTC 3'	**71**
CerSL ORF 3'	5'CTA CTC CTT CCg CTT ggA ggA gC 3'	**69**
LAC Sc F1	5' TCg ACC TCg ggg ACA CTg TAC C 3'	**59,4**
LAC Sc F2	5' ACC gTC ATg CCT ggA TAg CTC CC 3'	**60,1**
LAC Sc R1	3' CCg TTC gCT ATT Agg TTA CAC g 5'	**61**
LAC Sc R2	5' CCg AAA ggA CCg gAA ACA CCg g 3'	**60**
URA3 Sc F	5' Tgg Agg gCA CAg TTA AgC CgC 3'	**59,4**
URA3 Sc R	5' TCC gCC gCC TgC TTC AAA CC 3'	**60,3**

3.1.4 Antibiótico de seleção

3.1.4.1 Blasticidina S HCl

É um antibiótico nucleosídico isolado de *Streptomyces griseochromogenes* que inibe a síntese de proteína em células procariotas e eucariotas (Takeuchi et al., 1958; Yamaguchi et al., 1965). A resistência é conferida pela expressão de pelo menos um dos genes de blasticidina S deaminase: *BSD* de *Aspergillus terreus* (Kimura et al., 1994) ou *bsr* de *Bacillus cereus* (Izumi et al., 1991). Estas deaminases convertem a blasticidina S a um derivado não tóxico (Izumi et al., 1991). A concentração do antibiótico utilizada nos experimentos foi de 200 µg/ml. Este produto foi adquirido da empresa Invitrogen™.

3.1.5 Enzimas de restrição

Todas as enzimas de restrição utilizadas foram adquiridas de New England Biolabs ou Fermentas e as digestões foram realizadas seguindo o protocolo descrito pelo fabricante.

3.1.6 Reagentes

3.1.6.1 Ácido 5-Fluorótico ("5-fluorouracil-6-carboxylic acid monohydrate: 5-FOA")

Utilizado na genética molecular de leveduras para detectar expressão do gene URA3, que codifica orotina-5'-monofosfato (OMP) decarboxilase. As leveduras com um gene URA3 ativo (Ura+) convertem o 5-FOA à fluorodesoxiuridina, a qual é tóxica para a célula. Cepas de leveduras mutantes no gene URA3 crescem na presença de 5-FOA, se o meio for suplementado com uracila. O produto é utilizado na concentração de 1 mg/ml e foi adquirido das empresas Fermentas e Sigma.

Os demais reagentes de grau P.A. utilizados neste estudo foram comprados das empresas Sigma ou Merck.

3.2 Métodos

3.2.1 Extração de DNA Genômico de Tripanosomatídeos

Culturas de promastigotas de fase estacionária de *L. amazonensis*, com aproximadamente 1 x 10^9 células, foram centrifugadas a 3.000 *g* por 10 minutos. Posteriormente, o sedimento foi lavado três vezes com PBS estéril e ressuspenso em NaCl 150 mM (1 mL/g de célula). A suspensão foi adicionada, gota a gota, em TES (Tris 150 mM pH 7,5; EDTA 50 mM pH 8,0; SDS 1%) a 65 °C (20 mL/g de célula), sob leve agitação, e tratada com pronase (200 μg/mL) a 45 °C por 2 horas. Após adicionar o mesmo volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v) e incubar sob agitação leve à temperatura ambiente por uma hora, centrifugou-se o homogenato por 10 minutos a 10.000 *g*, e ao sobrenadante adicionou-se 0,1 volume de acetato de sódio 3 M pH 7,0 e 2 volumes de etanol 100% gelado; o precipitado foi enrolado em pipeta Pasteur, seco, ressuspenso em água e tratado com RNase A (20 μg/mL) a 37 °C durante 1 hora. Adicionou-se NaCl e SDS para concentração final de 0,2 M e 0,5%, respectivamente, para tratamento com proteinase K (50 μg/mL) a 45 °C por 1 hora. A solução foi novamente submetida à extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v), e o DNA precipitado com acetato de sódio e etanol 100% foi lavado duas vezes com etanol 70%, seco e ressuspenso em TE (Tris 10mM pH 7,5; EDTA 1 mM).

3.2.2 Purificação de DNA Genômico de Leishmania em Pequena Escala

A purificação de DNAg em pequena escala foi realizada conforme descrito por Medina-Acosta e Cross (1993). Culturas de promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis* contendo aproximadamente 1 x 10^8 células foram centrifugadas a 3.000 *g* por 10 minutos, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento de células em 1 mL de PBS estéril. As células foram passadas para um tubo eppendorf e novamente centrifugadas a 3.000 *g* por 5 minutos. O sedimento foi então ressuspenso em 150 μL de TELT (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 62,5 mM pH 9,0; LiCl 2,5 M; Triton X-100 4%) e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. Acrescentou-se 1 volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v), misturou-se por inversão por 5 minutos e em seguida centrifugou-se a

13.000 *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual se acrescentaram 2 volumes de etanol 100% gelado. A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos e em seguida centrifugada a 13.000 *g* por 5 minutos. O precipitado foi seco por 30 minutos a 42 °C, ressuspenso em 50 µL de TE e tratado com RNase A (200 µg/mL) a 37 °C durante 1 hora.

3.2.3 Purificação de DNA Genômico e plasmidial de Saccharomyces cerevisiae

Para a purificação do DNA genômico e plasmidial de *S. cerevisiae* aproximadamente 1 x 10^8 células foram lavadas com Sorbitol 1,2 M, centrifugadas a 16.000 *g* por 20 segundos, ressuspensas em 0,1 mL de solução de Zymoliase (Sorbitol 900 mM, Citrato de Sódio pH 7.0 90 mM, EDTA pH 8 54 mM, Zymoliase 1 mg/mL, β-mercaptoetanol 1%) e incubadas por 30 minutos a 30 °C. Os esferoblastos foram lavados 3 vezes com Sorbitol 1.2 M, ressuspensos em 0,1 mL da solução miniprep I (Glicose 50 mM, Tris-HCL pH 8.0 25 mM, EDTA 10 mM), 0,1 mL da solução miniprep II (NaOH 0,2M, SDS 1%), agitando por inversão, e 115 µL de NaOAc pH 4,8 5 M. A solução foi homogeneizada e centrifugada a 16.000 *g* por 2 min, em microcentrífuga. Ao sobrenadante recuperado foi adicionado 0,6 mL de etanol 100%. A mistura foi incubada em gelo seco por 5 min ou a – 20 °C por 20-30 min e centrifugado a 16.000 *g* por 5 min. O sedimento foi dissolvido em 200 µL de NH_4OAc 2M e o DNA precipitado com 0,6 mL de etanol 100% como descrito acima. O DNA sedimentado foi lavado com etanol 80% por duas vezes, seco em aparelho Eppendorf Vacufuge Concentrator Modelo 5301 (Eppendorf North America, Westbury, NY, U.S.A.) e ressuspenso em 20 ul de água.

3.2.4 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

As reações de amplificação foram realizadas segundo Saiki et al. (1985) e Mullis et al. (1986). O DNA contendo a sequência alvo foi submetido à reação com volume final de 50 µL em tampão de *Taq Platinum* polimerase 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8.4, KCl 50 mM) contendo $MgCl_2$ 1,5 mM; dNTPs 200 µM; Taq Platinum polimerase 2,5 UI (Invitrogen™) e 100 ng de cada um dos oligonucleotídeos. A reação contendo os pares de oligonucleotídeos CerSL ORF 3' e CerSL ORF 5' para a amplificação do gene CerS de *L. amazonensis* foi inicialmente

incubada a 94 °C por 1 minuto sendo em seguida submetida a 35 ciclos de amplificação, com as seguintes etapas: 1 minuto a 94 °C, 1 minuto na temperatura de anelamento (variando de 61 °C a 69,1 °C) e 80 segundos a 72 °C. Para a extensão final utilizamos a temperatura de 72 °C por 7 minutos. O mesmo foi realizado para amplificar o gene *LAC1* de *S. cerevisiae* utilizando quatro pares de "primers" distintos: Par 1 (LAC Sc F1 x LAC Sc R1), Par 2 (LAC Sc F1 x LAC Sc R2), Par 3 (LAC Sc F2 x LAC Sc R1), Par 4 (LAC Sc F2 x LAC Sc R2). Todas as reações foram submetidas à temperatura de desnaturação de 94 °C por 1 minuto, anelamento de 60 °C por 40 segundos e de extensão de 72 °C por 50 segundos para os pares 1 e 2 e 35 segundos para os pares 3 e 4. Os demais passos foram realizados como descrito acima. Outro par de oligonucleotídeos foi sintetizado para amplificar a região que cerca a inserção Ty presente no gene Ura3-52 do genoma da cepa YPK9 de *S. cerevisiae*. Os mesmos procedimentos foram realizados para a reação de cadeia em polimerase com exceção do tempo de extensão que foi de 6 minutos. A amplificação dos produtos esperados foi verificada submetendo-se uma alíquota de 10 μL da reação à eletroforese em gel de agarose.

3.2.5 Eletroforese de DNA

Para separação dos fragmentos de DNA utilizamos géis de agarose com concentrações entre 0,8 a 1,5% em tampão TAE 1X (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM) e corados com brometo de etídio (0,75 μg/mL). Os géis foram observados em transiluminador ultravioleta (UV) e fotografados em ImageQuant (Molecular Dynamics, CA) (Amersham Pharmacia Biotech, NJ). Como padrão de peso molecular foi utilizado DNA do fago λ (Gibco BRL) digerido com a enzima de restrição *Hin*d III.

3.2.6 Southern Blot

A transferência dos fragmentos de DNA foi realizada segundo Southern (1979), sendo utilizada membrana de Nylon (Amersham Hybond^{TM}-N^{+}).

3.2.7 Reações de Hibridização

Marcação das sondas utilizadas: A marcação do fragmento de DNA de CerSLa foi feita através da técnica de "random priming" (Feinberg et al., 1983) utilizando-se o kit "HexaLabel™ DNA Labeling" (Fermentas), na presença de α-[^{32}P]-dCTP (New England Nuclear, atividade específica de 3.000 Ci/mmol).

Reações de hibridização: A pré-hibridização foi feita em tampão composto de formamida 50%, SSPE 5X, Denhardt 2X, SDS 1% e 20 μg/mL de DNA de esperma de salmão a 37 °C por 2 horas. As reações de hibridização foram realizadas a 37 °C por 16 horas no mesmo tampão acrescido de 30 μg/mL DNA de esperma de salmão, previamente fervido com a sonda marcada. As duas primeiras lavagens das membranas hibridizadas foram feitas à temperatura ambiente com solução contendo SSC 2 X e SDS 0,1%. As lavagens de estringência foram feitas com SSC 0,1 X e SDS 0,1 % a temperatura de 65°C.

3.2.8 Clonagem Molecular

Para a ligação do produto amplificado (CerSLa) com o plasmídio de clonagem pCR®2.1-TOPO utilizamos uma proporção inserto: vetor de 8:1 em reação contendo tampão de ligação (Tris-HCL 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 2,5 mM, albumina sérica bovina 0,1 mg/mL, β-mercaptoethanol 7 mM, ATP 0,1 mM, dithiothreitol 2 mM, espermidina 1 mM) e T4 DNA ligase 1 UI (Gibco-BRL). A mistura foi incubada a 14 °C por 16 horas.

A digestão com as enzimas *Kpn* I e *Not* I do plasmídio obtido permitiu liberar o inserto a ser subclonado no plasmídio de expressão pYES6/CT. A preparação do vetor foi feita pela modificação do plasmídio pYES6/CT/lacZ, que foi digerido com as enzimas *Kpn* I e *Not* I, resultando na liberação de um fragmento contendo o gene lacZ. A separação do plasmídio pYES6/CT do fragmento lacZ foi realizada por eletroforese em gel de agarose "Low Melting" (GibcoBRL), no qual as bandas a serem clonadas foram recortadas do gel. Uma alíquota das amostras foi aplicada em gel de agarose para quantificação. A reação de ligação do plasmídio pYES6/CT com o inserto de CerSLa foi realizada utilizando-se 20 ng de vetor e 20 ng de inserto em tampão nas mesmas condições descritas anteriormente e foi incubada a 16 °C por 16 horas. A proporção de inserto: vetor utilizada foi de 4,5:1.

3.2.9 Preparação da Bactéria Competente

O método utilizado foi uma variação do descrito por Cohen et al. (1972), no qual as bactérias são tratadas com cloreto de cálcio. Uma colônia de *E. coli* DH5α foi inoculada em 3 mL de meio LB e incubada a 37 °C por 16 horas. Um inóculo de 500 µL desta cultura foi transferido para 100 mL de meio LB, e a cultura foi incubada a 37 °C, sob agitação constante, até uma DO_{600} entre 0,3 e 0,6. Em seguida a cultura foi resfriada a 4 °C, centrifugada a 3.000 g por 10 minutos a 4 °C, lavada com 40 mL de $CaCl_2$ 50mM gelado, mantida no gelo por 10-20 minutos e novamente centrifugada nas mesmas condições. O precipitado foi então ressuspenso em 5-10 ml de $CaCl_2$ 50mM, proporcional a $D.O._{600}$ inicial, contendo 15% de glicerol. As bactérias competentes foram mantidas a -70 °C.

3.2.10 Transformação e Plaqueamento

Após a ligação, o DNA foi misturado a 200 µL de bactéria *E. coli* DH5α competentes e incubado a 4 °C por 15 minutos. Em seguida, a mistura foi submetida a choque térmico a 42 °C por 90 segundos e a novamente transferida para o gelo por 1 minuto. Foram adicionados 800 µL de meio LB e a mistura foi incubada a 37 °C por 1 hora. A cultura foi plaqueada em LB com 120 µg/mL de ampicilina e incubada a 37 °C por 16 horas. Dez colônias foram selecionadas para extração de plasmídio e confirmação da ligação por padrão de restrição com *Eco* RI (pCR2.1-TOPO [CerSLa]) ou *Kpn* I e *Not* I (pYES6/CT [CerSLa]), seguindo, respectivamente, para o sequenciamento e transformação em leveduras.

3.2.11 Extração de DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi purificado conforme uma modificação do método de Birnboim e Dolly (1979) e utilizando-se o Kit “QIAprep Spin Miniprep” (QIAGEN), conforme orientação do fabricante.

3.2.12 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento automático foi realizado segundo o método descrito por Sanger e Coulson (1975) modificado para utilização de terminadores fluorescentes. Utilizou-se o kit "Big dye^{tm} Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (Applied Biosystems). A reação foi incubada por 1 minuto a 96 °C e em seguida, 30 ciclos de 15 segundos a 96 °C, 15 segundos a 50 °C e 4 minutos a 60 °C. O produto da reação de PCR foi precipitado pela adição de 90 µl de isopropanol 66%, seguido de agitação e incubação a temperatura ambiente por 15 minutos. Após incubação, o DNA foi centrifugado a 16.000 *g* por 20 minutos e então lavado com isopropanol 75% gelado. Em seguida, o DNA foi centrifugado a 16.000 *g* por 10 minutos, seco e ressuspenso em 20 µl de TSR ("Template Supression Reagent"), para o sequenciamento no aparelho ABI Prism 3.100 Genetic Analiser.

3.2.13 Análise das Seqüências de Nucleotídeos

A análise das sequências obtidas foi realizada utilizando-se o programa Lasergene (DNAStar Inc., Madison, WI, U.S.A.) e a busca de similaridade foi processada utilizando-se o programa BLAST (Altschul et al., 1990) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) e GeneDB (www.genedb.org/Homepage). Os alinhamentos foram feitos com o auxílio do programa Clustal W (Chenna et al., 2003) (www.ebi.ac.uk/clustalw) e refinados manualmente.

3.2.14 Teste de Confirmação de Cepa de Leveduras

O teste de confirmação de cepas de leveduras consiste no plaqueamento das leveduras em meio mínimo SD (para cepas selvagens) ou SG (para cepas deletadas) suplementada com os aminoácidos essenciais (adenina, histidina, leucina, lisina, triptofano e uracila) e em meios SD ou SG na ausência de um destes aminoácidos. Primeiramente as cepas YPK9 (selvagem) e YPK9 Δlac1 Δlag1 (deletada) foram estriadas em meio YPD e YPGal, respectivamente, e incubadas a 30 °C por 48 horas. Em seguida, realizamos a técnica de "replica plating" (Lederberg e Lederberg, 1952) onde as placas primárias (YPD e YPGal) foram impressionadas em um disco coberto com veludo e as placas de Petri secundárias (SDaa ou SGaa faltando um dos aminoácidos) foram impressionadas com as mesmas colônias de

microorganismos da primeira placa, reproduzindo o padrão “espacial” das colônias da primeira placa. Os meios foram incubados a 30 °C por 72 horas e o crescimento das leveduras nos diversos meios foi analisado conforme o genótipo apresentado por cada cepa. As colônias que cresceram nos meios adequados foram cultivadas isoladamente em meio rico líquido e utilizadas no estudo.

3.2.15 Teste de Sensibilidade à Blasticidina

O teste de sensibilidade à blasticidina (Invitrogen^{TM}) foi realizado para obtermos a concentração mínima necessária para inibir a multiplicação de *S. cerevisiae*, uma vez que a faixa de inibição deste antibiótico é muito ampla para leveduras (25 a 300 µg/mL). Para isto, cepas YPK9 selvagem e deletada foram plaqueadas com $D.O._{600}$ de 1, 0,1, 0,01, 0,001 e 0,0001 em meio YPD suplementado com 25, 50, 75, 100 e 200 µg/mL de blasticidina e incubadas a 30 °C por 48 horas, determinando-se a concentração mínima que resultava em inibição completa do crescimento.

3.2.16 Complementação em Leveduras

A transformação de *S. cerevisiae* cepa YPK9 selvagem e deletada com a construção pYES6/CT [CerSLa] foi realizada conforme Gietz e Schiestl (2007). Aproximadamente 2 x 10^6 células, cultivadas em meio líquido rico (YPD ou YPGal), foram lavadas três vezes em água estéril e incubadas a 42 °C por 40 minutos no tampão de transformação (PEG 6.000 50%, LiAc 1 M, 300 µg DNA de esperma de salmão) contendo 1 µg DNA plasmidial. As células foram centrifugadas a 13.000 *g* por 30 segundos, ressuspensas em meio YPD ou YPGal e incubadas a 30 °C por 2-3 horas. Em seguida, as leveduras transformadas foram plaqueadas em meio sólido de seleção (YPDBlast ou YPGalBlast) e incubadas a 30 °C por 3-4 dias. As células transformadas foram submetidas a duas passagens em meio seletivo e, posteriormente, em meio seletivo acrescido de 1 mg/ml de 5-FOA (Fermentas e Sigma-Aldrish).

3.2.17 Purificação de Microssomos de Fígado de Camundongo

A purificação da fração enriquecida em microssomos de fígado de camundongo foi realizada conforme Liu et al. (2010) com algumas modificações. Depois de anestesiados (Buitrago et al., 2008), os animais foram submetidos à sangria e tiveram seu sistema circulatório submetido à lavagem com PBS 1X através de injeção intra-cardíaca até o fígado apresentar-se com uma coloração amarelada. O órgão foi removido e lavado imediatamente em KCl 0,15 M gelado por 3 vezes e, em seguida, homogeneizado com 2 volumes de tampão Tris-HCL 0,05 M pH 7,4, EDTA 1mM e sacarose 0,25 M, utilizando homogeneizador de vidro do tipo Dounce. O homogeneizado foi tratado com Inibidores de Protease (Sigma-Aldrich), centrifugado a 10.000 *g* por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi ultracentrifugado a 100.000 *g* por 60 minutos a 4 °C em ultra-centrífuga Beckman Optima^{TM} TLX Ultracentrifugue com o rotor TLA120. O sedimento foi ressuspenso em tampão Tris-HCl 0,05M e armazenado à – 70 °C.

3.2.18 Purificação de Microssomos de Trypanossoma cruzi

A purificação da fração enriquecida em microssomos de *T. cruzi* foi obtida conforme Figueiredo (2008). Formas epimastigotas em fase exponencial foram lavadas (2X) em PBS com centrifugação de 1.500 *g* por 10 min a 4 °C. O precipitado contendo 5 x 10^{10} células foi suspenso em 10-20 mL de tampão STE (Tris-HCl pH 7.4 25 mM, sacarose 250 mM, EDTA 1 mM). A suspensão foi centrifugada (1.500 *g*, 10 min, 4 °C) e o sedimento suspenso em 1-5 mL de tampão A [STE contendo 2-mercaptoetanol 10 mM, PMSF 0,1 mM e coquetel de inibidores de protease (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich - 50 µl para cada 1 mL de preparação) composto por: AEBSF 20 mM, E-64 28 µM, Bestatina 260 µM, Leupeptina 1,8 µM, Aprotinina 0,6 µM e EDTA 2 mM]. O material foi transferido para um almofariz de porcelana e macerado entre os ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido (4 a 5 ciclos). A fração microssomal foi obtida por centrifugação diferencial. O macerado de células foi primeiramente centrifugado a 5.000 *g* por 10 min a 4 °C para remover as células não lisadas e o núcleo, sendo o sobrenadante coletado submetido à centrifugação de 27.000 *g* por 10 min a 4 °C. A fração microssomal foi obtida por ultra-centrifugação do sobrenadante obtido a 100.000 *g* por 90 min a 4 °C na ultra-centrífuga

Beckman Optima^{TM} TLX Ultracentrifugue com o rotor TLA111. O sedimento foi ressuspenso em 1 ml de solução de estocagem que é igual ao tampão A, porém com apenas 5 mM de 2-mercaptoetanol, distribuído em alíquotas de 20 µl e armazenado a -80 °C. Para a preparação iniciada com 5 x 10^{10} células obteve-se uma amostra contendo 39 mg de proteína/ml.

3.2.19 Purificação de Microssomos de Leishmania

A fim de obter a fração enriquecida em microssomos de *L. amazonensis* em concentrações adequadas diversos protocolos foram testados. Iniciamos com o sugerido por Previato et al. (1998) com algumas modificações. Aproximadamente 5 x 10^9 promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária foram lisadas por choque térmico (congelamento em N_2 líquido e aquecimento a 37 °C por cinco vezes) e, em seguida, homogeneizados em Dounce. O homogenato foi diluído em tampão Tris/Sacarose (Tris-HCl 25 mM pH 7,4, sacarose 250 mM / 10-20 mL por 2.10^{11} promastigotas), tratado com Inibidores de Protease (PMSF 1 mM, Benzamidina 2 mM, Leupeptina 50 µM, Fenantrolina 5 mM, Inibidor de Tripsina 50 µg/mL) e centrifugado a 12.000 *g* por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi ultracentrifugado a 120.000 *g* por 1 hora na ultra-centrífuga Beckman Optima^{TM} TLX Ultracentrifugue com o rotor TLA111 e a fração microssomal presente no sedimento foi ressuspensa em tampão Tris/sacarose. O extrato microssomal foi armazenado à – 70 °C. Para a preparação iniciada com 5 x 10^9 células obteve-se uma amostra contendo 30 µg de proteína/ml, a qual foi utilizada para realizar o 1° ensaio enzimático (*Leishmania* e microssomos de fígado). Outros protocolos também foram utilizados, como os descritos por Figueiredo (2008), Ilgoutz (1999) e Mahoney e Turco (1999) com algumas modificações. O procedimento de Figueiredo (2008) já descrito acima ("Purificação de microssomos de *T. cruzi*") foi adaptado para 5 x 10^7 promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária (4° dia de cultura), sendo obtida uma preparação com 0,4 mg de proteína/ml. O protocolo de Ilgoutz (1999), por sua vez, foi adaptado ao protocolo de Figueiredo (2008), onde as células após serem lavadas com PBS foram ressuspensas em uma solução hipotônica (tampão A sem sacarose) e lisadas por passagem em seringa e agulha (26G) por 12 vezes. O material contendo células lisadas foi submetido à centrifugação diferencial conforme Figueiredo (2008), porém excluindo a segunda centrifugação de 27.000 *g*, 10 min. Este procedimento

obteve um rendimento de 9 mg de proteína/mL. O protocolo descrito por Mahoney e Turco (1999) também foi adaptado ao procedimento de Figueiredo (2008). Neste caso, a lise dos parasitas foi realizada por sonicação (4 vezes por 15 segundos na potência 40) (Unique Ultrasonic). A fração microssomal foi obtida por centrifugação diferencial conforme Figueiredo (2008), sendo excluída a segunda centrifugação de 27.000 *g*, 10 min. Obteve-se um rendimento de 28 mg de proteína/mL a partir de 5 x 10^8 promastigotas, de 130 mg/mL a partir de 1 x 10^{10} células e 56 mg/mL a partir de 3 x 10^{10} células .

3.2.20 Quantificação de Proteína

As proteínas presentes na fração enriquecida em microssomos foram quantificadas pelos métodos descrito por Bradford (1976) utilizando-se o kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad®) ou por Smith et al. (1985) com BCA Protein Assay Kit (Pierce®).

3.2.21 Ensaio para Detecção de Atividade da Enzima Ceramida Sintase

Para a padronização do ensaio enzimático do controle e de *Leishmania*, diversos protocolos foram testados:

a- Inicialmente o ensaio enzimático *in vitro* da CerS foi realizado conforme Wang e Merril (2000). A mistura de reação (total de 100 µl) contendo tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 7,4), DTT 0,5 mM, [^{3}H]-esfingosina 1-10 µM (PerkinElmer, atividade específica de 18,2 Ci/mmol), palmitoil CoA (Sigma) 50-100 µM e 25-150 µg de extrato microssomal de fígado de camundongo foi incubada durante 15 minutos a 37 °C. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 1 mL de metanol e 0,5 mL de clorofórmio, seguida de extração dos SLs por clorofórmio. Para isto, foram adicionados 25 µg de ceramida não marcada como carreadora dos produtos da reação e 1 mL de clorofórmio. Após intensa agitação, 3 mL de água Mili-Q foram adicionados, sendo a solução novamente agitada intensamente e centrifugada a 1.000 *g* por 10 minutos a 4 °C. A fase orgânica foi recuperada e seca por N_2 gasoso. Para a análise por TLC, as amostras foram dissolvidas em 40 µL de metanol: clorofórmio (1:2) e aplicadas em placas de alumínio com sílica 60 (cromatofolha de alumínio

HPTLC, MERCK), a qual foi submetida a dois sistemas de corrida: 1) o sistema de corrida descrito por Ichikawa et al. (1994) que consiste em sistema clorofómio: metanol: água (60:35:8, v/v/v) em 20% de corrida da placa e clorofórmio:metanol:ácido acético (90:2:8, v/v/v) no restante da corrida e 2) o sistema de corrida descrito por Wang e Merril (2000) – dietileter: metanol (99:1, v/v). Os R*f*s dos produtos da reação foram determinados e comparados com os R*f*s dos padrões não marcados, que foram visualizados por vapor de I_2. Este mesmo protocolo também foi testado com maiores concentrações da fração microssomal de fígado de camundongo e de [^{3}H]-esfingosina (100 μg e 2 μM, respectivamente).

b- Outro protocolo testado foi o descrito por Hirschberg et al. (1993), onde a reação enzimática de volume final igual a 500 μl consistia de: tampão HEPES 20 mM pH 7.4, 0,25 μCi de [^{3}H]-esfingosina (PerkinElmer, atividade específica de 15-30 Ci/mmol), 20 μM de esfingosina fria (Sigma), 20 μM de BSA (Sigma), 75 μM de palmitoil CoA (Sigma) e 250 μg de fração microssomal de fígado de camundongo. As esfingosinas marcadas e frias foram misturadas e secas sob fluxo de N_2. Após foram adicionados tampão HEPES, BSA e fração microssomal de fígado de camundongo, sendo a solução incubada a 37 °C por 5 minutos para entrar em equilíbrio. Por último, adicionou-se o palmitoil CoA e a reação foi incubada a 37 °C por 40 min. Prosseguiu-se com a extração dos SLs e a análise por TLC conforme descrito acima.

c- A atividade de CerS de *T. cruzi* foi detectada utilizando o sistema descrito por Figueiredo (2008). A mistura final da reação enzimática contém: [^{3}H]-esfingosina (0,25 μCi/ensaio), Tampão I (Fosfato de Potássio pH 7.4 50 mM, $MnCl_2$ 1 mM e CHAPS 0,2%) ou tampão II (Tris-HCl pH 7.4 100 mM, $MgCl_2$ 1 mM, $MnCl_2$ 1 mM, DTT 1 mM, NaF 4 mM e CHAPS 0,2%), 5,6 ou 25 μg de proteína microssomal e 90 μM de palmitoil CoA, em um volume final de 100 μl ajustado com água Mili-Q. Inicialmente a solução alcoólica de [^{3}H]-esfingosina foi evaporada com N_2. A base esfingóide marcada foi suspensa em tampão I ou II e sonicada em banho de ultra-som por 1 minuto. Em seguida, adicionou-se a água Mili-Q, a fração microssomal e a fonte doadora do grupo acil, o palmitoil

CoA. A reação foi incubada a 28 °C por 4 horas, sendo interrompida após adição de 375 µL de clorofórmio: metanol (1:2, v:v), seguido de agitação por 2 minutos. Para a extração lipídica foram adicionados 125 µl de clorofórmio, seguido de agitação por 30 segundos. Após, acrescentou-se 125 µL de uma solução 10 mM de Tris-HCl pH 8,5, seguido de agitação por 30 segundos e centrifugação a 12.000 *g* por 10 min a temperatura ambiente, sendo a fase orgânica coletada e evaporada sob fluxo de N_2. Os lipídios obtidos foram submetidos à extração butanol:água. Nesse caso, o material obtido foi suspenso em 200 µL de 1-butanol saturado em água seguido da adição de 100 µL de água saturada em 1-butanol, agitado vigorosamente e centrifugado a 12.000 *g* por 1 min. A fase orgânica foi reservada em novos tubos enquanto que a fase aquosa foi re-extraída com 200 µL de 1-butanol, seguido de agitação e centrifugação. As fases orgânicas foram reunidas e evaporadas em aparelho Eppendorf Vacufuge Concentrator Modelo 5301 (Eppendorf North America, Westbury, NY, U.S.A.). Prosseguiu-se com a análise por TLC conforme descrito no item a.

d- Inicialmente as reações de ceramida sintase de *L. amazonensis* foram realizadas conforme Wang e Merril (2000) (descrito no item a) utilizando a fração microssomal de fígado de camundongo como controle. As reações de *Leishmania* foram incubadas a 25 °C utilizando 40 e 100 µg de proteína. Foram realizados ensaios baseados no descrito em *T. cruzi* no item c (Figueiredo, 2008), sendo alterada somente a temperatura de incubação para 25 °C. Primeiramente, este protocolo foi testado com 2,6 mg de fração microssomal e de proteína total de *L. amazonensis*, sendo posteriormente realizado com 1,3 mg e 100 µg de proteína microssomal. Também foram realizados ensaios de CerS com todos os constituintes dos tampões I e II descritos por Figueiredo (2008), resultando em um novo tampão (III) com a seguinte composição final: Fosfato de potássio pH 7.4 50 mM, $MnCl_2$ 1 mM, $MgCl_2$ 1 mM, DTT 1 mM e CHAPS 0,2%. Outra tentativa foi realizar ensaios com tampões adaptados de outros ensaios enzimáticos que utilizam extratos microssomais como o descrito por Carver e Turco (1991) para a atividade de glicosilação de fosfatidilinositol

lipid anchor formando o LPG (lipofosfoglican) em *L. donovani*. Este tampão possui 50 mM de HEPES pH 7.4, KCl 25 mM, $MnCl_2$ 5 mM, $MgCl_2$ 5 mM, ATP 0,8 mM e DTT 0,4 mM. Além disto, foi testada a capacidade da CerS de *Leishmania* utilizar os precursores esfinganina/esfingosina marcados com NBD e palmitoil CoA (C16) e miristoil CoA (C14) para a formação respectiva de NBD-C16 e C14 Ceramida. Para avaliar a interferência do tamoxifeno (Sigma-Aldrish) na atividade de CerS de *L. amazonensis* 0,1 µM, 1µM e 10 µM de Tamoxifeno foram acrescentados à reação enzimática. Utilizou-se como controle 1,4 e 14 µM de fumonisina B2 (Sigma-Aldrish).

3.2.22 Detecção do produto marcado

Os lipídios marcados com tritio foram visualizados após vaporização da placa com En^{3}Hance® (PerkinElmer®) seguido da exposição em filme autoradiográfico (Amersham Hyperfilm™ ECL, 18 x 24 cm) (GE Healthcare) a - 80° C por pelo menos 5 dias. Alternativamente, após a corrida de TLC a placa foi armazenada em screen (Stored Phosphor Screen-GE) por 15-30 dias e analisada em leitor STORM (840). Neste caso as placas não foram tratadas com En^{3}Hance®.

Os lipídios marcados com NBD foram protegidos da luz durante todo o experimento e após a corrida as placas fora analisadas em leitor de fluorescência (STORM 840) para detecção de bandas com sinal para o fluoróforo NBD (excitação/emissão: 455/530 nm).

Os produtos foram quantificados quanto à produção de ceramida marcada utilizando-se o software ImageJ® e a inibição ou aumento calculados comparando-se a intensidade de cada uma das bandas em relação ao ensaio controle (reação completa). Os padrões de SLs não fluorescentes como C16-ceramida, esfingosina e palmitoil CoA foram visualizados após exposição da placa ao vapor de iodo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação e caracterização do gene que codifica a CerS de *L. amazonensis*

A ceramida sintase de *S. cerevisiae* foi caracterizada por Guillas et al. em 2001. Foi demonstrado que os genes *LAC1* e *LAG1* codificam as subunidades catalíticas da enzima (Guillas et al., 2001). Posteriormente, Valle e Riezman (2005) identificaram a LIP1p que forma um complexo heteromérico com LAG1p e LAC1p e é necessária para a síntese de ceramida *in vitro* e *in vivo* em *S. cerevisiae* (Vallee e Riezman, 2005). Com o objetivo de identificar genes ortólogos em *Leishmania* utilizamos a sequência do gene *LAG1* de *S. cerevisiae* (NM_001179083) para uma busca de sequências similares no banco de dados do genoma de *L. (L.) major, L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) mexicana* (GeneDB), utilizando o programa Blastx (Gish, 1993). As sequências identificadas no genoma de *L. major* (LmjF31.1780)*, L. braziliensis* (LbrM31_V2.2010), *L. infantum* (LinJ31_V3.1800) e *L. mexicana* (LmxM30.1780) apresentaram, respectivamente, 27% (40/145 aminoácidos), 34% (51/146), 28% (41/145) e 29% (43/146) de identidade e 47% (69/145), 53% (78/146), 47% (69/145) e 48% (71/146) de similaridade em relação à sequência traduzida do gene de CerS de *S. cerevisiae*. A análise de similaridade entre as proteínas putativas de *Leishmania* foi realizada com o auxílio do programa Clustal W (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/). A sequência de *L. major* (LmjF31.1780) (total de 461 aminoácidos) apresentou 95% de identidade e 97% de similaridade em relação à proteína de *L. infantum* (LinJ31_V3.1800); 68% de identidade e 80% de similaridade em relação à proteína de *L. braziliensis* (LbrM31_V2.2010); e 87% de identidade e 92% de similaridade em relação à proteína de *L. mexicana* (LmxM30.1780), o que nos mostra a conservação da proteína entre estas diferentes espécies.

O alinhamento das sequências do gene putativo que codifica a CerS das diferentes espécies de *Leishmania* realizado no programa ClustalW e posteriormente rearranjado no programa GeneDoc permite fácil visualização da alta similaridade entre as sequências descritas acima (Figura 5).

Desta forma, com o propósito de clonar o gene que codifica a CerS de *L. amazonensis* utilizamos a sequência do gene putativo de CerS de *L. major* (LmjF31.1780) para desenhar oligonucleotídeos capazes de amplificar o gene putativo de CerS de *L. amazonensis*. As sequências dos oligonucleotídeos confeccionados possuem 24 pb e estão localizadas nas

extremidades 5’ e 3’ da fase aberta de leitura do gene que codifica a CerS, sendo nomeados de CerSL ORF 5’ e CerSL ORF 3’ (Figura 5).

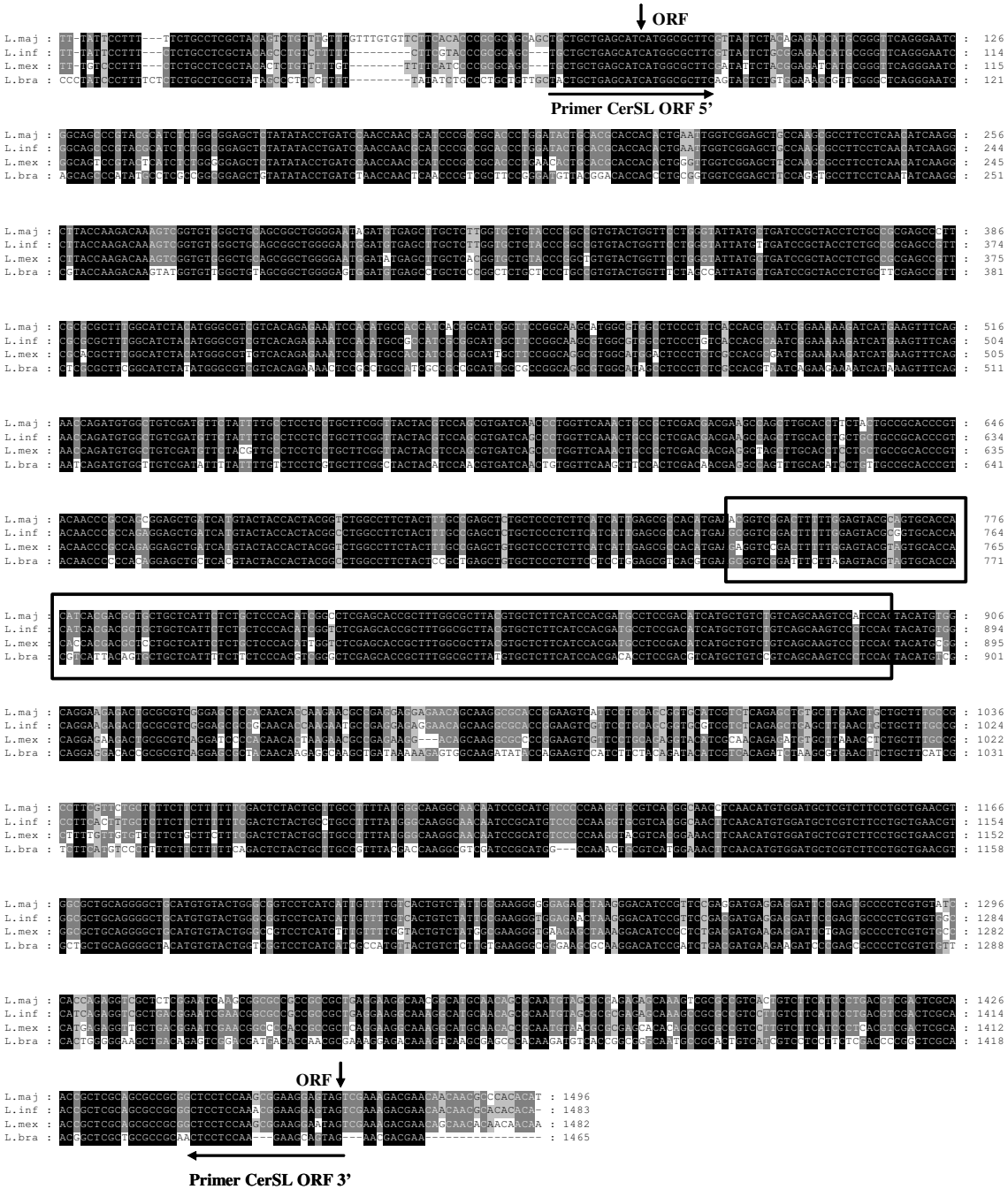


Figura 5. Alinhamento das sequências de CerS de *Leishmania* sp. para a confecção dos primers CerSL ORF 5’ e CerSL ORF 3’. Alinhamento da sequência de nucleotídeos de CerS de *L. major* (LmjF31.1780), *L. infantum* (LinJ31_V3.1800), *L. mexicana* (LmxM30.1780) e *L. braziliensis* (LbrM31_V2.2010). As setas horizontais delimitam a sequência escolhida para a confecção dos primers CerSL ORF 5’ e CerSL ORF 3’ e as setas verticais delimitam a ORF da CerS. A seqüência do motivo Lag 1 está destacada no interior do quadro. L.maj: *L. major*, L.inf: *L. infantum*, L.mex: *L. mexicana*, L.bra: *L. braziliensis*.

Esses oligonucleotídeos foram utilizados em reações de amplificação utilizando gDNA de *L. amazonensis* como fita molde. O produto amplificado, com o tamanho esperado de aproximadamente 1,3 kb foi identificado em todas as reações realizadas e nenhuma banda inespecífica foi visualizada, o que nos mostra boa especificidade dos oligonucleotídeos (Figura 6).

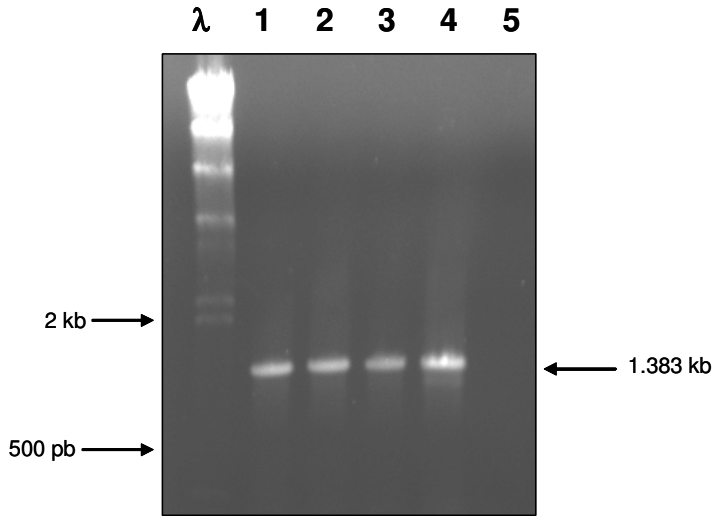


Figura 6. Amplificação do gene CerS de *Leishmania*. Reação de polimerização em cadeia (PCR) em gradiente de temperatura com DNA genômico (DNAg) de *L. amazonensis* (1-3) e *L. major* (4) para amplificação da ORF CerS com o par de primers CerSL ORF 5' e CerSL ORF 3'. As temperaturas de anelamento foram: 61 °C (1), 63,3 °C (2), 65,4 °C (3 e 4). O controle negativo da reação sem DNAg está demonstrado na canaleta 5. Marcador: DNA de fago λ digerido com a enzima de restrição *Hin* dIII.

Os fragmentos amplificados foram clonados no plasmídio pCR2.1-TOPO e transformados em *E. coli* DH5α. Para confirmação da clonagem, os clones pCR2.1-TOPO [CerSLa] e pCR2.1-TOPO [CerSLm] foram digeridos com *Eco* RI (Figura 7), obtendo-se o padrão de bandas esperado de 3,9 kb (plasmídio pCR2.1-TOPO) e 1,3 kb (inserto CerS). Quatro clones de *L. major* foram sequenciados e a sequência consenso obtida de 1.386 pb foi alinhada com a sequência putativa de CerS de *L. major* (LmjF31.1780) utilizando os programas DNAStar-SeqMan (Lasergene) e ClustalW. Em ambos, observamos 100% de identidade entre as sequências comprovando que a sequência depositada no banco de dados do genoma de *L. major* está correta. Concomitantemente, cinco clones de *L. amazonensis* foram sequenciados a fim de obter a sequência do gene que codifica a CerS de *L. amazonensis*. Ao alinhar as sequências consenso obtidas de *L. amazonensis* e *L. major* no

programa ClustalW nota-se 92,1% de identidade entre as sequências, o que demonstra a alta conservação desta proteína entre as duas espécies.

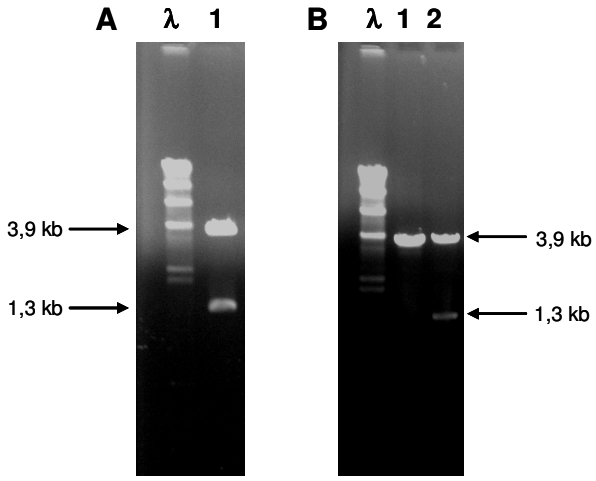


Figura 7. Confirmação da clonagem da sequência CerSLa e CerSLm no plasmídio pCR2.1-TOPO. Digestão dos clones pCR2.1-TOPO [CerSLa] e pCR2.1-TOPO [CerSLm] com *Eco* RI. **A.** (1) clone pCR2.1-TOPO [CerSLa] com inserto liberado. **B.** (1) pCR2.1-TOPO sem inserto e (2) clone pCR2.1-TOPO [CerSLm] com o inserto liberado. Marcador: DNA de fago λ digerido com a enzima de restrição *Hin* dIII.

A fim de esclarecer quais clones estavam com o inserto na orientação correta para posterior clonagem no plasmídio de expressão, analisamos as seqüências obtidas do sequenciamento em relação ao mapa do vetor pCR2.1-TOPO e notamos que somente o clone pCR2.1-TOPO [CerSLa4] estava na orientação correta. Para confirmar este dado prosseguimos com a digestão dos clones com *Bam* HI e *Sac* I. Conforme o mapa de restrição do inserto (obtido pelo programa DNAStar-MapDraw a partir da sequência consenso de *L. amazonensis*) e do vetor (Figura 8 A), o clone digerido com *Bam* HI que estivesse com a orientação correta iria apresentar bandas de 4,5 kb e 0,8 kb, e os clones com orientação invertida, bandas de 4,7 kb e 0,6 kb. Já os clones digeridos com *Sac* I iriam apresentar bandas de 5,1 kb e 0,2 kb, se estivessem na orientação correta e bandas de 3,8 kb e 1,3 kb se estivessem invertidos. Não foi possível visualizar a banda de 0,2 kb na digestão com *Sac* I, porém percebe-se que a orientação do clone está correta pela visualização da banda de 5,1 kb e não de 3,8 kb (Figura 8 B). A obtenção de bandas de 4,5 kb e 0,8 kb quando digerido com *Bam* HI (Figura 8 c) confirma, mais uma vez, que o clone pCR2.1-TOPO [CerSLa4] está com o inserto na orientação correta. Sendo assim, esse clone foi selecionado para a subclonagem em pYES6/CT e transformação em leveduras, como descrito mais adiante.

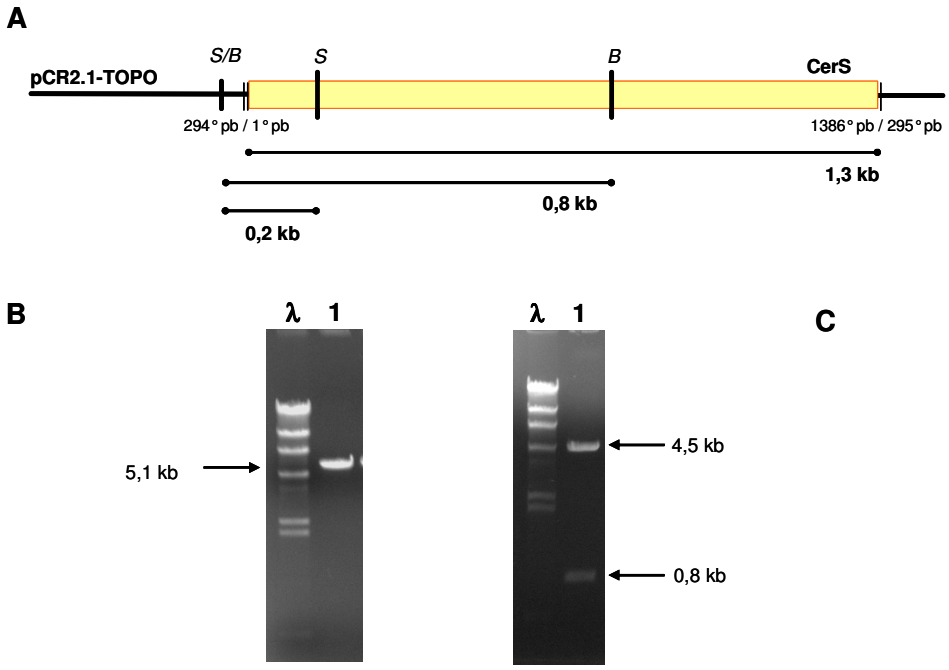


Figura 8. Confirmação da orientação do inserto CerSLa no plasmídio pCR2.1-TOPO. A. Esquema mostrando o "polylinker" e o inserto dos clones pCR2.1-TOPO [CerSLa]. Os sítios para as enzimas de restrição *Sac* I (S) e *Bam* HI (B) estão identificados e os tamanhos dos fragmentos esperados na digestão são indicados pelas linhas contínuas. **B.** clone pCR2.1-TOPO [CerSLa] digerido com *Sac* I. **C.** clone pCR2.1-TOPO [CerSLa4] digerido com *Bam*H I. Marcador: DNA de fago λ digerido com a enzima de restrição *Hin* dIII.

A partir da seqüência consenso do gene que codifica a CerS de *L. amazonensis* foi gerada a seqüência de aminoácidos da proteína CerS de *L. amazonensis* (Figura 9), a qual possui 75%, 91%, 92% e 99% de identidade com as sequencias de *L. braziliensis, L. major, L. infantum e L. mexicana,* respectivamente, demonstrando assim que a sequência de *L. amazonensis* se insere nos padrões das demais espécies de *Leishmania*. Além disto, em alinhamento global, a sequência protéica putativa de CerS de *L. amazonensis* apresentou 24%, 30% e 42% de identidade com as sequências de *S. cerevisiae* (NP_011860.1), *Homo sapiens* (NP_671723) e *T. cruzi* (Tc00.1047053507395.10), respectivamente. Isto está de acordo com a maior proximidade evolutiva entre a *Leishmania* e os tripanosomatídeos e menor proximidade com leveduras e homem. O fato da sequência de *L. amazonensis* possuir apenas 30% de identidade com a sequência de humanos nos permite pensar em menores chances de reação cruzada durante o tratamento da leishmaniose humana com tamoxifeno, caso o mecanismo de ação desta droga esteja realmente envolvido com a inibição desta enzima.

Nesta sequência, também foi identificado o motivo Lag1 que consiste em uma sequência de 52 aminoácidos (posições 217 a 269) que apresenta maior conservação entre diferentes espécies, como *H. sapiens*, *Caenorhabditis elegans* e *S. cerevisiae* (Jiang et al., 1998) e possui os aminoácidos essenciais para a atividade da CerS (Kageyama-Yahara e Riezman, 2006). Desta forma, o motivo Lag1 é essencial para a atividade de CerS.

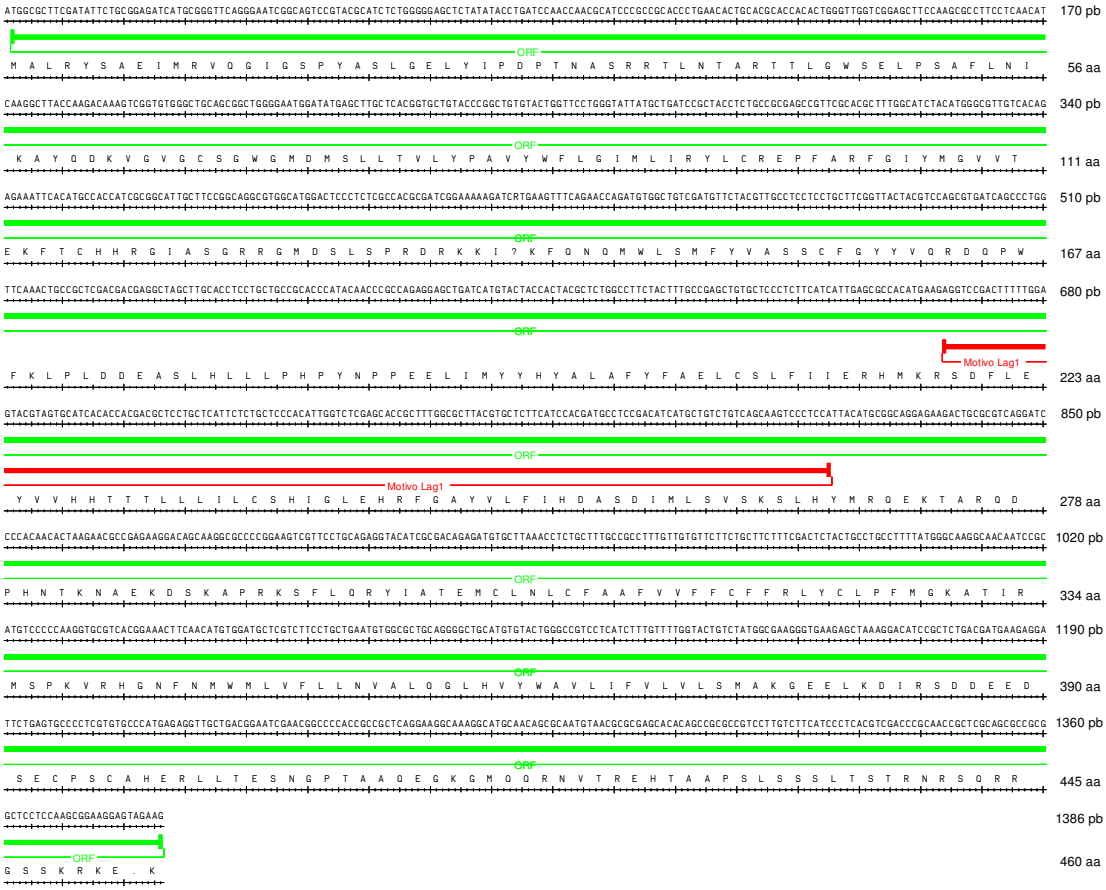


Figura 9. Sequência de aminoácidos e de nucleotídeos da proteína CerS de *L. amazonensis*. Sequência de nucleotídeos e correspondente sequência traduzida do gene CerS putativo de *L. amazonensis* gerados no programa DNAStar-MapDraw (Lasergene). A barra verde corresponde à ORF da CerS e a barra vermelha ao motivo Lag1.

Além do motivo Lag1 todos os membros da família de proteínas LAG compartilham um perfil semelhante de domínios transmembrana (DTMs), sendo predito o número de quatro a sete DTMs (Venkataraman e Futerman, 2002). Desta forma, para determinar se a proteína putativa de CerS de *L. amazonensis* possui essa característica a sequência obtida foi submetida à análise *in sílico* com o auxílio do programa DNAStar-Protean (Lasergene) e dos programas disponíveis no Expasy (Gasteiger et al., 2003) (www.expasy.org), como TMHMM

(www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0), TMpred (Stoffel et al., 1993) (www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) e SOSUI (Hirokawa et al., 1998) (http://bp.nuap.nagoyau.ac.jp/sosui/sosui_submit.html).

As análises pelo DNAStar-Protean indicam que a CerS de *L. amazonensis* é uma proteína constituída de 460 aminoácidos, possui peso molecular igual a 52,9 kDa e ponto isoelétrico de 8,8. O cálculo de hidrofilicidade, segundo Kyte e Doolitte (1982), revelou dez regiões hidrofóbicas que consistem em uma freqüência de 35% de aminoácidos hidrofóbicos na proteína total (Figura 10). Oito destas regiões hidrofóbicas colocalizam-se com os DTM determinados por outros programas (ver adiante), sendo que as duas últimas regiões parecem participar do mesmo DTM localizado entre os aminoácidos 350 e 380 da proteína (comparar figuras 10 e 11). O índice de antigenicidade, calculado conforme Jameson e Wolf (1988), apresentou-se elevado, mostrando que esta proteína possui diversos pontos antigênicos. Os três programas do Expasy indicaram a CerS de *L. amazonensis* como uma proteína de membrana, sendo que os programas TMHMM e SOSUI previram seis DTM e o programa TMpred apenas cinco. Nota-se que o programa TMpred não reconheceu justamente o DTM que está próximo à posição 250 da proteína identificada no programa TMHMM, a qual é definida como uma região com probabilidade de localização transmembrana de cerca de 65% (Figura 11). Surpreendentemente, esta é justamente a região onde se localiza o motivo Lag1, a qual também não foi reconhecida como região transmembrana (TM) por alguns programas utilizados no estudo da CerS de *S. cerevisiae* por Kageyama-Yahara e Riezman em 2006. Neste estudo, os pesquisadores confirmaram a existência dos DTM 5 e 6 (que compreendem o motivo Lag1) através de análises de glicosilação e digestão por endoglicosidase H (Kageyama-Yahara e Riezman, 2006).

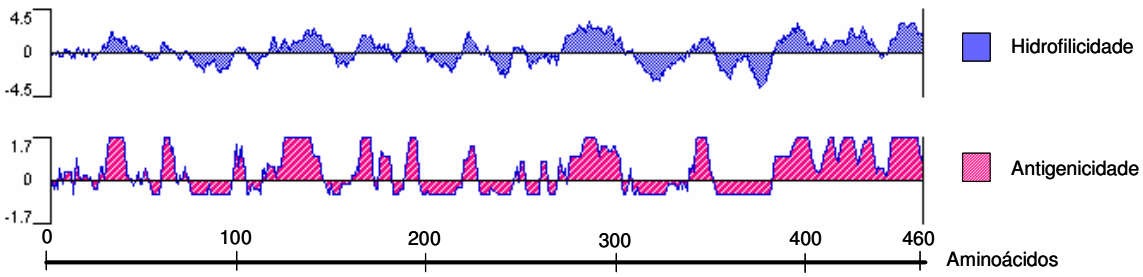


Figura 10. Análise das características estruturais da proteína CerS de *L. amazonensis*. Utilizando o programa DNAStar-Protean (Lasertgene) a hidrofilicidade foi calculada pelo método descrito por Kyle e Doolitte (1982) e a antigenicidade pelo método descrito por Jamenson e Wolf (1988). A barra inferior representa os aminoácidos da proteína.

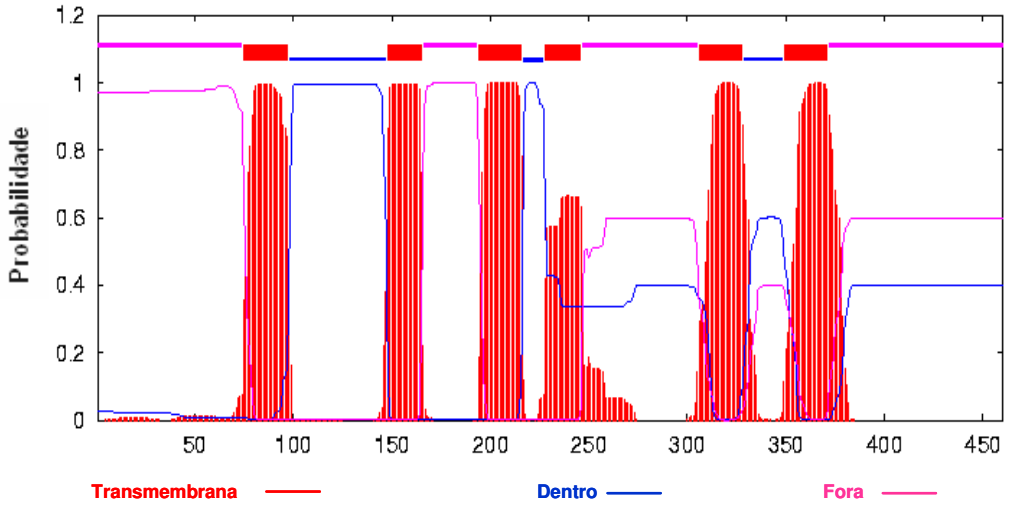


Figura 11. Análise de domínios transmembrana da proteína CerS de *L. amazonensis*. Gráfico de probabilidade de regiões transmembrana na proteína CerS de *L. amazonensis* gerado pelo programa TMHMM. Os traços vermelhos representam as predições de regiões transmembrana, os traços azuis representam segmentos provavelmente localizados no lado endoplasmático da membrana do retículo endoplasmático e os traços rosa segmentos localizadas no lado citoplasmático. O eixo X representa os aminoácidos da proteína.

A figura 12, gerada pelo programa SOSUI, mostra a predição da estrutura secundária para a proteína CerS de *L. amazonensis*. Parte do motivo Lag1 está localizado no 4° DTM que possui estrutura de hélice secundária. As hélices secundárias possuem hidrofobicidade semelhante aos segmentos hidrofóbicos de proteínas solúveis e, possivelmente, formam os sítios ativos da proteína (Hirokawa et al., 1998). Kageyama-Yahara e Riezman estudaram a topologia da CerS de *S. cerevisiae* em 2006 e observaram que os resíduos de histidina (His^{255} e His^{256}) e ácido aspártico (Asp^{283} e Asp^{286}) do motivo Lag1 (Figura 12, setas) são críticos para a função da proteína LAG1 *in vivo* (Kageyama-Yahara e Riezman, 2006). Em *S. cerevisiae* estes aminoácidos estão presentes na região TM da CerS (Figura 12, B) (sequência NP_011860.1 analisada no programa SOSUI), enquanto que em *L. amazonensis* os resíduos de ácido aspártico estão presentes em uma provável porção citoplasmática da CerS (Figura 12, A), considerando que a proteína de *L. amazonensis* está localizada na membrana do retículo endoplasmático como observado em diversas espécies. Em *T. cruzi,* os resíduos de histidina permanecem na região TM como nos demais, porém os resíduos de ácido aspártico estão em uma provável porção endoplasmática da proteína (Figura 12, C)

(sequência XP_805927.1 analisada no programa SOSUI), considerando também a sua localização no RE.

Devido à localização dos resíduos de histidina e ácido aspártico na bicamada lipídica em *S. cerevisiae* e à similaridade estrutural entre Lag e TRAM ("translocating chain-associating membrane protein") Kageyama-Yahara e Riezman sugerem que a LAG1p e LAC1p de *S. cerevisiae* formem um canal hidrofóbico na membrana, o que pode explicar como a CerS pode ser capaz de captar esfinganina dos dois lados da membrana do retículo endoplasmático (Kageyama-Yahara e Riezman, 2006). No entanto, estas informações não podem ser aplicadas à CerS de *L. amazonensis* já que metade do motivo Lag1 está localizado na face citoplasmática da membrana. Estudos realizados com extrato microssomal de fígado de camundongo feitos por Mandon et al. (1992) e Hirschberg et al. (1993) demonstram que a acilação da esfingosina e esfinganina que resulta na formação da ceramida e dihidroceramida, respectivamente, ocorrem na face citoplasmática do RE, o que corrobora os resultados observados em *L. amazonensis* (Hirschberg et al., 1993, Mandon et al., 1992).

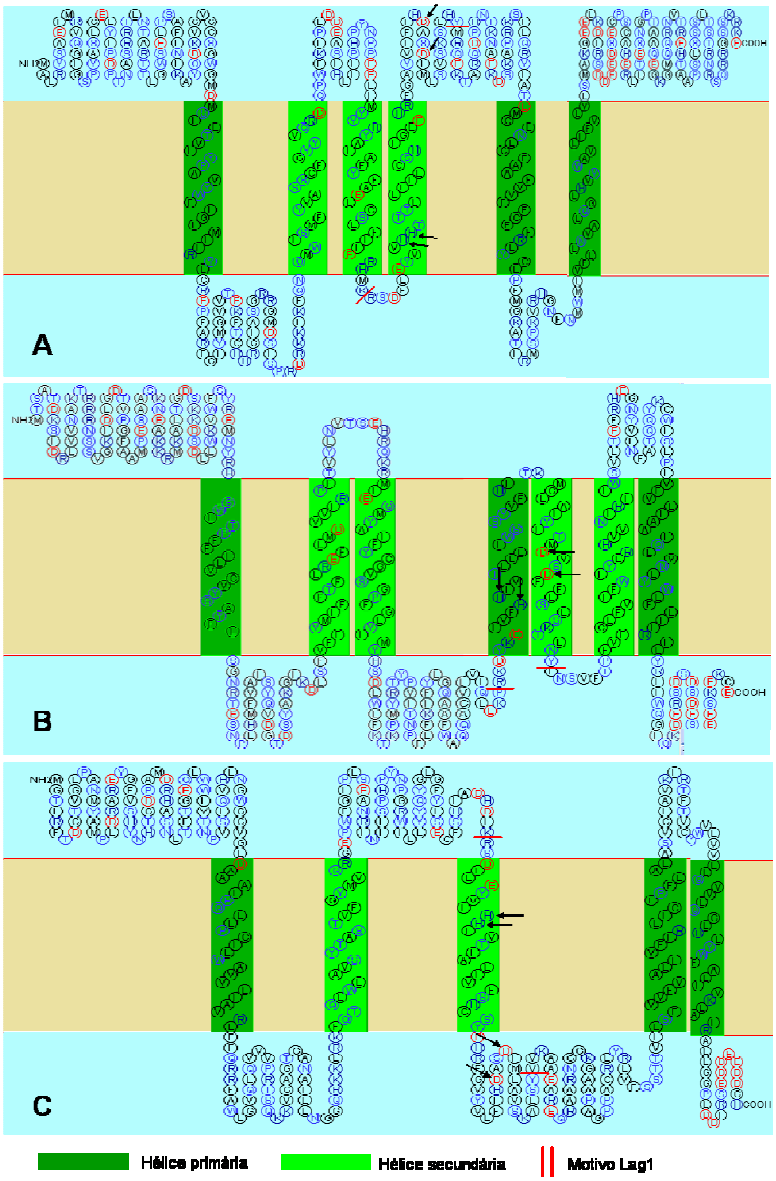


Figura 12. Predição da estrutura secundária da proteína CerS de *L. amazonensis, S. cerevisiae* e *T. cruzi*. Esquema ilustrativo da estrutura secundária da proteína CerS de *L. amazonensis* (A)*, S. cerevisiae* (B) e *T. cruzi* (C) gerado pelo programa SOSUI. Regiões transmembrana em verde escuro representam hélices primárias, regiões transmembrana em verde claro representam hélices secundárias, traços em vermelho delimitam o motivo Lag1 e setas pretas indicam a localização dos aminoácidos histidina e ácido aspártico.

Conforme a análise dos programas TMHMM e SOSUI, as regiões N- e C-terminal da CerS de *L. amazonensis* estão localizadas na face citoplasmática da membrana (provavelmente do retículo endoplasmático), assim como foi observado no estudo da CerS de *S. cerevisiae* (Kageyama-Yahara e Riezman, 2006). No entanto, quando utilizamos o programa SOSUI para analisar a sequência de *S. cerevisiae* observamos uma proteína com a porção C-terminal na face endoplasmática da membrana (Figura 12, B), sendo observada

uma disposição semelhante para a proteína de *T. cruzi* (Figura 12, C). Esta disposição da porção N-terminal na porção citoplasmática da membrana e a porção C-terminal na porção endoplasmática também foi observada nas proteínas putativas de CerS de *L. major, L. mexicana, L. braziliensis, L. infantum* quando analisadas pelo mesmo programa.

4.2 Organização do gene CerS em *L. amazonensis*

Para verificar a organização genômica do gene CerS de *L. amazonensis*, o DNA genômico foi digerido com sete enzimas de restrição e hibridizado com sonda correspondente à ORF do gene CerSLa. As digestões com as enzimas de restrição *Ava* I, *Ava* II, *Ns*i I, *Pvu* II, *Sac* II, *Sph* I e *Xho* I produziram padrões de hibridização compatíveis com o mapa de restrição gerado a partir da sequência consenso da ORF da CerS de *L. amazonensis* pelo programa DNAStar-MapDraw (Lasergene). O conjunto dos resultados de todas as digestões sugere que existe apenas uma cópia do gene CerS no genoma de *L. amazonensis* (Figura 13). Estes dados foram confirmados quando realizamos busca por sequências similares ao *LAG1* e *LAC1* de *S. cerevisiae* no banco de dados do genoma de *L. major, L. braziliensis, L. infantum* e *L. mexicana* e não encontramos outra sequência homóloga além da que está sendo caracterizada neste estudo. Isto diferencia a *L. amazonensis* da maioria das espécies já estudadas uma vez que, com exceção de tomate (Brandwagt et al., 2000), foram identificados pelo menos dois genes homólogos ao *LAG1* de *S. cerevisiae* em cada organismo. Por exemplo, em *C. elegans* e em *T. cruzi* foram identificados 2 genes parálogos (Figueiredo, 2008; Jiang et al., 1998) e em humanos e camundongos seis genes (Mizutani et al., 2005).

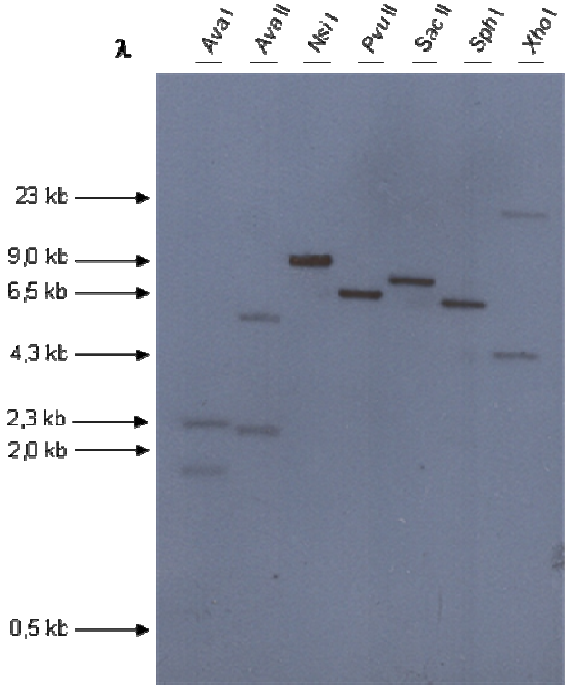


Figura 13. Organização genômica do gene CerS de *L. amazonensis*. Membrana de nylon contendo DNA genômico de *L. amazonensis* digerido com as enzimas de restrição *Ava* I, *Ava* II, *Nsi* I, *Pvu* II, *Sac* II, *Sph* I e *Xho* I, hibridizada com a sonda correspondente à ORF do gene CerSLa. Lavagem de estringência com SSC 0,1 X e SDS 0,1 % a temperatura de 65°C. Tempo de exposição de uma semana.

4.3 Complementação de Levedura com o gene CerS de *L. amazonensis*

Para verificar se o gene caracterizado codifica uma proteína com atividade de CerS foi realizada a complementação em *S. cerevisiae* com o gene que codifica a CerS putativa de *L. amazonensis.* Em *S. cerevisiae*, a deleção simultânea do gene *LAG1* e *LAC1* elimina toda a biossíntese de ceramida dependente de acil-CoA detectável nas frações microssomais, resultando em uma redução severa nos níveis de ceramida e IPC com o concomitante acúmulo de esfingosina livre e de ácidos graxos (Guillas et al., 2001; Schorling et al., 2001). A deleção individual de *LAG1* ou *LAC1* resulta em células viáveis, enquanto que a dupla deleção resulta em inviabilidade na cepa YPK9 ou fragilidade osmótica, hipersensibilidade ao reagente calcofluor e diminuição severa na taxa de crescimento na cepa W303 de *S. cerevisiae* (Barz e Walter, 1999; Guillas et al., 2001; Jiang et al., 1998). Sendo assim, a cepa YPK9 Δlac1 Δlag1 só é viável se portar uma cópia extra de um gene que codifica a CerS. A letalidade desta cepa já foi revertida pela expressão de genes como *LASS1* de humanos e

LAGCe-1 de *Caenorhabditis elegans*, dois genes que apresentam, respectivamente, 26% e 32% de identidade de aminoácidos com o gene *LAG1* de *S. cerevisiae* (Jiang et al., 1998). Recentemente, foi demonstrado que o gene *UOG1* de camundongos, cujo grau de identidade é de 27% em relação ao gene *LAG1* de leveduras é capaz de induzir uma atividade de ceramida sintase específica para estearoil-CoA (C18:0) em células de mamíferos (Venkataraman e Futerman, 2002). Desta forma, como as sequências de *S. cerevisiae* e *L. amazonensis* possuem 24% de identidade é provável que o gene caracterizado seja capaz de complementar a cepa YPK9 Δlac1 Δlag1.

A cepa YPK9 Δlac1 Δlag1 utilizada neste estudo é complementada com o próprio gene *LAC1* funcional clonado no plasmídeo pBM150 para se manter viável. O vetor pBM150 está sob o controle do promotor *GAL1,10* (Jiang et al., 1998) e contém a origem de replicação *ARS1-CEN4* para a manutenção estável em baixo número de cópias em leveduras e o marcador auxotrófico *URA3* (Johnston e Davis, 1984). Desta forma, para avaliarmos se esta levedura é capaz de sobreviver somente com a CerS de *Leishmania* foi utilizada a técnica de "plasmid shuffling", na qual a levedura é transformada com um plasmídio contendo o gene putativo de *Leishmania* e forçada a perder o plasmídio contendo o gene *LAC1* de *Saccharomyces*.

Antes de iniciarmos o trabalho com as leveduras gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Andreas Conzelmann, nós precisávamos ter a certeza de que estávamos trabalhando com as cepas YPK9 (selvagem) e YPK9 Δlac1 Δlag1 (deletada). Para isto, foi realizado um teste baseado na capacidade de crescimento e proliferação da levedura quanto à auxotrofia (Figura 14). Os mutantes em questão são auxotróficos para certos aminoácidos, ou seja, eles precisam captar aminoácidos exógenos presentes no meio de cultura para sobreviver. Neste caso, como a cepa selvagem possui o genótipo com as deleções ade2-101^{ochie}, his3-Δ200, leu2-Δ1, lys2-801^{amber}, trp1-Δ63 e ura3-52, ela é auxotrófica para adenina, histidina, leucina, lisina, triptofano e uracila, ou seja, esta cepa não é capaz de sintetizar estes aminoácidos. Isto torna necessário a presença destes aminoácidos no meio de cultura. Já a cepa deletada que possui o genótipo ade2-101^{ochie}, his3-Δ200, leu2-Δ1, lys2-801^{amber}, trp1-Δ63, ura3-52., *LAC1*::*LEU2*, *LAG1*::*TRP1* é auxotrófica somente para adenina, histidina e lisina, uma vez que os genes *LAC1* e *LAG1* foram substituídos pelos genes *LEU2* e *TRP1* e o plasmídio pBM150 possui um marcador URA, ou seja, estas células conseguem sintetizar leucina, triptofano e uracila sobrevivendo na ausência destes aminoácidos. Desta forma, para verificarmos a

identidade destas leveduras as cepas selvagem e deletada foram plaqueadas em meio mínimo (SD e SG, respectivamente) suplementado com adenina, histidina, leucina, lisina, triptofano e uracila e em meios SD ou SG com todos os aminoácidos citados menos um. Assim, observamos que a cepa selvagem foi capaz de crescer em meios mínimos suplementados com todos os aminoácidos, porém incapaz na ausência de pelo menos um dos aminoácidos. Por outro lado, a cepa deletada cresceu em meios sem leucina e triptofano, mas não sem adenina, histidina e lisina.

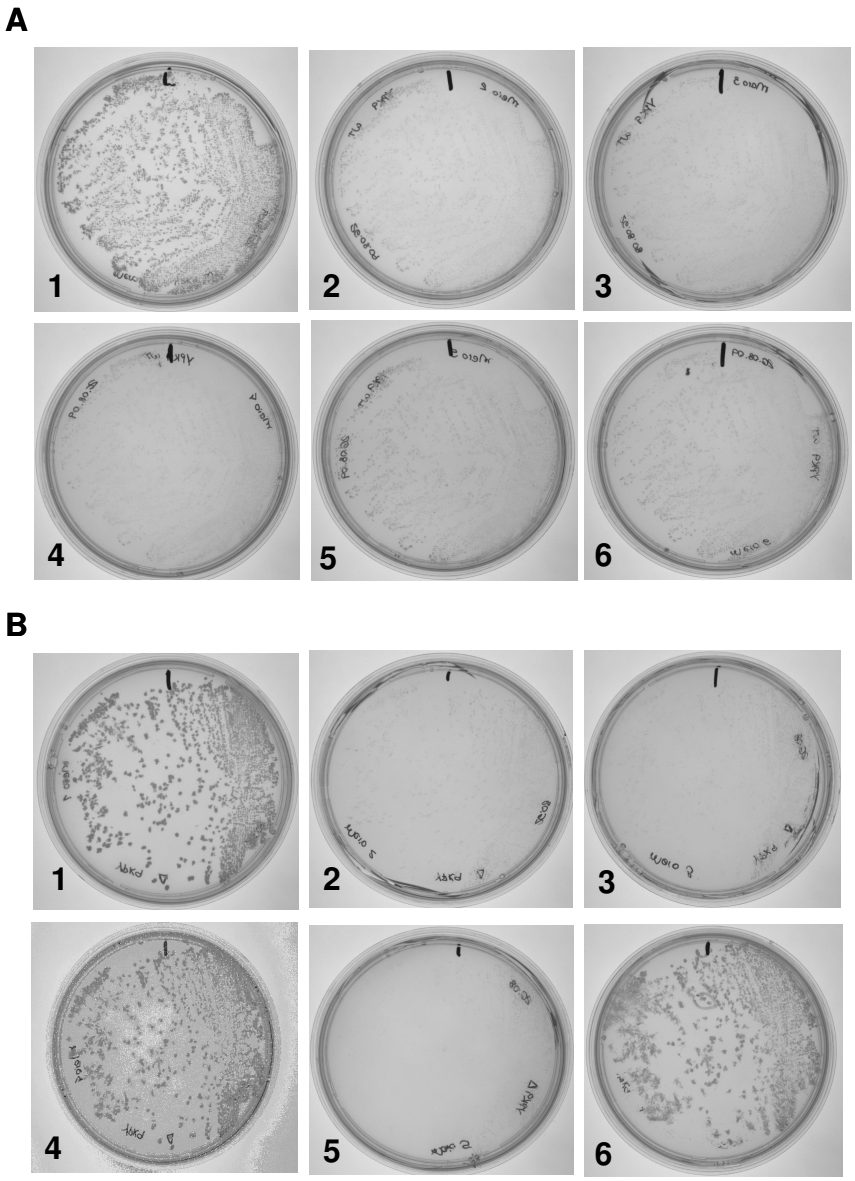


Figura 14. Confirmação de cepa YPK9 de *S. cerevisiae* quanto à auxotrofia. Cepas YPK9 selvagem (A) e deletada (B) cultivadas em meio mínimo SD e SG, respectivamente, suplementado com adenina, histidina, leucina, lisina, triptofano e uracila (1). Os demais meios foram enriquecidos com todos os aminoácidos citados anteriormente menos: adenina (2), histidina (3), leucina (4), lisina (5) e triptofano (6).

Para a expressão do gene putativo de CerS de *L. amazonensis* em células de levedura foi utilizado o plasmídio pYES6/CT/Lac Z que possui o gene de resistência ao antibiótico blasticidina como marca de seleção. Desta forma, como as concentrações de blasticidina indicadas pelo fabricante para leveduras são de 25 a 300 μg/mL foram realizados testes de sensibilidade ao antibiótico para sabermos a concentração mínima necessária para inibir a multiplicação das cepas selvagem e deletada na ausência do gene de resistência presente no

plasmídio. Foi observada total inibição do crescimento das leveduras apenas em meios contendo 200 μg/mL de blasticidina.

O clone pCR2.1-TOPO [CerSLa4] descrito anteriormente, contendo o inserto na orientação correta, foi digerido com *Kpn* I e *Not* I para a liberação do inserto a ser subclonado no plasmídio de expressão pYES6/CT. A preparação do vetor foi feita pela modificação do plasmídio pYES6/CT/lacZ, que foi digerido com as enzimas *Kpn* I e *Not* I, resultando na liberação de um fragmento contendo o gene lacZ. Após ligação do plasmídio de expressão pYES6/CT com o inserto CerSLa a construção pYES6/CT [CerSLa] foi digerida com *Kpn* I para linearização do DNA e, posteriormente, com *Not* I para a liberação do inserto, sendo observado um padrão de bandas de 7 kb (plasmídio + inserto) e 5,7 kb (plasmídio) / 1,3 kb (inserto), respectivamente (dados não apresentados). Assim, confirmamos a subclonagem da ORF CerS de *L. amazonensis* no plasmídio pYES6/CT, sob controle do promotor *Gal1,10.*

As cepas YPK9 selvagem e deletada de *S. cerevisiae* foram transformadas com a construção pYES6/CT [CerSLa] e com o plasmídio pYES6/CT vazio como controle da complementação. As duas cepas também foram submetidas ao mesmo processo de transformação, porém sem DNA, o qual foi utilizado como controle da reação. Após a transformação, todas as células foram plaqueadas em meio rico seletivo (YPDBlast ou YPGalBlast), onde somente as células submetidas ao processo de transformação sem DNA não cresceram devido a ausência do gene de resistência ao antibiótico presente no plasmídio pYES6/CT (dados não apresentados). Neste momento, as leveduras YPK9 deletadas transformadas possuíam dois plasmídios: o pBM150 [*LAC1*] e o pYES6/CT [CerSLa] ou pBM150 [*LAC1*] e pYES6/CT. Para verificarmos se as células poderíam se manter viáveis somente com o gene de *L. amazonensis*, as leveduras transformadas foram plaqueadas em meios mínimos seletivos contendo 5-FOA. O 5-FOA é tóxico para as células que possuem o gene URA3, o qual está presente no plasmídio pBM150. Desta forma, somente conseguiria sobreviver a célula que pudesse eliminar o plamídio pBM150 [*LAC1*] de *S. cerevisiae* e, ao mesmo tempo, possuísse um gene codificando uma proteína com atividade de CerS.

Todas as cepas foram plaqueadas em diferentes meios como prova fenotípica do genótipo esperado após transformação e seleção (Figura 15). Para estes testes todas as cepas transformadas foram plaqueadas em meio mínimo contendo galactose como fonte de

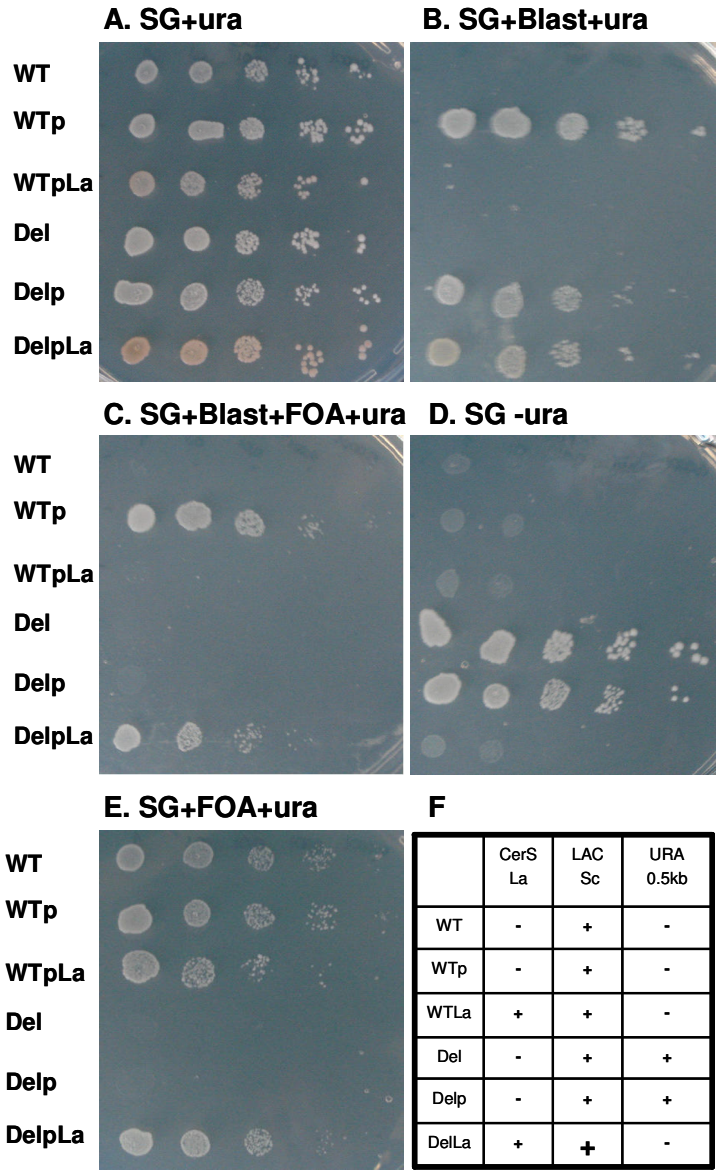
carbono (SG), adenina, histidina, leucina, lisina e triptofano. Esse meio recebeu suplementação com uracila e/ou 5-FOA e/ou blasticidina em diversas combinações.

Como esperado, todas as cepas cresceram em meio SG+ura (controle positivo) (Figura 15 A). No meio SG+Blast+ura (Figura 15 B), observou-se crescimento somente das células transformadas com pYES6/CT e pYES6/CT [CerSLa], devido à marca de resistência ao antibiótico conferida pelo plasmídio e à disponibilidade de uracila no meio. Notamos em vários experimentos que a cepa YPK9 transformada com pYES6/CT [CerSLa] mostrava inibição do crescimento na presença de blasticidina, o que não era esperado. Inicialmente estas células apresentavam crescimento normal em meios seletivos, porém com repiques sucessivos o crescimento das mesmas foi se reduzindo gradativamente, principalmente quando em cultura líquida. É possível que, além do antibiótico de seleção ser mais instável em cultura líquida, a alta expressão de genes codificadores de CerS resulte em altos níveis intracelulares de ceramida que estão relacionados à inibição do crescimento celular, diferenciação celular ou apoptose (revisado em Shaymam, 2000).

Como esperado, em meio SG+Blast+FOA+ura não observamos crescimento das cepas selvagem e deletada não transformadas devido à sensibilidade à blasticidina (Figura 15 C). A cepa YPK9 selvagem transformada com pYES6/CT vazio conseguiu crescer neste meio seletivo contendo blasticidina e 5-FOA devido a três fatores: aquisição do gene de resistência ao antibiótico, genótipo deletado para URA3 (adquire uracila do meio, não sendo sensíveis ao 5-FOA) e presença de genes *LAC1* e *LAG1* próprios. A cepa YPK9 selvagem transformada com pYES6/CT [CerSLa] não cresceu neste meio provavelmente devido às condições citadas anteriormente. As leveduras deletadas transformadas com pYES6/CT [CerSLa] conseguiram sobreviver em meio seletivo com 5-FOA. Isto indica que o gene de CerS de *L. amazonensis* é capaz de complementar a cepa YPK9 deletada que perdeu o plasmídio pBM150 contendo o gene *LAC1* de *S. cerevisiae*, ou seja, provavelmente a proteína de *L. amazonensis* possui a atividade de CerS. Nota-se também que as cepas YPK9 deletadas transformadas apenas com pYES6/CT não cresceram neste meio porque não foram capazes de sobreviver sem o gene *LAC1* de *S. cerevisiae* presente no plasmídio pBM150, confirmando a importância da CerS na sobrevivência destas células.

Para confirmar se as leveduras deletadas transformadas com pYES6/CT [CerSLa], previamente plaqueadas em 5-FOA, perderam o plamídio pBM150 [*LAC1*] todos os clones foram plaqueados em meio SG-ura, onde somente células que contém o gene URA3 são

capazes de sobreviver. Como podemos observar na figura 15 D a cepa deletada transformada com o gene de *Leishmania* não cresceu no meio sem ura, ou seja, esta cepa perdeu o plasmídio pBM150 durante a seleção em 5-FOA. Esta informação se confirma quando as células são plaqueadas em meio SG+FOA+ura (Figura 15 E), onde podemos observar o crescimento somente das células que são deletadas para o gene URA ou células que conseguem sobreviver sem o plasmídio pBM150 e sem gene de *S. cerevisiae*, neste caso a cepa deletada transformada com o gene putativo CerS de *L. amazoenensis.*



	CerS La	LAC Sc	URA 0.5kb
WT	-	+	-
WTp	-	+	-
WTLa	+	+	-
Del	-	+	+
Delp	-	+	+
DelLa	+	+	-

Figura 15. Confirmação da transformação de *S. cerevisiae* cepa YPK9 selvagem e deletada com gene CerS de *L. amazonensis*. Cepas YPK9 selvagem (WT), YPK9 selvagem + pYES6/CT (WTp), YPK9 selvagem + pYES6/CT [CerSLa] (WTpLa), YPK9 deletada (Del), YPK9 deletada + pYES6/CT (Delp), YPK9 deletada + pYES6/CT [CerSLa] (DelpLa) plaqueadas com D.O. decrescentes (1, 0,1, 0,001, 0,001 e 0,0001) em diferentes meios mínimos como: SG+ura (A), SG+Blast+ura (B), SG+Blast+FOA+ura (C), SG-ura (D) e SG+FOA+ura (E), para avaliar o perfil de crescimento das células transformadas. F: Tabela representativa dos resultados de PCR com oligonucleotídeos CerSL, *LAC1* Sc e URA3 Sc indicando se o produto foi amplificado (+) ou não (-) nos diferentes clones. WTp = WT transformada com pYES6/CT, WTpLa = WT transformada com pYES6/CT [CerSLa], Delp = Del transformada com pYES6/CT, DelpLa =Del transformada com pYES6/CT [CerSLa].

Para confirmar o genótipo das leveduras complementadas foi realizada reação de polimerização em cadeia utilizando como alvos os genes CerS de *L. amazonensis* e *LAC1* de *S. cerevisiae*, esperando-se assim confirmar a presença ou ausência desses genes nos transformantes (Figura 15 F, Figura 16 A e B). Inesperadamente, a reação de PCR realizada

com o par de “primers” (LAC Sc For 1 e LAC Sc Rev 1) para o gene *LAC1* de *S. cerevisiae* a partir do DNA total da cepa deletada transformada com pYES6/CT [CerSLa] e selecionada em 5-FOA gerou um produto amplificado do tamanho esperado (Figura 15 F e Figura 16 B). Isto indica que o gene *LAC1* permanecia nestas células. Para confirmar tal resultado, um novo par de oligonucleotídeos foi sintetizado (LAC Sc For 2 e LAC Sc Rev 2) (Figura 16 B). Novas reações de PCR foram realizadas com as quatro possíveis combinações geradas a partir dos dois pares de oligonucleotídeos, sendo obtidos produtos amplificados com os tamanhos correspondentes em todos os casos. Estes resultados indicam duas possibilidades: (1) as células incorporaram em seu genoma o próprio gene *LAC*1 que estava presente no plasmídio pBM150 ou (2) o 5-FOA não foi capaz de selecionar esta cepa. A segunda hipótese é menos provável uma vez que esta cepa se mostrou auxotrófica para ura (Figura 15 D), o que indica que estas células expulsaram o plasmídio pBM150 após seleção em 5-FOA.

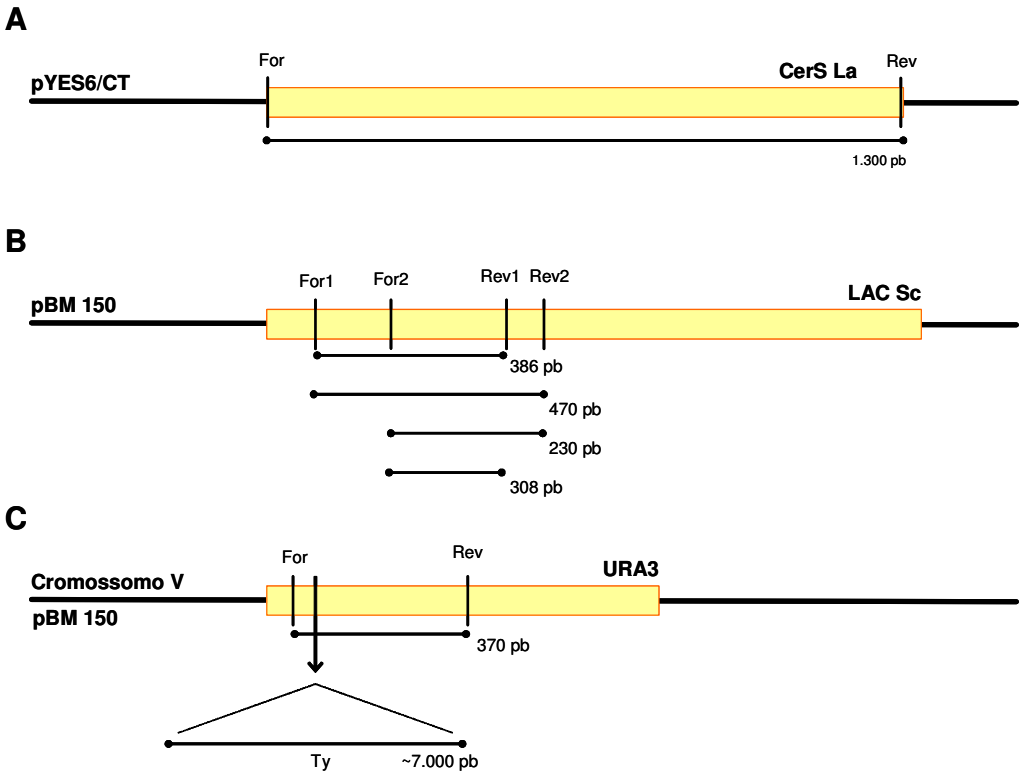


Figura 16. Esquema dos genes CerS de L. amazonensis, LAC e URA3 de S. cerevisiae e dos produtos amplificados a partir dos pares de oligonucleotídeos. Esquema demonstrando a localização dos pares de oligonucleotídeos capazes de amplificar os genes CerS de *L. amazonensis* (A), LAC (B) e URA3 (C) de *S. cerevisiae*. Os sítios de anelamento dos "primers" estão identificados e os tamanhos dos produtos amplificados esperados estão demonstrados pelas linhas contínuas.

Com a finalidade de identificar a presença ou não do plasmídio pBM150 na célula para confirmar novamente a ação do 5-FOA, e consequente expulsão do plasmídeo pBM150, ou possível incorporação do gene *LAC1* de *S. cerevisiae* no genoma da célula, foram sintetizados oligonucleotídeos que cercam a região do inserto Ty presente no gene cromossômico URA3 dos mutantes *ura3-52* que tornam o gene inativo (Rose e Winston, 1984) (Figura 16 C). A localização estratégica dos oligonucleotídeos visava obter produtos amplificados de diferentes tamanhos para se diferenciar a presença do gene URA3 presente no plasmídio pBM150 (370 pb) e o gene URA3 genômico com inserção Ty - mutante *ura3-52* (~ 7 kb). Como não foi utilizada uma DNA polimerase apropriada para amplificação de produtos longos na reação de PCR, era esperado a ausência do produto de aproximadamente 7 kb referente ao gene URA3 genômico com inserção Ty. A cepa deletada apresentou um produto amplificado referente ao gene URA3 presente no plasmídio pBM150 (Figura 15 F). Como previsto, quatro clones independentes da cepa deletada e complementada com o gene de

Leishmania não apresentaram produto amplificado de 370 pb o que confirma a eliminação do plasmídeo pBM150 da célula e, consequentemente a incorporação do gene *LAC1* de *S. cerevisiae* (Figura 15 F). Por se tratar de um gene essencial é possível que estas células tenham incorporado o gene *LAC1* por garantia de sobrevivência, porém é estranho este fato ter ocorrido somente com a cepa deletada transformada com o gene de *Leishmania*. Além do gene CerS de *L. amazonensis*, o que diferencia esta célula da levedura deletada e deletada transformada com o plasmídio vazio é o contato com o 5-FOA (uma vez que estas duas células morrem na presença de 5-FOA). Estudos tem demonstrado que o 5-FOA é altamente mutagênico (Wellington e Rustchenko, 2005; Wellington et al., 2006). Estes pesquisadores demonstraram as células que sobreviveram à exposição ao 5-FOA por apenas um dia adquirirem alterações no tamanho de vários cromossomos (Wellington e Rustchenko, 2005). Somado a estas, outras alterações genéticas já foram reportadas em *S. cerevisiae* expostos ao 5-FOA (Hiraoka et al., 2000). Frente às informações citadas e aos dados obtidos neste estudo é fácil aceitar a hipótese de que as células deletadas transformadas com o gene CerS de *L. amazonensis* e selecionadas em 5-FOA incorporaram o gene *LAC1* de *S. cerevisiae* em seu genoma. Isto nos impede de inferir se o gene putativo CerS de *L. amazonensis* produz uma proteína com atividade de CerS e é capaz de complementar estas células.

Devido ao insucesso no teste de complementação em leveduras acima citado nova transformação foi realizada nas mesmas condições anteriores, no entanto algo mais intrigante foi observado. As células deletadas transformadas ou não com o plasmídio pYES6/CT vazio cresceram nos meios contendo 5-FOA (dados não apresentados). Foram preparados meios contendo 1 e 2 mg/mL de 5-FOA de diferentes lotes e marcas (Sigma® e Fermentas®), no entanto não foi possível a seleção destas leveduras em 5-FOA. Acredita-se que estas células tenham sofrido os efeitos mutagênicos causados pelo 5-FOA descritos por Wellington e Rustchenko (2005) e adquirido resistência à droga através de alterações nos cromossomos (alongamento do cromossomo 5 ou trissomia do cromossomo 4), que ocorre com uma frequência média de aproximadamente 1×10^{-5} (Wellington e Rustchenko, 2005). Algumas hipóteses do mecanismo de resistência à droga incluem: mudanças na quantidade ou expressão de um gene afetando diretamente ou indiretamente o fluxo de entrada ou saída do 5-FOA na célula, como as permeases ou bombas de efluxo celular, ou destruição do

5-FOA ou superprodução de um metabólito que antagoniza o seu efeito tóxico (Wellington e Rustchenko, 2005).

Além disto, estudos vem demonstrando que existe uma relação entre células resistentes a múltiplas drogas (MDR) e a expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídios em leveduras em brotamento (Dawson et al., 2008). Uma via que parece controlar a resistência inata a drogas em leveduras em brotamento envolve a ATPase-(H+) vacuolar (V-ATPase) que parece ser controlada pelo gene Rav1 (Parsons et al., 2004; Yoshida e Anraku, 2000). Dawson et al. demonstraram que *Schizosaccharomyces pombe* deletados para o gene *LAC1*, mas não para seu homólogo *LAG1*, apresentam fenótipo de sensibilidade a multidrogas devido à maior permeabilidade da célula à droga ou a capacidade reduzida de sua extrusão. Células deletadas para *Rav1* também apresentam este comportamento, o qual é revertido com a super expressão de *LAG1.* Duplos mutantes para *LAC1* e *Rav1* apresentam atividade V-ATPase deficiente, o que resulta em um acúmulo de drogas dentro da célula. Estes pesquisadores também observaram que a super expressão de *LAC1* e *LAG1* na cepa selvagem resultou no aumento da resistência a drogas (Dawson et al., 2008). Todos estes dados sugerem que a alteração de dosagem da CerS pode modular a resistência inata a drogas de *S. pombe*. Isto pode explicar um dos motivos pelo qual as células neste estudo adquiriram a resistência ao FOA, já que as mesmas são complementadas com o gene *LAC1* de *S. cerevisiae*, mesmo que em baixo número de cópias. Talvez, uma alternativa seria utilizar cepas YPK9 deletadas para *LAC1* e *LAG1* e complementadas com o gene *LAG1* de *S. cerevisiae*, como foi utilizado na caracterização de CerS de outros organismos, como *T. cruzi*, humano e *C. elegans*, uma vez que o envolvimento do gene *LAG1* no mecanismo de resistência a drogas parece ser mais brando.

Outro fator capaz de explicar a falha de seleção em leveduras seria a inatividade da molécula de 5-FOA. Isto é pouco provável uma vez que quatro diferentes lotes de diferentes marcas foram testados, além de diferentes formas de diluição da droga no meio de cultura. Além disto, um dos lotes de 5-FOA foi capaz de selecionar uma cepa diferente de *S. cerevisiae* em um estudo concomitante realizado em outro laboratório (Dr. Mário Henrique de Barros, comunicação pessoal).

Devido ao insucesso na complementação em leveduras poderíamos propor como alternativa para a caracterização do gene putativo de *L. amazonensis* o sistema de transfecção e hiperexpressão em células de linhagem como HeLa, HEK 293 ou *COS*, utilizados

para caracterização dos genes humanos que codificam CerS (Laviad et al., 2008, Mizutani et al., 2008).

4.4 Ensaio Enzimático da CerS *In Vitro*

A atividade *in vitro* de CerS já foi estudada em diversas espécies baseando-se na formação da ceramida a partir da base esfingóide marcada e um doador de acil CoA sob a ação da enzima presente em um extrato microssomal. O ensaio ocorre em um tampão reacional contendo diferentes íons, cofatores, detergentes e estabilizadores protéicos. Com a finalidade de investigar se o tamoxifeno interfere na atividade de CerS de *L. amazonensis*, iniciamos a padronização de ensaios enzimáticos para testar a atividade de CerS *in vitro* utilizando frações enriquecidas em microssomos de *L. amazonensis*. Para isso, utilizamos inicialmente frações enriquecidas em microssomos de fígado de camundongo como controle da reação e posteriormente extratos microssômicos de *T. cruzi*.

A princípio a reação para CerS foi realizada conforme descrito por Wang e Merril (2000) onde 25 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,4), 0,5 mM de DTT, 1 µM de [^{3}H]-esfingosina, 50 µM de palmitoil CoA e 40 µg extrato microssômico de *L. amazonensis* e de fígado de camundongo foram incubados a 25 ° e 37 °C, respectivamente, por 15 minutos (Reação 1, Figura 17). Foram utilizados como controle reações realizadas na ausência de extrato microssomal e na ausência de palmitoil CoA. Os lipídios foram extraídos da reação e submetidos a dois diferentes sistemas de separação por TLC (Ichikawa et al, 1994; Wang e Merril, 2000) para verificar qual deles seria o mais apropriado para avaliar os produtos da reação. Notamos que ambos sistemas separam muito bem a [^{3}H]–esfingosina da [^{3}H]-ceramida formada concluindo-se que qualquer dos dois sistemas poderia ser utilizado. Como podemos observar na figura 17 não houve a formação da ceramida marcada esperada nas posições 4 e 8 (reações enzimáticas completas com microssomos de *L. amazonensis* e de fígado de camundongo, respectivamente) com valores de R*f*s igual a 0,83 e 0,48 dos controles nos sistemas de corrida descritos por Ichikawa et al. (1994) e Wang e Merril (2000), respectivamente.

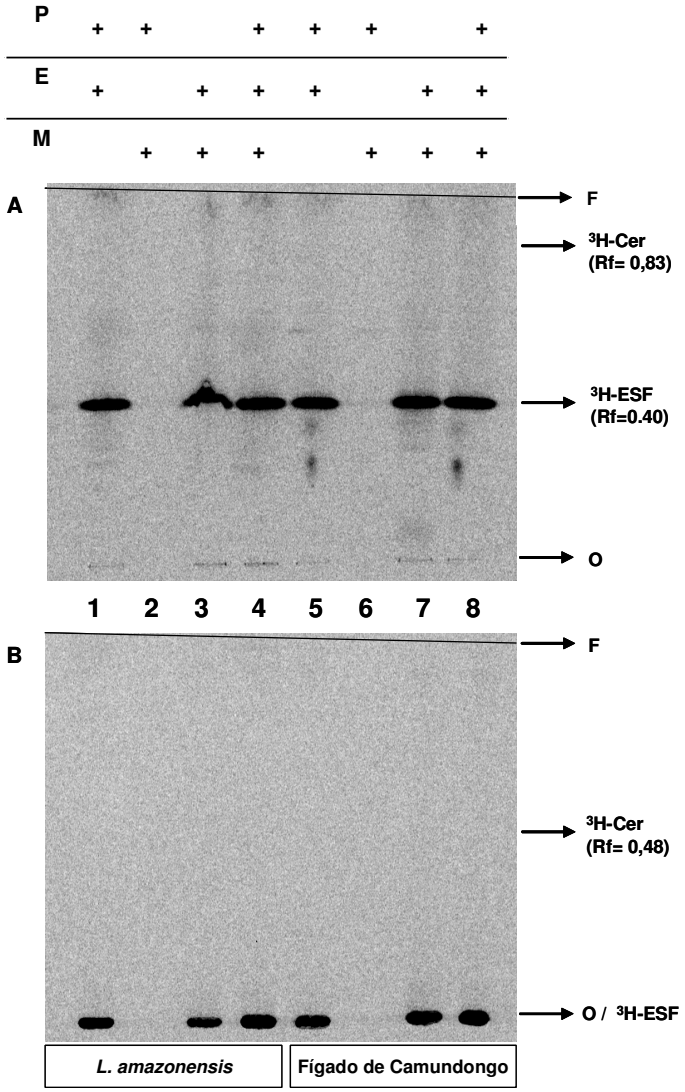


Figura 17. Análise da atividade para CerS. TLC do extrato lipídico dos produtos da reação enzimática para CerS com as frações protéicas enriquecidas em microssomos de *L. amazonensis* e de fígado de camundongo submetidos a dois diferentes sistemas de corrida. **A.** Sistema de corrida clorofómio:metanol:água (60:35:8, v/v/v) em 20% da corrida na placa e clorofórmio:metanol:ácido acético (90:2:8, v/v/v) no restante da corrida (Ichikawa et al., 1994). **B.** Sistema de corrida dietileter: metanol (99:1, v/v) (Wang e Merril et al., 2000). (1) reação enzimática contendo apenas palmitoil CoA e [^{3}H]-esfingosina (controle negativo), (2) reação contendo palmitoil CoA e microssomos de *L. amazonensis*, (3) reação contendo [^{3}H]-esfingosina e microssomos de *L. amazonensis*, (4) reação completa contendo palmitoil CoA, [^{3}H]-esfingosina e microssomos de *L. amazonensis*, (5) reação contendo apenas palmitoil CoA e [^{3}H]-esfingosina (controle negativo), (6) reação contendo palmitoil CoA e microssomos de fígado de camundongo, (7) reação contendo [^{3}H]-esfingosina e microssomos de fígado de camundongo e (8) reação completa contendo palmitoil CoA, [^{3}H]-esfingosina e microssomos de fígado de camundongo. P: palmitoil CoA, E: [^{3}H]-esfingosina, : ^{3}H-ESF: [^{3}H]-esfingosina, ^{3}H-Cer: [^{3}H]-ceramida, M: fração microssomal de *L. amazonensis* ou de fígado de camundongo.O: origem, F: frente.

A ausência de atividade observada poderia ser devida a requerimentos iônicos específicos ou à concentração inadequada de qualquer um dos componentes do ensaio. Novos ensaios foram realizados aumentando as concentrações dos extratos microssômicos

e do precursor [^{3}H]–esfingosina para 100 µg e 2 µM, respectivamente, e novamente não obtivemos a formação de [^{3}H]–ceramida (Reação 2). Desta forma, novas condições de ensaio foram testadas utilizando 2 mM de $MgCl_2$, 20 µM de BSA, 20 µM de esfingosina fria, 0,25 µCi de [^{3}H]–esfingosina, 75 µM de palmitoil CoA e 250 µg de fração microssomal, ressuspendidos com HEPES em um volume final de 500 µl conforme descrito por Hirschberg et al. (1993) (Reação 3). A BSA age como carreadora dos substratos da reação que são hidrofóbicos e tendem a se envolver com as membranas microssomais reduzindo suas concentrações livres para a reação. Na reação os complexos de acil-CoA's e [^{3}H]–esfingosina são preparados com BSA e, em seguida, incubados na presença da fração microssomal. Ambos substratos hidrofóbicos entram em equilíbrio com as membranas doadoras e são convertidos em [^{3}H]–ceramida. Foi demonstrado que a taxa de conversão no sistema reacional é dependente da relação entre BSA e palmitoil CoA (C16:0). Por exemplo, em baixas concentrações, o palmitoil CoA se liga fortemente à BSA tornando-se indisponível para a reação enzimática (Pauly e McMillin, 1988) e em altas concentrações atuam como detergentes e reduzem drasticamente a síntese de [^{3}H]–ceramida, presumivelmente pela perda da integridade de membrana ou da estrutura da enzima. Desta forma, foi utilizada a relação esfingosina:BSA:palmitoil CoA de 1:1:3-4 conforme proposto por Hirschberg et al. (Hirschberg et al., 1993). Neste estudo, a presença de co-fatores no sistema reacional também foi avaliada. A estimulação máxima da síntese de [^{3}H]–ceramida foi obtida na presença de 1 mM de $MgCl_2$, enquanto que concentrações mais baixas de $MnCl_2$ (0,5 mM) desempenharam um efeito semelhante (Hirschberg et al., 1993). No entanto, mesmo com estas alterações não conseguimos obter a formação de ceramida marcada no ensaio realizado, mesmo na reação controle utilizando frações ricas em microssomos de fígado de camundongo.

O fato da reação controle não ter gerado o produto marcado pode estar relacionada com a inatividade da enzima presente na fração microssomal, uma vez que estes ensaios foram padronizados especificamente para a CerS de camundongo. Por outro lado, o insucesso nas reações com o extrato de *Leishmania* poderia ser devido à grande distância evolutiva das espécies avaliadas o que implica em requerimentos específicos para CerS de cada espécie.

Desta forma, optamos por utilizar um controle evolutivamente mais próximo das leishmânias, como o *T. cruzi* com base na hipótese de que os requerimentos enzimáticos

seriam semelhantes. A atividade *in vitro* de CerS de *T. cruzi* foi caracterizada por Figueiredo em 2008. Neste trabalho, o conteúdo reacional era constituído por tampão fosfato de potássio (50 mM), $MnCl_2$ (1 mM) e CHAPS (0,2%) (Tampão II) e o tempo de incubação era superior ao descrito nos protocolos anteriormente citados (4 horas em comparação a 15 e 40 minutos em Wang e Merril, 2000 e Hirschberg et al., 1993, respectivamente) (Reação 4, Figura 18). Como podemos observar na figura 18 conseguimos reproduzir a reação enzimática de CerS com a fração microssomal de *T. cruzi*. Entretanto não observamos síntese de ceramida quando foi utilizado o extrato microssômico de *Leishmania* preparado como descrito por Previato et al. (1998).

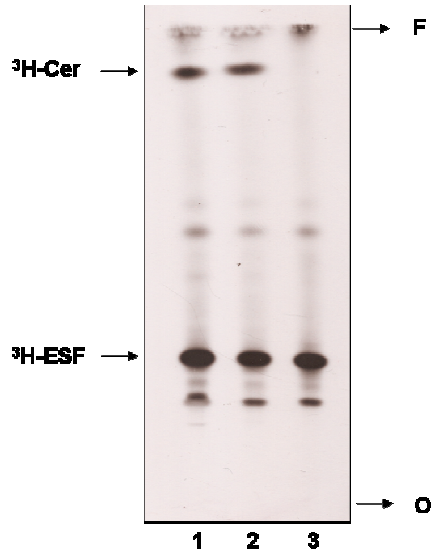


Figura 18: Atividade de ceramida sintase em *T. cruzi*. As reações foram preparadas em tampão I (50 mM de fosfato de potássio pH 7,4, 1 mM $MnCl_2$ e 0,2% CHAPS), na presença de [^{3}H]-esfingosina, palmitoil CoA e 80 µg (1), 350 µg (2) e 0 µg (3) de fração microssomal de *T. cruzi*. [^{3}H]-Cer= C16 ceramida, [^{3}H]-ESF: esfingosina, F: frente, O: origem. Sistema de corrida descrito por Ichikawa et al, 1994.

Assim, foram ensaiados outros protocolos para obtenção de extrato microssômico de *L. amazonensis* funcional e com alta concentração de proteínas. Inicialmente seguimos o protocolo utilizado por Figueiredo (2008), porém não obtivemos bom rendimento de proteínas no extrato (0,6 mg/mL). Considerando a alta concentração de proteases presentes em *Leishmania*, modificamos o protocolo incluindo uma ampla gama de inibidores de protease (PMSF 1 mM, Benzamidina 2 mM, Leupeptina 50 µM, Fenantrolina 5 mM, Inibidor de Tripsina 50 µg/mL). Desta forma, realizamos nova extração microssomal com maior quantidade de parasitas e modificando os inibidores, porém a solução ficou muito viscosa.

Acreditamos que o procedimento de maceração em cadinho em ciclos de descongelamento e congelamento com N_2 líquido seja muito agressivo para a *Leishmania*, o que promove a ruptura do núcleo e liberação do DNA na solução deixando-a viscosa. O aumento da viscosidade da solução impede a separação dos *debris* celulares e de células inteiras das frações menores de membrana reduzindo a recuperação dos microssomos e, consequentemente o rendimento da extração. A fim de aproveitar o material macerado a solução foi tratada com DNase (20 U/mL) por 15 minutos a temperatura ambiente e submetida a centrifugação diferencial. O extrato microssômico obtido foi utilizado como fonte de CerS na reação enzimática realizada nos mesmos padrões utilizados para *T. cruzi* modificando apenas a temperatura de incubação para 25°C (Reação 5), porém não houve a formação da ceramida marcada. É possível que a incubação do extrato a temperatura ambiente por 15 minutos para a ação da DNAse, possa ter levado à degradação de proteínas ou permitido a ação de proteases não inibidas presentes no extrato.

A fim de encontrar um método de lise celular menos agressivo que mantivesse o núcleo do parasita intacto novos protocolos de obtenção de fração microssomal foram testados. Para isto, foram realizados testes piloto com 5 x 10^8 parasitas modificando o procedimento de Figueiredo apenas na etapa de lise. O primeiro método testado consistia em ressuspender os parasitas em uma solução hipotônica e passá-las em agulha 26G para que as células osmoticamente alteradas se rompessem (Ilgoutz et al., 1999). No segundo método os parasitas foram lisados por sonicação (6 vezes, 25 segundos na potência de 20) (Mahoney e Turco, 1999). Diferentemente do protocolo utilizado por Figueiredo, em ambos os testes a solução contendo os parasitas lisados foi submetida a apenas duas centrifugações: a primeira a 3.000 *g* por 10 minutos para a retirada de células íntegras e debris celulares e a segunda a 100.000 *g* por 90 minutos para obtenção dos microssomos. Os dois procedimentos não lisaram o núcleo das células e tiveram um rendimento protéico razoável (9 e 28 mg/mL para Ilgoutz, 1999 e Mahoney e Turco, 1999, respectivamente). Devido ao maior rendimento protéico na lise dos parasitas por sonicação realizamos a purificação de microssomos de *L. amazonensis* baseados no protocolo de Figueiredo (2008) modificado conforme Mahoney e Turco (1999) com 1 x 10^{10} parasitas e obtivemos um ótimo rendimento de 130 mg/mL de proteína. A fração microssomal obtida foi utilizada como fonte de CerS para as reações enzimáticas 6 a 11 descritas adiante.

Desta forma, a reação enzimática para CerS foi realizada utilizando o novo extrato microssômico de *L. amazonensis*, sob as mesmas condições utilizadas para *T. cruzi* (Reação 6). Não houve formação da ceramida marcada nas reações de *Leishmania*, o que nos levou a suspeitar da atividade do extrato microssomal ou das condições reacionais inadequadas para a atividade da CerS de *L. amazonensis* (dados não apresentados).

Vários experimentos foram então realizados utilizando diversos tampões de reação e variando a concentração de extrato microssômico de *Leishmania*. Entretanto, em nenhuma das condições testadas foi possível observar síntese de ceramida nas reações com extrato de *Leishmania*, enquanto o controle com extrato de *T. cruzi* foi sempre ativo. Desta forma, decidimos investigar a integridade do extrato microssomal de *L. amazonensis*. Para isto, verificamos se o extrato apresenta atividade de cisteíno protease, utilizando o ensaio de digestão "in-gel" conforme Yokoyama-Yasunaka et al. (1994). Observamos que a atividade de cisteína protease no extrato microssomal de *Leishmania* estava intacto, o que nos permitia supor que havia chances da CerS também estar ativa neste extrato (dados não apresentados).

Em outros sistemas, reações para análise da atividade de CerS utilizam sempre esfinganina (via de síntese *de novo*) e não esfingosina (via de síntese de salvação). Embora fosse improvável que apenas uma insaturação na molécula pudesse interferir no reconhecimento tridimencional da base esfingóide, modificando a atividade da enzima, decidimos testar o precursor esfinganina nas reações. Também alteramos o tipo de marcação, sendo utilizadas moléculas marcadas com NBD (Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol) que permitem a visualização do resultado de forma mais rápida e efetiva que a marcação com tritio. O fluoróforo NBD é uma molécula amplamente empregada na pesquisa de lipídios graças à propriedade de ligar-se facilmente ao grupo acil lipídico. Os picos de emissão/exitação de NBD estão próximos a 470/530 nm (revisado em Rasmussen e Hermetter, 2008). Desta forma, novos ensaios enzimáticos para a atividade de CerS foram realizados com os precursores fluorescentes (NBD-esfingosina e NBD-esfinganina), tampão III e 2,6 mg de fração microssomal preparada conforme Figueiredo (2008) e Mahoney e Turco (1999) (Reação 7). Finalmente, observamos a formação de NBD-ceramida nas reações de *T. cruzi* e de *Leishmania* utilizando tanto o precursor NBD-esfingosina quanto NBD-esfinganina (Figura 19).

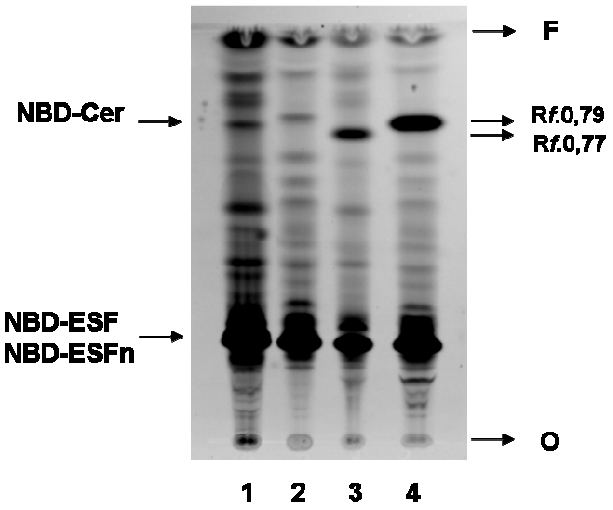


Figura 19: Atividade de ceramida sintase em *L. amazonensis*. As reações foram preparadas em tampão III (50 mM fosfato de potássio pH 7.4, 1 mM $MnCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT e CHAPS 0,2%) na presença de palmitoil CoA, NBD-esfingosina (1 e 3) e NBD- esfinganina (2 e 4) e 2,6 mg de fração microssomal de *L. amazonensis* (1 e 2) e 300 µg de fração microssomal de *T. cruzi* (3 e 4). NBD-Cer = NBD-ceramida, NBD-ESF = NBD-esfingosina, NBD-ESFn = NBD-esfinganina, F: frente, O: origem. Sistema de corrida descrito por Ichikawa et al, 1994.

Como palmitoil CoA foi utilizado como fonte de acil na reação esperava-se a formação de ceramidas com 16 carbonos (C16-ceramida). Observamos síntese de moléculas que migram com R*f*s iguais a 0,79, 0,81, 0,75 e 0,78 nas reações 1 a 4, respectivamente (Figura 19). Estes valores de Rf são compatíveis com o observado, no mesmo sistema de separação, para NBD-C16 ceramida (0,8) presente em extrato lipídico total de promastigotas de *L. amazonensis* marcados com NBD-esfingosina e NBD-esfinganina e analisadas por espectrometria de massas (Miguel, 2011). É interessante notar que tanto nos ensaios de *Leishmania* quanto de *T. cruzi* as reações com NBD-esfingosina geraram um produto marcado com NBD com Rf menor (0,78 e 0,75, reação 1 e 3, respectivamente) do que as reações feitas com NBD-esfinganina (0,81 e 0,79, reações 2 e 4, respectivamente). É possível que esta diferença de migração esteja relacionada ao fato da acilação de esfinganina gerar diidroceramida, a qual é posteriormente é dessaturada à ceramida em um sistema *in vivo*. Desta forma, a presença de duas moléculas de hidrogênio na diidroceramida e a insaturação na molécula de ceramida, poderiam alterar o perfil de migração destas moléculas. É interessante notar que sob as mesmas condições reacionais, utilizando NBD-esfingosina e NBD-esfinganina para as duas espécies, as moléculas sintetizadas pela CerS de *T. cruzi*

apresentaram um coeficiente de retenção menor (Rf=0,75 e 0,79, respectivamente) que as moléculas obtidas nas reações com extrato de *L. amazonensis* (Rf=0,78 e 0,81, respectivamente).

Avaliando-se a intensidade das bandas correspondentes a NBD-ceramida e NBD-diidroceramida observa-se maior intensidade do produto gerado nas reações a partir de esfinganina (coluna 4, Figura 19) em *T. cruzi*. Ao contrário, observa-se maior abundância do produto gerado a partir de esfingosina (coluna 1, Figura 19) em *L. amazonensis*. Embora as bandas correspondentes aos precursores marcados com NBD se apresentem mais intensos nas canaletas correspondentes aos ensaios citados acima, estes resultados podem indicar preferências diferentes pelas bases esfingóides nos dois organismos. Talvez a CerS de *T. cruzi* seja mais específica para a via de síntese *de novo* de ceramida e a de *Leishmania* para a via de síntese de salvação. Além disto, houve claramente maior rendimento nas reações com extratos de *T. cruzi*, o que sugere que as condições reacionais ainda não eram as mais adequadas para a CerS de *L. amazonensis*.

Essa diferença no rendimento da reação enzimática foi confirmada em experimento utilizando o precursor marcado com trítio (Reação 8) nas mesmas condições utilizadas na reação 11. Apenas o produto da reação com microssomos de *T. cruzi* foi detectado após 15 dias de exposição em "screen" e detecção por Storm. Essa mesma placa foi então tratada com En^{3}hance® e submetida a autoradiografia com exposição por 30 dias, sendo então possível visualizar uma intensa banda na reação com extrato de *T. cruzi* e uma fraca marcação na reação com microssomos de *Leishmania* (resultados não apresentados). Isto demonstra que, além das condições enzimáticas ainda inadequadas, a ausência de detecção da formação de ceramida marcada com trítio em todas as reações anteriores também estava relacionada à baixa sensibilidade de detecção para marcação com trítio.

Também é necessário ressaltar que nos ensaios descritos acima e apresentados na Figura 19, foram utilizadas diferentes concentrações de extrato nas reações de *T. cruzi* e *L. amazonensis*, o que também poderia explicar diferentes eficiências na síntese de ceramida. Mas os resultados observados na Figura 19 demonstram que *L. amazonensis* possui uma proteína com atividade de CerS presente em sua fração microssomal, capaz de utilizar tanto esfingosina como esfinganina marcados com o fluoróforo NBD como precurssores na reação. Desta forma, prosseguimos com a padronização das reações enzimáticas utilizando os precursores marcados com NBD.

Como os ensaios com extratos de *Leishmania* apresentaram baixo rendimento realizamos novos ensaios utilizando o miristoil CoA como fonte de acil para a formação da ceramida. Isto porque a enzima SPT de *L. major* utiliza preferencialmente o miristoil CoA como fonte de acil CoA para iniciar a via de biossíntese de novo de SLs (Hsu et al., 2007). Desta forma, pretendíamos avaliar se a CerS de *L. amazonensis* também possui preferências sobre algum destes doadores de acil CoA para a formação de ceramida. Neste ensaio também foi reduzida a quantidade de NBD-esfinganina de ambos os parasitas e da fração microssomal de *L. amazonensis* (5 µM e 1,3 mg, respectivamente) com a intenção de melhorar o rendimento da reação (Reação 9, Figura 20), uma vez que foi demonstrado que na reação de CerS de *T. cruzi* há redução da produção de ceramida conforme aumenta a concentração da proteína (Figueiredo, 2008).

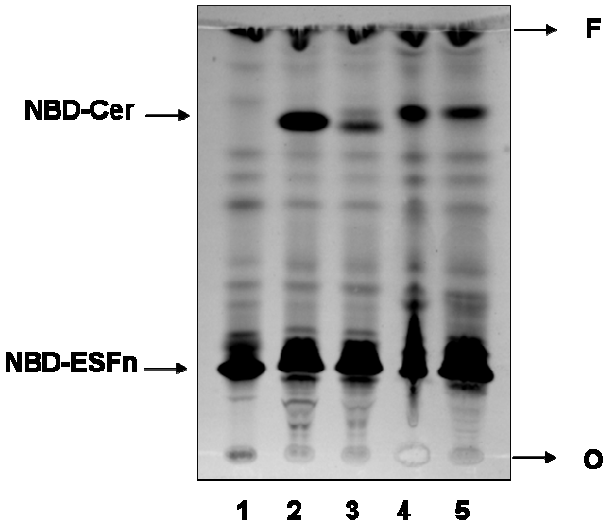


Figura 20: Atividade de ceramida sintase em *L. amazonensis* com dois diferentes doadores de acil CoA. As reações foram preparadas em tampão III (50 mM fosfato de potássio pH 7.4, 1 mM $MnCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT e CHAPS 0,2%) na presença de palmitoil CoA (2 e 4) ou miristoil CoA (3 e 5), NBD- esfinganina (NBD-ESFn) e 300 µg de fração microssomal de *T. cruzi* (2 e 3) e 1,3 mg de fração microssomal de de *L. amazonensis* (4 e 5). NBD-esfingosina padrão (1). NBD-Cer = NBD-ceramida, NBD-ESFn: NBD-esfinganina, F: frente, O: origem. Sistema de corrida descrito por Ichikawa et al, 1994.

Diferentemente do demonstrado por Figueiredo (2008) a CerS de *T. cruzi* foi capaz de utilizar o miristoil CoA como fonte de grupo acil para a formação da ceramida (coluna 3, Figura 20), embora o rendimento tenha sido inferior ao do ensaio realizado com palmitoil CoA (coluna 2, Figura 20). Nos ensaios de *Leishmania* também houve a formação de ceramida utilizando o miristoil CoA (coluna 5, Figura 20), porém não pudemos inferir se a *L.*

amazonensis possui preferências por um substrato ou outro já que o ensaio com palmitoil CoA apresentou um padrão de corrida alterado (coluna 4, Figura 20). Um fato interessante de notar é que a redução da quantidade do precursor e das frações microssomais de *Leishmania* aumentaram o rendimento da reação.

Como foram utilizados palmitoil e miristoil CoA como fonte de grupo acil para a formação da ceramida esperava-se a formação de C16 e C14-ceramida, respectivamente, com diferentes padrões de corrida. No entanto, as ceramidas formadas apresentaram os mesmos valores de Rfs independentemente do substrato utilizado. É interessante notar que, independentemente do doador de grupo acil utilizado, a ceramida formada pela CerS de *T. cruzi* (R*f* = 0,7) apresentou um R*f* menor que a formada pela CerS de *L. amazonensis* (R*f* = 0,8). Como descrito acima, este fato também foi observado em ensaios realizados tanto com esfinganina como esfingosina.

Outro fato interessante na figura 20 é que as bandas mais fracas observadas por toda a corrida são provenientes da degradação parcial da NBD-esfinganina (coluna 1, Figura 20) e que justamente na região de migração da ceramida não há nenhum produto degradado, o que comprova que as bandas de Rfs de 0,8 e 0,7 correspondem a formação de ceramida a partir das bases esfingóides e ácidos graxos CoA.

Para melhor caracterizar o ensaio *in vitro* de CerS de *L. amazonensis* realizamos reações enzimáticas na ausência de um ou dois componentes, além de reduzir a quantidade das frações microssomais de *Leishmania* e do precursor marcado para 100 µg e 4 µM, respectivamente (Reação 10, Figura 21).

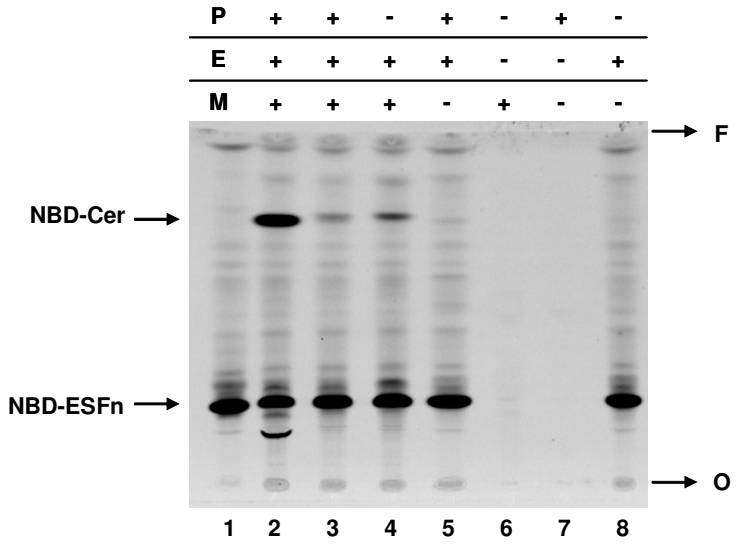


Figura 21: Atividade de ceramida sintase de *L. amazonensis*. As reações foram preparadas em tampão III (50 mM fosfato de potássio pH 7.4, 1 mM $MnCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT e CHAPS 0,2%) na presença de 90 µM de palmitoil CoA, 4 µM de NBD- esfinganina (NBD-ESFn), 300 µg de fração microssomal de *T. cruzi* (2) e 100 µg de fração microssomal de *L. amazonensis* (3, 4 e 6) e na ausência de palmitoil CoA (4), fração microssomal (5), NBD-esfinganina e palmitoil CoA (6), NBD-esfinganina e fração microssomal (7) e palmitoil CoA e fração microssomal (8). NBD-esfingosina padrão (1). NBD-Cer = NBD-ceramida, NBD-ESFn: NBD-esfinganina, F: frente, O: origem. Sistema de corrida descrito por Ichikawa et al, 1994.

A reação controle de CerS de *Leishmania* resultou em um produto marcado com R*f* igual a 0,8 (coluna 3, Figura 21), que equivale ao R*f* da NBD-C16 diidroceramida. Inesperadamente, a intensidade do produto obtido na reação de *L. amazonensis* sem palmitoil CoA (coluna 4) apresentou um aumento de 92 % em relação à banda observada na reação controle (coluna 3, Figura 21). Talvez a CerS de *Leishmania* tenha preferência por outras fontes de grupamento acil que estejam presentes no extrato microssômico e desta forma, apresenta maior rendimento na reação, mesmo que as concentrações do ácido graxo estejam baixas. De fato, a coloração da placa com vapor de iodo mostrou a presença de diversas bandas referentes a lipídios insaturados (dados não apresentados), inclusive no material aplicado na canaleta 6 (Figura 21), que contem a reação na ausência de NBD-esfinganina e palmitoil CoA, ou seja só com fração microssomal. Isto indica que a fração microssomal de *L. amazonensis* possui lipídios insaturados, os quais podem ser utilizados para a formação de diidroceramida *in vitro*. Desta forma, seria interessante realizar um "screening" com diferentes fontes de acil CoA para verificar qual ácido graxo a CerS de *L. amazonensis* prefere utilizar para formar ceramida e dihidroceramida *in vitro.*

Como esperado, não foi visualizada a formação do produto dihidroceramida nas reações enzimáticas na ausência de fração microssomal (coluna 5, Figura 21) e na ausência de NBD-esfinganina (coluna 6, Figura 21), tanto por detecção de fluorescência como após coloração com vapor de iodo (resultados não apresentados). Assim, mostramos que somente a presença de palmitoil CoA e dos cofatores presentes no tampão reacional são insuficientes para formar a ceramida.

A coluna 8 representa a reação enzimática na ausência de palmitoil CoA e de fração microssomal, sendo na verdade visualizados somente os produtos de degradação da NBD-esfinganina sob as condições de temperatura e microambiente da reação. Cabe evidenciar a ausência de banda de degradação na região de migração da NBD-ceramida e NBD-diidroceramida, demonstrando novamente que a banda de R*f* igual a 0,8 equivale somente ao produto marcado formado na reação *in vitro.*

Nas reações controle com extrato de *T. cruzi* foi também detectada uma banda de R*f* igual a 0,15 (coluna 2, Figura 21) que é compatível com o coeficiente de migração de NBD-IPC observado na marcação metabólica de *L. amazonensis* com NBD-ceramida (Miguel, 2011). A síntese de IPC nesta reação seria teoricamente possível, dadas as condições reacionais semelhantes e a possibilidade de existir fosfatidilinositol (PI) na fração microssomal de *T. cruzi*. Em concordância com essa hipótese, a coloração com azul de molibidênio da placa contendo as mesmas reações permitiu a detecção de moléculas fosforiladas com R*f* de 0,15 nas reações de *T. cruzi*.

Tendo, portanto, padronizado condições para detectar a atividade de CerS nos extratos de *L. amazonensis* e com o o objetivo de verificar se o tamoxifeno interfere na atividade da CerS desse organismos, foram realizados ensaios enzimáticos de CerS na presença de 0,1, 1, 10 e 100 µM de tamoxifeno (Reação 11, Figura 22). Utilizamos também a fumonisina B2 (FB2) como controle, que é descrita como um inibidor clássico de CerS.

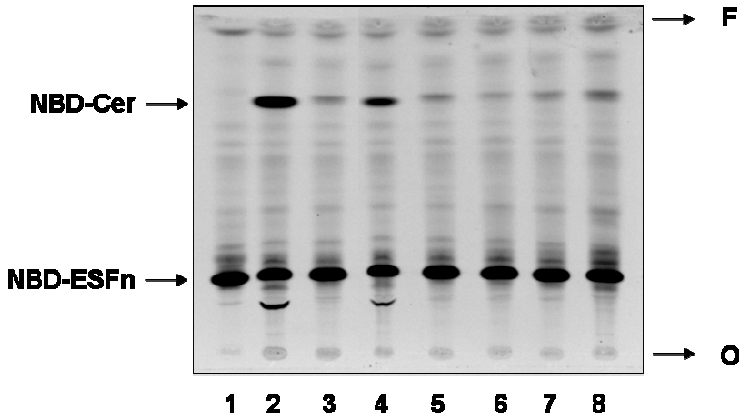


Figura 22: Efeitos do tamoxifeno e da fumonisina B2 na atividade de ceramida sintase de *L. amazonensis*. As reações foram preparadas em tampão III (50 mM fosfato de potássio pH 7.4, 1 mM $MnCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT e CHAPS 0,2%) na presença de (90 µM) palmitoil CoA, (4 µM) NBD- esfinganina, 100 µg de fração microssomal de *T. cruzi* (2 e 4) e de *L. amazonensis* (3, 5 a 8), 1,4 µM (4 e 5) e 14 µM (6) de Fumonisina B2 e 10 µM (7) e 100 µM (8) de tamoxifeno. NBD-esfingosina padrão (1). NBD-Cer = NBD-ceramida, NBD-ESFn: NBD-esfinganina, F: frente, O: origem. Sistema de corrida descrito por Ichikawa et al, 1994.

Resultados obtidos por Figueiredo (2008) indicavam que a FB1 em concentrações de 1,4 µM é capaz de inibir em 93% a atividade da CerS de *T. cruzi*. Observamos que a FB2 nas mesmas concentrações resultou em redução de 54% na síntese de ceramida quando incubada com extratos microssômicos de *T. cruzi*. No entanto, a incubação de extratos microssômicos de *L. amazonensis* com a mesma dose (1,4 µM) de FB2 resultou em um aumento de 10% na intensidade do produto da reação (Coluna 5, Figura 22). Observamos uma redução de 44% do produto marcado na reação de *L. amazonensis* somente quando utilizamos 14 µM de FB2 (Coluna 6, Figura 22).

Esta concentração é 10 vezes superior à capaz de inibir 93% da produção de ceramida em *T. cruzi* (Figueiredo, 2008), 100 vezes maior que a capaz de inibir 50% da atividade em fração microssomal de fígado de rato (Wang et al., 1991) e 5.000 vezes maior que a concentração inibitória para 50% da atividade em fração microssomal de cérebro de rato (Merrill et al., 1993). Estes estudos utilizaram FB1 para a inibição da atividade de CerS, porém as fumonisinas B1 e B2 são estruturalmente análogas e possuem propriedades toxicológicas semelhantes, como indução de câncer de fígado em camundongos (Gelderblom et al., 1993) e citotoxicidade em várias linhagens celulares (Yoo et al., 1992; Abbas et al., 1993; Gelderblom et al., 1993). Além disto, foi demonstrado que a FB2 também é um inibidor de CerS de camundongo tanto *in vitro* (Wang et al., 1991) como *in vivo* (Voss et

al., 1993). Desta forma, estes resultados demonstram que a CerS de *L. amazonensis* não é sensível à FB2, ao contrário do observado em diversas células eucariotas como o *T. cruzi*.

Comparando-se as reações de *T. cruzi* controle (coluna 2, Figura 22) e tratado com 1,4 µM de FB2 (coluna 4, Figura 22) nota-se que além da ceramida houve redução da provável banda de NBD-IPC, visto que há menor disponibilidade do precursor ceramida para a formação do fosfoesfingolipídio.

O tamoxifeno não foi capaz de inibir ou reduzir a atividade da CerS de *L. amazonensis* nas concentrações de 0,1 e 1 µM (dados não apresentados). Em ensaios enzimáticos incubados na presença de 10 µM de tamoxifeno, houve redução da atividade *in vitro* de CerS de *L. amazonensis* em aproximadamente 10% (média aritmética dos resultados obtidos em três diferentes ensaios) (Figura 22, coluna 7). Considerando que a concentração inibitória para 50% da cultura de promastigotas de *L. amazonensis* é de 10 µM (Miguel et al., 2007), a taxa de redução de apenas 10% da produção de ceramida *in vitro* é pouco significante. Isto porque em sistemas *in vitro* a droga está em contato direto com o seu alvo, o que facilita a atividade da mesma, necessitando menores concentrações da droga para obter a mesma taxa de inibição obtida em sistemas mais complexos. Além disto, o uso de 100 µM de tamoxifeno no ensaio proporcionou um aumento de 78% da produção de diidroceramida marcada. Esses ensaios foram realizados duas vezes e mostraram resultados concordantes. O aumento na síntese de ceramida observado em ensaios realizados com altas concentrações de tamoxifeno é intrigante e deverá ser investigado mais detalhadamente. De qualquer forma, é improvável que esse efeito esteja relacionado ao mecanismo de ação da droga em parasitas intactos, já que foi observado apenas em concentrações muito elevadas. Desta forma, fica claro que a atividade de CerS de *L. amazonensis* não é inibida por tamoxifeno.

Considerando-se que promastigotas de *L. amazonensis* em cultura tratados com 10 µM de tamoxifeno apresentam alterações marcantes no metabolismo de esfingolipídeos (Miguel, 2011), novas investigações a respeito desta via devem ser realizadas a fim de esclarecer o mecanismo pelo qual o tamoxifeno é capaz de matar estes parasitos.

Por outro lado, os dados obtidos nesse trabalho estabelecem as bases para que possamos completar a caracterização da atividade enzimática da CerS de *L. amazonensis*, com a determinação de atividade na presença de diferentes grupos acil. A caracterização por espectrometria de massas dos produtos gerados na reação poderá também permitir

esclarecer os diferentes padrões de retenção observados em cromatografia em camada delgada para as moléculas sintetizadas a partir dos diferentes precursores.

Será também interessante verificar a existência de atividade reversa de Ceramidase em extrato microssomal de *L. amazonensis*, o que poderia explicar a permanência da produção de ceramida em condições inibitórias para CerS. A atividade reversa de ceramidase já foi descrita em diversos organiasmos como humanos (Okino et al., 2003), ratos (El Bawab et al., 2001), camundongos (Mao et al., 2003), leveduras (Mao et al., 2000a, Mao et al., 2000b) e bactérias (Nieuwenhuizen et al., 2003), porém não foi descrita em organismos evolutivamente mais próximos à *Leishmania* como o *T. cruzi* (Figueiredo, 2008).

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados na presente tese concluímos que *L. amazonensis* possui uma proteína com atividade de CerS identificada em ensaios enzimáticos de CerS *in vitro,* utilizando frações enriquecidas em microssomos de promastigotas de *L. amazonensis*. Apesar da impossibilidade de demonstrar a capacidade do gene putativo de CerS de *L. amazonensis* de complementar leveduras duplamente deletadas para *LAC1* e *LAG1*, é provável que a proteína envolvida na atividade enzimática *in vitro* seja a proteína codificada pelo gene putativo caracterizado. Esta hipótese é suportada pela semelhança entre as sequências protéicas de CerS de *L. amazonensis* e *T. cruzi* (identidade igual a 42%), a existência de domínios transmembrana característicos da família das proteínas LAG e à presença do motivo Lag1 e dos aminoácidos essenciais para a atividade de CerS. Outros fatores importantes são a existência de um único gene ortólogo ao gene LAG1 de *S. cerevisiae* presente no genoma de *Leishmania* e consequente existência de atividade enzimática de CerS em fração microssomal de *L. amazonensis*.

A CerS de *L. amazonensis* é capaz de utilizar tanto a esfingosina quanto a esfinganina para a formação da ceramida *in vitro*, assim como o palmitoil e o miristoil CoA como fonte de grupo acil.

A Fumonisina B2, inibidora clássica de CerS de mamíferos, não foi capaz de inibir a atividade de CerS de *L. amazonensis* em concentrações usualmente tóxicas para diversas espécies, inclusive para *T. cruzi*.

O tamoxifeno não inibe a atividade de CerS de *L. amazonensis* in vitro. A discreta inibição da atividade de CerS de *L. amazonensis in vitro* em concentrações próximas à IC_{50} para promastigotas de *L. amazonensis* em cultura foi considerada não significativa, especialmente pela ausência de um padrão compatível com um fenômeno dose-resposta.

A incapacidade do tamoxifeno de inibir a atividade de CerS de *L. amazonensis* em reações enzimáticas *in vitro* de forma significativa demonstra que esta enzima provavelmente não é responsável pela atividade leishmanicida da droga sobre diversas espécies de *Leishmania* tanto *in vitro* e como *in vivo*.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

Abbas HK, Gelderblom WC, Cawood ME, Shier WT. Biological activities of fumonisins, mycotoxins from Fusarium moniliforme, in jimsonweed (Datura stramonium L.) and mammalian cell cultures. Toxicon. 1993;31:345-53.

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 leishmaniases. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43:2910-4.

Alrajhi AA, Ibrahim EA, De Vol EB, Khairat M, Faris RM, Maguire JH. Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. N Engl J Med. 2002;346:891-5.

Altan N, Chen Y, Schindler M, Simon SM. Tamoxifen inhibits acidification in cells independent of the estrogen receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:4432-7.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990;215:403-10.

Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Canavate C, Dedet JP, Gradoni L, Ter Horst R, Lopez-Velez R, Moreno J. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. Clin Microbiol Rev. 2008;21:334-59.

Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B, Jimenez M, Laguna F, Lopez-Velez R, Molina R, Moreno J. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. Clin Microbiol Rev. 1997;10:298-319.

Amato VS, Rabello A, Rotondo-Silva A, Kono A, Maldonado TP, Alves IC, Floeter-Winter LM, Neto VA, Shikanai-Yasuda MA. Successful treatment of cutaneous leishmaniasis with lipid formulations of amphotericin B in two immunocompromised patients. Acta Trop. 2004;92:127-32.

Armijos RX, Weigel MM, Calvopina M, Mancheno M, Rodriguez R. Comparison of the effectiveness of two topical paromomycin treatments versus meglumine antimoniate for New World cutaneous leishmaniasis. Acta Trop. 2004;91:153-60.

*De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: http://www.icmje.org [2007 May 22].

Ashford RW. The leishmaniases as model zoonoses. Ann Trop Med Parasitol. 1997;91:693-701.

Baird B, Sheets ED, Holowka D. How does the plasma membrane participate in cellular signaling by receptors for immunoglobulin E? Biophys Chem. 1999;82:109-19.

Balana-Fouce R, Reguera RM, Cubria JC, Ordonez D. The pharmacology of leishmaniasis. Gen Pharmacol. 1998;30:435-43.

Barz WP, Walter P. Two endoplasmic reticulum (ER) membrane proteins that facilitate ER-to-Golgi transport of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. Mol Biol Cell. 1999;10:1043-59.

Basu MK, Ray M. Macrophage and *Leishmania*: an unacceptable coexistence. Crit Rev Microbiol. 2005;31:145-54.

Bates PA, Rogers ME. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. Curr Mol Med. 2004;4:601-9.

Bates PA. The developmental biology of Leishmania promastigotes. Exp Parasitol. 1994;79:215-8.

Bergman L, Beelen ML, Gallee MP, Hollema H, Benraadt J, van Leeuwen FE. Risk and prognosis of endometrial cancer after tamoxifen for breast cancer. Comprehensive Cancer Centres' ALERT Group. Assessment of Liver and Endometrial cancer Risk following Tamoxifen. Lancet. 2000;356:881-7.

Berman J. Recent Developments in Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. Curr Infect Dis Rep. 2005;7:33-38.

Bern C, Hightower AW, Chowdhury R, Ali M, Amann J, Wagatsuma Y, Haque R, Kurkjian K, Vaz LE, Begum M, Akter T, Cetre-Sossah CB, Ahluwalia IB, Dotson E, Secor WE, Breiman RF, Maguire JH. Risk factors for kala-azar in Bangladesh. Emerg Infect Dis. 2005;11:655-62.

Bern C, Maguire JH, Alvar J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis. 2008;2:e313.

Bionda C, Portoukalian J, Schmitt D, Rodriguez-Lafrasse C, Ardail D. Subcellular compartmentalization of ceramide metabolism: MAM (mitochondria-associated membrane) and/or mitochondria? Biochem J. 2004;382:527-33.

Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 1979;7:1513-23.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-54.

Brady RO, Koval GJ. The enzymatic synthesis of sphingosine. J Biol Chem. 1958;233:26-31.

Braga MD, Coelho IC, Pompeu MM, Evans TG, MacAullife IT, Teixeira MJ, Lima JW. [Control of canine visceral leishmaniasis: comparison of results from a rapid elimination program of serum-reactive dogs using an immunoenzyme assay and slower elimination of serum-reactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence]. Rev Soc Bras Med Trop. 1998;31:419-24.

Brandwagt BF, Mesbah LA, Takken FL, Laurent PL, Kneppers TJ, Hille J, Nijkamp HJ. A longevity assurance gene homolog of tomato mediates resistance to *Alternaria alternata f.* sp. lycopersici toxins and fumonisin B1. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97:4961-6.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SINAN/SVS/MINISTÉRIO DA SAÚDE). Casos confirmados de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2009. 2010a. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/1_lta_casos_27_10_2010.pdf [20 Jun 2011].

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SINAN/SVS/MINISTÉRIO DA SAÚDE). Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2009. 2010b. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2_lv_casos_14_10_10.pdf [20 Jun 2011].

Brown DA, London E. Functions of lipid rafts in biological membranes. Annu Rev Cell Dev Biol. 1998;14:111-36.

Buffet PA, Rosenthal E, Gangneux JP, Lightburne E, Couppie P, Morizot G, Lachaud L, Marty P, Dedet JP. [Therapy of leishmaniasis in France: consensus on proposed guidelines]. Presse Med. 2011;40:173-84.

Buitrago S, Martin TE, Tetens-Woodring J, Belicha-Villanueva A, Wilding GE. Safety and efficacy of various combinations of injectable anesthetics in BALB/c mice. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2008;47:11-7.

Cabot MC, Giuliano AE, Volner A, Han TY. Tamoxifen retards glycosphingolipid metabolism in human cancer cells. FEBS Lett. 1996;394:129-31.

Cabot MC, Zhang ZC, Giuliano AE. Tamoxifen elicits rapid transmembrane lipid signal responses in human breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat. 1995;36:299-306.

Camargo-Neves VLFG, Carmen M, Cruz LL, Almeida RG. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo 2006. São Paulo: Secretaria de

Estado da Saúde, Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN e Coordenadoria de Controle de Doenças - CCD.

Campos-Munoz L, Quesada-Cortes A, Martin-Diaz MA, Rubio-Flores C, de Lucas-Laguna R. [*Leishmania braziliensis*: report of a pediatric imported case with response to liposomal amphotericin B]. Actas Dermosifiliogr. 2007;98:42-4.

Carver MA, Turco SJ. Cell-free biosynthesis of lipophosphoglycan from Leishmania donovani. Characterization of microsomal galactosyltransferase and mannosyltransferase activities. J Biol Chem. 1991;266:10974-81.

Chang J, Powles TJ, Ashley SE, Gregory RK, Tidy VA, Treleaven JG, Singh R. The effect of tamoxifen and hormone replacement therapy on serum cholesterol, bone mineral density and coagulation factors in healthy postmenopausal women participating in a randomised, controlled tamoxifen prevention study. Ann Oncol. 1996;7:671-5.

Chatterjee S, Smith ER, Hanada K, Stevens VL, Mayor S. GPI anchoring leads to sphingolipid-dependent retention of endocytosed proteins in the recycling endosomal compartment. EMBO J. 2001;20:1583-92.

Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acids Res. 2003;31:3497-500.

Chrusciak-Talhari A, Dietze R, Chrusciak Talhari C, da Silva RM, Gadelha Yamashita EP, de Oliveira Penna G, Lima Machado PR, Talhari S. Randomized controlled clinical trial to access efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2011;84:255-60.

Cohen SN, Chang AC, Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1972;69:2110-4.

Collin S, Davidson R, Ritmeijer K, Keus K, Melaku Y, Kipngetich S, Davies C. Conflict and kala-azar: determinants of adverse outcomes of kala-azar among patients in southern Sudan. Clin Infect Dis. 2004;38:612-9.

Collins M, Carter KC, Baillie AJ, O'Grady J. The distribution of free and non-ionic vesicular sodium stibogluconate in the dog. J Drug Target. 1993;1:133-42.

Correa DS, Tempone AG, Reimao JQ, Taniwaki NN, Romoff P, Favero OA, Sartorelli P, Mecchi MC, Lago JH. Anti-leishmanial and anti-trypanosomal potential of polygodial isolated from stem barks of *Drimys brasiliensis Miers* (Winteraceae). Parasitol Res. 2011;109:231-6.

Costa CH, Vieira JB. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2001;34:223-8.

Craven PC, Ludden TM, Drutz DJ, Rogers W, Haegele KA, Skrdlant HB. Excretion pathways of amphotericin B. J Infect Dis. 1979;140:329-41.

Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. Trends Parasitol. 2003;19:502-8.

Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. Indian J Med Res. 2006;123:399-410.

Crofts MA. Use of amphotericin B in mucocutaneous leishmaniasis. J Trop Med Hyg. 1976;79:111-3.

Cuzick J, Powles T, Veronesi U, Forbes J, Edwards R, Ashley S, Boyle P. Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials. Lancet. 2003;361:296-300.

D'Mello N P, Childress AM, Franklin DS, Kale SP, Pinswasdi C, Jazwinski SM. Cloning and characterization of LAG1, a longevity-assurance gene in yeast. J Biol Chem. 1994;269:15451-9.

Dantas-Torres F, Brandao-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2006;48:151-6.

Dawson K, Toone WM, Jones N, Wilkinson CR. Loss of regulators of vacuolar ATPase function and ceramide synthesis results in multidrug sensitivity in *Schizosaccharomyces pombe*. Eukaryot Cell. 2008;7:926-37.

del Rosal T, Artigao FB, Miguel MJ, de Lucas R, del Castillo F. Successful treatment of childhood cutaneous leishmaniasis with liposomal amphotericin B: report of two cases. J Trop Pediatr. 2010;56:122-4.

Demicheli C, Ochoa R, da Silva JB, Falcao CA, Rossi-Bergmann B, de Melo AL, Sinisterra RD, Frezard F. Oral delivery of meglumine antimoniate-beta-cyclodextrin complex for treatment of leishmaniasis. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48:100-3.

Denny PW, Goulding D, Ferguson MA, Smith DF. Sphingolipid-free *Leishmania* are defective in membrane trafficking, differentiation and infectivity. Mol Microbiol. 2004;52:313-27.

Desjeux P. Leishmaniasis. Nat Rev Microbiol. 2004;2:692.

Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. Clin Dermatol. 1996;14:417-23.

Desjeux P, Alvar J. Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. Ann Trop Med Parasitol. 2003;97(Suppl 1):3-15.

Di Lella F, Vincenti V, Zennaro D, Afeltra A, Baldi A, Giordano D, Pasanisi E, Bacciu A, Bacciu S, Di Lella G. Mucocutaneous leishmaniasis: report of a case with massive involvement of nasal, pharyngeal and laryngeal mucosa. Int J Oral Maxillofac Surg. 2006;35:870-2.

Dietze R, Carvalho SF, Valli LC, Berman J, Brewer T, Milhous W, Sanchez J, Schuster B, Grogl M. Phase 2 trial of WR6026, an orally administered 8-aminoquinoline, in the treatment of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania chagasi*. Am J Trop Med Hyg. 2001;65:685-9.

El Bawab S, Birbes H, Roddy P, Szulc ZM, Bielawska A, Hannun YA. Biochemical characterization of the reverse activity of rat brain ceramidase. A CoA-independent and fumonisin B1-insensitive ceramide synthase. J Biol Chem. 2001;276:16758-66.

Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 1983;132:3-13.

Figueiredo JM. Caracterização Molecular e Funcional da Ceramida sintase dependente de acil-CoA em *Trypanosoma cruzi*. [tese (Doutorado em Ciências Biológicas)]. Rio de Janeiro: Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2008.

Figueiredo JM, Dias WB, Mendonca-Previato L, Previato JO, Heise N. Characterization of the inositol phosphorylceramide synthase activity from *Trypanosoma cruzi*. Biochem J. 2005;387:519-29.

Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, Vogel V, Robidoux A, Dimitrov N, Atkins J, Daly M, Wieand S, Tan-Chiu E, Ford L, Wolmark N. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. J Natl Cancer Inst. 1998;90:1371-88.

Frezard F, Demicheli C, Ferreira CS, Costa MA. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45:913-6.

Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. Nucleic Acids Res. 2003;31:3784-8.

Gelderblom WC, Cawood ME, Snyman SD, Vleggaar R, Marasas WF. Structure-activity relationships of fumonisins in short-term carcinogenesis and cytotoxicity assays. Food Chem Toxicol. 1993;31:407-14.

Ghosh S, Bhattacharyya S, Das S, Raha S, Maulik N, Das DK, Roy S, Majumdar S. Generation of ceramide in murine macrophages infected with *Leishmania donovani* alters macrophage signaling events and aids intracellular parasitic survival. Mol Cell Biochem. 2001;223:47-60.

Gietz RD, Schiestl RH. Large-scale high-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. Nat Protoc. 2007;2:38-41.

Gish W, States DJ. Identification of protein coding regions by database similarity search. Nat Genet. 1993;3:266-72.

Gladue RP, Bright GM, Isaacson RE, Newborg MF. *In vitro* and *in vivo* uptake of azithromycin (CP-62,993) by phagocytic cells: possible mechanism of delivery and release at sites of infection. Antimicrob Agents Chemother. 1989;33:277-82.

Goodwin LG, Page JE. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. Biochem J. 1943;37:198-209.

Goss PE, Ingle JN, Martino S, Robert NJ, Muss HB, Piccart MJ, Castiglione M, Tu D, Shepherd LE, Pritchard KI, Livingston RB, Davidson NE, Norton L, Perez EA, Abrams JS, Cameron DA, Palmer MJ, Pater JL. Randomized trial of letrozole following tamoxifen as extended adjuvant therapy in receptor-positive breast cancer: updated findings from NCIC CTG MA.17. J Natl Cancer Inst. 2005;97:1262-71.

Gossage SM, Rogers ME, Bates PA. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. Int J Parasitol. 2003;33:1027-34.

Gradoni L, Scalone A, Gramiccia M, Troiani M. Epidemiological surveillance of leishmaniasis in HIV-1-infected individuals in Italy. AIDS. 1996;10:785-91.

Gregoriadis G. Overview of liposomes. J Antimicrob Chemother. 1991;28 Suppl B:39-48.

Guillas I, Kirchman PA, Chuard R, Pfefferli M, Jiang JC, Jazwinski SM, Conzelmann A. C26-CoA-dependent ceramide synthesis of *Saccharomyces cerevisiae* is operated by Lag1p and Lac1p. EMBO J. 2001;20:2655-65.

Gumprecht LA, Marcucci A, Weigel RM, Vesonder RF, Riley RT, Showker JL, Beasley VR, Haschek WM. Effects of intravenous fumonisin B1 in rabbits: nephrotoxicity and sphingolipid alterations. Nat Toxins. 1995;3:395-403.

Gundimeda U, Chen ZH, Gopalakrishna R. Tamoxifen modulates protein kinase C via oxidative stress in estrogen receptor-negative breast cancer cells. J Biol Chem. 1996;271:13504-14.

Hadighi R, Mohebali M, Boucher P, Hajjaran H, Khamesipour A, Ouellette M. Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. PLoS Med. 2006;3:e162.

Harper MJ, Walpole AL. Mode of action of I.C.I. 46,474 in preventing implantation in rats. J Endocrinol. 1967a;37:83-92.

Harper MJ, Walpole AL. A new derivative of triphenylethylene: effect on implantation and mode of action in rats. J Reprod Fertil. 1967b;13:101-19.

Harrison LR, Colvin BM, Greene JT, Newman LE, Cole Jr JR. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. J Vet Diagn Invest. 1990;2:217-21.

Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis. Clin Exp Dermatol. 2000;25:363-70.

Herwaldt BL, Berman JD. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. Am J Trop Med Hyg. 1992;46:296-306.

Hiraoka M, Watanabe K, Umezu K, Maki H. Spontaneous loss of heterozygosity in diploid *Saccharomyces cerevisiae* cells. Genetics. 2000;156:1531-48.

Hirokawa T, Boon-Chieng S, Mitaku S. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. Bioinformatics. 1998;14:378-9.

Hirschberg K, Rodger J, Futerman AH. The long-chain sphingoid base of sphingolipids is acylated at the cytosolic surface of the endoplasmic reticulum in rat liver. Biochem J. 1993;290 (Pt 3):751-7.

Hla T. Physiological and pathological actions of sphingosine 1-phosphate. Semin Cell Dev Biol. 2004;15:513-20.

Howard PC, Eppley RM, Stack ME, Warbritton A, Voss KA, Lorentzen RJ, Kovach RM, Bucci TJ. Fumonisin b1 carcinogenicity in a two-year feeding study using F344 rats and B6C3F1 mice. Environ Health Perspect. 2001;109 Suppl 2:277-82.

Hsu FF, Turk J, Zhang K, Beverley SM. Characterization of inositol phosphorylceramides from *Leishmania major* by tandem mass spectrometry with electrospray ionization. J Am Soc Mass Spectrom. 2007;18:1591-604.

Ichikawa S, Nakajo N, Sakiyama H, Hirabayashi Y. A mouse B16 melanoma mutant deficient in glycolipids. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91:2703-7.

Ilgoutz SC, Mullin KA, Southwell BR, McConville MJ. Glycosylphosphatidylinositol biosynthetic enzymes are localized to a stable tubular subcompartment of the endoplasmic reticulum in *Leishmania mexicana*. EMBO J. 1999;18:3643-54.

Irie T, Uekama K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. J Pharm Sci. 1997;86:147-62.

Izumi M, Miyazawa H, Kamakura T, Yamaguchi I, Endo T, Hanaoka F. Blasticidin S-resistance gene (bsr): a novel selectable marker for mammalian cells. Exp Cell Res. 1991;197:229-33.

Jameson BA, Wolf H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. Comput Appl Biosci. 1988;4:181-6.

Jarvis WD, Kolesnick RN, Fornari FA, Traylor RS, Gewirtz DA, Grant S. Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91:73-7.

Jayadev S, Liu B, Bielawska AE, Lee JY, Nazaire F, Pushkareva M, Obeid LM, Hannun YA. Role for ceramide in cell cycle arrest. J Biol Chem. 1995;270:2047-52.

Jha SN, Singh NK, Jha TK. Changing response to diamidine compounds in cases of kala-azar unresponsive to antimonial. J Assoc Physicians India. 1991;39:314-6.

Jha TK, Singh NKP, Singh IJ, Jha S. Combination therapy in Kala-azar. J Assoc Physicians India. 1995; 43:319-20.

Jha TK. Kala-azar an opportunistic infection in HIV/AIDS-Third World Congress on Leishmaniasis 10-15 April 2005 - Palermo, Te

Jiang JC, Kirchman PA, Zagulski M, Hunt J, Jazwinski SM. Homologs of the yeast longevity gene LAG1 in *Caenorhabditis elegans* and human. Genome Res. 1998;8:1259-72.

Johnston M, Davis RW. Sequences that regulate the divergent GAL1-GAL10 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol. 1984;4:1440-8.

Kageyama-Yahara N, Riezman H. Transmembrane topology of ceramide synthase in yeast. Biochem J. 2006;398:585-93.

Kaneshiro ES, Jayasimhulu K, Lester RL. Characterization of inositol lipids from *Leishmania donovani* promastigotes: identification of an inositol sphingophospholipid. J Lipid Res. 1986;27:1294-303.

Kayser O, Kiderlen AF, Bertels S, Siems K. Antileishmanial activities of aphidicolin and its semisynthetic derivatives. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45:288-92.

Kellerman TS, Marasas WF, Thiel PG, Gelderblom WC, Cawood M, Coetzer JA. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B1. Onderstepoort J Vet Res. 1990;57:269-75.

Kimura M, Takatsuki A, Yamaguchi I. Blasticidin S deaminase gene from *Aspergillus terreus* (BSD): a new drug resistance gene for transfection of mammalian cells. Biochim Biophys Acta. 1994;1219:653-9.

Klopper A, Hall M. New synthetic agent for the induction of ovulation: preliminary trials in women. Br Med J. 1971;1:152-4.

Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides L, Polizopoulou Z, Billinis C, Argyriadis D, Diakou N, Papadopoulos O. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. Vet Parasitol. 2001;98:247-61.

Krolewiecki A, Leon S, Scott P, Abraham D. Activity of azithromycin against *Leishmania major in vitro* and *in vivo*. Am J Trop Med Hyg. 2002;67:273-7.

Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J Mol Biol. 1982;157:105-32.

Lachaud L, Bourgeois N, Plourde M, Leprohon P, Bastien P, Ouellette M. Parasite susceptibility to amphotericin B in failures of treatment for visceral leishmaniasis in patients coinfected with HIV type 1 and *Leishmania infantum*. Clin Infect Dis. 2009;48:e16-22.

Lainson R, Ryan L, Shaw JJ. Infective stages of Leishmania in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1987;82:421-4.

Lalak NJ, Morris DL. Azithromycin clinical pharmacokinetics. Clin Pharmacokinet. 1993;25:370-4.

Laviad EL, Albee L, Pankova-Kholmyansky I, Epstein S, Park H, Merrill AH, Futerman AH. Characterization of ceramide synthase 2: tissue distribution, substrate specificity, and inhibition by sphingosine 1-phosphate. J Biol Chem. 2008;283:5677-84.

Lederberg J, Lederberg EM. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J Bacteriol. 1952;63:399-406.

Liu ZY, Huang LL, Chen DM, Yuan ZH. Metabolism of mequindox in liver microsomes of rats, chicken and pigs. Rapid Commun Mass Spectrom. 2010;24:909-18.

Llanos-Cuentas A, Echevarría J, Cruz M, La Rosa A, Campos P, Campos M, Franke E, Berman J, Modabber F, Marr J. Efficacy of sodium stibogluconate alone and in combination with allopurinol for treatment of mucocutaneous leishmaniasis. Clin Infect Dis. 1997;25(3):677-84.

Lopes MC, Vale MG, Carvalho AP. Ca2(+)-dependent binding of tamoxifen to calmodulin isolated from bovine brain. Cancer Res. 1990;50:2753-8.

Lopez-Velez R, Perez-Molina JA, Guerrero A, Baquero F, Villarrubia J, Escribano L, Bellas C, Perez-Corral F, Alvar J. Clinicoepidemiologic characteristics, prognostic factors, and survival analysis of patients coinfected with human immunodeficiency virus and *Leishmania* in an area of Madrid, Spain. Am J Trop Med Hyg. 1998;58:436-43.

Love RR, Mazess RB, Barden HS, Epstein S, Newcomb PA, Jordan VC, Carbone PP, DeMets DL. Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer. N Engl J Med. 1992;326:852-6.

Maarouf M, Adeline MT, Solignac M, Vautrin D, Robert-Gero M. Development and characterization of paromomycin-resistant *Leishmania donovani* promastigotes. Parasite. 1998;5:167-73.

Machado PR, Ampuero J, Guimaraes LH, Villasboas L, Rocha AT, Schriefer A, Sousa RS, Talhari A, Penna G, Carvalho EM. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania braziliensis in Brazil: a randomized and controlled trial. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4:e912.

Magee T, Pirinen N, Adler J, Pagakis SN, Parmryd I. Lipid rafts: cell surface platforms for T cell signaling. Biol Res. 2002;35:127-31.

Mahoney AB, Turco SJ. Characterization of the glucosyltransferases that assemble the side chains of the Indian *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. Arch Biochem Biophys. 1999;372:367-74.

Maia-Elkhoury AN, Carmo EH, Sousa-Gomes ML, Mota E. [Analysis of visceral leishmaniasis reports by the capture-recapture method]. Rev Saude Publica. 2007;41:931-7.

Mandala SM, Thornton RA, Frommer BR, Curotto JE, Rozdilsky W, Kurtz MB, Giacobbe RA, Bills GF, Cabello MA, Martin I, et al. The discovery of australifungin, a novel inhibitor of sphinganine N-acyltransferase from *Sporormiella australis*. Producing organism, fermentation, isolation, and biological activity. J Antibiot (Tokyo). 1995;48:349-56.

Mandon EC, Ehses I, Rother J, van Echten G, Sandhoff K. Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase, and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver. J Biol Chem. 1992;267:11144-8.

Mao C, Xu R, Bielawska A, Szulc ZM, Obeid LM. Cloning and characterization of a Saccharomyces cerevisiae alkaline ceramidase with specificity for dihydroceramide. J Biol Chem. 2000;275:31369-78.

Mao C, Xu R, Szulc ZM, Bielawski J, Becker KP, Bielawska A, Galadari SH, Hu W, Obeid LM. Cloning and characterization of a mouse endoplasmic reticulum alkaline ceramidase: an enzyme that preferentially regulates metabolism of very long chain ceramides. J Biol Chem. 2003;278:31184-91.

Marsden PD. Cutaneous leishmaniasis. BMJ. 1990;300:1716-7.

Martin MB, Grimley JS, Lewis JC, Heath HT, Bailey BN, Kendrick H, Yardley V, Caldera A, Lira R, Urbina JA, Moreno SN, Docampo R, Croft SL, Oldfield E. Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, and *Plasmodium falciparum*: a potential route to chemotherapy. J Med Chem. 2001;44:909-16.

Mathers CD, Ezzati M, Lopez AD. Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework. PLoS Negl Trop Dis. 2007;1:e114.

Medina-Acosta E, Cross GA. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. Mol Biochem Parasitol. 1993;59:327-9.

Melaku Y, Collin SM, Keus K, Gatluak F, Ritmeijer K, Davidson RN. Treatment of kala-azar in southern Sudan using a 17-day regimen of sodium stibogluconate combined with paromomycin: a retrospective comparison with 30-day sodium stibogluconate monotherapy. Am J Trop Med Hyg. 2007;77:89-94.

Merril AH, Sandhoff K. Sphingolipids: Metabolism and cell signaling. In: Vance DE, Vance JE, editors. Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. Amsterdam: Elsevier; 2002. p. 373-408.

Merrill Jr. AH, van Echten G, Wang E, Sandhoff K. Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and de novo sphingolipid biosynthesis in cultured neurons in situ. J Biol Chem. 1993;268:27299-306.

Miguel DC. Caracterização da atividade de tamoxifeno na tratamento da leishmaniose experimental e investigação sobre seus mecanismos de ação [tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK, Andreoli WK, Mortara RA, Uliana SR. Tamoxifen is effective against Leishmania and induces a rapid alkalinization of parasitophorous vacuoles harbouring *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes. J Antimicrob Chemother. 2007;60:526-34.

Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK, Uliana SR. Tamoxifen is effective in the treatment of *Leishmania amazonensis* infections in mice. PLoS Negl Trop Dis. 2008;2:e249.

Miguel DC, Zauli-Nascimento RC, Yokoyama-Yasunaka JK, Katz S, Barbieri CL, Uliana SR. Tamoxifen as a potential antileishmanial agent: efficacy in the treatment of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* infections. J Antimicrob Chemother. 2009;63:365-8.

Mishra J, Saxena A, Singh S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. Curr Med Chem. 2007;14:1153-69.

Mizutani Y, Kihara A, Chiba H, Tojo H, Igarashi Y. 2-Hydroxy-ceramide synthesis by ceramide synthase family: enzymatic basis for the preference of FA chain length. J Lipid Res. 2008;49:2356-64.

Mizutani Y, Kihara A, Igarashi Y. Mammalian Lass6 and its related family members regulate synthesis of specific ceramides. Biochem J. 2005;390:263-71.

Modabber F, Buffet PA, Torreele E, Milon G, Croft SL. Consultative meeting to develop a strategy for treatment of cutaneous leishmaniasis. Institute Pasteur, Paris. 13-15 June, 2006. Kinetoplastid Biol Dis. 2007;6:3.

Monzote L. Antileishmanial patents antileishmanial current drugs and relevant patents. Recent Pat Antiinfect Drug Discov. 2011;6:1-26.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986;51 Pt 1:263-73.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. Lancet. 2005;366:1561-77.

Na-Bangchang K, Karbwang J. Current status of malaria chemotherapy and the role of pharmacology in antimalarial drug research and development. Fundam Clin Pharmacol. 2009;23:387-409.

Nelson DL, Cox, MM. Lipídios. In: David L. Nelson MMC, editors. Leningher: princípios de bioquímica. 4° ed. São Paulo: Sarvier; 2002. p. 280-300.

Neumann A, Baginski M, Czub J. How do sterols determine the antifungal activity of amphotericin B? Free energy of binding between the drug and its membrane targets. J Am Chem Soc. 2010;132:18266-72.

Nieuwenhuizen WF, van Leeuwen S, Jack RW, Egmond MR, Gotz F. Molecular cloning and characterization of the alkaline ceramidase from Pseudomonas aeruginosa PA01. Protein Expr Purif. 2003;30:94-104.

Nonata R, Sampaio R, Marsden PD. Mucosal leishmaniasis unresponsive to glucantime therapy successfully treated with AmBisome. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1997;91:77.

Obeid LM, Linardic CM, Karolak LA, Hannun YA. Programmed cell death induced by ceramide. Science. 1993;259:1769-71.

Ogretmen B, Hannun YA. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. Nat Rev Cancer. 2004;4:604-16.

Okazaki T, Bielawska A, Bell RM, Hannun YA. Role of ceramide as a lipid mediator of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced HL-60 cell differentiation. J Biol Chem. 1990;265:15823-31.

Okino N, He X, Gatt S, Sandhoff K, Ito M, Schuchman EH. The reverse activity of human acid ceramidase. J Biol Chem. 2003;278:29948-53.

Oliveira MM, Timm SL, Costa SC. Lipid composition of *Trypanosoma cruzi*. Comp Biochem Physiol B. 1977;58:195-9.
Olivier M, Badaro R, Medrano FJ, Moreno J. The pathogenesis of *Leishmania*/HIV co-infection: cellular and immunological mechanisms. Ann Trop Med Parasitol. 2003;97 Suppl 1:79-98.

Omollo R, Alexander N, Edwards T, Khalil EA, Younis BM, Abuzaid AA, Wasunna M, et al. Safety and Efficacy of miltefosine alone and in combination with sodium stibogluconate and liposomal amphotericin B for the treatment of primary visceral leishmaniasis in East Africa: study protocol for a randomized controlled trial. Trials.2011;12(1):166

Parsons AB, Brost RL, Ding H, Li Z, Zhang C, Sheikh B, Brown GW, Kane PM, Hughes TR, Boone C. Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways. Nat Biotechnol. 2004;22:62-9.

Pauly DF, McMillin JB. Importance of acyl-CoA availability in interpretation of carnitine palmitoyltransferase I kinetics. J Biol Chem. 1988;263:18160-7.

Perez-Victoria FJ, Castanys S, Gamarro F. *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47:2397-403.

Pierce SK. Lipid rafts and B-cell activation. Nat Rev Immunol. 2002;2:96-105.

Pink R, Hudson A, Mouries MA, Bendig M. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. Nat Rev Drug Discov. 2005;4:727-40.

Pintado V, Martin-Rabadan P, Rivera ML, Moreno S, Bouza E. Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. A comparative study. Medicine (Baltimore). 2001;80:54-73.

Pinto WJ, Wells GW, Lester RL. Characterization of enzymatic synthesis of sphingolipid long-chain bases in *Saccharomyces cerevisiae*: mutant strains exhibiting long-chain-base auxotrophy are deficient in serine palmitoyltransferase activity. J Bacteriol. 1992;174:2575-81.

Powles TJ. Efficacy of tamoxifen as treatment of breast cancer. Semin Oncol. 1997;24:S1-48-S1-54.

Previato JO, Sola-Penna M, Agrellos OA, Jones C, Oeltmann T, Travassos LR, Mendonca-Previato L. Biosynthesis of O-N-acetylglucosamine-linked glycans in Trypanosoma cruzi. Characterization of the novel uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase-catalyzing formation of N-acetylglucosamine alpha1-->O-threonine. J Biol Chem. 1998;273:14982-8.

Rabello A, Orsini M, Disch J. *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. Ann Trop Med Parasitol. 2003;97 Suppl 1:17-28.

Ratha J, Majumdar KN, Mandal SK, Bera R, Sarkar C, Saha B, Mandal C, Saha KD, Bhadra R. A sphingolipid rich lipid fraction isolated from attenuated *Leishmania donovani* promastigote induces apoptosis in mouse and human melanoma cells *in vitro*. Mol Cell Biochem. 2006;290:113-23.

Rasmussen JA, Hermetter A. Chemical synthesis of fluorescent glycero- and sphingolipids. Prog Lipid Res. 2008;47:436-60.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. Lancet Infect Dis. 2007;7:581-96.

Rey LC, Martins CV, Ribeiro HB, Lima AA. American visceral leishmaniasis (kala-azar) in hospitalized children from an endemic area. J Pediatr (Rio J). 2005;81:73-8.

Ritmeijer K, Dejenie A, Assefa Y, Hundie TB, Mesure J, Boots G, den Boer M, Davidson RN. A comparison of miltefosine and sodium stibogluconate for treatment of visceral leishmaniasis in an Ethiopian population with high prevalence of HIV infection. Clin Infect Dis. 2006;43:357-64.

Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Macedo VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. Am J Trop Med Hyg. 2001;65:456-65.

Rose M, Winston F. Identification of a Ty insertion within the coding sequence of the *S. cerevisiae* URA3 gene. Mol Gen Genet. 1984;193:557-60.

Rosenthal E, Marty P, Poizot-Martin I, Reynes J, Pratlong F, Lafeuillade A, Jaubert D, Boulat O, Dereure J, Gambarelli F, et al. Visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection in southern France. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1995;89:159-62.

Rowlands MG, Parr IB, McCague R, Jarman M, Goddard PM. Variation of the inhibition of calmodulin dependent cyclic AMP phosphodiesterase amongst analogues of tamoxifen; correlations with cytotoxicity. Biochem Pharmacol. 1990;40:283-9.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science. 1985;230:1350-4.

Sampaio SA, Castro RM, Dillon NL, Martins JE. Treatment of mucocutaneous (American) leishmaniasis with amphotericin B: report of 70 cases. Int J Dermatol. 1971;10:179-81.

Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. J Mol Biol. 1975;94:441-8.

Schorling S, Vallee B, Barz WP, Riezman H, Oesterhelt D. Lag1p and Lac1p are essential for the Acyl-CoA-dependent ceramide synthase reaction in *Saccharomyces cerevisae*. Mol Biol Cell. 2001;12:3417-27.

Scott P. Immunologic memory in cutaneous leishmaniasis. Cell Microbiol. 2005;7:1707-13.

Sen R, Chatterjee M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. Phytomedicine. 2011. In press.

Sereno D, Cordeiro da Silva A, Mathieu-Daude F, Ouaissi A. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. Parasitol Int. 2007;56:3-7.

Sevova ES, Goren MA, Schwartz KJ, Hsu FF, Turk J, Fox BG, Bangs JD. Cell-free synthesis and functional characterization of sphingolipid synthases from parasitic trypanosomatid protozoa. J Biol Chem. 2010;285:20580-7.

Shayman JA. Sphingolipids. Kidney Int. 2000;58:11-26.

Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. Nature. 1997;387:569-72.

Sindermann H, Engel KR, Fischer C, Bommer W. Oral miltefosine for leishmaniasis in immunocompromised patients: compassionate use in 39 patients with HIV infection. Clin Infect Dis. 2004;39:1520-3.

Singh MN, Stringfellow HF, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch PL, Martin FL. Tamoxifen: important considerations of a multi-functional compound with organ-specific properties. Cancer Treat Rev. 2007;33:91-100.

Smith ER, Merrill AH, Obeid LM, Hannun YA. Effects of sphingosine and other sphingolipids on protein kinase C. Methods Enzymol. 2000;312:361-73.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem. 1985;150:76-85.

Solomon M, Baum S, Barzilai A, Scope A, Trau H, Schwartz E. Liposomal amphotericin B in comparison to sodium stibogluconate for cutaneous infection due to *Leishmania braziliensis*. J Am Acad Dermatol. 2007;56:612-6.

Soto J, Rea J, Balderrama M, Toledo J, Soto P, Valda L, Berman JD. Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 2008;78:210-1.

Southern EM. Measurement of DNA length by gel electrophoresis. Anal Biochem. 1979;100:319-23.

Steigbigel N. Macrolides and clindamycin. Mandell: Douglas and Bennett's; 1995.

Steiner AZ, Terplan M, Paulson RJ. Comparison of tamoxifen and clomiphene citrate for ovulation induction: a meta-analysis. Hum Reprod. 2005;20:1511-5.

Stoffel W, Duker M, Hofmann K. Molecular cloning and gene organization of the mouse mitochondrial 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase. FEBS Lett. 1993;333:119-22.

Stoffel W, Sticht G, LeKim D. Synthesis and degradation of spingosine bases in *Hansenula ciferrii*. Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 1968;349:1149-56.

Straus AH, Levery SB, Jasiulionis MG, Salyan ME, Steele SJ, Travassos LR, Hakomori S, Takahashi HK. Stage-specific glycosphingolipids from amastigote forms of *Leishmania (L.) amazonensis*. Immunogenicity and role in parasite binding and invasion of macrophages. J Biol Chem. 1993;268:13723-30.

Sundar S, Chakravarty J. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. Expert Opin Investig Drugs. 2008;17:787-94.

Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Fischer C, Junge K, Bryceson A, Berman J. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. N Engl J Med. 2002;347:1739-46.

Sundar S, Singh VP, Sharma S, Makharia MK, Murray HW. Response to interferon-gamma plus pentavalent antimony in Indian visceral leishmaniasis. J Infect Dis. 1997;176(4):1117-9.

Sutterwala SS, Hsu FF, Sevova ES, Schwartz KJ, Zhang K, Key P, Turk J, Beverley SM, Bangs JD. Developmentally regulated sphingolipid synthesis in African trypanosomes. Mol Microbiol. 2008;70:281-96.

Takeuchi S, Hirayama K, Ueda K, Sakai H, Yonehara H. Blasticidin S, a new antibiotic. J Antibiot (Tokyo). 1958;11:1-5.

Tempone AG, Martins de Oliveira C, Berlinck RG. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. Planta Med. 2011;77:572-85.

Tremblay M, Olivier M, Bernier R. *Leishmania* and the pathogenesis of HIV infection. Parasitol Today. 1996;12:257-61.

Vallee B, Riezman H. Lip1p: a novel subunit of acyl-CoA ceramide synthase. EMBO J. 2005;24:730-41.

van der Westhuizen L, Shephard GS, Rheeder JP, Burger HM, Gelderblom WC, Wild CP, Gong YY. Simple intervention method to reduce fumonisin exposure in a subsistence maize-farming community in South Africa. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2010;27:1582-8.

Venkataraman K, Futerman AH. Do longevity assurance genes containing Hox domains regulate cell development via ceramide synthesis? FEBS Lett. 2002;528:3-4.

Verma NK, Dey CS. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48:3010-5.

Voss KA, Chamberlain WJ, Bacon CW, Norred WP. A preliminary investigation on renal and hepatic toxicity in rats fed purified fumonisin B1. Nat Toxins. 1993;1:222-8.

Wang E, Merrill AH. Ceramide synthase. In: Merril AH, Hannun YA. Methods Enzymol. San Diego, Califórnia: Academic Press; 2000. p. 15-21.

Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill Jr AH. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. J Biol Chem. 1991;266:14486-90.

Ward HW. Anti-oestrogen therapy for breast cancer: a trial of tamoxifen at two dose levels. Br Med J. 1973;1:13-4.

Watanabe M, Kitano T, Kondo T, Yabu T, Taguchi Y, Tashima M, Umehara H, Domae N, Uchiyama T, Okazaki T. Increase of nuclear ceramide through caspase-3-dependent regulation of the "sphingomyelin cycle" in Fas-induced apoptosis. Cancer Res. 2004;64:1000-7.

Wellington M, Kabir MA, Rustchenko E. 5-fluoro-orotic acid induces chromosome alterations in genetically manipulated strains of *Candida albicans*. Mycologia. 2006;98:393-8.

Wellington M, Rustchenko E. 5-Fluoro-orotic acid induces chromosome alterations in *Candida albicans*. Yeast. 2005;22:57-70.

White-Gilbertson S, Mullen T, Senkal C, Lu P, Ogretmen B, Obeid L, Voelkel-Johnson C. Ceramide synthase 6 modulates TRAIL sensitivity and nuclear translocation of active caspase-3 in colon cancer cells. Oncogene. 2009;28:1132-41.

Williams RD, Wang E, Merrill Jr AH. Enzymology of long-chain base synthesis by liver: characterization of serine palmitoyltransferase in rat liver microsomes. Arch Biochem Biophys. 1984;228:282-91.

Williams-Brown MY, Salih SM, Xu X, Veenstra TD, Saeed M, Theiler SK, Diaz-Arrastia CR, Salama SA. The effect of tamoxifen and raloxifene on estrogen metabolism and endometrial cancer risk. J Steroid Biochem Mol Biol. 2011;126:78-86.

Williamson JG, Ellis JD. The induction of ovulation by tamoxifen. J Obstet Gynaecol Br Commonw. 1973;80:844-7.

Winter G, Fuchs M, McConville MJ, Stierhof YD, Overath P. Surface antigens of *Leishmania mexicana* amastigotes: characterization of glycoinositol phospholipids and a macrophage-derived glycosphingolipid. J Cell Sci. 1994;107(Pt 9):2471-82.

Wiseman H, Halliwell B. Tamoxifen and related compounds protect against lipid peroxidation in isolated nuclei: relevance to the potential anticarcinogenic benefits of breast cancer prevention and therapy with tamoxifen? Free Radic Biol Med. 1994;17:485-8.

Yamaguchi H, Yamamoto C, Tanaka N. Inhibition of protein synthesis by blasticidin S. I. Studies with cell-free systems from bacterial and mammalian cells. J Biochem. 1965;57:667-77.

Yamey G, Torreele E. The world's most neglected diseases. BMJ. 2002;325:176-7.

Yardley V, Croft SL. Activity of liposomal amphotericin B against experimental cutaneous leishmaniasis. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41:752-6.

Yokoyama-Yasunaka JK, Pral EM, Oliveira Junior OC, Alfieri SC, Stolf AM. Trypanosoma cruzi: identification of proteinases in shed components of trypomastigote forms. Acta Trop. 1994;57:307-15.

Yoo HS, Norred WP, Wang E, Merrill AH, Riley RT. Fumonisin inhibition of *de novo* sphingolipid biosynthesis and cytotoxicity are correlated in LLC-PK1 cells. Toxicol Appl Pharmacol. 1992;114:9-15.

Yoshida S, Anraku Y. Characterization of staurosporine-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: vacuolar functions affect staurosporine sensitivity. Mol Gen Genet. 2000;263:877-88.

Zhang K, Beverley SM. Phospholipid and sphingolipid metabolism in *Leishmania.* Mol Biochem Parasitol. 2010;170:55-64.

Zhang K, Hsu FF, Scott DA, Docampo R, Turk J, Beverley SM. *Leishmania* salvage and remodelling of host sphingolipids in amastigote survival and acidocalcisome biogenesis. Mol Microbiol. 2005;55:1566-78.

Zhang K, Pompey JM, Hsu FF, Key P, Bandhuvula P, Saba JD, Turk J, Beverley SM. Redirection of sphingolipid metabolism toward de novo synthesis of ethanolamine in *Leishmania*. EMBO J. 2007;26:1094-104.

Zhang K, Showalter M, Revollo J, Hsu FF, Turk J, Beverley SM. Sphingolipids are essential for differentiation but not growth in *Leishmania*. EMBO J. 2003;22:6016-26.

Zhang O, Wilson MC, Xu W, Hsu FF, Turk J, Kuhlmann FM, Wang Y, Soong L, Key P, Beverley SM, Zhang K. Degradation of host sphingomyelin is essential for *Leishmania* virulence. PLoS Pathog. 2009;5:e1000692.