UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL

CAROLINA DE LIMA JORGE

**Identificação de genes que codificam
translocadores de fosfolipídios em *Leishmania***

São Paulo
2018

CAROLINA DE LIMA JORGE

**Identificação de genes que codificam
translocadores de fosfolipídios em *Leishmania***

Versão Corrigida

Tese apresentada ao Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Profa. Dra. Lucile Maria Floeter-Winter

São Paulo
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo

Jorge, Carolina de Lima

Identificação de genes que codificam translocadores de fosfolipídios em *Leishmania* / Carolina de Lima Jorge; orientadora, Lucile Maria Floeter-Winter. – 2018 123f.

Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de pós-graduação em Medicina Tropical, Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.
Versão Corrigida

1. *Leishmania (L.) amazonensis*. 2. Infectividade. 3. Apoptose. 4. Fosfolipídios. 5. Translocadores.
I. Floeter-Winter, Lucile Maria, orientadora. II. Doutora.

Nome: Jorge, Carolina de Lima

Título: Identificação de genes que codificam translocadores de fosfolipídios em *Leishmania*.

Tese apresentada ao Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovada em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Julgamento _____

Dedicatória

À minha família, Aldo e Barbara, por me dar e também receber amor incondicional.

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Dra. Lucile Maria Floeter-Winter, por sempre trabalhar pela minha melhora profissional. Agradeço por ter me recebido em seu laboratório e me ensinado tanto. Certamente é e sempre será a melhor professora que eu já tive;

Ao Prof. Dr. Thomas Günther Pomorski, por me receber em seu laboratório, ensinado os ensaios com paciência e gentileza;

À Profa. Dra. Iolanda Midea Cuccovia, do Instituto de Química da USP por auxiliar nos ensaios de lipossomas;

À Profa. Dra. Célia Regina da Silva Garcia, do laboratório de biologia celular e molecular na interação Plasmodium-hospedeiro, por ter gentilmente disponibilizado o equipamento FACs e também o microscópio de fluorescência diversas vezes;

À Dra. Sandra, por ter me direcionado diversas vezes durante o projeto de doutorado, por me ajudar a pensar racionalmente sobre os ensaios, e me ajudar com as minhas diversas dúvidas durante esse período;

Ao MSc. Ricardo, por ter me recebido como sua estagiária, e me ensinado o básico do básico quando cheguei ao laboratório, e por ainda me ajudar em tantas coisas diárias. Agradeço também pelos incontáveis momentos de risada e descontração que você me proporcionou;

À Dra. Juliana Aoki, por responder às minhas dúvidas diárias com tanta tranquilidade, por ter me sugerido a colaboração com os mutantes resistentes à miltefosina, e também pelos momentos de descontração;

Às meninas batlabianas: Rúbia, Nandy e Phanie, muito obrigada por me ajudarem com as dúvidas de informática e também no dia a dia do laboratório. Obrigada por me proporcionarem tantas risadas;

À Dra. Fernanda Laranjeira da Silva, por ter ensinado no início do meu projeto, técnicas que utilizo até hoje.

Ao Dr. Marcos Gonzaga dos Santos, por ter me passado gentilmente informações no início do meu projeto.

À Dra. Greice Kelle Viegas Saraiva, do Instituto de Química, por sintetizar os lipossomas tão úteis no desenvolvimento desta tese;

À Myna Nakabashi, do laboratório de biologia celular e molecular na interação Plasmodium-hospedeiro, por gentilmente me auxiliar com qualquer dúvida referente ao FACs;

Agradeço ao Luiz Sardinha, do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, por gentilmente me auxiliar no FACs Sorter;

Agradeço à minha família, Aldo Jorge e Barbara de Lima Jorge, por todo o apoio, carinho, amor, suporte financeiro e por acreditarem em mim;

Agradeço aos meus amigos, Fernando, Gláucia, Janaína, Elisabete, Taís Omote, Thaís Sala, Thais Rangel, Raissa e Laura por todos os momentos de boas risadas, carinho, conselhos e amizade;

Agradeço ao Diogo, pela amizade, companheirismo e amor, por me acompanhar e incentivar desde o meio da faculdade até quase o final deste doutorado;

À secretária do IMT Eliane Araujo, por tão gentilmente responder à todas as minhas dúvidas durante esse período;

Agradeço também a quem de alguma forma contribuiu para este projeto e que, por erro meu, não citei;

Agradeço o suporte financeiro que recebi durante o doutorado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo processo número 2014/17542-3 e ao CNPq.

Epígrafe

“The cheese-mites asked how the cheese got there,
And warmly debated the matter;
The Orthodox said that it came from the air,
And the Heretics said from the platter.
They argued it long and they argued it strong,
And I hear they are arguing now;
But of all the choice spirits who lived in the cheese,
Not one of them thought of a cow.”
(Doyle, A.C., 1898)

Resumo

Jorge, Carolina de Lima. **Identificação de genes que codificam translocadores de fosfolipídios em *Leishmania***. 123f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Entre as estratégias que os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam para o escape da resposta imune do hospedeiro vertebrado, há a ocorrência de um tipo de morte celular programada, conhecida como apoptose. Quando em contato com o macrófago, a *Leishmania* é fagocitada de forma silenciosa, evitando a resposta inflamatória do hospedeiro vertebrado. Alguns autores defendem que a *Leishmania* mimetiza a apoptose, expondo entre outras moléculas um fosfolipídio que sinalizaria para o macrófago que está em apoptose, e esse mecanismo é denominado na literatura como mimetismo apoptótico. O objetivo desta tese foi elucidar como ocorre esse escape com o enfoque nos fosfolipídios presentes e expostos em parasitas mutantes de *L. (L.) amazonensis* com características fenotípicas distintas, utilizando diferentes estratégias: transfecção com cosmídeos contendo frações do genoma de *L. (L.) amazonensis*; identificação e clonagem do gene *pi4k* contido no cosmídeo em vetor de expressão em *Leishmania*; seleção de parasitas resistentes a miltefosina, mantidos ou não sob pressão do antibiótico, seleção de parasitas na 28ª passagem em cultura; seleção de parasitas purificados de macrófagos de linhagem RAW. A caracterização desses mutantes foi realizada em relação à ligação de anexina V-FITC, infectividade em macrófagos da linhagem RAW, tomada de fosfolipídios fluorescentes (NBD), IC₅₀ de células tratadas com os antibióticos duramicina, miltefosina e anfotericina B. De acordo com os ensaios de ligação à anexina V-FITC, identificamos que os mutantes *pi4k*-pSNBR e os mutantes resistentes à miltefosina apresentaram maior ligação à anexina V-FITC. O gene que codifica a fosfatidilinositol (PI) 4-kinase, fez com que os parasitas que continham tanto o cosmídeo como o superexpressor *pi4k*, apresentassem menor infectividade em relação ao controle selvagem. O mesmo ocorreu para os parasitas resistentes à miltefosina. Em contrapartida, os parasitas derivados desses resistentes, mas mantidos sem pressão do antibiótico, recuperaram os valores de infectividade comparáveis ao grupo controle. Interessante é que os parasitas resistentes à miltefosina, mantidos ou não sob pressão, assim como o parasita superexpressor do gene *pi4k* apresentaram maior ligação à anexina V-FITC em relação ao controle selvagem, indicando que a ligação à anexina V-FITC não se correlaciona com infectividade. Parasitas resistentes à miltefosina, mantidos ou não sob pressão apresentaram maior sensibilidade à duramicina, e quando tratados com anfotericina B, esses parasitas apresentaram maior resistência. Uma outra abordagem analisada nessa tese foi elucidar qual o fosfolipídio é reconhecido pelo macrófago durante a infecção por *L. (L.) amazonensis*. Como resultado, observamos que os lipossomas contendo PC levam à diminuição dose-dependente da infecção, o que não foi visto em PS ou PC:PE. Esse resultado sugere a importância de PC para o estabelecimento da infectividade.

Palavras-chave: *Leishmania (L.) amazonensis*; Infectividade; Apoptose; Fosfolipídios; Translocadores.

Abstract

Among the strategies that *Leishmania* protozoans present to escape the immune response of the vertebrate host, there is a type of programmed cell death, known as apoptosis. When in contact with the macrophage, *Leishmania* is phagocytized in a silent manner, avoiding the inflammatory response of the vertebrate host. Some authors argue that *Leishmania* mimics apoptosis, exposing among other molecules a phospholipid that would signal to the macrophage that is in apoptosis, and this mechanism is denominated in the literature as apoptotic mimicry. The objective of this thesis was to elucidate how this escape occurs with the focus on the phospholipids present and exposed in mutant parasites of *L. (L.) amazonensis*, with distinct phenotypic characteristics, using different strategies, such as selection of parasites showing higher attachment to annexin V-FITC. After transfection with cosmids containing the genome of *L. (L.) amazonensis*; identification and cloning of the *pi4k* gene contained in the cosmid in *Leishmania* expression vector; selection of parasites resistant to miltefosine, whether or not under antibiotic pressure, selection of parasites at the 28th passage in culture; selection of purified strains of RAW lineage macrophages. The characterization of these mutants was performed in relation to the annexin V-FITC binding, infectivity in RAW lineage macrophages, fluorescent phospholipid (NBD) uptake, IC₅₀ of cells treated with the antibiotics duramycin, miltefosine and amphotericin B. According to the binding assays to Annexin V-FITC, we have identified that *pi4k*-pSNBR mutants and miltefosin-resistant mutants showed higher attachment to annexin V-FITC. The gene coding for phosphatidylinositol (PI) 4-kinase caused the parasites containing both the cosmid and the *pi4k* superexpressor to have less infectivity than the wild-type control. The same occurred for parasites resistant to miltefosine. In contrast, the parasites derived from these resistant, but kept without antibiotic pressure, recovered infectivity values, comparable to the control group. Interestingly, miltefosine-resistant parasites, whether or not under pressure, as well as the overexpressing parasite of the *pi4k* gene showed greater attachment to annexin V-FITC over wild-type control, indicating that attachment to annexin V-FITC does not correlate with infectivity. Parasites resistant to miltefosine, whether or not under pressure, showed greater sensitivity to duramycin, and when treated with amphotericin B, these parasites showed greater resistance. Another approach analyzed in this thesis was to elucidate the phospholipid recognized by the macrophage during infection by *L. (L.) amazonensis*. As a result, we observed that PC-containing liposomes lead to dose-dependent decrease of infection, which has not been seen in PS or PE. This result suggests the importance of PC for the establishment of infectivity.

Key words: *Leishmania (L.) amazonensis*; Infectivity; Apoptosis, Phospholipids, Translocators

Lista de abreviaturas

ABCc8	Cassete de ligação ATP família c8
ATP	Adenosina trifosfato
B.O.D	Demanda bioquímica de Oxigênio
BSA	Albumina de soro bovino
cDNA	DNA complementar
CO ₂	Gás carbônico
Cos	Cosmídeo
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dnase	Desoxirribonuclease
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
FACs	Fracionador celular ativado por fluorescência
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GTP	Guanosina trifosfato
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid)
IC ₅₀	Concentração necessária para inibir o crescimento celular em 50% máxima)
IPTG	Isopropil b-D-tiogalactosídeo
LB	Meio de cultura Luria Bertani
M199	Meio de cultura M199
MCP	Morte celular programada
mRNA	RNA mensageiro
N ₂	Nitrogênio
NBD	N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il) amino
NMR	Ressonância nuclear magnética
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
P28	Passagem de 28 semanas ou mais
PBS	Tampão fosfato salina
PC	Fosfatidilcolina

PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Fosfatidiletanolamina
PI	Iodeto de propídio
<i>PI4k</i>	Fosfatidilinositol 4 kinase
PMSF	Fluoreto de fenil metil sulfonila
PS	Fosfatidilserina
PSS I	Fosfatidilserina sintetase I
PSS II	Fosfatidilserina sintetase II
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RAW	Linhagem do macrófago
RNA	Ácido ribonucleico
Rnase	Ribonuclease
RNI	Intermediários reativos de nitrogênio
ROI	Intermediários reativos de oxigênio
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	RNA ribossômico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TAE	Tris-acetato-EDTA
TE	Tris-EDTA
Th1	T helper Cell 1
Th 2	T helper Cell 2
TLC	Cromatografia em camada delgada
U	Unidade
UV	Ultravioleta
V	Volume

Lista de símbolos de unidades de medida

%	Por cento
°C	Grau Celsius
μ	Micro
A	Ampère
u. a	Unidades arbitrárias
pb	Pares de bases
F	Faraday
g	Grama
K	Kelvin
kb	Quilobases
L	litro
m	Metro
M	Molar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
pH	Potencial hidrogeniônico
V	Volt
xg	Unidade correspondente à aceleração normal da gravidade

Lista de figuras

Figura 1- Ciclo de vida dos parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	2
Figura 2- Translocação de fosfolipídios catalisados pelo movimento de flipase, flopase e escramblase.....	8
Figura 3- Padrão de restrição de DNA de cosmídeo recuperado dos diferentes mutantes, cuja superexpressão leva a uma alteração no comportamento do parasita com relação à ligação de anexina V-FITC.....	29
Figura 4- Ligação de promastigotas em fase exponencial de cultura tratados com anexina V-FITC e analisadas em citometria de fluxo (FACs).....	30
Figura 5 - Determinação da velocidade de tomada de lipídios marcados com NBD-PC, NBD-PS, NBD-PE e NBD-SM em <i>L. (L.) amazonensis</i> Selvagem e mutante Cos 3.....	31
Figura 6- Efluxo de NBD-lipídio por <i>Leishmania</i> Selvagem e Cos 3.....	32
Figura 7- Imagem retirada do programa <i>BioEdit</i> . Amostras 7-12 alinhadas com a sequência localizada no cds de <i>L. (L.) amazonensis</i>	34
Figura 8- Amplificação do fragmento gênico phosphatidylinositol 4-kinase (<i>pi4k</i>), para posterior clivagem utilizando enzima de restrição <i>EcoRI</i> e <i>BamHI</i>	35
Figura 9- Confirmação da ligação inserto <i>pi4k</i> em vetor pGEM T-easy com a utilização de enzima de restrição <i>EcoRI</i> e <i>BamHI</i>	36
Figura 10- Confirmação da ligação em fase entre o fragmento gênico <i>pi4k</i> e vetor de expressão em <i>Leishmania</i> (pSNBR).....	37
Figura 11- PCR utilizando como alvo DNA genômico de <i>L. (L.) amazonensis</i> e os iniciadores que amplificam os fragmentos gênicos dos genes <i>pi4k</i> com tamanho esperado de aproximadamente 100 bp.....	38

Figura 12- Clivagem com enzima de restrição <i>EcoRI</i> de DNA de plasmídeo recombinante de clones obtidos após a transformação de <i>E. coli</i> com pGEM-T easy ligado ao fragmento gênico de <i>pi4k</i>	38
Figura 13- Clivagem com enzima de restrição <i>ScaI</i> de DNA do plasmídeo recombinante de clones obtidos após a transformação de <i>E. coli</i> com pGEM-T easy ligado ao fragmento gênico de <i>pi4k</i>	39
Figura 14- Curvas-padrão do gene alvo <i>pi4k</i>	40
Figura 15- RT-qPCR de RNA transcrito do alvo <i>pi4k</i> normalizado pelo transcrito do gene <i>gapdh</i>	40
Figura 16- Ligação de promastigotas em fase estacionária � anexina V-FITC das amostras selvagem, vetor pSNBR e <i>pi4k</i> -pSNBR.....	41
Figura 17- Infecção de macrófago de linhagem RAW com promastigotas dos grupos selvagem, vetor pSNBR e <i>pi4k</i> -pSNBR em <i>chamber slide</i> de vidro.....	42
Figura 18– Ensaio de IC ₅₀ com promastigotas selvagem em fase estacionária de cultura, tratados com os antibióticos miltefosina, anfotericina B e duramicina.....	44
Figura 19– Ensaio de IC ₅₀ com promastigotas em fase estacionária de cultura, tratados com os antibióticos miltefosina e duramicina com células de <i>L. (L.) amazonensis</i> selvagem, Cos 3 e vetor cLHYG.....	44
Figura 20– Ensaio de IC ₅₀ dos parasitas Selvagem, vetor pSNBR e <i>pi4k</i> -pSNBR tratados com os antibióticos anfotericina B, miltefosina e duramicina.....	45
Figura 21– Ensaio de IC ₅₀ de <i>L. (L.) amazonensis</i> tratada com o antibiótico miltefosina.....	47
Figura 22- Curva de crescimento com células de <i>L. (L.) amazonensis</i> selvagem, transfectadas com vetor cLHYG e transfectadas com Cos 3.....	49

Figura 23- Curva de crescimento dos clones P28, Miltefosina 128 e Miltefosina ⁻ com pré-inóculo de 1×10^5	50
Figura 24- Ligação de promastigotas em fase estacionária à anexina V-FITC dos grupos P28, Miltefosina 128 e Miltefosina ⁻	51
Figura 25- Infecção de macrófago RAW por promastigotas dos grupos P28, Miltefosina 128 e Miltefosina ⁻ em <i>chamber slide</i> de vidro.....	52
Figura 26– Padronização de competição entre fosfolipídios para a tomada por <i>L. (L.) amazonensis</i>	54
Figura 27– Ensaio de competição entre fosfolipídios para a tomada por <i>L. (L.) amazonensis</i>	55
Figura 28- Competição de internalização de fosfolipídio NBD-PC e PC, PS e PE não marcados na tomada por promastigotas de P28, Miltefosina 128 e Miltefosina ⁻	56
Figura 29- Competição de internalização de fosfolipídio NBD-PS e PC, PS e PE não marcados na tomada por promastigotas de P28, Miltefosina 128 e Miltefosina ⁻	57
Figura 30- Competição de internalização de fosfolipídio NBD-PE e PC, PS e PE não marcados na tomada por promastigotas de P28, Miltefosina 128 e Miltefosina ⁻	58
Figura 31– Ensaio de IC ₅₀ dos parasitas P28, Miltefosina 128 e Miltefosina ⁻ com a utilização dos antibióticos anfotericina B, miltefosina e duramicina.....	59
Figura 32- Ligação de promastigotas em fase estacionária à anexina V-FITC dos grupos P1 BALB/c, P1 RAW e P28.....	61
Figura 33- Infecção de macrófago RAW por parasitas P1 BALB/c, P1 RAW e P28 cultivados em <i>chamber slide</i> de vidro.....	62

Figura 34– Ensaio de tomada de NBD-PC, NBD-PS e NBD-PE por promastigotas de P1 BALB/c, P1 RAW e P28.....	63
Figura 35– Ensaio de IC ₅₀ dos parasitas P1 BALB/c, P1 RAW e P28 com a utilização dos antibióticos anfotericina B, miltefosina e duramicina.....	64
Figura 36- Ensaio de competição “piloto” entre lipossomas de PC e promastigotas estacionários de <i>L. (L.) amazonensis</i>	66
Figura 37- Infecção de macrófago RAW por <i>L. (L.) amazonensis</i> na presença de lipossomas de PC, PS e PC:PE (1:1).....	67
Figura 38- Infecção de macrófago RAW por <i>L. (L.) amazonensis</i> na presença de lipossomas de fosfatidilserina (PS) ou fosfatidilcolina (PC)....	69
Figura 39- Teste de sensibilidade do AlamarBlue®.....	70
Figura 40- Teste de sensibilidade do AlamarBlue® em diferentes concentrações de células.....	71
Figura 41- Ensaio de toxicidade de macrófago e <i>Leishmania</i> tratados com lipossomas.....	71
Figura 42- Amplificação do fragmento gênico <i>abcc8</i> contendo sequências para posterior clivagem utilizando enzimas de restrição <i>EcoRI</i> e <i>HindIII</i>	73
Figura 43- Amplificação do fragmento gênico <i>gtp</i> contendo sequências para posterior clivagem utilizando enzima de restrição <i>EcoRI</i> e <i>BamHI</i>	73
Figura 44- PCR utilizando como alvo DNA genômico de <i>L. (L.) amazonensis</i> e os iniciadores que amplificam os fragmentos gênicos dos genes <i>gtp</i> e <i>abcc8</i>	74
Figura 45- Clivagem com enzima de restrição <i>EcoRI</i> de DNA de plasmídeo recombinante de clones obtidos após a transformação de <i>E. coli</i> com pGEM-T easy ligado aos fragmentos gênicos de <i>gtp</i> ou <i>abcc8</i>	75

Figura 46- Clivagem com enzima de restrição <i>ScaI</i> de DNA do plasmídeo recombinante de clones obtidos após a transformação de <i>E. coli</i> com pGEM-T easy ligado aos fragmentos gênicos de <i>gtp</i> ou <i>abcc8</i>	75
Figura 47- Curvas-padrão dos genes alvos: <i>abcc8</i> e <i>gtp</i>	76
Figura 48- qPCR de RNA transcrito dos alvos em A: <i>abcc8</i> e B: <i>gtp</i> , normalizados pelo transcrito do gene <i>gapdh</i>	77

Lista de Tabelas

Tabela 1- oligonucleotídeos utilizados para realização de PCR ou sequenciamento.....	19
Tabela 2 - Tabela com os dados referentes ao deslocamento das populações anexina V-FITC (+) e anexina V-FITC negativas (-) em análise por FACs durante 3 semanas após a transfecção.....	25
Tabela 3 - Tabela referente aos dados de deslocamento das populações anexina V-FITC positivas (+) e anexina V-FITC negativas (-) em análise de FACs, em duas semanas após a transfecção.....	26
Tabela 4 -Tabela referente ao deslocamento das populações FITC positivas (+) e FITC negativas (-) ilustrando a caracterização das culturas durante o <i>sorting</i>	27
Tabela 5- Dados indicando o deslocamento de clones oriundos de populações FITC positivas (+) e FITC negativas (-) logo após o <i>sorting</i>	28
Tabela 6- Mutantes superexpressos ligantes à anexina V – FITC.....	28

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1 <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	1
1.2 Tratamento.....	3
1.3 Macrófago	3
1.4 Macrófago e <i>Leishmania</i>	4
1.5 Apoptose	5
1.6 Anexina V	6
1.7 Fosfolipídios	6
1.8 Anexina V-FITC, <i>Leishmania</i> e fosfolipídios.....	8
2. Objetivos.....	10
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivos específicos	10
3. Materiais e métodos.....	11
3.1 Organismos.....	11
3.1.1 Parasitas.....	11
3.1.2 Macrófagos.....	11
3.1.3 Bactérias e vetores.....	11
3.2 Biblioteca de cosmídeos de <i>L. (L.) amazonensis</i>	12
3.3 Ligação Inserto-vetor.....	12
3.4 Preparo de bactéria termo competentes	12
3.5 Transformação de bactérias <i>E. coli</i> Sure	13
3.6 Extração de DNA de plasmídeos/cosmídeos bacterianos em pequena escala (“Mini-Prep”).....	13
3.7 Extração de DNA de plasmídeos/cosmídeos bacterianos em média escala (“Med-Prep”)	14
3.8 Eletroforese em gel de agarose	15
3.9 Eletroporação de <i>L. (L.) amazonensis</i>	15

3.10	Placas de meio semissólido	16
3.11	Ensaio de sensibilidade a antibióticos.....	17
3.12	Fracionamento de populações de <i>Leishmania</i> por <i>Sorter</i>	17
3.13	Extração do DNA do cosmídeo contido na <i>Leishmania</i>	17
3.14	Análise da exposição de ligantes de anexina V-FITC por FACs	18
3.15	PCR.....	18
3.16	Oligonucleotídeos Iniciadores	19
3.17	Sequenciamento de DNA.....	19
3.18	Seleção de mutantes de <i>L. (L.) amazonensis</i> resistentes a miltefosina.....	19
3.19	Extração de RNA de <i>Leishmania</i>	20
3.20	cDNA.....	21
3.21	RT-qPCR.....	21
3.22	Ensaio de tomada de fosfolipídio fluorescente – NBD	21
3.23	Ensaio de efluxo de fosfolipídios fluorescentes – NBD	22
3.24	Ensaio de viabilidade utilizando Alamar Blue.....	22
3.25	Ensaio de competição entre lipossomas e <i>L. (L.) amazonensis</i>	23
4.	Resultados.....	24
4.1	Identificação de translocador de fosfolipídio em <i>L. (L.) amazonensis</i> .	24
4.1.1	Superexpressor ligante à anexina V-FITC.....	24
4.1.2	Caracterização do DNA contido nos clones superexpressores de ligante à anexina V-FITC... ..	29
4.1.3	Análise de perfil de tomada de NBD-lipídios	30
4.1.4	Análise de efluxo de NBD-lipídios	31
4.1.5	Identificação do gene	32
4.1.6	Seleção dos genes alvos.....	33
4.1.7	Ligação de fragmento gênico <i>pi4k</i> em vetor de expressão em <i>Leishmania</i> pSNBR.....	35

4.1.8	Ensaios de RT-qPCR	37
4.2	Caracterização do mutante superexpressor <i>pi4k</i>	41
4.2.1	Ligação à anexina V-FITC	41
4.2.2	Análise de Infectividade	42
4.2.3	Efeito de antibióticos que atuam sobre os fosfolípidios presentes na membrana de <i>L. amazonensis</i>	43
4.3	Seleção de mutantes de <i>L. (L.) amazonensis</i> resistentes à miltefosina	46
4.3.1	Seleção de clones resistentes à miltefosina	47
4.3.2	Curva de crescimento dos parasitas	48
4.3.3	Análise de Infectividade	51
4.3.4	Análise de perfil de tomada de NBD-lipídios marcados dos mutantes resistentes a miltefosina	53
4.3.4.1	Padronização do ensaio de competição entre fosfolípidios marcados (NBD) e não marcados	54
4.3.4.2	Análise de perfil de tomada de NBD-lipídios marcados e não marcados dos mutantes resistentes a miltefosina	56
4.3.5	Perfil de sensibilidade aos antibióticos dos mutantes resistentes a miltefosina	59
4.4	Caracterização de <i>L. (L.) amazonensis</i> purificada de macrófago RAW	60
4.4.1	Ligação à anexina V	60
4.4.2	Análise de infectividade	61
4.4.3	Ensaio de tomada de NBD-lipídios	62
4.4.4	Ensaio de sensibilidade aos antibióticos	63
4.5	Identificação do fosfolípido envolvido no reconhecimento do macrófago para a fagocitose do parasita	64
4.5.1	Testes de viabilidade celular de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> e macrófagos tratados com lipossomas	69

4.6 Superexpressão dos genes candidatos	72
4.6.1 Gene <i>abcc8l</i>	72
4.6.2 Gene <i>gtp</i>	73
4.6.3 Análise de expressão por qPCR	74
5. Discussão	78
5.1 Estratégia experimental.....	78
5.2 Infectividade e ligação à anexina V	82
5.3 Ensaio de tomada de fosfolipídios e NBD-lipídeos	84
5.4 Ensaio de sensibilidade aos antibióticos	86
5.5 Identificação do fosfolipídio externalizado pela <i>Leishmania</i> e reconhecido pelo macrófago para realizar a fagocitose.....	88
6. Conclusões	90
7. Referências Bibliográficas	91

1. Introdução

1.1 *Leishmania (L.) amazonensis*

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitas obrigatórios e caracterizam-se por apresentar duas formas morfológicas distintas em dois diferentes hospedeiros em seu ciclo de vida: formas promastigotas que residem e multiplicam-se no hospedeiro invertebrado, e formas amastigotas que residem e multiplicam-se no hospedeiro vertebrado^{1; 2}.

A forma promastigota apresenta formato fusiforme, com o flagelo aparente e dependendo de sua localização no hospedeiro invertebrado, pode ser denominada como forma procíclica ou metacíclica. A forma promastigota procíclica encontra-se aderida no trato digestório do hospedeiro invertebrado, apresenta elevada taxa de multiplicação por divisão binária e é a forma menos infectiva. Após a migração para as glândulas salivares do hospedeiro invertebrado, as formas procíclicas diferenciam-se em formas metacíclicas, com menor capacidade de divisão e mais infectivas³.

O ciclo de vida de *Leishmania* (Figura 1) inicia-se com a picada do inseto flebotomíneo e durante o repasto sanguíneo, formas promastigotas metacíclicas são inoculadas no hospedeiro vertebrado e fagocitadas pelo macrófago. No interior dos macrófagos, as formas promastigotas diferenciam-se em formas amastigotas. Neste ambiente ocorre a proliferação das formas amastigotas dentro do fagolisossomo do macrófago, que é a fusão das organelas lisossomo e fagossomo⁴.

Com o estabelecimento da infecção, o parasita apresenta diversas replicações no interior no macrófago, que leva ao rompimento da membrana do macrófago, e as formas amastigotas livres podem ser novamente fagocitadas por outros macrófagos⁵. Durante o repasto sanguíneo por um novo inseto flebotomíneo, este pode ingerir macrófagos infectados, e as formas amastigotas são liberadas e logo diferenciam-se em formas promastigotas dando continuidade ao ciclo.

Adaptado de ⁶.

Figura 1- Ciclo de vida dos parasitas do gênero *Leishmania*. O homem representa o hospedeiro acidental, e o canídeo o hospedeiro reservatório.

A fusão do lisossomo com o fagossomo leva ao aumento no metabolismo oxidativo do macrófago, quando há a produção de ânions superóxidos (H_2O_2) e óxido nítrico (NO), que são reconhecidos como eficientes microbicidas e agem contra a infecção estabelecida por *Leishmania*^{7:8}. Porém, mesmo com o mecanismo microbicida do hospedeiro vertebrado, o parasita pode deslocar a resposta inflamatória do hospedeiro de Th1 para Th2, mecanismo esse que acarreta na inibição do chamado *burst* oxidativo do macrófago, e assim levando ao estabelecimento da infecção⁹.

Em seu ciclo natural, observamos a infecção desses parasitas em diversos hospedeiros vertebrados, principalmente roedores e marsupiais, sendo que o principal hospedeiro invertebrado é o inseto flebotômico fêmea da espécie *Lutzomyia (Nyssomyia) flaviscutellata*¹⁰.

1.2 Tratamento

A Organização Mundial da Saúde (OMS) é a organização responsável por estabelecer diretrizes para o controle e tratamento de doenças. O tratamento indicado pela OMS para o controle de leishmaniose no Brasil é o antimoniato de N-metilglucamina. No entanto, por apresentar efeitos adversos aos pacientes e também pela detecção de parasitas resistentes, outras alternativas vem sendo utilizadas, tais como pentamidina, anfotericina B e lipossomos contendo miltefosina (OMS 2010).

A miltefosina é um composto que possui estrutura análoga ao fosfolípido fosfatidilcolina (PC), e foi desenvolvida inicialmente para tratamento de câncer^{11;12}. Entretanto, sua utilização e eficácia no tratamento de leishmaniose vem sendo relatada¹³. É o único antibiótico que pode ser usado por via oral para o tratamento de leishmaniose, podendo causar a apoptose dessas células, porém o mecanismo de ação desse antibiótico não é muito bem compreendido^{14;15}.

O mecanismo de entrada de miltefosina nas células foi estudado e, por apresentar estrutura análoga à PC, essa molécula é translocada para dentro das células^{11;16}. Em parasitas de *L. (L.) donovani* resistentes a miltefosina observou-se redução no nível de ergosterol¹⁷.

Já o antibiótico anfotericina B, surgiu após a recorrente diminuição da eficácia dos antimoniais na década de 60. A anfotericina B é um antifúngico que se liga preferencialmente ao ergosterol presente na membrana da célula¹⁸.

Esse antibiótico age interferindo no metabolismo de esterol presente nas células de *Leishmania*, que estão ligadas à solubilidade da membrana do parasita e infectividade nas células do hospedeiro. No Brasil, esse antibiótico não é utilizado para o tratamento de leishmaniose cutânea, apenas visceral (OMS 2010).

1.3 Macrófago

O sistema imune dos mamíferos compreende células que realizam constante varredura de células invasoras ou células do próprio organismo, que apresentam características que podem comprometer a homeostase do mesmo, como por exemplo, células necróticas, que quando são danificadas, liberam todo o seu conteúdo intracelular e quando em contato com as células vizinhas

apresentam potencial tóxico e, nesse caso, há o desencadeamento da resposta inflamatória^{19;20}.

Outra forma de morte celular é denominada como apoptose, que é uma forma de morte celular programada (MCP). As células em processo apoptótico apresentam uma cascata de sinalização intracelular, que levam à clivagem de organelas, sendo posteriormente divididas em microvesículas. Quando o macrófago identifica as células em apoptose, detecta sinalizações na membrana e realiza a fagocitose sem desencadear uma resposta inflamatória, pois a célula não apresenta potencial infectivo e dentro do fagolisossomo do macrófago, é iniciado o processo de digestão desta célula^{21;22;23}.

1.4 Macrófago e *Leishmania*

A principal célula infectada por *Leishmania* é o macrófago. Por sua vez, os organismos do gênero *Leishmania*, possuem estratégias para o escape da resposta inflamatória do hospedeiro vertebrado⁹.

Na literatura, é proposto que quando em contato com o macrófago, a *Leishmania* apresente algumas moléculas que são responsáveis pela subversão da resposta imune do hospedeiro vertebrado. Alguns trabalhos demonstraram que a exposição do fosfolípido fosfatidilserina (PS) pelo parasita é reconhecida por um receptor específico que está presente na membrana dos macrófagos.

Porém, após a realização de extração total de lipídios presentes na membrana de *L. donovani*, não foi possível detectar a presença de PS²⁴ e assim, nesta tese, realizamos ensaios para elucidar qual fosfolípido é reconhecido pelo macrófago.

A forma mais comum de verificar a infectividade dos parasitas, na literatura, é a utilização da proteína anexina ligada ao fluorocromo FITC. Nos ensaios, normalmente são utilizados parasitas em fase estacionária, que possuem maior taxa infectiva, pois apresentam maior quantidade de parasitas na forma promastigota metacíclica^{3;25;26}.

Quando realizados ensaios com células em fase estacionária de cultura, observaram que as células ligavam em média 4% a mais na proteína anexina V-FITC em relação às células em fase logarítmica de crescimento, que é a fase menos infectiva, pois apresenta maior número de parasitas na forma promastigota procíclica²⁷.

A ligação com anexina V-FITC é um indicativo de que as células estão em processo apoptótico e, assim sendo, expondo mais para a face externa da bicamada lipídica da membrana plasmática, fosfolipídios que normalmente estariam internalizados e que possuem forte ligação com anexina V-FITC, sendo que também foi evidenciada a importância do cálcio presente nas células para a ligação com essa proteína²⁴.

Por esse motivo, há a hipótese de que a população de *Leishmania* em fase estacionária apresenta uma grande fração de células promastigotas metacíclicas em processo apoptótico e esse conjunto de fatores favorecem a subversão da resposta inflamatória do hospedeiro vertebrado²⁸.

Dentro dessa hipótese há duas linhas defendidas na literatura: Algumas células de *Leishmania* que são apresentadas para o macrófago estão em processo apoptótico e com isso toda a população presente no inóculo é fagocitada, sendo esse processo denominado como altruísta, pois a parte da população que não está em processo apoptótico realiza o estabelecimento da infecção²⁶.

Por outro lado, há também a hipótese de que os parasitas na verdade estão em um processo de mimetismo apoptótico, ou seja, algumas sinalizações apoptóticas são externalizadas pela *Leishmania* que são detectadas por receptores presentes na membrana do macrófago porém, não há uma completa sinalização em cascata dentro do parasita, com isso a *Leishmania* permanece viável, realiza o escape da resposta imune do hospedeiro e, posteriormente, o estabelecimento da infecção²⁹.

1.5 Apoptose

As células em apoptose são localizadas pelos macrófagos e então fagocitadas sem desencadear uma resposta inflamatória, este tipo de morte celular é um mecanismo utilizado por diversas espécies, para manter a homeostase do organismo³⁰.

No início da apoptose, as células apresentam um período de formação de vesículas, que são denominados como corpúsculos apoptóticos, ou seja, o conteúdo intracelular é comprimido até o surgimento de vesículas que serão desassociadas da célula, as células em apoptose apresentam o núcleo condensado e também fragmentado em pequenas partes^{31;32}.

Há também a fragmentação do DNA em tamanhos aproximados de 200 pb, o que não é observado em células viáveis. O complexo de Golgi, o retículo endoplasmático e a mitocôndria também apresentam fragmentação³¹, ocorrendo o início da ativação do complexo de caspases, que são as responsáveis por desencadear a liberação de proteínas pertencentes à família de proteases e, início do processo de clivagem dos componentes do citoesqueleto das células. O que contribui para o arredondamento e também retração da célula nos estágios iniciais da apoptose³².

Com o desequilíbrio do citoesqueleto da célula, a formação de vesículas é facilitada (precursoras dos corpúsculos apoptóticos). Neste estágio inicial da apoptose, as células perdem também a adesão com a matrix extracelular³³, os fatores de transcrição são clivados por caspases e os fatores de iniciação de tradução são consequentemente afetados³⁴.

1.6 Anexina V

A anexina V é uma proteína que foi purificada inicialmente de tecido retirado de fígado de galinha³⁵, quando conjugada ao fluorocromo FITC (Isotiocianato de fluoresceína), tornou-se uma ferramenta amplamente utilizada para investigação de células de câncer. Diversos trabalhos já foram publicados utilizando anexina V-FITC, demonstrando como se dá a ligação com células cancerosas em processo apoptótico^{36; 37}.

Sem outros experimentos que validassem a hipótese, publicações afirmavam que a anexina V-FITC se ligava especificamente à fosfatidilserina (PS) e, por consequência, células que apresentavam aumento na ligação à anexina V-FITC possuíam uma concentração elevada de PS na face externa da bicamada lipídica da membrana plasmática^{34;38}.

Postulando-se que a ligação de anexina V-FITC sinalizava a exposição de PS e, portanto, de apoptose, porém, quando essa proteína foi descrita, foi demonstrado que a anexina V se liga à fosfolipídios aniônicos de forma preferencial, mas apenas na presença de cálcio³⁵.

1.7 Fosfolipídios

Os fosfolipídios foram inicialmente descritos como moléculas que apresentavam apenas funções estruturais na célula, pois com seus dois pólos

opostos, um hidrofílico e outro hidrofóbico são moléculas que de acordo com a sua estrutura molecular formam naturalmente vesículas de membranas, podendo apresentar cargas negativas, positivas ou neutras³⁹.

Dependendo da carga do fosfolípido, ele pode ser localizado na face interna ou externa da bicamada lipídica da membrana, sendo que normalmente fosfolípidos de carga negativa e/ou dipolar (ex.: fosfatidilserina – PS e fosfatidiletanolamina – PE, respectivamente) são localizados na face interna da bicamada lipídica da membrana plasmática. Já fosfolípidos de carga positiva, como por exemplo, fosfatidilcolina (PC), localizam-se normalmente na face externa da bicamada lipídica da membrana⁴⁰.

PS foi durante muito tempo indicado como um sinalizador importante de células em apoptose, sendo que foi descrito um receptor de moléculas de PS em macrófagos, identificando células cancerosas que apresentavam uma elevada exposição de PS na face externa da bicamada lipídica da membrana plasmática⁴¹.

Já PC é descrito na literatura como o fosfolípido mais abundante nas células, e também é o precursor de outros fosfolípidos como PS e PE⁴⁰, sendo que também por ser muito utilizado pelos parasitas, possui a maior velocidade de internalização de fosfolípidos em *Leishmania*²⁷. Outra característica de PC é que dependendo da sua concentração nas células, pode evitar o desencadeamento do processo apoptótico⁴².

Outra característica importante é que os fosfolípidos apresentam movimentos entre as duas faces da bicamada lipídica da membrana plasmática. Esses movimentos são catalisados por enzimas denominadas como flipases, flopases ou escramblases. A flipase e flopase promovem uma translocação unidirecional dos fosfolípidos da face externa da bicamada lipídica da membrana plasmática para a interna ou da face interna para a externa, respectivamente, sendo os dois movimentos ATP dependentes⁴³.

As proteínas que participam do movimento de flipase podem ser classificadas como translocases de aminofosfolípidos (APLT), enzimas que pertencem à família de ATPases do tipo P⁴⁴. As proteínas da família ABC (*ATP – binding cassette*) estão associadas com as enzimas do tipo flopase^{45;46}. Em *Leishmania*, existe um membro dessa família que foi apontado como envolvido no tráfego de fosfolípidos⁴⁷.

Por sua vez, a escramblase catalisa a translocação dos fosfolipídios de forma bidirecional, sendo cálcio dependente. Estudos anteriores demonstraram que esse tipo de enzima possui um importante papel na exposição de PS em células em apoptose^{43;48}.

Na figura 2, apresentamos o esquema gráfico das três formas principais de translocação de fosfolipídeos:

Adaptado de ⁴⁹

Figura 2- Translocação de fosfolipídios catalisados pelo movimento de flipase, flopase e escramblase. Os fosfolipídios apresentam na sua estrutura uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica, formando assim uma bicamada lipídica. Os fosfolipídios podem ser translocados entre as faces interna e externa da bicamada lipídica da membrana por movimentos catalisados por flipase, flopase e/ou escramblase.

1.8 Anexina V-FITC, *Leishmania* e fosfolipídios

Como informado anteriormente, amastigotas de *L. (L.) amazonensis* possuem ligantes à proteína anexina V-FITC⁵⁰, e na literatura foi apresentado também que quando as células eram previamente tratadas com anexina V-FITC, a infectividade de *Leishmania* era reduzida em mais de 50%, demonstrando ser o ligante de anexina V-FITC, uma importante molécula de reconhecimento por parte do macrófago. Os autores propuseram que esse seria um mecanismo de mimetismo de células em apoptose que *Leishmania* utilizaria para poder invadir os macrófagos sem ativá-los⁵⁰.

Também foi demonstrado que parte da população de uma cultura de promastigotas de *L. (L.) major* expunha ligantes à anexina V-FITC na face externa da membrana quando a cultura entrava em fase estacionária, e que a porção da população que expunha ligantes à anexina V-FITC consistia de células

com características apoptóticas, tais como a fragmentação do DNA nuclear e redução da mitocôndria³.

Em estudos recentes, demonstramos em nosso laboratório como se dá a cinética de tomada de serina por promastigotas e por amastigotas⁵¹. Esses estudos indicam que serina é essencial para o parasita, e que, portanto, deve estar disponível no meio do hospedeiro, ou seja, no intestino do inseto, ou no fagolisossomo no macrófago.

Também mostramos que há no parasita uma fosfatidil serina sintase II (PSS II), enzima que catalisa a troca de etanolamina por serina na fosfatidiletanolamina (PE) produzindo fosfatidilserina (PS). O nocaute nulo para essa enzima se mostrou inviável, indicando que a proteína é essencial ao parasita (dos Santos et al., dados não publicados). Vale salientar que a PSS II também catalisa a troca de PS para PE⁵².

Em colaboração com o grupo do Prof. Thomas Günther Pomorski, da Universidade de Copenhagen, Dinamarca, utilizando metodologias como cromatografia em camada delgada (TLC), espectrometria de massa e ressonância nuclear magnética (NMR), e o fosfolípido PS não foi detectado em extrato total de lipídios de *L. donovani*.

Porém, fosfolípidios como o ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol e fosfatidilinositol foram detectados e podem ser as moléculas responsáveis pela ligação à anexina V-FITC²⁴. Ainda nessa colaboração estamos realizando a extração de lipídios totais de outras espécies de *Leishmania*, e os resultados preliminares, indicam que PS não é encontrado em nenhuma espécie de *Leishmania*.

Levando em consideração que há o reconhecimento de um fosfolípido na superfície externa de células em apoptose, e que este é um dos sinais reconhecidos pela desativação da resposta inflamatória dos fagócitos o objetivo nessa tese foi de identificar tanto o fosfolípido como seu translocador em *L. (L.) amazonensis*.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Propomos para esta tese, a identificação de genes que codificam um translocador de fosfolipídio na membrana plasmática de *L. (L.) amazonensis*. Assim como caracterizar o papel fisiológico desse translocador na exposição do parasita durante a fagocitose no macrófago, e identificar o fosfolipídio envolvido nesse processo.

2.2 Objetivos específicos

- Obter mutantes que exponham fosfolipídios ligantes de anexina V-FITC na face externa da membrana plasmática de *L. (L.) amazonensis*;
- Determinar as sequências de DNA presentes nesses mutantes;
- Subclonar o gene candidato em vetor de expressão em *Leishmania*, transfectar em *L. (L.) amazonensis*, superexpressar o gene através de passagens sucessivas e assim confirmar a atividade de translocação;
- Caracterizar as atividades de translocação dos mutantes em diferentes condições;
- Identificar o fosfolipídio presente na membrana do parasita envolvido no reconhecimento deste pelo macrófago.

3. Materiais e métodos

3.1 Organismos

3.1.1 Parasitas

Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* – MHOM/BR/73/M2269 foram cultivadas em meio M199 (Gibco-BRL), acrescido de 10% de soro fetal bovino (para 1L – 0.33g NaHCO₃; 40 mL HEPES 1M; 1 mL PEN/ESTREPTO 1 mg/L; 100 µL Adenina 1M; 200 µL Hemina 25 mg/mL), filtrados em membrana de 0.22 µm e mantidas em estufa B.O.D. a 25°C. O repique foi realizado semanalmente com a transferência de 1/10 do volume final da cultura inicial para 10 mL de meio novo. Quando utilizadas células transfectadas com vetor de expressão em *Leishmania*, adicionou-se o antibiótico higromicina (20 µg/mL) para os vetores cLHYG e pXHyg e neomicina (50 µg/mL) para o vetor pSNBR.

3.1.2 Macrófagos

A cultura de macrófagos RAW 264.7 ATCC® foi mantida em estufa a 37°C com 5% CO₂ em 10 mL de meio RPMI 1640 (com 25 mM de Hepes e L-glutamina) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2,3 g/L de bicarbonato de sódio. As células foram repicadas a cada quatro dias.

3.1.3 Bactérias e vetores

A cepa de bactéria utilizada foi *Escherichia coli* SURE™ (Stratagene, La Jolla, Califórnia, EUA) e14⁻(mcrA⁻) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr) 171 endA1 gyrA96 thi-1 supE44 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan^r) uvrC[F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)] foi utilizada para as transformações. cultivadas em meio TB ou SOB a 37°C.

Os seguintes vetores foram utilizados para a construção dos plasmídeos recombinantes:

pGEM-T easy - clivado com *EcoRV* e tendo uma timina adicionada à extremidade 3', possuindo assim 3018 bases, o gene β -lactamase, o gene *lacZ*, a origem de replicação do fago f1 e os sítios múltiplos de clonagem.

cLHYG – Vetor *shuttle* de expressão tanto em *E. coli* como em *Leishmania* com tamanho de 12189 bases, possui marca de seleção de resistência aos antibióticos higromicina B e ampicilina, gentilmente cedido pelo Prof. Paulo C. Cotrim do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo⁵³.

pSNBR – Vetor *shuttle* de expressão tanto em *E. coli* como em *Leishmania* com tamanho de 6503 bases, possui marca de seleção de resistência aos antibióticos neomicina e ampicilina, gentilmente cedido pelo Prof. Paulo C. Cotrim do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo⁵⁴.

3.2 Biblioteca de cosmídeos de *L. (L.) amazonensis*

Os cosmídeos foram construídos no vetor cLHYG contendo inserto de DNA de *L. (L.) amazonensis* de cerca de 40 kb, gentilmente cedida pela Profa. Silvia Uliana, Departamento de Parasitologia ICB USP⁵⁵.

A metodologia básica utilizada no desenvolvimento deste projeto é aquela condensada em (Sambrook 1989), com modificações em técnicas específicas

3.3 Ligação Inserto-vetor

Inicialmente realizamos o isolamento do fragmento gênico alvo por meio de PCR. Após a amplificação do fragmento gênico, realizamos a ligação em vetor pGEM T-easy seguindo as instruções do fabricante. A ligação do fragmento gênico em vetor de expressão em *Leishmania* foi realizada utilizando o *kit* T4 DNA Ligase (Promega), seguindo as instruções do fabricante após nos certificarmos da identidade do fragmento gênico amplificado por meio de sequenciamento.

3.4 Preparo de bactéria termo competentes

Para obtenção de bactérias termo competentes, realizamos a estricagem de bactéria *E. coli* SURE em placa de meio de cultura SOB, que foi incubada *overnight* à 37°C. Realizamos o inóculo de uma colônia em 10 mL de meio de cultura SOB, que foi incubado à 37°C *overnight* em agitação constante de 15 xg. Ao inóculo inicial foi adicionado em 100 mL de meio de cultura SOB, que foi levado ao *shaker* para agitação constante de 15 xg, até atingir D.O. entre 0.4 e 0.6 (~595 nm).

A cultura contendo as bactérias foi dividida em tubos do tipo *falcon* de 50 mL e incubadas no gelo por 10 minutos. Após, a cultura foi centrifugada à 1600 xg durante 10 minutos à 4°C, desprezando o sobrenadante. As bactérias foram ressuspensas em 33 mL de FSB (10 mM acetato de potássio; 10% glicerol; 100 mM KCl; 45 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 10 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 3 mM HACoCl_3 ; pH 6,4) e incubadas em gelo por 10 minutos.

A ressuspensão foi centrifugada à 1600 xg por 10 minutos à 4°C, desprezando a seguir o sobrenadante. As células foram ressuspensas em 8 mL de FSB, adicionando 280 µL de DMSO, e incubadas logo a seguir em gelo, durante 5 minutos.

Após o tempo de incubação, adicionou-se mais 280 µL de DMSO, incubando por 10 minutos a suspensão. Após o tempo de incubação, a ressuspensão foi aliquoteada com volume de 200 µL para cada tubo do tipo *eppendorf*, utilizando banho de gelo seco-etanol para o congelamento das células. As alíquotas foram estocadas em -80°C.

3.5 Transformação de bactérias *E. coli* Sure

As bactérias *E. coli* SURE foram descongeladas em gelo e foi adicionado o DNA contendo a ligação entre o vetor e o fragmento gênico. O protocolo de transformação utilizado foi o de choque térmico a 42°C por 90 segundos e gelo por 2 minutos. Após este processo, foi adicionado 800 µL de meio de cultura SOB e as células foram incubadas à 37°C sem agitação durante 1 hora.

As células foram então plaqueadas em meio sólido de SOB com o antibiótico de seleção e as placas foram incubadas à 37°C *overnight*. Os clones foram selecionados e incubado em meio SOB líquido com o antibiótico de seleção para posterior extração de DNA.

3.6 Extração de DNA de plasmídeos/cosmídeos bacterianos em pequena escala (“Mini-Prep”)

Colônias de *E.coli*, transformadas com o plasmídeo ou cosmídeo de interesse foram previamente incubadas em 3 mL de meio SOB (triptona: 20 g/L; extrato de levedura: 5 g/L; NaCl: 0.5 g/L; KCl: 0,186 g/L; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 2.05 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 2,45g/L; pH 7,0), contendo ampicilina (100 mg/L) e mantidas em constante agitação *overnight*, a 37°C. As células foram coletadas por

centrifugação a 5.200 xg, a 4°C por 5 minutos e ressuspensas em 300 µL de solução P1 (100 µg/mL RNase, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0).

A seguir 300 µL de solução P2 (NaOH 0.2 M e 1% de SDS (dodecil sulfato de sódio)) foram acrescentados e misturados com as células por três inversões do tubo, seguidos de tratamento por 5 minutos a temperatura ambiente. Mais 300 µL de solução P3 (CH₃COOK a 3 M), foram adicionados e misturados por cinco inversões do tubo.

Após o tratamento, a preparação foi submetida à centrifugação a 5.200 xg, a 4°C por 15 minutos. A fase aquosa foi coletada e novamente centrifugada a 5.200 xg, a 4°C por 15 minutos. À fase aquosa adicionou-se 600 µL de isopropanol e o precipitado resultante foi coletado por centrifugação a 5.200 xg, a 4°C por 30 minutos e lavado com 3 volumes de etanol 70%. O precipitado foi então seco em temperatura ambiente e ressuspensão em 0.05 mL de solução TE (10 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA). Após a extração, foi realizada a quantificação de DNA e análise da pureza em equipamento Nanodrop ND-1000 (ThermoScientific).

3.7 Extração de DNA de plasmídeos/cosmídeos bacterianos em média escala (“Med-Prep”)

Colônias de *E. coli*, contendo o plasmídeo ou cosmídeo de interesse foram previamente incubadas em 10 mL de meio TB (triptona: 12 g/L; extrato de levedura: 24 g/L; glicerol: 4 mL/L; KH₂PO₄: 170 mM; K₂HPO₄: 720 mM; pH 7,0) contendo ampicilina (100 mg/L) e mantidas em agitação *overnight*, a 37°C.

Essa pré-cultura foi então incubada em novo 50 mL de meio TB contendo ampicilina (100 mg/l), e novamente mantida sob agitação a 37°C *overnight*. As células foram coletadas por centrifugação a 5.200 xg, a 4°C por 5 minutos e ressuspensas em 3 mL de solução P1. A seguir, 3 mL de solução P2 foram acrescentados e misturados com as células por três inversões do tubo, seguidos de tratamento por 5 minutos a temperatura ambiente.

Mais 3 mL de solução P3 foram adicionados e misturados por cinco inversões do tubo. Após o tratamento, a preparação foi incubada no gelo por 15 minutos e em seguida submetida à nova centrifugação.

A fase aquosa foi coletada e em seguida foi adicionado 6 mL de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 misturando-se 5 vezes por inversão do tubo,

uma nova centrifugação a 5.200 xg a 4°C por 10 minutos permitiu a separação de fases e a fase aquosa foi coletada e precipitada pela adição de 2/3 do volume da fase aquosa de isopropanol.

O precipitado foi coletado por centrifugação a 5.200 xg a 4°C por 30 minutos, lavado com 3 volumes de etanol 70%, centrifugado novamente a 5.200 xg a 4°C por 15 minutos. O precipitado foi então seco em temperatura ambiente e ressuspenso em 0.5 mL de solução TE. Após a extração foi realizada a quantificação e análise de pureza do DNA em equipamento Nanodrop ND-1000 (ThermoScientific).

Seguiu-se com o tratamento de RNase (10 mg/mL) por um período de 1 hora a temperatura de 37°C, após o que a extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico 25:24:1 (V/V/V) foi repetida. Após a separação das fases por centrifugação por 5 minutos a temperatura ambiente a 5.200 xg, a fase aquosa foi coletada e extraída com igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 (V/V). A fase aquosa foi colhida após nova centrifugação e precipitada pela adição de 0.1 volume de acetato de sódio a 3 M e 2/3 de volume de isopropanol. O precipitado foi colhido e lavado como descrito anteriormente e depois de seco, ressuspenso em 0.05 mL de TE.

3.8 Eletroforese em gel de agarose

Às amostras foram acrescidas de 1/10 de volume de tampão de amostra (0.25% azul de bromofenol; 0.25% xileno cianol FF; 15 % Ficoll – tipo 400, Pharmacia) e aplicadas em gel de agarose com concentração adequada ao tamanho do fragmento.

A eletroforese foi realizada em tampão TAE 1 X (40 mM Tris-acetato de 1 mM EDTA – e 2.5 µg/mL de brometo de etídio), onde foi aplicada uma diferença de potencial de 7.7 Volts/cm por tempo suficiente para que o corante azul de bromofenol migrasse 2/3 do comprimento do gel. A visualização foi feita através da incidência de luz ultravioleta em transiluminador, e as imagens foram registradas utilizando máquina fotográfica digital (Kodak, EasyShare C743).

3.9 Eletroporação de *L. (L.) amazonensis*

A cultura de formas promastigotas, em fase exponencial tardia foi centrifugada e lavada em PBS 1X (cloreto de sódio 150 mM e mono-

hidrogenofosfato dissódico 50 mM, pH 7,4). O número de células foi ajustado para uma concentração de 2×10^8 células/mL. A contagem foi realizada em contador Beckman-Coulter Z1.

As células foram lavadas em tampão *cytomix* (120 mM KCl; 0,15 mM CaCl_2 ; 10 mM K_2HPO_4 ; 25 mM Hepes; 2 mM EDTA e 5 mM MgCl_2 pH 7,6) e centrifugada a 1.600 xg por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram ressuspensas em volume de tampão necessário para a concentração final de 2×10^8 células/mL. Dessa cultura eram utilizados 500 μL da suspensão por ponto de eletroporação.

Para cada transfecção, foram adicionados de 2 a 10 μg de DNA de interesse, em uma cubeta de eletroporação de 4 mm de distância entre os eletrodos. A cubeta foi mantida em gelo por 10 minutos e então submetida a eletroporação a 1.500 V; 25 μF , com intervalo de 10 segundos entre os choques no aparelho Gene Pulser Xcell (Bio-Rad). Após a eletroporação, as células foram transferidas para frascos de cultura, contendo 10 mL de M199, sem adição de antibióticos. Após 24 horas, foi adicionado o antibiótico de seleção.

3.10 Placas de meio semissólido

Colônias de *Leishmania* foram obtidas por plaqueamento sendo que as placas de meio de cultura semissólido foram preparadas 24 horas antes do uso, com uma solução de ágar à 2% em água autoclavada fundida e acrescida de igual volume de meio M199 2 vezes concentrado. Após resfriamento parcial, sem, no entanto, endurecer o ágar, adicionou-se 20 $\mu\text{g/mL}$ do antibiótico apropriado e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB).

No fluxo laminar para evitar contaminação, foram aplicados 20 mL da mistura em cada placa de Petri. Após gelificar o ágar, as placas foram mantidas com a tampa para baixo, para evitar condensação na tampa. Após 24 horas do preparo da placa, as alíquotas da cultura de célula foram centrifugadas a 1.600 xg por 10 minutos. As células foram gentilmente ressuspensas em 500 μL de meio M199, e 100 μL foram aplicados por placa, espalhando cuidadosamente com a alça descartável.

A placa foi fechada e envolta, ainda no fluxo com *parafilm*, para evitar contaminação, e mantidas na estufa B.O.D. a 25°C. Cerca de duas a três semanas após o plaqueamento, as colônias correspondentes a cada clone foram

observadas em microscópio invertido e transferidas para frascos de cultura em meio líquido M199, com antibiótico na mesma concentração.

3.11 Ensaio de sensibilidade a antibióticos

O ensaio de sensibilidade a drogas foi realizado em placa de 96 poços, utilizando 1×10^5 células em 100 μL de meio de cultura M199 para cada poço e antibióticos em diferentes concentrações, que foram previamente diluídas em meio 199 - duramicina: 0 a 40 μM , miltefosina: 0 a 14 μM e anfotericina B: 0 a 0.07 μM .

As placas foram mantidas à temperatura de 25°C por 3 ou 7 dias. Após o período de incubação, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e contadas em citômetro de fluxo (BD FACSCalibur™) com contagem de 10 μL de cada poço. As análises foram realizadas em software GraphPad Prism 6.

3.12 Fracionamento de populações de *Leishmania* por Sorter

O fracionamento de populações por Sorter foi utilizado para separar população anexina V-FITC positivas e anexina V- FITC negativas. O processo de *sorting* foi o realizado no aparelho Sorter (BD FACs Aria II) do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein.

3.13 Extração do DNA do cosmídeo contido na *Leishmania*

Aproximadamente 3×10^8 promastigotas em fase exponencial tardia de crescimento foram coletadas por centrifugação a 2.000 xg por 10 minutos e lavadas com PBS 1X. A suspensão foi transferida para microcubo do tipo *ependorf* e centrifugada por 10 minutos a 1.000 xg à temperatura ambiente.

As células foram ressuspensas 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%) por inversão gentil até ressuspensão completa. Seguido de incubação por 5 minutos à temperatura ambiente. À amostra foi adicionado 150 μL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1 V/V/V), homogeneizado gentilmente e incubado por 5 minutos.

Após centrifugação a 12.000 xg, a 4°C por 5 minutos a fase aquosa foi então coletada. A seguir foi adicionado à fase aquosa, 300 μL de etanol absoluto, homogeneizando-se a mistura por 15 segundos, e mantendo por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o precipitado foi coletado por centrifugação

a 12.000 xg, a 4°C por 10 minutos, lavado com 1 mL de etanol 70% gelado, e centrifugado novamente. O precipitado foi seco a temperatura ambiente e ressuspenso em 100 µL de água.

O DNA obtido foi analisado por digestão com enzima de restrição apropriada em tampão de reação fornecido pelo fabricante (Fermentas) para volumes finais de 10 µL a 100 µL de reação. A digestão foi feita por 1 a 16 horas à temperatura de 37°C.

3.14 Análise da exposição de ligantes de anexina V-FITC por FACs

A análise da exposição de ligantes à anexina V-FITC pelas células foi realizada em aparelho de FACs (BD FACSCalibur™) após tratamento com anexina V-FITC ligada a FITC, e iodeto de propídio (PI), determinando-se a porcentagem de células íntegras (não coradas por PI) às quais a anexina V-FITC se ligou, como descrito anteriormente⁵⁰. Aproximadamente 1×10^7 células foram ressuspensas em 1 mL de tampão de ligação de anexina V-FITC (10 mM Hepes pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM $MgCl_2$ e 1,8 mM $CaCl_2$, filtrado e mantido a 4°C), e a 100 µL dessa suspensão foi adicionado anexina V conjugada a FITC (BD Pharmingen™) seguido por incubação a 25°C por 20 minutos no escuro.

Em seguida foi adicionado PI para uma concentração final de 10 µg/mL e as células foram analisadas em aparelho de FACs (BD FACSCalibur™). Para a análise dos dados, foi utilizado o software “FlowJo”.

3.15 PCR

As reações foram realizadas em um volume final de 20 a 50 µL utilizando-se 2 unidades de *Taq* DNA polimerase (Qiagen), com tampão fornecido pelo fabricante, 2 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de dNTPs e 0.2 µM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores. A cada reação foram adicionados 50 ng de DNA genômico do organismo de interesse. As reações eram iniciadas com desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguindo-se então por 40 ciclos térmicos compreendidos por etapas de desnaturação (1 minuto a 94°C), associação (1 minuto na temperatura adequada aos iniciadores) e extensão (1 minuto para cada 1 kb do amplicon, a 72°C). Após os ciclos, seguia-se uma incubação de 10 minutos a 72°C.

3.16 Oligonucleotídeos Iniciadores

Os oligonucleotídeos utilizados estão representados na tabela 1:

Tabela 1- oligonucleotídeos utilizados para realização de PCR ou sequenciamento.

Iniciador	Sequência	extensão (seg.)	Temp. teórica (°C)
cLHYG F	5'-GATGTTGATGTCGCCACCG-3'	30	59,5°C
cLHYG F2	5'-ATCACGGATCTCTGACACAC-3'		58,4°C
cLHYG R	5'-CCGCATAATACGACTCACT-3'		55,0°C
T7	5'-ATTATGCTGAGTGATATCCC-3'	30	54,3°C
SP6	5'-AAGATATCACAGTGGATTTA-3'		50,2°C
GTP F	5' GTACCATCGAATTCATGAAGTGGTGCAGCGTGC 3'	210	65,3
GTP R	5' GCACTATAGGATCCGATGGCAGTCACCAACG 3'		67,3
ABCc8 F	5' GAATTCATGGGAAAAGCACGTGTCATGTC 3'	420	68,2
ABCc8 R	5' AAGCTTTCAGAGGTATGACTCCAAGTCC 3'		67,4
PI4K F	5' GTACCATCGAATTCATGGGCGGCATACCCAACC 3'	120	61,6
PI4K R	5' GTCACAGGATCCCTAGAGAATCCCGTTCTGGAG 3'		61,2

3.17 Sequenciamento de DNA

As amostras de DNA obtidas através da extração de cosmídeo ou de plasmídeo foram sequenciadas, utilizando o *kit* de sequenciamento da A & B Technologies (1 µL da preparação de DNA 200-500 ng/µL, para cada 2 µL do oligonucleotídeo iniciador apropriado 3.2 µM; 2 µL de *Big Dye*; 6 µL de *Save Money* 200 mM Tris pH 8,0; 5 mM MgCl₂) e 9 µL de água. A reação de precipitação baseou-se: adição de 80 µL de isopropanol 75%, seguido de centrifugação a seguir a 20.000 xg, a 4°C por 20 minutos.

O precipitado foi lavado com 100 µL de etanol 70% e nova centrifugação. O sobrenadante foi descartado e precipitado seco foi enviado para o Centro de Sequenciamento do Instituto de Química USP.

3.18 Seleção de mutantes de *L. (L.) amazonensis* resistentes a miltefosina

Linhagens mutantes de *L. (L.) amazonensis* foram selecionadas após manutenção em meio M199 líquido suplementado contendo concentrações crescentes de miltefosina. A concentração inicial para selecionar os parasitas resistentes foi baseada no IC₅₀ desse antibiótico. A partir dessa concentração, estabeleceu-se que os mutantes deveriam atingir a concentração máxima de 10X o valor de IC₅₀.

À partir dessas culturas, clones foram isolados em plas de meio M199 semisólido, conforme descrito no item 3.10. Após a seleção, os clones foram caracterizados.

3.19 Extração de RNA de *Leishmania*

Uma suspensão com 1×10^8 de células em fase estacionária foi centrifugada a 3.000 xg, 4°C por 15 minutos. As células foram lavadas com PBS e foi adicionado 750 µL de Trizol (Invitrogen) e 250 µL de PBS. As células foram incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente. Após o período de incubação, foi adicionado 200 µL de clorofórmio gelado, homogenizado gentilmente e incubado por mais 10 minutos a temperatura ambiente.

A mistura foi então centrifugada a 12.000 xg, 4°C por 15 minutos e a fase aquosa foi recuperada. O RNA foi precipitado com adição de 500 µL de isopropanol gelado e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. Após o período de incubação, a solução foi centrifugada a 12.000 xg, 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 75% gelado. O *pellet* foi ressuspensão em 10 µL de H₂O, mantendo as amostras no gelo.

As amostras foram quantificadas em Nanodrop ND-1000 (ThermoScientific) e então foi realizado o tratamento com DNase, utilizando 1 unidade de DNase para cada 1 µg de RNA, segundo as instruções do fabricante. Após o tratamento com DNase, uma segunda fase de tratamento com clorofórmio foi realizada. 1 volume de clorofórmio gelado foi adicionado ao RNA e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente.

Em seguida foi centrifugado a 12.000 xg, 4°C por 15 minutos. A fase aquosa foi coletada, transferida para um novo tubo eppendorf, adicionado 200 µL de isopropanol gelado e 20 µL de acetato de amônio 5 M e incubado por 1 hora a -20°C. A mistura foi centrifugada a 12.000 xg, a 4°C por 30 minutos, desprezando o sobrenadante em seguida. O *pellet* foi ressuspensão em H₂O e quantificado em Nanodrop ND-1000 (ThermoScientific). A amostra foi armazenada à -80°C até o momento da preparação de cDNA.

3.20 cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA obtido como descrito no item 3.19. Para a reação, utilizamos as orientações do fabricante. Resumidamente foi utilizado 2 µg de RNA; 400 U de enzima transcriptase reversa; 2 mM de *random primers*; 40 mM de dNTPs. As amostras foram armazenadas à -20°C.

3.21 RT-qPCR

Para a realização do RT-qPCR, foi utilizado o kit LuminoCt® SYBR® Green qPCR ReadyMix™ com 375 µM de oligonucleotídeos iniciadores e 5 µL do produto de cDNA diluído 500 vezes. A reação foi realizada no aparelho PikoReal™ Real-Time PCR System, com ciclo inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por 30 segundos adquirindo fluorescência no final do tempo de extensão. A dissociação ocorria após os 40 ciclos e vai da temperatura de 60°C até 95°C, com aquisição de fluorescência de até 0.5°C. As amostras foram analisadas no PikoReal Software 2.1, e como normalizador, utilizamos o gene *gapdh*.

3.22 Ensaio de tomada de fosfolipídio fluorescente – NBD

Para o preparo de lipídios, alíquotas de 2,5 µL (2 mM em Metanol:Clorofórmio CH₃OH/CHCl₃) de NBD-lipídio de fosfatidilcolina (NBD-PC), fosfatidiletanolamina (NBD-PE), fosfatidilserina (NBD-PS) ou esfingomielina (NBD-SM) foram acondicionados em tubos de vidro e secos com nitrogênio gasoso. O conteúdo foi diluído em 100 µL de meio HPMI (132 mM NaCl; 3.5 mM KCl; 2 mM MgCl₂ * 2H₂O; 25 mM Glucose; 20 mM HEPES, pH 7,4).

Foram adicionados 1 x 10⁷ parasitas em fase mid-log ou estacionária de crescimento, previamente lavadas duas vezes com meio HPMI e centrifugadas a 1.000 xg por 10 minutos. Após a lavagem, foi adicionado a cada amostra 1 µL de OBAA (4-(4-octadecylphenyl) -4-oxobutenoic acid – TOCRIS bioscience Cat No 0606) 5 µM e 5 µL de PMSF -Phenylmethylsulfonyl fluoride 1 mM) e incubado à temperatura ambiente por 15 minutos.

Após o período de incubação, foi adicionado 900 µL das células previamente tratadas em cada tubo de vidro contendo os 100 µL da suspensão NBD-lipídio e incubado a temperatura ambiente. Após 3 minutos (tempo 0) e com intervalos de dez minutos, 200 µL da suspensão contendo os parasitas e os

fosfolipídios marcados foram transferidos para tubo tipo *ependorf* contendo 20 μ L de BSA 20% (Bovine Serum Albumin – Sigma, Cat No A6003) seguido de 5 minutos de incubação em gelo. A amostra foi então transferida para tubo de FACS contendo 2 μ L de iodeto de propídio (1 mg/mL). Foram realizadas análises em 0 minuto, 10 minutos, 20 minutos e 30 minutos.

As células foram analisadas em citometria de fluxo (BD FACSCalibur™) e os dados colhidos foram analisados com a utilização do programa Flow Jo_V10. Após a separação da população dos parasitas, utilizou-se a média geométrica do histograma do parâmetro de fluorescência apropriado. Foi calculada a média e desvio padrão dos resultados. Para a realização da análise de unidades arbitrárias por minutos, foi utilizado o programa Sigma Plot.

3.23 Ensaio de efluxo de fosfolipídios fluorescentes – NBD

O ensaio de efluxo foi realizado nas mesmas condições informadas no item 3.22, exceto que, após a marcação dos fosfolipídios, realizou-se duas vezes a lavagem de cada amostra com 1 mL de HPMI e 100 μ L BSA 20 % (200 mg/mL) a 4 °C 1.000 xg. A seguir, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio HPMI com 20 % (v/v) de BSA e incubado a temperatura ambiente. As células foram transferidas para tubo de FACS e foi adicionado 2 μ L de iodeto de propídio (1 mg/mL). A análise dos dados foi realizada conforme descrito no item 3.22.

3.24 Ensaio de viabilidade utilizando Alamar Blue

O ensaio de viabilidade de células foi realizado utilizando o reagente Alamar Blue (Thermo Fisher Scientific), seguindo as orientações do fabricante.

Antes de adicionar o reagente, as células foram incubadas em *chamber slide* de vidro a 34°C 5% CO₂ durante 4 horas. Após 4 horas de incubação foi adicionado 10% do volume total de Alamar Blue e/ou digitonina (0.1 mM) um reagente que nessa concentração, causa a morte celular, que foi utilizado como controle negativo.

A incubação se deu durante 2 horas a 34°C 5% CO₂. Após a incubação, as células foram transferidas da *chamber slide* para placas de 96 *wells*, contendo 100 μ L em cada poço. A placa foi analisada em Multi-Mode Microplate Reader (FlexStation 3 - molecular devices). Utilizamos o software GraphPad Prism para análise dos dados.

3.25 Ensaio de competição entre lipossomas e *L. (L.) amazonensis*

Os lipossomas compostos de fosfolipídios específicos foram obtidos em colaboração com a Profa. Iolanda Cuccovia do Instituto de Química da USP. Resumidamente, aos lipídios, na molaridade desejada em um tubo de ensaio de vidro, foram adicionados 0.5 mL de diclometano, e o solvente dos tubos foi evaporado com fluxo baixo de N₂, formando um filme lipídico no fundo do tubo.

O restante do solvente foi removido dos tubos sob vácuo durante uma hora. O conteúdo do tubo de ensaio foi ressuspensão em 700 µL de meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e agitado em vórtex durante 1 minuto, sendo levado a banho de ultrassom por alguns minutos, para que todo o conteúdo no tubo de ensaio fosse removido. A solução foi submetida a 11 ciclos de extrusão para obter o tamanho aproximado de 100 nm.

Os ensaios de infecção *in vitro* foram realizados com a linhagem RAW. Os macrófagos foram coletados por centrifugação (10 minutos a 1.500 xg), ressuspensos em RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e contados em câmara de Neubauer. Aproximadamente $2,5 \times 10^5$ macrófagos em 400 µl foram incubados a 37°C, em lâmina de vidro tipo *chamber slide*, por 4 e 24 horas. A infecção foi realizada com $6,25 \times 10^5$ promastigotas em fase estacionária de crescimento e as células foram incubadas em RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino.

Para os ensaios de infecção e competição de lipossomas, aproximadamente $6,25 \times 10^5$ promastigotas e concentrações variando de 2 µM a 12 mM de lipossomas em 100 µl foram misturados aos macrófagos pré-incubados prosseguindo-se a incubação a 37°C por 4 e 24 horas. Após cada período a lâmina correspondente foi lavada com PBS 1X e corada com coloração de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), utilizado para marcar diretamente o DNA nuclear.

A determinação de amastigotas por macrófago infectado e a porcentagem de macrófagos infectados foi realizada por contagem em microscópio de fluorescência. Ao microscópio foram escolhidos 4 campos, aleatoriamente, em cada poço da lâmina e contados, o número de amastigotas em 100 macrófagos infectados e a porcentagem de macrófagos infectados. Foram contados 800 macrófagos para cada condição, por experimento.

4. Resultados

4.1 Identificação de translocador de fosfolípido em *L. (L.) amazonensis*

4.1.1 Superexpressor ligante à anexina V-FITC

Com o objetivo de localizar o gene responsável pela exposição do fosfolípido que é reconhecido pelo macrófago, que está presente na face externa da bicamada lipídica da membrana plasmática de em infecções com *L. (L.) amazonensis*, utilizou-se a biblioteca genômica de *L. (L.) amazonensis* compreendendo aproximadamente 98% do DNA total clonada no vetor cLHYG⁵⁵.

As construções foram agrupadas em *pools* e denominadas de forma numérica. Cada *pool* foi então transfectado em *L. (L.) amazonensis*, organizando-se os cosmídeos em conjuntos que aqui denominamos: Cos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8, de acordo com a numeração das placas de origem.

De cada conjunto foi feito uma preparação de DNA em média escala denominada como *med-prep* de cosmídeo. Cada preparação de DNA foi então utilizada em experimento de transfecção por eletroporação, aplicando-se 5 µg de DNA para cada ponto de eletroporação, contendo 1×10^8 promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em fase log tardia de cultura. Como controle negativo foram utilizados 5 µg de DNA do vetor pXHyg, como grupo controle do antibiótico higromicina.

Após 24 horas da eletroporação, foi adicionado à cultura 10 µg/mL do antibiótico higromicina para selecionar positivamente apenas as células que receberam o cosmídeo na transfecção. Após uma semana, a concentração do antibiótico foi aumentada para 20 µg/mL, porém as construções contendo os cosmídeos dos conjuntos Cos 1, 2, 6 e 8 não sobreviveram.

As análises de ligação à anexina V-FITC foram realizadas em fase exponencial de crescimento (dias 3 e 4), pois o nosso objetivo foi verificar se haveria uma superexpressão dos mutantes transfectados para a ligação à anexina V-FITC, ou seja, a nossa hipótese foi que, ao utilizar transfectantes contendo DNA fracionado, facilitaria a localização do gene alvo, que daria o fenótipo de ligação à anexina V-FITC.

Após as análises, realizamos a extração do DNA do cosmídeo presente nos parasitas transfectados. O DNA extraído foi novamente transfectado por eletroporação, e após a seleção dos novos clones, analisamos os parasitas

transfectados em FACs, mas utilizamos apenas os parasitas que apresentavam o fenótipo de aumento de ligação à anexina V-FITC. Foram utilizados em todos os pontos 5 µg de DNA de cada *pool* de cosmídeos na eletroporação. O resultado da análise desse experimento, também foi realizada por três semanas consecutivas.

De acordo com a Tabela 2, verificamos que dentre os clones de Cos 3 houve variação nos valores médios de ligação à anexina V-FITC. E o grupo selvagem apresentou uma porcentagem menor de ligantes à anexina V-FITC (média de 0,5%).

Tabela 2 - Tabela com os dados referentes ao deslocamento das populações anexina V-FITC (+) e anexina V-FITC negativas (-) em análise por FACs durante 3 semanas após a transfecção. As amostras foram previamente tratadas com anexina V – FITC. Os números da coluna “conjunto” representam o conjunto de cosmídeos da biblioteca genômica de *L. (L.) amazonensis* correspondentes à cultura resultante na transfecção seguidas pelos controles pXHyg e *Leishmania* selvagem.

pXHyg e *Leishmania* selvagem.

Conjunto		Semana	% FITC +	% FITC -
Cos 3	A	1	1,71	96,8
		2	-	-
		3	1,83	97,0
	B	1	1,42	96,3
		2	0,86	98,7
		3	2,50	96,6
	C	1	1,43	96,2
		2	3,83	93,9
		3	2,12	97,4
	D	1	1,51	96,3
		2	-	-
		3	3,82	94,5
Cos 5 B		1	1,16	98,7
		2	0,64	99,0
		3	1,59	97,8
Cos 7 A		1	0,98	98,5
		2	-	-
		3	1,91	97,1
pXHyg		1	1,79	97,8
		2	0,35	99,3
		3	2,22	96,6
Selvagem		1	0,82	99,0
		2	0,14	99,8
		3	1,30	98,1

Todo o experimento foi novamente repetido utilizando-se DNA das amostras correspondentes aos conjuntos Cos 2, 3; 5; 6; 7 e 8, mas com diferentes concentrações de DNA do *pool* de cosmídeos em cada ponto da transfecção, pois o nosso objetivo foi verificar se com uma concentração reduzida de DNA, os grupos Cos 1, 2, 6 e 8 sobreviveriam, pois, nossa hipótese

foi de que, se haveria relação de uma grande concentração de DNA com a morte dos parasitas.

Novamente, as culturas transfectadas com o DNA dos grupos Cos 6 e 8 mostraram-se inviáveis. Decorridas 24 horas da eletroporação, adicionou-se 20 µg/mL do antibiótico higromicina aos grupos viáveis. Então, foram realizadas novas análises no FACs entre os dias 3 e 4 de cultura após cada repique.

Os valores encontrados nesses experimentos estão sintetizados na tabela 3. Podemos notar que a concentração inicial de DNA de 4 µg, produziu melhores resultados de população expondo o ligante à anexina V-FITC, então selecionamos para futuras análises, os mutantes resultantes das transfecções com concentração inicial de 4 e 5 µg.

Tabela 3 - Tabela referente aos dados de deslocamento das populações anexina V-FITC positivas (+) e anexina V-FITC negativas (-) em análise de FACs, em duas semanas após a transfecção. As amostras foram previamente tratadas com anexina V – FITC. Os números da coluna “conjunto” representam o conjunto de cosmídeos da biblioteca genômica de *L. (L.) amazonensis* correspondentes à cultura resultante na transfecção seguidas pelos controles pXHyg e *Leishmania* selvagem; os números que se seguem entre parênteses indicam a concentração de DNA utilizada em cada ponto da eletroporação.

Conjunto	Semana	% FITC +	% FITC -
Cos 2A (2µg)	1	1,17	98,5
	2	1,66	96,9
Cos 2 (4µg)	1	1,66	97,6
	2	1,30	97,8
Cos 2A (4µg)	1	1,63	97,2
	2	1,41	97,3
Cos 2B (4µg)	1	1,60	97,7
	2	1,44	97,4
Cos 3 (2µg)	1	1,46	97,8
	2	1,42	97,0
Cos 3A (2µg)	1	3,60	95,1
	2	0,95	99,0
Cos 3 (4µg)	1	2,71	95,7
	2	1,41	96,3
Cos 3A (4µg)	1	4,44	92,9
	2	1,45	94,1
Cos 5 (4µg)	1	1,50	98,0
	2	2,08	95,7
Cos 5A (4µg)	1	2,38	96,4
	2	2,10	95,6
Cos 7 (2µg)	1	2,51	96,2
	2	1,76	97,0
Cos 3A (2µg)	1	1,22	95,2
	2	7,23	87,0
Selvagem	1	1,30	98,1
	2	1,69	96,9
pXHyg	1	2,22	96,6
	2	0,96	98,6

A seguir escolhemos as culturas resultantes da transfecção com os conjuntos Cos 3C; Cos 3D; Cos 5B; Cos 7A; Cos 5A (4 µg), Cos 7 (2 µg); Cos 3A (4 µg), que apresentaram maior ligação à anexina V-FITC para realizarmos o fracionamento das células pelo processo de *Sorter* (BD FACSAria II) das populações ligante à anexina V-FITC positivas e negativas.

Devido à grande manipulação que ocorre durante o fracionamento, as amostras Cos 3D (5 µg); Cos 7A (5 µg); Cos 5A (4 µg), Cos 7A (4 µg), Cos 3A (4 µg) e pXHyg contaminaram. O experimento foi continuado apenas com as amostras Cos 3C (5 µg) e Cos 5B (5 µg). As amostras foram analisadas após 1 semana, para verificar o deslocamento entre as diferentes populações, e após a análise, as amostras foram plaqueadas em meio de cultura 199 semissólido contendo o antibiótico higromicina, para selecionar positivamente células que continham o cosmídeo e obtenção de clones, pois o nosso objetivo foi selecionar populações homogêneas.

Os valores encontrados nesses experimentos estão representados na tabela 4. Podemos notar que há uma diferença entre as populações ligantes à anexina V-FITC positivas e negativas provenientes do *sorter*, e uma diferença maior entre os diferentes conjuntos.

Tabela 4 -Tabela referente ao deslocamento das populações FITC positivas (+) e FITC negativas (-) ilustrando a caracterização das culturas durante o *sorting*. As amostras foram previamente tratadas com anexina V – FITC. A primeira coluna está dividida entre as populações FITC positivas e FITC negativas que foram fracionadas anteriormente.

População	Amostra	% FITC +	% FITC -
FITC positivas	Cos 3C	9,66	87,4
	Cos 5B	4,21	93,3
FITC negativas	Cos 3C	7,49	89,7
	Cos 5B	3,28	94,9
-	Selvagem	1,05	98,6

O plaqueamento foi realizado tanto com a população FITC positiva, quanto a população FITC negativa. Para cada placa foram semeados cerca de 1.000 promastigotas de cada cultura analisada. Após cerca de três semanas do plaqueamento, as colônias foram selecionadas e transferidas para meio líquido M199 acrescido do antibiótico higromicina.

Após o estabelecimento dessas culturas em meio líquido, por cerca de uma semana, foi realizada uma nova análise no FACS dos clones provenientes

do plaqueamento e comparada com o controle negativo *L. (L.) amazonensis* selvagem, descritos na tabela 5:

Tabela 5- Dados indicando o deslocamento de clones oriundos de populações FITC positivas (+) e FITC negativas (-) logo após o *sorting*. As amostras foram previamente tratadas com anexina V – FITC. A primeira coluna está dividida entre as populações FITC positivas e FITC negativas que foram fracionadas por *sorter* anteriormente.

Amostras	Clones	% FITC +	% FITC -
FITC positivas	Cos 3-1	2,91	88,7
	Cos 3-2	10,9	80,9
	Cos 3-3	10,4	82,6
	Cos 5-4	5,43	89,3
FITC negativas	Cos 3-5	10,8	81,6
	Cos 3-6	9,78	90,2

Existem clones com uma porcentagem de células com exposição de ligante à anexina V-FITC de cerca de 10% (Cos 3-2 e Cos 3-3), mas isso também foi observado em um clone originado da população anexina V-FITC negativa (Cos 3-5). Se levarmos em consideração que o fracionamento se dá numa distribuição normal, é possível que alguns parasitas da fração anexina V-FITC negativa estejam no *overlap* da fração positiva.

A partir do fracionamento por FACs *Sorter* de populações de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* transfectados com lotes da biblioteca genômica do mesmo organismo e que apresentavam: a) deslocamento anexina V-FITC positivo, e b) deslocamento anexina V-FITC negativo, foi feito o plaqueamento e os clones do grupo Cos 3 resultantes foram novamente analisados em FACs em relação à ligação com anexina V-FITC, em fase exponencial da cultura, denominados como Mutante 1, 2 e 3. Um resumo das características de fracionamento de ligação à anexina V-FITC:

Tabela 6- Mutantes superexpressos ligantes à anexina V – FITC.

Amostras	% ligação Anexina V-FITC
Selvagem	6.7 ($\pm$ 0.61)
Mutante 1 A	11.8 ($\pm$ 2.73)
Mutante 1 B	10.0 ($\pm$ 2.23)
Mutante 2	9.3 ($\pm$ 4.88)
Mutante 3	11.1 ($\pm$ 3.64)

De acordo com a tabela 6, os mutantes provenientes do fracionamento apresentam um perfil de superexpressão de ligação à anexina V-FITC em relação ao grupo selvagem.

4.1.2 Caracterização do DNA contido nos clones superexpressores de ligante à anexina V-FITC

Após as análises dos clones em FACs, foi realizada a extração de DNA para recuperar o cosmídeo presente na célula. Em seguida, esse DNA presente no cosmídeo foi utilizado na transformação de bactérias *E. coli* Sure, que foram submetidas à seleção em meio SOB contendo ampicilina. Como o cosmídeo é um vetor *shuttle*, esperou-se a seleção apenas das bactérias contendo o cosmídeo, que confere resistência a ampicilina, e que devia carregar o segmento do genoma de *Leishmania* responsável pelo fenótipo observado no FACs.

Após a extração do DNA dos cosmídeos contidos nessas bactérias, realizamos a caracterização com base no perfil de digestão do DNA, utilizando a enzima de restrição *Bam*HI e o material resultante foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0.7%, como apresentado na figura 3. O DNA de todos os mutantes apresentaram um padrão de fragmentos semelhantes, o que nos levou à hipótese de que o gene responsável pelo fenótipo de ligação à anexina V-FITC era comum aos clones.

Figura 3- Padrão de restrição de DNA de cosmídeo recuperado dos diferentes mutantes, cuja superexpressão leva a uma alteração no comportamento do parasita com relação à ligação de anexina V-FITC. M: fago lambda digerido com *Hind*III, sendo que nas canaletas em vermelho o DNA foi digerido com *Bam*HI, nas canaletas sem marcação, apresentamos os DNA não digerido dos mutantes 1, 2 e 3 obtidos do grupo Cos 3.

O DNA contido nos cosmídeos foi novamente utilizado para transfecção por eletroporação em *L. (L.) amazonensis* e em seguida foram analisadas as formas promastigotas transfectadas, para verificar como se dava a exposição do ligante à anexina V-FITC em fase exponencial de crescimento da cultura. Todos

os clones apresentaram um aumento ligação com anexina V-FITC (maior que 2%) em relação ao controle, na presença ou ausência de cálcio (Figura 4).

Figura 4- Ligação de promastigotas em fase exponencial de cultura tratados com anexina V-FITC e analisadas em citometria de fluxo (FACs). O grupo Cos 3 apresentou maior ligação à anexina V-FITC, comparado com o grupo selvagem, mesmo na ausência de cálcio. Os promastigotas selvagem e mutantes Cos 3 foram tratados com anexina V-FITC, por 20 minutos à 25°C. Após o tratamento, as células foram lavadas com tampão de anexina V sem cálcio (A, B e C) ou em tampão com tampão de anexina V com cálcio (D, E e F). A digitonina foi utilizada como controle positivo para a ligação com anexina V-FITC (C e F).

4.1.3 Análise de perfil de tomada de NBD-lipídios

Após analisar o perfil de ligação à anexina V-FITC do grupo Cos 3, realizamos a análise do perfil de tomada de lipídios marcados com a fluorescência NBD. O nosso objetivo foi de obter resultados de internalização de unidades de fluorescência, pois esse ensaio poderia nos dar indicativos para identificar um translocador putativo do tipo flipase ou escramblase, que catalisa a translocação do lipídio da face externa da bicamada lipídica da membrana plasmática para a face interna presente no cosmídeo do mutante⁵⁶.

Os ensaios foram realizados como descrito no item 3.22, com os seguintes lipídeos marcados com fluorescência, denominados como NBD-lipídios: fosfatidilcolina (NBD-PC), fosfatidilserina (NBD-PS), fosfatidiletanolamina (NBD-PE) e esfingomielina (NBD-SM). O fosfolipídio SM foi

utilizado como controle negativo, por se tratar de um fosfolipídio presente apenas em mamíferos.

De acordo com os dados demonstrados na figura 5, verificamos que o fosfolipídio mais presente nos parasitas em fase mid-log de crescimento foi o PC. Verificamos ainda que o mutante Cos 3 apresentou maior tomada de lipídio NBD-PC quando comparado ao parasita selvagem, o que confirmou nossa hipótese de que algum gene presente no mutante Cos 3 pode estar relacionado à superexpressão de um translocador de fosfolipídio. E ainda, esse gene poderia ser uma flipase com afinidade para PC ou ainda uma escramblase, que catalisa movimentos bidirecionais.

Figura 5 - Determinação da velocidade de tomada de lipídios marcados com NBD-PC, NBD-PS, NBD-PE e NBD-SM em *L. (L.) amazonensis* Selvagem e mutante Cos 3. A cinética de internalização de lipídios marcados com NBD-PC, NBD-PE, NBD-PS e NBD-SM em promastigotas em fase mid-log de crescimento foi analisada em citometria de fluxo (FACs) à 25°C com 3 experimentos independentes. As taxas de internalização foram calculadas com "single-exponential equation" (Software Sigma Plot). Em preto: Selvagem; branco: Cos 3. Sendo que * $p \leq 0.05$.

4.1.4 Análise de efluxo de NBD-lipídios

Após a realização do ensaio de tomada de fosfolipídios marcados, realizamos ensaios de efluxo de NBD-lipídios para verificar a externalização dos fosfolipídios e ainda determinar a presença de um translocador putativo do tipo flopase, que estaria relacionado a exposição para a face externa da membrana.

De acordo com a figura 6, verificamos que não houve diferença de efluxo NBD-PC e NBD-PS entre o parasita selvagem e o mutante Cos 3. Por outro lado, verificamos que em ensaios com NBD-PE houve uma diferença significativa de externalização, no tempo de 30 min, do mutante Cos 3 em relação ao controle selvagem, o que pode sugerir que o translocador ativo seja uma flopase.

Figura 6- Efluxo de NBD-lipídio por *Leishmania* selvagem e Cos 3. O efluxo de fosfolipídios marcados com NBD de fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilserina (PS) em promastigotas em fase mid-log de cultura foi analisado em citometria de fluxo (FACs) à temperatura de 25°C. As taxas de efluxo foram calculadas com média e desvio padrão de pelo menos dois experimentos independentes com NBD-PC e PE (figuras A e C respectivamente) e um de NBD-PS (B). Nos círculos: *L. (L.) amazonensis* Selvagem; Nos triângulos: *L. (L.) amazonensis* Cos 3. A análise foi realizada em software GraphPad Prism.

Como os dois ensaios de tomada e efluxo demonstraram atividades tanto de flipase quanto de flopase, pode ser que o gene presente no mutante Cos 3 esteja relacionado a uma escramblase.

4.1.5 Identificação do gene

Baseado nos dados de superexpressão da ligação à anexina V-FITC, de tomada e efluxo do mutante Cos 3 em relação ao parasita selvagem, iniciamos o processo para identificar o gene responsável pela translocação do fosfolipídio da face interna da bicamada lipídica da membrana plasmática para a externa.

Assim, foi realizado o sequenciamento do inserto presente no cosmídeo Cos 3, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores: cLHYGF, cLHYGR e cLHYGF2 (item 3.16), complementares às sequências do vetor que flanqueiam o sítio de clonagem dos fragmentos da biblioteca genômica, ou seja, realizamos o sequenciamento parcial da sequência presente no cosmídeo, sendo parte do início e parte do final.

Dessa forma, foram obtidas as sequências das extremidades 5' e 3' do inserto Cos 3. Com posse das sequências, realizamos um *blast* no site GeneDB (<http://www.genedb.org/Homepage/Lmexicana>) com dados de *Leishmania* (*L.*) *mexicana* (que apresenta maior proximidade filogenética com a espécie de *L.* (*L.*) *amazonensis*), uma vez que o genoma de *L.* (*L.*) *amazonensis* não está anotado.

Encontramos que tanto a extremidade 5' como a extremidade 3' apresentavam sequências que se alinhavam precisamente no cromossomo 33 de *L.* (*L.*) *mexicana*.

4.1.6 Seleção dos genes alvos

Uma vez determinada as sequências das extremidades do inserto cos 3 e sua localização no cromossomo 33 de *L.* (*L.*) *amazonensis*, realizamos uma análise *in silico* dos genes que poderiam estar relacionados à ligação a anexina V. Dentre os genes identificados, e nessa análise localizamos o gene phosphatidylinositol 4-kinase.

No item 4.6 dessa tese, apresentamos também resultados de dois genes candidados, porém, como não obtivemos sucesso na transfecção em *Leishmania*, não apresentamos o resultado em conjunto.

O gene *pi4k* codifica uma proteína que participa na regulação do recrutamento e da atividade de diversas proteínas sinalizadoras nas membranas celulares, e também regula diversos eventos de sinalização, como tráfego vesicular e transporte de lipídios⁵⁷. Esse gene ainda não está caracterizado em *Leishmania*. Assim, realizamos o protocolo de clonagem apenas desse gene no vetor pSNBR para superexpressão em *L.* (*L.*) *amazonensis* e análise de fenótipo.

A partir dos dados de sequências desse gene em *L.* (*L.*) *mexicana*, foi utilizada novamente a ferramenta *blast* para verificar se no *scaffold* de *L.* (*L.*) *amazonensis*⁵⁸, havia os CDs presentes em *L.* (*L.*) *mexicana*.

Dessa forma obtivemos a sequência de nucleotídeos, para os genes candidatos em *L. (L.) amazonensis*, a partir dos códons codificadores do N e do C terminal de cada proteína, apresentado na figura 7:

Figura 7- Imagem retirada do programa *BioEdit*. Amostras 7-12 alinhadas com a sequência localizada no cds de *L. (L.) amazonensis*. “A30100 Scaffold1463..34244”. Todas as amostras são provenientes do mutante denominado na tese como Cos 3.

Como já havíamos sequenciado a parte inicial e final desse DNA, e já havíamos escolhido o gene alvo, seguimos então com a amplificação dos fragmentos gênicos de *pi4k* por PCR.

Após a amplificação do fragmento gênico por PCR, esses foram purificados e ligados no vetor pGEM-T easy, vetor comercial que é utilizado para a ligação de produtos de PCR por possuir extremidade que se liga à cauda poli A presente no produto amplificado. E após a ligação do inserto em vetor,

realizamos a transformação de bactéria *E. coli* SURE com o plasmídeo contendo o fragmento de DNA.

O DNA presente nos plasmídeos recombinantes foi recuperado dos clones selecionados e confirmamos a sequência de cada fragmento clonado, e uma vez certificada a identidade correta do gene candidato, os DNAs foram clivados com a enzima de restrição *EcoRI* para purificação do fragmento e transferência para vetor de expressão em *Leishmania*.

Após a obtenção de ligação em pGEM-T easy do gene alvo *pi4k*, utilizamos o vetor *shuttle* pSNBR (por possuir sítio *polylinker* com enzimas de restrição comuns, e pelo tamanho, que facilitaria a ligação com o fragmento gênico) para a ligação dos fragmentos gênicos e posterior transfecção por eletroporação em *Leishmania*. Utilizamos como controle do mutante, *Leishmania* transfectada com o vetor de expressão pSNBR sem a ligação de fragmento gênico, para o controle do antibiótico neomicina.

4.1.7 Ligação de fragmento gênico *pi4k* em vetor de expressão em *Leishmania* pSNBR

Primeiramente, desenhamos oligonucleotídeos iniciadores *pi4k* F e *pi4k* R contendo a sequência das enzimas de restrição *EcoRI* e *Bam*HI, respectivamente, para clonagem em fase de leitura no vetor pSNBR, apresentado na figura 8:

Figura 8- Amplificação do fragmento gênico phosphatidylinositol 4-kinase (*pi4k*), para posterior clivagem utilizando enzima de restrição *EcoRI* e *Bam*HI. PCR utilizando como alvo DNA genômico de *L. (L.) amazonensis* com oligonucleotídeo iniciador *pi4k* F *EcoRI* e *pi4k* R *Bam*HI que amplificam o fragmento gênico phosphatidylinositol 4-kinase. Nas canaletas 1-4: amplificação do fragmento gênico alvo de aproximadamente 1.8 kb utilizando um gradiente de temperatura de 60-70°C. Na canaleta 5: Controle negativo: sem a presença de DNA; em M: padrão de tamanho de 1 kb.

Utilizando DNA total de *L. (L.) amazonensis* como molde para a PCR, realizamos uma análise de gradiente de amplificação (figura 8). A partir da amplificação específica do gene *pi4k*, realizamos o protocolo de clonagem no vetor pGEM-T easy para confirmação da sequência do gene.

Após a clonagem do vetor pGEM-T easy, os clones foram analisados por padrão de digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*. De acordo com a figura 9, verificamos que os 4 clones isolados apresentaram fragmentos representados pelo vetor pGEM-T easy (3015 pb) e o gene *pi4k* (1800 pb).

Figura 9- Confirmação da ligação inserto *pi4k* em vetor pGEM T-easy com a utilização de enzima de restrição *EcoRI* e *BamHI*. Foram utilizadas as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* para obtenção do inserto contendo as extremidades coesivas para *EcoRI* e *BamHI*. Na canaleta 1: Clivagem do vetor pSNBR com enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*, com fragmento esperado de 6.5 kb; nas canaletas 2-5: Clivagem de ligação *pi4k* e pGEM T-easy com enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*, com fragmentos esperados de 3 kb (pGEM T-easy) e 1.8 kb (*pi4k*); em M: padrão de tamanho de 1 kb.

Após a confirmação da digestão, selecionamos 3 clones que foram sequenciados para análise da sequência. Confirmada a sequência do gene *pi4k*, realizamos o protocolo de clonagem no vetor pSNBR. A clonagem foi realizada com digestão dos clones *pi4k* pGEM-T easy e do vetor pSNBR com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*, nas condições especificadas para digestão dupla. A confirmação da clonagem foi realizada através da digestão dos clones com as mesmas enzimas e liberação dos fragmentos de 1.6 kb e 200 pb do inserto e de 6.3 kb do vetor (figura 10).

Figura 10- Confirmação da ligação em fase entre o fragmento gênico *pi4k* e vetor de expressão em *Leishmania* (pSNBR). Os fragmentos de 6.3 kb, 1.6 kb e 0.2 kb presentes na canaleta 1 (nas caixas vermelhas), confirmam que o fragmento gênico está ligado em fase com o vetor e apto à transfecção por eletroporação em *Leishmania*.

Após confirmação da clonagem do gene *pi4k* no vetor pSNBR, a construção foi transfectada em *L. (L.) amazonensis*. Após 24 horas de cultura, foi adicionada 6 μ M do antibiótico neomicina para início da seleção e superexpressão.

Como controles, realizamos transfecção com o DNA do vetor sem inserto. A concentração do antibiótico foi dobrada a cada semana em um novo repique, até chegar à concentração de 50 μ M, e então as células foram plaqueadas em meio de cultura 199 semissólido para a isolamento de clones, que foi denominado nessa tese como *pi4k*-pSNBR.

4.1.8 Ensaios de RT-qPCR

Para caracterizar a expressão do gene *pi4k*, analisamos a expressão do gene por ensaios de RT-qPCR. Primeiramente, desenhamos oligonucleotídeos iniciadores que geraram produtos de cerca de 100 pb e verificamos a amplificação, que após ser realizado a purificação do fragmento contido no gel de agarose, apresentou a sequência esperada (figura 11):

Figura 11- PCR utilizando como alvo DNA genômico de *L. (L.) amazonensis* e os oligonucleotídeos iniciadores que amplificam os fragmentos gênicos dos genes *pi4k* com tamanho esperado de aproximadamente 100 bp. Na canaleta 1, temos o produto para *pi4k*. A canaleta 2 corresponde ao controle negativo, sem DNA template; em M: padrão de tamanho de 50 bp.

Após a realização do PCR para a amplificação do fragmento gênico, realizamos então a ligação inserto-vetor em vetor pGEM-T easy, que em seguida foi utilizada para a transformação de bactérias termocompetentes. As colônias bacterianas foram obtidas em placa de meio de cultura SOB.

Após o crescimento das bactérias, procedemos a extração do DNA por *mini-prep*. O DNA foi clivado com enzima de restrição *EcoRI*, que liberou o fragmento clonado, apontado na figura 12 pela seta preta:

Figura 12- Clivagem com enzima de restrição *EcoRI* de DNA de plasmídeo recombinante de clones obtidos após a transformação de *E. coli* com pGEM-T easy ligado ao fragmento gênicos de *pi4k*. A amostra 8 apresentou o fragmento gênico esperado após a clivagem, de aproximadamente 100 bp. As amostras estão apresentadas em não digeridas (número ímpar) e digeridas (número par), respectivamente. M: Padrão de 100 bp, a seta preta aponta para o fragmento liberado.

O procedimento de quantificação necessita de uma curva padrão construída com valores de Ct obtidos de curvas com quantidade conhecida de moléculas. Assim, iniciamos a padronização dessas curvas. Primeiramente foi realizada a clivagem do DNA de cada clone por enzima de restrição *ScaI* das amostras, pois não há sítios de restrição dessa enzima nos fragmentos gênicos escolhidos, e também porque essa enzima possui apenas um sítio de restrição no vetor pGEM-T easy.

A linearização da molécula alvo resulta em uma reação com melhor eficiência do que quando o DNA possui estrutura circular, evitando que haja uma polimerização em círculo. Obtivemos, assim, um fragmento linear (figura 13), que foi utilizado para os ensaios de qPCR.

Figura 13- Clivagem com enzima de restrição *ScaI* de DNA do plasmídeo recombinante de clones obtidos após a transformação de *E. coli* com pGEM-T easy ligado ao fragmento gênico de *pi4k*. Em M: Padrão de 100 bp.

Após obter a confirmação em gel de agarose, a amostra clivada em *ScaI* foi purificada com Kit QIAquick® Gel Extraction Kit – Qiagen, seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram então quantificadas para certificar a concentração, e após foi realizado o sequenciamento para confirmação de identidade do fragmento gênico.

Após nos certificarmos com o sequenciamento de que o fragmento gênico isolado era correspondente ao gene *pi4k*, iniciamos a padronização em qPCR pela construção das curvas-padrão. Apresentamos a curvas-padrão na figura 14, com os dados de eficiência, que mostra que a diluição do alvo teste (curva-padrão) resultaram na curva esperada, e que os oligonucleotídeos geraram o

fragmento esperado na amplificação. As reações foram realizadas com diluições dos alvos foram realizadas de 10^1 a 10^7 moléculas.

Standard curves: *pi4k*

Efficiency (%): 99,3222397315099 R2:0,999403597979621 Slope: -0,299555758579145

y-intercept: 11,3168735720094

Equation: $y = -0,300 * x + 11,317$

Figura 14- Curvas-padrão do gene alvo *pi4k*.

Os ensaios de RT-qPCR foram realizados em paralelo com curvas padrão do gene *pi4k* para quantificação absoluta do transcrito em formas promastigotas selvagem, e transfectadas com a construção *pi4k*-pSNBR ou com o vetor pSNBR vazio em dia 3 (que corresponde à fase mid-log) e 7 (que corresponde à fase estacionária, com maior ligação à anexina V-FITC) de crescimento.

Assim como esperado, verificamos na figura 15 que houve maior quantidade do transcrito *pi4k* em células transfectadas com a construção *pi4k*-pSNBR em relação as células selvagens ou transfectadas com o vetor vazio.

Verificamos ainda, maior expressão na fase estacionária de crescimento em relação a fase mid-log de crescimento.

Figura 15- RT-qPCR de RNA transcrito do alvo *pi4k* normalizado pelo transcrito do gene *gapdh*. Nas colunas pretas: Dia 3 de cultura, e nas colunas cinzas: Dia 7 de cultura. As Amostras de cDNA foram utilizadas para a realização da PCR quantitativa. $p \leq 0.005$.

O resultado demonstra que a ligação do fragmento gênico no vetor de expressão em *Leishmania* apresentou o resultado esperado, ou seja, a superexpressão do número de cópias de RNA quando comparado ao parasita selvagem e também com o controle de transfecção / antibiótico neomicina.

Podemos observar também, que a quantidade de RNA presente no 7 dia de cultura apresentou aumento significativo no parasita superexpressor contendo o fragmento gênico *pi4k* quando comparado com o dia 3 de cultura.

Esse resultado reforça a nossa hipótese de que esse gene está ligado à sinalização pró apoptótica do parasita.

4.2 Caracterização do mutante superexpressor *pi4k*

4.2.1 Ligação à anexina V-FITC

Após análise da expressão do gene *pi4k*, realizamos ensaios de ligação à anexina V-FITC dos mutantes *pi4k*-pSNBR. Selecionamos as células nos eixos anexina V-FITC positivas e PI negativas, para obter apenas as populações com perfil apoptótico.

De acordo com a figura 16, verificamos que os mutantes *pi4k*-pSNBR apresentaram maior ligação à anexina V-FITC quando comparado ao grupos selvagem e com o vetor vazio.

Figura 16- Ligação de promastigotas em fase estacionária à anexina V-FITC das amostras selvagem, vetor pSNBR e *pi4k*-pSNBR. O gráfico representa as populações anexina V-FITC positivas e PI negativas. Os grupos selvagem (coluna preta), vetor pSNBR (coluna branca) e *pi4k*-pSNBR (coluna cinza) foram tratados com anexina V-FITC, por 20 minutos a 25°C. Após o tratamento, as células foram lavadas com tampão de anexina V-FITC contendo cálcio. Os ensaios foram realizados em FACs, e analisados em software GraphPad Prism. Sendo que * $p \leq 0.05$.

Na figura 16, os mutantes transfectados superexpressos *pi4k*, apresentaram ligação à anexina V-FITC 4 vezes maior quando comparado ao

parasita do grupo selvagem, e os parasitas transfectados com o vetor vazio (coluna cinza) apresentaram 2 vezes mais ligação à anexina V-FITC do que o grupo selvagem, porém não de forma significativa, como observado no grupo superexpressor.

4.2.2 Análise de Infectividade

A seguir, realizamos ensaios de infectividade em macrófagos da linhagem RAW na presença de parasitas de *L. (L.) amazonensis* dos grupos: selvagem, vetor pSNBR e *pi4k*-pSNBR. A nossa hipótese era de que o grupo superexpresso contendo o gene *pi4k* apresentaria aumento na infectividade, já que a literatura sugere que a população de parasitas que apresentam superexpressão na ligação à anexina V-FITC, possuem maior índice de infectividade.

Figura 17- Infecção de macrófago de linhagem RAW com promastigotas dos grupos selvagem, vetor pSNBR e *pi4k*-pSNBR em *chamber slide* de vidro. Os ensaios foram realizados em 4, 24 e 48 horas, lavados com PBS 1X estéril, corados com Giemsa e analisados em microscópio de luz comum para a determinação do número de média $\pm$ desvio padrão de amastigotas por macrófago infectado (A); macrófagos infectados por macrófagos totais (B) e em (C) apresentamos o índice de infectividade que corresponde à multiplicação do número de amastigotas por macrófago pelo resultado de macrófagos infectados. Na coluna preta: selvagem, branca: vetor pSNBR e cinza: *pi4k*. Sendo que * $p \leq 0.05$ e ** $p \leq 0.005$.

Os parasitas Selvagem, vetor pSNBR e *pi4k*-pSNBR, não apresentaram diferença significativa no número de amastigotas por macrófago infectado (figura 17 A), e diferente da nossa hipótese inicial, houve uma diminuição significativa da entrada do parasita no macrófago, quando comparamos os parasitas transfectados (vetor pSNBR e *pi4k*-pSNBR) com selvagem e por consequência diminuição no índice de infecção (figuras 17 B e C respectivamente).

4.2.3 Efeito de antibióticos que atuam sobre os fosfolípidios presentes na membrana de *L. amazonensis*

Nesse ensaio, realizamos a análise funcional dos parasitas mutantes para ser possível inferir sobre a distribuição fosfolipídica na membrana do parasita. Para tanto, foi determinado o valor de IC₅₀ que é a concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular, com miltefosina, duramicina e anfotericina B.

A miltefosina, por possuir estrutura análoga à PC poderia descrever sobre o perfil de internalização do fosfolípido PC. A anfotericina B, que possui ligação preferencial ao esterol externalizado na membrana da células poderia descrever sobre infectividade e multiplicação dos parasitas. Já a duramicina, que apresenta ligação preferencial à PE poderia descrever o perfil de distribuição do fosfolípido PE externalizado na membrana do parasita.

Primeiramente, foi analisado o perfil de sensibilidade dessas drogas frente ao parasita selvagem. De acordo com a figura 18, verificamos que o parasita selvagem apresenta maior sensibilidade à anfotericina B, seguido de duramicina e miltefosina, com valores de IC₅₀ de 0,028, 0,69 e 25 µM, respectivamente.

Figura 18– Ensaio de IC_{50} com promastigotas selvagem em fase estacionária de cultura, tratados com os antibióticos miltefosina, anfotericina B e duramicina. O gráfico apresenta as diferentes concentrações de miltefosina (traço contínuo), duramicina (traço intermitente) e anfotericina B (pontilhado). Os ensaios foram realizados em placas de cultura contendo 96 wells, com a adição de 2×10^3 promastigotas em fase estacionária de cultura, com volume final de 200 μ L por poço. Após 72 horas as células foram fixadas com 200 μ L de PBS 1x com adição de 1% de formol por poço. A alíquota de 10 μ L de suspensão por poço foi contada em equipamento FACs, sem utilização de fluorescência. As análises foram elaboradas em software GraphPad Prism.

Em seguida, realizamos testes funcionais com os mutantes Cos 3 e *pi4k*-pSNBR, com os respectivos controles. De acordo com a figura 19, não houve diferença de sensibilidade às drogas nos mutantes Cos 3 em relação aos controles selvagem e vetor cLHYG.

Figura 19– Ensaio de IC_{50} com promastigotas em fase estacionária de cultura, tratados com os antibióticos miltefosina e duramicina com células de *L. (L.) amazonensis* selvagem, Cos 3 e vetor cLHYG. O ensaio foi realizado em placas de 96 wells, com a adição de 1×10^5 células de *L. (L.) amazonensis*, com volume final de 200 μ L por poço. Após 48 horas, foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer com as células fixadas em PBS 1x com adição de 1% de formol. As análises foram elaboradas em software GraphPad Prism.

Similarmente, análises funcionais dos mutantes *pi4k*-pSNBR e os parasitas selvagem não apresentaram diferença de sensibilidade às drogas. Entretanto, os parasitas controle contendo apenas o vetor pSNBR apresentaram maior resistência a miltefosina, anfotericina B e duramicina (figura 20).

Esse resultado não era o esperado, porém, não há indícios de que houve contaminação entre *pi4k*-pSNBR e pSNBR, de acordo com os resultados de RT-qPCR apresentados.

Figura 20– Ensaio de IC₅₀ dos parasitas Selvagem, vetor pSNBR e *pi4k*-pSNBR tratados com os antibióticos anfotericina B, miltefosina e duramicina. O gráfico apresenta as diferentes concentrações dos antibióticos A: anfotericina b, B: miltefosina e C: duramicina, utilizados no ensaio com células de Selvagem (traço contínuo), vetor pSNBR (traço intermitente) e *pi4k*-pSNBR (pontilhado). O ensaio foi realizado em placas de 96 wells, com a adição de 2×10^3 promastigotas em fase estacionária de cultura, com volume final de 200 μL por poço. Após 72 horas, as células foram fixadas com 200 μL de PBS 1x com adição de 1% de formol por poço. Foi utilizada a alíquota de 10 μL de suspensão por poço para contagem em equipamento FACs, sem utilização de fluorescência. As análises foram elaboradas em software GraphPad Prism.

4.3 Seleção de mutantes de *L. (L.) amazonensis* resistentes à miltefosina

Para verificar a presença de um desequilíbrio funcional de proteínas flipase, flopase e/ou escramblase, selecionamos mutantes de *L. (L.) amazonensis* resistentes a miltefosina através de pressão seletiva. Como informado anteriormente na introdução, os parasitas de *Leishmania*, quando tratados com o antibiótico miltefosina podem apresentar resistência, e isso gera diminuição na eficácia do tratamento.

Como disponível na literatura, foi demonstrado que esses parasitas apresentam mutações em seu DNA e com isso, há a diminuição da internalização e possível aumento de efluxo de miltefosina, gerando assim a seleção positiva dos parasitas resistentes, que supomos possuem desequilíbrio funcional das proteínas flipase, flopase e/ou escramblase.

O nosso objetivo foi obter mutantes resistentes para então caracterizar os perfis de: tomada e efluxo dos mutantes quando tratados com lipídios marcados com fluorescência NBD; ensaios de infecção com macrófagos de linhagem RAW; ensaios de sensibilidade à duramicina, anfotericina B, e a própria miltefosina e, por fim, ensaios de ligação à anexina V-FITC, já que não conseguimos obter mais mutantes proveniente do grupo Cos 3.

Nossa hipótese foi que, os mutantes resistentes a miltefosina apresentariam alteração na expressão do gene responsável pela tomada de PC, e por consequência, miltefosina, e com isso diminuição na velocidade de tomada, e maior porcentagem de ligação à anexina V-FITC. Já nos ensaios de suscetibilidade a drogas, nossa hipótese foi de que haveria resistência cruzada com o antibiótico anfotericina B, como já foi também descrito na literatura em parasitas de outras espécies de *Leishmania*.

A seleção de mutantes resistentes à miltefosina baseou-se curvas de crescimento de *L. (L.) amazonensis* selvagem em presença de miltefosina (figura 21). Assim, a partir do IC₅₀, iniciamos a seleção de mutantes resistentes por pressão seletiva em sucessivas passagens da droga em cultura até atingir a concentração de 10X o valor de IC₅₀.

4.3.1 Seleção de clones resistentes à miltefosina

Para iniciar, realizamos um ensaio de IC₅₀ de *L. (L.) amazonensis* selvagem (figura 21), para verificar qual seria a concentração apropriada de miltefosina inicial para a seleção de parasitas resistentes, utilizando o pré-inóculo de 1×10^5 parasitas:

Figura 21– Ensaio de IC₅₀ de *L. (L.) amazonensis* tratada com o antibiótico miltefosina. O ensaio foi realizado em placas de 96 wells, com a adição de 1×10^5 células de *L. (L.) amazonensis*, com volume final de 200 µL por poço. Após 48h, foi realizada a contagem das células fixadas em PBS 1x com adição de 1% de formol em câmara de Neubauer. A análise foi elaborada em software GraphPad Prism.

Diferente do apresentado na figura 18, o IC₅₀ foi fixado em 8.053 µM de miltefosina, no ensaio realizado em 48 horas, pois a concentração de células e o tempo de incubação do antibiótico foi alterado.

Para obter parasitas 10 vezes mais resistentes, iniciamos o tratamento das células com miltefosina. A cada repique, realizamos o tratamento com o dobro da concentração de miltefosina utilizada na passagem anterior, mantendo essa concentração durante dois repiques, sempre com uma cultura de parasitas Selvagem acompanhando a passagem das semanas.

Após a obtenção de mutantes resistentes a miltefosina, selecionamos clones através de plaqueamento em meio de cultura 199 semissólido a seleção de 3 diferentes clones (denominado na tese como “Miltefosina 128”). O nosso objetivo foi selecionar populações homogêneas (clonal), pois dessa forma, podemos inferir que o fenótipo apresentado pelo grupo resistente é em decorrência de uma alteração em comum a todos da população.

Durante 3 meses realizamos os repiques das culturas sem a presença de miltefosina, para obtenção de parasitas sem a pressão do antibiótico, utilizado como controle da manutenção das células ao longo dos meses. Esse controle foi utilizado, pois como informado na literatura, culturas de promastigotas de *Leishmania* que possuem longo tempo de passagem apenas *in vitro*, e sem a possibilidade de diferenciação para amastigotas, apresentam diminuição na infectividade, e possivelmente alteração na tomada e/ou efluxo de lipídeos, e também na sensibilidade aos antibióticos.

Após a seleção de clones resistentes à miltefosina, retiramos a pressão do antibiótico durante 12 semanas, que foram novamente selecionados em meio de cultura 199 semissólido para a obtenção de clones para uma cultura homogênea (denominado na tese como “Miltefosina⁻”). Durante todo o período continuamos com o repique semanal dos parasitas Selvagem, e obtivemos no final do período três clones provenientes de um parasita com passagem 28 (denominado na tese como “P28”).

Os clones dos grupos Miltefosina 128, Miltefosina⁻ e P28 apresentaram um perfil similar, então devido ao grande número de amostras que seria utilizado para cada ensaio, resolvemos utilizar apenas o “clone 1” de cada grupo (dados não apresentados).

4.3.2 Curva de crescimento dos parasitas

Inicialmente padronizamos o inóculo inicial da curva de crescimento para podermos melhorar a divisão entre as fases mid-log, log e estacionária de cultura nos ensaios. Na figura 22 C, observamos que um pré inóculo de 1×10^5 de células Selvagem permite uma divisão bem estabelecida entre as diferentes fases de crescimento em cultura:

Figura 22- Curva de crescimento com células de *L. (L.) amazonensis* selvagem, transfectadas com vetor cLHYG e transfectadas com o cosmídeo Cos 3. O crescimento dos parasitas foi determinado por contagem do número de células nos dias 3, 4 e 5 e 7. Na figura A: Curva de crescimento com pré-inóculo inicial de 1×10^6 células; figura B: Curva de crescimento com pré-inóculo inicial de 5×10^5 células e figura B: Curva de crescimento com pré-inóculo inicial de 1×10^5 células. As células foram fixadas com 950 μ L de PBS 1x com adição de 1% de formol por poço e 20 μ L de células de cultura. A alíquota de 15 μ L de suspensão foi em câmara de neubauer, em microscópio de luz. As análises foram realizadas em software GraphPad Prism.

As células nas figuras 22 A e B não apresentaram a divisão desejada das fases mid-log, log e estacionária. Já a figura 22 C apresentou a divisão, em que na fase mid-log há o aumento do número de células de 1 vez, seguido pelo aumento de 3.5 a 4 vezes na fase log e na estacionária a estabilização no crescimento.

Após a escolha do pré inóculo de 1×10^5 de células, por apresentar melhor divisão entre as fases mid-log, log e estacionária, padronizamos para todos os experimentos realizamos nesta tese esse pré-inóculo. Na figura 23, apresentamos a curva de crescimento dos parasitas P28, Miltefosina 128 e Miltefosina:

Figura 23- Curva de crescimento dos clones P28, Miltefosina 128 e Miltefosina⁻ com pré-inóculo de 1×10^5 . O ensaio foi realizado em triplicata entre os dias 3 a 7 de cultura com pré-inóculo de 1×10^5 células. Em A: P28⁺; em B: Miltefosina 128 e em C: Miltefosina⁻. As células foram fixadas com 950 μ L de PBS 1x com adição de 1% de formol por poço e 20 μ L de células de cultura. A alíquota de 15 μ L de suspensão foi em câmara de Neubauer, em microscópio de luz. As análises foram realizadas em software GraphPad Prism.

Na figura 23, os grupos P28, Miltefosina 128 e Miltefosina⁻ apresentaram, com o pré-inóculo de 1×10^5 o mesmo perfil apresentado na figura 22 com o grupo selvagem, ou seja, uma divisão bem estabelecida entre as fases mid-log, log e estacionária. Após a padronização do pré-inóculo das amostras, seguimos com a realização dos ensaios de anexina V-FITC, tomada e efluxo de NBD-lipídios, ensaio de infecção e suscetibilidade aos antibióticos.

De acordo com a figura 24, o mutante Miltefosina 128 apresentou maior ligação à anexina V-FITC, quando comparado com o parasita selvagem. Interessantemente, esse perfil foi revertido quando retirada a pressão seletiva com a droga (Miltefosina⁻).

Figura 24- Ligação de promastigotas em fase estacionária à anexina V-FITC dos grupos P28, Miltefosina 128 e Miltefosina⁻. O gráfico representa as populações anexina V-FITC positivas e PI negativas. Os grupos P28 (coluna preta), Miltefosina 128 (coluna cinza) e Miltefosina⁻ (coluna branca) foram tratados com anexina V-FITC, por 20 minutos a 25°C. Após o tratamento, as células foram lavadas com tampão de anexina. Os ensaios foram realizados em FACs, e analisados em software GraphPad Prism. Sendo que $**p \leq 0.005$.

Os mutantes Miltefosina 128, com a pressão do antibiótico miltefosina apresentaram maior ligação à anexina V-FITC, em relação aos grupos P28 e também ao grupo sem a pressão de miltefosina, que apresenta um retorno de perfil Selvagem.

Em seguida, realizamos ensaios de infectividade em macrófagos de linhagem RAW com os mutantes Miltefosina 128, Miltefosina⁻ e P28.

4.3.3 Análise de Infectividade

Nesta etapa apresentamos os ensaios de infectividade, com macrófagos RAW na presença de parasitas de *L. (L.) amazonensis* dos grupos: selvagem, P28, Miltefosina 128 e Miltefosina⁻.

Nesse ensaio, o objetivo foi verificar a entrada do parasita no macrófago (4h), replicação (24h) e estabelecimento da infectividade (48h). O resultado está demonstrado na figura 25:

Figura 25- Infecção de macrófago RAW por promastigotas dos grupos P28, Miltefosina 128 e Miltefosina⁻ em *chamber slide* de vidro. Os ensaios foram realizados em 4, 24 e 48 horas, lavados com PBS 1X estéril, corados com Giemsa e analisados em microscópio de luz comum para a determinação do número de média $\pm$ desvio padrão de amastigotas por macrófago (A) e macrófagos infectados por macrófagos totais (B) e em (C) apresentamos o índice de infectividade que corresponde à multiplicação do número de amastigotas por macrófago pelo resultado de macrófagos infectados. Na coluna preta: P28 cinza: Miltefosina 128 e branca: Miltefosina⁻. Sendo que * $p \leq 0.05$ e ** $p \leq 0.005$.

Os resultados apresentados na figura 25, demonstram que os parasitas Miltefosina⁻ conseguiram estabelecer a infectividade (figura 25 C) de forma significativamente maior quando comparada aos parasitas P28 e Miltefosina 128.

Em relação ao número de amastigotas por macrófago infectado (figura 25 A), há uma quantidade significativamente menor na entrada do parasita (4h), quando comparados os parasitas P28 e Miltefosina⁻, porém esse perfil é alterado quando observamos o estabelecimento da infecção (48h), que o parasita Miltefosina⁻ apresenta maior quantidade de amastigotas por macrófago infectado, quando comparado ao parasita P28.

Os parasitas P28 e Miltefosina 128 apresentam o mesmo perfil de amastigotas por macrófago infectado, macrófago infectado por macrófago total e índice de infecção (figuras 25 A, B e C respectivamente).

4.3.4 Análise de perfil de tomada de NBD-lipídios marcados dos mutantes resistentes a miltefosina

Os ensaios de internalização de fosfolipídios, por meio de medidas de unidades de fluorescência com fosfolipídios marcados com fluorescência NBD, objetivaram verificar se os parasitas P28, Miltefosina^r e Miltefosina 128 apresentariam alteração significativa na tomada de lipídio em relação ao parasita selvagem.

O nosso objetivo foi de obter resultados de internalização de unidades de fluorescência dos grupos citados acima para ser possível fazer um comparativo entre eles, pois esse ensaio poderia nos dar indicativos de um translocador putativo do tipo flipase que catalisa a translocação do lipídio da face externa da bicamada lipídica da membrana plasmática para a face interna.

Os ensaios foram realizados com os seguintes NBD-lipídios: fosfatidilcolina (NBD-PC), fosfatidilserina (NBD-PS), fosfatidiletanolamina (NBD-PE) e esfingomielina (NBD-SM). O fosfolipídio SM foi utilizado como controle negativo, por se tratar de um fosfolipídio presente apenas em mamíferos.

Na figura 26, apresentamos o ensaio piloto do ensaio de competição entre lipídios marcados (NBD) e não marcados. Nesse ensaio, o nosso objetivo foi verificar como cada parasita realiza a tomada de lipídio dependendo as espécies de lipídios presentes no meio.

4.3.4.1 Padronização do ensaio de competição entre fosfolipídios marcados (NBD) e não marcados.

Figura 26– Padronização de competição entre fosfolipídios para a tomada por *L. (L.) amazonensis*. A cinética de tomada fosfolipídios marcados (NBD) de PC (A), PS (B), PE (C) e SM (D) por promastigotas na fase estacionária de cultura foi analisada em citometria de fluxo (FACs) à 25°C. As taxas de internalização foram calculadas com média e desvio padrão de três experimentos independentes. Nos círculos: NBD, triângulos: NBD + PC não marcado, losangos: NBD + PS não marcado e quadrados: NBD + PE não marcado. Sendo que * $p \leq 0.05$ e ** $p \leq 0.005$.

Na figura 26 A, o parasita Selvagem, tratado apenas com NBD-PC apresentou significativamente maior tomada quando comparado aos grupos NBD-PC e PC, PS e PE não marcado, sendo que a diminuição foi praticamente de 50% quando na presença dos lipídios não marcados.

Já no tratamento com NBD-PS (figura 26 B), houve novamente o aumento da ligação, quando apenas na presença com NBD-PS, porém houve diminuição significativa na competição entre NBD-PS e PS sem marcação, que pode ser observado nos 20 minutos de tomada quando comparada à PE e PC sem

marcação. Já, quando há a competição entre NBD-PS e PE e PC sem marcação, há a diminuição novamente de aproximadamente 50% de tomada de NBD-PS.

No grupo tratado com NBD-PE, observamos um comportamento contrário, ou seja, quando na presença de PS ou PC não marcados, há uma cinética de tomada significativamente maior de NBD-PE de 50%. Esse perfil de aumento não é observado no grupo de PE não marcado.

Uma outra forma de apresentar o resultado, é utilizando a equação “ $y = A * [1 - \exp(-k * t)]$ ” (figura 27), que nos dá uma taxa de internalização de unidades arbitrárias total por minuto e uma coluna para cada tipo de tratamento utilizado:

Figura 27– Ensaio de competição entre fosfolípidios para a tomada por *L. (L.) amazonensis*. A cinética de tomada lipídios marcados (NBD) de PC, PS, PE e SM por promastigotas na fase estacionária de cultura foi analisada em citometria de fluxo (FACs) à 25°C. As taxas de internalização foram calculadas com média e desvio padrão de três experimentos independentes com "single-exponential equation" (Software Sigma Plot). * $p \leq 0.05$ e ** $p \leq 0.005$.

Os resultados apresentados como lipídios-NBD são os mesmos que já observamos em *Leishmania* na literatura, ou seja, a tomada de PC é maior em relação à PS e PE, e a de PS é maior em relação à PE.

No grupo de NBD-PS, quando há a competição com PC e PE não marcados, não há diminuição significativa na tomada, porém, quando na presença de PS, a diminuição de tomada de NBD-PS é significativamente maior.

Surpreendentemente, no grupo PE, quando na presença de PC ou PS não marcados, há um aumento na tomada do fosfolipídio, podendo sugerir, que PC e PS permitem que esse fosfolipídio forme uma estrutura favorável para a tomada em *L. (L.) amazonensis*. Como controle, utilizamos a competição de NBD-PE e PE não marcado, e com esse fosfolipídio observamos que não há um aumento na tomada.

4.3.4.2 Análise de perfil de tomada de NBD-lipídios marcados e não marcados dos mutantes resistentes a miltefosina

Na figura 28, seguimos para o ensaio com os grupos P28, Miltefosina⁻ e Miltefosina 128, para conseguirmos verificar qual era o perfil de internalização:

Figura 28- Competição de internalização de fosfolipídio NBD-PC e PC, PS e PE não marcados na tomada por promastigotas de P28, Miltefosina 128 e Miltefosina⁻. A cinética de tomada lipídios marcados e não marcados por promastigotas na fase estacionária de cultura foi analisada em citometria de fluxo (FACs) à 25°C. Nas colunas pretas: P28, cinza: Miltefosina 128 e branca: Miltefosina⁻. As taxas de internalização foram calculadas com média e desvio padrão de três experimentos independentes com "single-exponential equation" (Software Sigma Plot). *p ≤ 0.05 e **p ≤ 0.005.

Nos ensaios realizados de NBD-PC (figura 28), os mutantes Miltefosina 128 e Miltefosina⁻ apresentaram uma cinética significativamente menor de tomada em relação ao controle P28 quando adicionado o fosfolipídio não marcado PC PS e PE, há uma tendência de diminuição de entrada do NBD-PC. Já o parasita P28 tratado com NBD-PC, apresenta competição de tomada,

quando na presença de PC e PS não marcado, porém, na presença de PE não marcado, há o aumento no perfil de tomada.

Na figura 29, apresentamos o perfil de tomada de NBD-PS na presença de PC, PS e PE não marcados:

Figura 29- Competição de internalização de fosfolípido NBD-PS e PC, PS e PE não marcados na tomada por promastigotas de P28, Miltefosina 128 e Miltefosina⁻. A cinética de tomada lipídios marcados e não marcados por promastigotas na fase estacionária de cultura foi analisada em citometria de fluxo (FACs) à 25°C. Nas colunas pretas: P28, cinza: Miltefosina 128 e branca: Miltefosina⁻. As taxas de internalização foram calculadas com média e desvio padrão de três experimentos independentes com "single-exponential equation" (Software Sigma Plot). * $p \leq 0.05$ e ** $p \leq 0.005$.

Na figura 29, no ensaio de tomada de NBD-PS, observamos que o parasita P28 apresenta novamente um perfil significativamente maior de tomada, quando comparado aos parasitas Miltefosina 128 e Miltefosina⁻.

Por fim, na figura 30 realizados o ensaio com NBD-PE:

Figura 30- Competição de internalização de fosfolípido NBD-PE e PC, PS e PE não marcados na tomada por promastigotas de P28, Miltefosina 128 e Miltefosina⁻. A cinética de tomada lipídios marcados e não marcados por promastigotas na fase estacionária de cultura foi analisada em citometria de fluxo (FACs) à 25°C. Nas colunas pretas: P28, cinza: Miltefosina 128 e branca: Miltefosina⁻. As taxas de internalização foram calculadas com média e desvio padrão de três experimentos independentes com "single-exponential equation" (Software Sigma Plot). *p ≤ 0.05 e **p ≤ 0.005.

Na figura 30, observamos um resultado oposto aos apresentados nas figuras 28 e 29, ou seja, há o aumento da tomada de NBD-PE do parasita Miltefosina⁻ na presença de PS não marcados em relação aos P28 e Miltefosina 128 de forma significativa, sendo que no resultado de NBD-PE com PC não marcado, não há aumento na tomada, mas o parasita Miltefosina⁻ apresenta padrão de tomada similar quando comparado ao parasita P28.

O parasita Miltefosina 128, apresentou diminuição significativa na cinética de tomada de NBD-PE quando comparado ao parasita P28 e quando na presença de NBD-PE e PC não marcado, apresentou diminuição de tomada significativamente menor em relação aos parasitas P28 e Miltefosina⁻. E na tomada de NBD-PE e PS não marcado, apresentou diminuição de tomada significativamente menor em relação ao parasita Miltefosina⁻.

Os parasitas P28, Miltefosina 128 e Miltefosina⁻ não apresentaram diferença significativa quando comparados com o tratamento de NBD-PE com PE não marcado. Vale salientar, que quando na presença de fosfolípido de outra espécie, há a tomada significativamente maior de NBD-PE.

4.3.5 Perfil de sensibilidade aos antibióticos dos mutantes resistentes a miltefosina

O objetivo desses ensaios foi obter um perfil dos parasitas P28, Miltefosina 128 e Miltefosina^r na presença dos antibióticos, pois como agem nas moléculas presentes na membrana de *Leishmania*, podem ser úteis para, ao final correlacionar com os resultados obtidos em relação à infectividade, tomada de lipídios e também ligação à anexina V-FITC.

Na figura 31, realizamos o ensaio de IC₅₀ dos parasitas contidos no ensaio de resistência à miltefosina: P28, Miltefosina 128 e Miltefosina^r, tratados com os antibióticos anfotericina B, miltefosina e duramicina.

Figura 31– Ensaio de IC₅₀ dos parasitas P28, Miltefosina 128 e Miltefosina^r com a utilização dos antibióticos anfotericina B, miltefosina e duramicina. O gráfico apresenta as diferentes concentrações de A: anfotericina B, B: miltefosina e C: duramicina, utilizadas no ensaio com células de P28 (traço contínuo), Miltefosina 128 (traço intermitente) e Miltefosina^r (pontilhado). O ensaio foi realizado em placas de 96 wells, com a adição de 2×10^3 promastigotas em fase estacionária, com volume final de 200 μ L por poço. Após 72h as células foram fixadas com 200 μ L de PBS 1x com adição de 1% de formol por poço. A alíquota de 10 μ L de suspensão por poço foi contada em FACs, sem utilização de fluorescência. As análises foram realizadas em software GraphPad Prism.

O parasita Miltefosina⁺ apresentou alteração no perfil, quando comparado com Miltefosina 128, pois perdeu o perfil de resistência à anfotericina B, demonstrado em Miltefosina 128 (figura 31 A), mas a alteração não é observada nos tratamentos com miltefosina (31 B) e duramicina (31 C), que apresenta perfil próximo ao Miltefosina 128, sendo mais resistente e suscetível aos antibióticos miltefosina e duramicina respectivamente:

4.4 Caracterização de *L. (L.) amazonensis* purificada de macrófago RAW

Outra forma de localizar o fosfolípido e/ou translocador de fosfolípido em *Leishmania*, foi a utilização de parasitas previamente infectados em macrófagos RAW (37°C em meio RPMI), que foram extraídos dos macrófagos RAW e purificados, e após, transferidos novamente para cultura com meio 199 a 25°C.

Nossa hipótese era que esses parasitas apresentariam menor infectividade em relação ao Selvagem, visto que foram apenas selecionados *in vitro* com macrófagos da linhagem RAW, pois como não foram inoculados em hospedeiro vertebrado, e sim apenas em macrófago de linhagem, poderiam apresentar um perfil diferente nos ensaios de tomada de NBD-lipídios, ligação à anexina V-FITC e sensibilidade aos antibióticos, quando comparados ao grupo Selvagem, que foi purificado de células infectadas de camundongos BALB/c.

O grupo resultante da purificação em células de linhagem de macrófago RAW foi denominado nesta tese como “P1 RAW”, o grupo resultante da purificação de camundongos foi denominado como “P1 BALB/c” e o grupo controle com passagem tardia foi denominado como “P28”

4.4.1 Ligação à anexina V

Na figura 32, apresentamos a comparação do perfil de ligação à anexina V-FITC:

Figura 32- Ligação de promastigotas em fase estacionária à anexina V-FITC dos grupos P1 BALB/c, P1 RAW e P28. O gráfico representa as populações anexina V-FITC positivas e PI negativas. Os grupos P1 BALB/c (coluna preta), P1 RAW (coluna cinza) e P28 (coluna branca) foram tratados com anexina V-FITC, por 20 minutos a 25°C. Após o tratamento, as células foram lavadas com tampão de anexina. Os ensaios foram realizados em FACs, e analisados em software GraphPad Prism. Sendo que * $p \leq 0.05$ e ** $p \leq 0.005$.

Os parasitas P1 BALB/c foram os que apresentaram menor ligação à anexina V-FITC na fase estacionária de cultura, sendo que os outros dois grupos da figura 32 (P28 e P1 RAW não apresentaram diferença significativa entre eles).

4.4.2 Análise de infectividade

Após, realizamos na figura 33 a plotagem em um mesmo gráfico dos parasitas *L. (L.) amazonensis* selvagem: P1 BALB/c, P1 RAW e P28. O objetivo nessa parte da tese foi verificar se os diferentes grupos apresentariam alteração na infectividade.

Os resultados indicam que o parasita P1 RAW apresenta menor número de amastigotas por macrófago infectado (figura 33 A), quando comparado ao parasita P1 BALB/c na entrada do parasita (4h). Porém, essa diferença significativa não é observada na replicação (24h) e estabelecimento da infectividade (48h). No caso do número de macrófago infectado por macrófago total (figura 33 B) e índice de infecção (figura 33 C) não há diferença significativa em relação ao parasita P1 BALB/c.

Figura 33- Infecção de macrófago RAW por parasitas P1 BALB/c, P1 RAW e P28 cultivados em *chamber slide* de vidro. Os ensaios foram realizados em 4, 24 e 48 horas, lavados com PBS 1X estéril, corados com Giemsa e analisados em microscópio de luz comum para a determinação do número de média $\pm$ desvio padrão de amastigotas por macrófago (A) e macrófagos infectados por macrófagos totais (B) e em (C) apresentamos o índice de infectividade que corresponde à multiplicação do número de amastigotas por macrófago pelo resultado de macrófagos infectados. Nas colunas preta: P1 BALB/c, cinza P1 RAW e branca: P28. sendo que * $p \leq 0.05$ e ** $p \leq 0.005$.

No parasita P28, há uma diminuição de entrada de parasitas quando observado o número de macrófago total por macrófago infectado (figura 33 B), em relação aos parasitas P1 BALB/c e P1 RAW. Na figura 33 A, amastigota por macrófago infectado, não observamos a diferença significativa na entrada, apenas em 24h, quando comparado ao parasita P1 BALB/c, que resulta em diminuição no índice de infecção, demonstrado na figura 33 C.

4.4.3 Ensaio de tomada de NBD-lipídios

Seguimos com a obtenção do perfil de velocidade de tomada de NBD-lipídios do parasita realizamos os ensaios de tomada de NBD-PC, NBD-PS e NBD-PE, cujos resultados são apresentados na figura 34:

Figura 34– Ensaio de tomada de NBD-PC, NBD-PS e NBD-PE por promastigotas de P1 BALB/c, P1 RAW e P28. A cinética de tomada lipídios marcados NBD-PC, NBD-PS e NBD-PE por promastigotas na fase estacionária de cultura foi analisada em citometria de fluxo (FACs) à 25°C. Nas colunas preta: P1 BALB/c, cinza: P1 RAW e branca: P28. As taxas de internalização foram calculadas com média e desvio padrão de três experimentos independentes com "single-exponential equation" (Software Sigma Plot). * $p \leq 0.05$.

O parasita Selvagem P28 apresentou uma velocidade maior de tomada de NBD-PC em relação à Selvagem, sendo que não houve diferença significativa entre os outros grupos e na presença dos tratamentos com NBD-PS ou NBD-PE.

4.4.4 Ensaio de sensibilidade aos antibióticos

Para finalizar as análises, apresentamos na figura 35 o tratamento dos parasitas selvagens P1 BALB/c, P18 e P1 RAW, com os antibióticos anfotericina B, miltefosina e duramicina.

Figura 35– Ensaio de IC₅₀ dos parasitas P1 BALB/c, P1 RAW e P28 com a utilização dos antibióticos anfotericina B, miltefosina e duramicina. O gráfico apresenta as diferentes concentrações de A: anfotericina B, B: miltefosina e C: duramicina, utilizadas no ensaio com células de P1 BALB/c (traço contínuo), P28 (traço intermitente) e P1 RAW (pontilhado). O ensaio foi realizado em placas de 96 *wells*, com a adição de 2×10^3 promastigotas em fase estacionária, com volume final de 200 μ L por poço. Após 72h as células foram fixadas com 200 μ L de PBS 1x com adição de 1% de formol por poço. A alíquota de 10 μ L de suspensão por poço foi contada em FACs, sem utilização de fluorescência. As análises foram realizadas em software GraphPad Prism.

4.5 Identificação do fosfolípido envolvido no reconhecimento do macrófago para a fagocitose do parasita

Para identificar qual é o fosfolípido que poderia estar envolvido na sinalização que indica ao macrófago que o parasita está em processo apoptótico, utilizamos a estratégia de um ensaio de competição entre *Leishmania* e lipossomos construídos com um único fosfolípido em infecções com o macrófago RAW 264.7. O racional do experimento era verificar após 4 h (tempo para a entrada da *Leishmania* no macrófago) e 24 h (replicação da *Leishmania* dentro do macrófago) qual era o fosfolípido que competia com a *Leishmania* pelo sítio de entrada preferencial do macrófago, diminuindo a infecção.

Para elucidar qual fosfolípido presente na bicamada lipídica da membrana plasmática de *L. (L.) amazonensis* que participa da sinalização fagocítica ao macrófago sem desencadear a resposta inflamatória do hospedeiro vertebrado, realizamos o ensaio de competição com concentrações crescentes de lipossomas construídos com fosfolípidos de fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS) e fosfatidilcolina : fosfatidiletanolamina (PC:PE 1:1), na presença de promastigotas de *L. amazonensis* e macrófagos da linhagem RAW 247.7.

Nossa hipótese consistiu na competição pela ligação do fosfolípido no sítio de reconhecimento do macrófago, impedindo a fagocitose do parasita. Assim, a diminuição da infecção em relação à infecção controle, sem adição de lipossoma, é um indicativo que houve ligação competitiva do fosfolípido ao receptor do macrófago, implicando esse fosfolípido no reconhecimento pelo macrófago para realizar a fagocitose do parasita.

Inicialmente, realizamos um ensaio piloto da competição, para verificar quais concentrações de lipossomas deveríamos usar. Como vemos na figura 36, escolhemos as concentrações de 0.2 μ M, 20 μ M e 2 mM por possuir a alteração gradual esperada, por ser possível assim utilizar concentrações com uma ordem de grandeza de diferença entre cada concentração escolhida, e por fim, por ser possível utilizar a diluição seriada, que facilita os ensaios. No ensaio piloto, utilizamos apenas o lipossoma PC:

Figura 36- Ensaio de competição “piloto” entre lipossomas de PC e promastigotas estacionárias de *L. (L.) amazonensis*. A: Média e desvio padrão de amastigotas /macrófago infectado; B: Média e desvio padrão de macrófago infectado/macrófago total e C: Média e desvio padrão de A x Média de B. *P ≤0.05.

Após essa padronização, realizamos os ensaios com lipossomas contendo exclusivamente o fosfolípido PC, PS e PC:PE (1:1) (figura 37), nas concentrações de 0.2 μM, 20 μM e 2 mM. No caso do fosfolípido PE, não foi possível sintetizar um lipossoma exclusivo, então foi sintetizado lipossomas com composição 50% PC e 50% PE, pois a molécula de PE não possui a estabilidade necessária para a sintetização de um lipossoma exclusivo⁵⁹.

Cada ensaio foi realizado em duplicata, e em cada poço foram escolhidos quatro locais aleatórios para a contagem de 100 macrófagos. Ao final, em cada lâmina, foram contados 8 campos aleatórios para cada condição (800 macrófagos).

Figura 37- Infecção de macrófago RAW por *L. (L.) amazonensis* na presença de lipossomas de PC, PS e PC:PE (1:1). O ensaio de competição foi realizado entre promastigotas de *L. (L.) amazonensis* selvagem e lipossomas de PC, PS e PC:PE (1:1) e na presença de macrófagos cultivados em *chamber slide* de vidro, nas concentrações de 0.2 μ M, 20 μ M e 2 mM de lipossomas. Os ensaios foram realizados em 4 e 24 horas, lavados com PBS 1X estéril, corados com DAPI e analisados em microscópio de fluorescência para a determinação do número de amastigotas por macrófago (A, D e G) e % de macrófagos infectados (B, E e H). Em (C, F e I) apresentamos o índice de infectividade que corresponde à multiplicação do número de amastigotas por macrófago pela % de macrófagos infectados. A média $\pm$ desvio padrão de cada valor obtido na infecção sem adição de lipossomas, ou seja, macrófagos RAW e *L. (L.) amazonensis* na proporção de 1:5 (grupo controle), foi considerada como 100%. No grupo “4 horas” foram realizados três experimentos independentes (n=3), e no grupo “24 horas” foram realizados quatro experimentos independentes (n=4), sendo que *p $\leq$ 0.05 e **p $\leq$ 0.005.

O ensaio foi realizado em lâminas de *chamber slide* de vidro, e após 4h de infecção, as lâminas foram lavadas e uma lâmina de cada duplicata foi fixada

e corada com DAPI. A segunda lâmina de cada duplicata foi fixada após 24h e todas as lâminas foram então coradas com DAPI para observação em microscópio de fluorescência para a determinação do número de macrófagos infectados e do número de amastigotas por macrófago.

Na figura 37 (C, F e I) apresentamos o índice de infecção que é a relação entre o número de amastigota/macrófago infectado e a porcentagem de macrófagos infectados, nos dois tempos de infecção. As amostras fixadas após 4 horas de infecção representam a entrada do parasita no macrófago, e após 24 horas, é possível verificar a sua replicação.

Os ensaios com lipossomas na presença de PC (figura 37 A, B e C) apresentaram uma redução na quantidade de macrófagos infectados, que reflete na diminuição do índice de infecção. Já os lipossomas de PS e PC:PE não influenciaram na infectividade (figura 37 F e I).

O mesmo ensaio de competição na infecção de macrófagos RAW por *L. (L.) amazonensis* foi repetido para o tempo de entrada (4 horas) agora na presença de uma concentração de 12 mM de lipossomas de PS para verificar se a ausência de competição observada na figura 38 não seria por uma ainda baixa concentração do lipossoma PS na competição. Como controle utilizou-se lipossomas de PC na concentração de 5 mM. Os resultados são apresentados na figura 38, sendo que os dados foram normalizados tomando-se a infecção com *L. (L.) amazonensis* como sendo 100%.

Figura 38- Infecção de macrófago RAW por *L. (L.) amazonensis* na presença de lipossomas de fosfatidilserina (PS) ou fosfatidilcolina (PC). O ensaio de competição foi realizado entre promastigotas de *L. (L.) amazonensis* selvagem e lipossomas de PS ou PC na presença de macrófagos cultivados em *chamber slide* de vidro, nas concentrações de 12 mM de PS ou 5 mM de PC. Os ensaios foram realizados por 4 horas de infecção, quando as lâminas foram lavadas com PBS 1X estéril, coradas com DAPI e analisadas em microscópio de fluorescência para a determinação do número de amastigotas por macrófago (A) e % de macrófagos infectados (B). Em (C) apresentamos o índice de infectividade que corresponde à multiplicação do número de amastigotas por macrófago pela % de macrófagos infectados. Foram realizados três experimentos independentes (n=3), sendo que *p ≤ 0.05 e **p ≤ 0.005.

Pode-se verificar que há diminuição significativa na infecção quando ocorreu a competição com lipossomas PC a 5 mM. Interessante que, diferente do observado na figura 37, o número de amastigotas por macrófago também está reduzido neste tratamento, em relação ao controle. Ainda, a competição com lipossomas de PS na concentração de para 12 mM, há uma diminuição significativa na porcentagem de macrófagos infectados, mas menos drástica do que ocorre com PC a 5 mM, o que influencia o índice de infecção final.

4.5.1 Testes de viabilidade celular de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e macrófagos tratados com lipossomas

Nesta parte da tese, o objetivo foi verificar se os lipossomas eram de alguma forma tóxicos para o parasita ou para os macrófagos RAW.

O ensaio realizado foi de viabilidade celular utilizando o reagente Alamar Blue®, que ao entrar em contato com as células que estão metabolicamente ativas, convertem o reagente em um indicador fluorescente e colorimétrico, sendo que células que estão danificadas ou mortas não possuem a capacidade metabólica para converter o reagente, e com isso o indicativo fica muito baixo ou então ausente.

O ensaio piloto foi realizado com 3 diferentes concentrações de macrófago RAW (3×10^5 , 1.5×10^5 e 0.75×10^5), *L. (L.) amazonensis* (1.5×10^6 , 7.5×10^5 e 3.75×10^5) e 3 diferentes meios de cultura: Medium 199 (utilizado como meio de cultura para promastigotas de *L. (L.) amazonensis*), Medium RPMI (utilizado como meio de cultura para macrófagos RAW) e Medium 199 Branco (utilizado como controle dos meios de cultura, pois segundo os fabricantes, o *fenol red* poderia causar interferência quando em contato com o reagente Alamar Blue®). O ensaio foi realizado em placas de 96 wells, durante 4 horas à 34°C em 5% de CO₂.

De acordo com o resultado apresentado na figura 39 é possível observar que o aparelho detectou de maneira dose dependente a fluorescência em relação ao número de macrófagos e *Leishmania*, e que o meio de cultura contendo *fenol red* não apresenta interferência significativa com o Alamar Blue:

Figura 39- Teste de sensibilidade do AlamarBlue®. O ensaio foi realizado durante 4 horas a 34°C em 5% de CO₂. As amostras macrófagos RAW, *L. (L.) amazonensis* e os meios de cultura foram analisados em plataforma Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices). O resultado apresenta a média $\pm$ SEM da DO. * $p \leq 0.05$ e ** $p \leq 0.005$.

Após a realização do ensaio piloto, verificamos então a sensibilidade das células ao reagente Alamar Blue®, e como controle negativo adicionamos digitonina, como apresentado na figura 40:

Figura 40- Teste de sensibilidade do AlamarBlue® em diferentes concentrações de células. O ensaio foi realizado durante 4 horas a 34°C em 5% de CO₂ sem tratamento. Após 10% do volume total foi tratado com AlamarBlue® durante 2 horas a 34°C em 5% de CO₂ com ou sem digitonina (Sigma). O sobrenadante foi transferido para placa de 96 poços e foi analisado em plataforma Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices). Em A: Macrófagos RAW; B: *L. (L.) amazonensis* e C: Infecção de *L. (L.) amazonensis* em Macrófagos RAW. O resultado apresenta a média ± SEM da DO, normalizada pelas células não tratadas (100%). *p ≤ 0.05 e **p ≤ 0.005.

Após os ensaios de sensibilidade de macrófagos e de *L. (L.) amazonensis* aos reagentes Alamar e Digitonina, iniciamos os testes de toxicidade com os lipossomas, conforme apresentado na figura 41.

Figura 41- Ensaio de toxicidade de macrófago e *Leishmania* tratados com lipossomas. O ensaio foi realizado durante 4 horas a 34°C em 5% de CO₂ sem tratamento. Após 10% do volume total foi tratado com AlamarBlue® durante 2 horas a 34°C em 5% de CO₂ com ou sem digitonina (Sigma). O sobrenadante foi transferido para placa de 96 poços e foi analisado em plataforma Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices). O resultado apresenta a média ± SEM da DO, normalizada pelas células não tratadas (100%). *p ≤ 0.05. E **p ≤ 0.005.

Os ensaios foram realizados nas mesmas condições apresentadas no item 3.25 para os ensaios de competição de lipossomas e *Leishmania*, mas após as 4 horas de incubação, foi adicionada à cada poço da *shamber slide* 10% de Alamar Blue do volume total e digitonina quando apropriado, durante 2 horas. Após o sobrenadante foi transferido para placas de 96 *wells* e analisado em plataforma Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices). Todos os ensaios foram realizados à 34°C à 5% CO₂:

A concentração de 2 mM de PC (figura 41 A) ou PC:PE (figura 41 C) apresentou toxicidade para *Leishmania*, mas não para o macrófago (figura 41 D e F). Esse resultado sugere que baixas concentrações de PC não são tóxicas para a infecção, corroborando com resultados de outros pesquisadores, que indicam que PC poderia proteger as células contra a apoptose⁶⁰.

4.6 Superexpressão dos genes candidatos

Como informado anteriormente, não obtivemos sucesso na ligação do fragmento gênico em vetor de expressão pSNBR dos outros genes candidatos, porém, apresentamos nesse item os resultados obtidos.

4.6.1 Gene *abcc8*

O gene *abcc8*, em mamíferos, codifica a proteína responsável pela abertura do canal de potássio ATP dependente (característica dos membros da família ABC). Quando o canal de potássio/ATP é inibido, há a despolarização da membrana, e com isso, há o estímulo de entrada de cálcio para dentro da célula⁶¹. O fragmento gênico de *abcc8* foi amplificado utilizando iniciadores contendo a sequência para a clivagem com enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*. Após foi realizada a amplificação gênica (figura 42) utilizando como molde o DNA de *L. (L.) amazonensis*:

Figura 42- Amplificação do fragmento gênico *abcc8* contendo sequências para posterior clivagem utilizando enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*. PCR utilizando como alvo DNA de *L. (L.) amazonensis* com *primers* ABCC8 F *EcoRI* e ABCC8 R *HindIII* que amplificam o fragmento gênico *abcc8*. Nas canaletas 1 e 2: amplificação do fragmento gênico alvo de aproximadamente 6.2 kb. Na canaleta 3: Controle negativo; em M: padrão de tamanho de 1 kb.

4.6.2 Gene *gtp*

O gene *gtp* (guanosine triphosphate binding protein) que possui esse nome pela capacidade da proteína que codifica se ligar à nucleotídeos de guanina, está relacionado ao crescimento celular, movimento e organização do citoesqueleto, proliferação, tráfego na membrana e secreção, e também está ligada à apoptose⁶².

O fragmento gênico de *gtp* foi amplificado utilizando *primers* com os iniciadores contendo a sequência para a clivagem com enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*. Após foi realizada a amplificação gênica utilizando como molde o DNA de *L. (L.) amazonensis*, apresentado na figura 43:

Figura 43- Amplificação do fragmento gênico *gtp* contendo sequências para posterior clivagem utilizando enzima de restrição *EcoRI* e *BamHI*. PCR utilizando como alvo DNA de *L. (L.) amazonensis* com *primers* GTP F *EcoRI* e GTP R *BamHI* que amplificam o fragmento gênico *gtp*. Na canaleta 1: Controle negativo; na canaleta 2: amplificação do fragmento gênico alvo de aproximadamente 2.5 kb; em M: padrão de tamanho de 1 kb.

4.6.3 Análise de expressão por qPCR

Para caracterizar a expressão dos genes *abcc8* e *gtp* e verificar se havia alteração da expressão de cada gene nas fases mid-log, logarítmica e estacionária, começamos com a padronização da PCR com iniciadores que geram produtos de cerca de 100 bp, tamanho considerado ideal para a quantificação em qPCR. O resultado da PCR inicial está apresentado na figura 44. Pode-se verificar, que para todos os genes foi obtido o fragmento esperado de aproximadamente 100 bp, indicado pelas setas pretas.

Figura 44- PCR utilizando como alvo DNA genômico de *L. (L.) amazonensis* e os iniciadores que amplificam os fragmentos gênicos dos genes *gtp* e *abcc8*. Nas canaletas 1 e 3 temos o produto para *gtp* e *abcc8* respectivamente. As canaletas 2 e 4 correspondem ao controle negativo, sem DNA template; em M: padrão de tamanho de 50 bp. Nas flechas a amplificação do fragmento gênico de aproximadamente 100 bp.

O procedimento de quantificação necessita de uma curva padrão construída com valores de Ct obtidos de curvas com quantidade conhecida de moléculas. Assim, para cada um dos fragmentos clonados, iniciamos a padronização dessas curvas. Primeiramente foi feita a clivagem do DNA de cada clone por enzima de restrição *Scal* das amostras, pois não há sítios de restrição dessa enzima nos fragmentos gênicos escolhidos, e também porque essa enzima possui apenas um sítio de restrição no vetor pGEM-T easy.

Após a realização do PCR para a amplificação do fragmento gênico, realizamos então a ligação inserto-vetor em vetor pGEM-T easy, que em seguida foi utilizada para a transformação de bactérias termocompetentes. As colônias bacterianas obtidas por plaqueamento em placa de meio de cultura SOB, contendo o antibiótico ampicilina foram escolhidas para cada gene, transferidas para 3 mL de meio de cultura SOB, contendo ampicilina, e foram incubadas em sob agitação constante de 15 xg em temperatura de 37°C, *overnight*. Após o crescimento das bactérias, procedemos a extração do DNA por *mini-prep*, como

descrito em Material e Métodos (3.6) O DNA foi clivado com enzima de restrição *EcoRI*, que libera o fragmento clonado, sendo assim possível verificar qual clone possuía o fragmento gênico esperado.

A linearização da molécula alvo resulta em uma reação com melhor eficiência do que quando o DNA está circular, evitando que haja uma polimerização em círculo. Foram escolhidas as amostras dos clones que apresentaram o tamanho de fragmento esperado de aproximadamente 100 bp, os clones escolhidos foram: 3, 4 e 9, apontados na figura 45 pelas setas pretas:

Figura 45- Clivagem com enzima de restrição *EcoRI* de DNA de plasmídeo recombinante de clones obtidos após a transformação de *E. coli* com pGEM-T easy ligado aos fragmentos gênicos de *gtp* ou *abcc8*. As amostras 3, 4 e 9 apresentaram o fragmento gênico esperado após a clivagem, de aproximadamente 100 bp. As amostras estão apresentadas em não digeridas (número ímpar) e digeridas (número par), respectivamente. De 1-5: *abcc8*; de 6-10 *gtp*; M: Padrão de 100 bp, as setas pretas apontam para o fragmento liberado.

Obtivemos, assim, um fragmento linear (figura 46), que foi utilizado para os ensaios de qPCR, como alvo para construção de curva-padrão.

Figura 46- Clivagem com enzima de restrição *ScaI* de DNA do plasmídeo recombinante de clones obtidos após a transformação de *E. coli* com pGEM-T easy ligado aos fragmentos gênicos de *gtp* ou *abcc8*. Nas canaletas 1 e 2: *abcc8*; 3 e 4: *gtp*. Em M: Padrão de 100 bp.

Após obter a confirmação em gel de agarose, as amostras clivadas em *Scal* foram purificadas com Kit QIAquick® Gel Extraction Kit – Qiagen, seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram então quantificadas para certificar a concentração, e após foi realizado o sequenciamento para confirmação de identidade do fragmento gênico.

Após nos certificarmos, com o sequenciamento, de que estávamos utilizando o fragmento gênico correto, iniciamos a padronização em qPCR pela construção das curvas-padrão. Apresentamos as curvas-padrão na figura 47, com os dados de eficiência para cada fragmento.

Standard curves: ABCC8

Efficiency (%): 116,055980185232 R2: 0,785633345439024

Standard curves: GTP

Efficiency (%): 96,1186369260979 R2: 0,999892167041868

Figura 47- Curvas-padrão dos genes alvos: *abcc8* e *gtp*.

A figura 47 mostra que as diluições dos alvos testes (curva-padrão) resultaram na curva esperada, e que os oligonucleotídeos estão corretos para gerar o fragmento esperado na amplificação. As reações foram realizadas com diluições dos alvos foram realizadas de 10^1 a 10^7 moléculas.

Após a padronização das curvas-padrão para cada fragmento gênico, iniciamos a PCR quantitativa com amostras de cDNA obtidas partir de RNA total de culturas de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* nos dias 3, 5, 7 e 10 de cultura.

Na figura 48, mostramos os dados de quantificação dos transcritos dos genes alvos, estudados neste projeto. Foi extraído RNA nos dias de cultura 3, que corresponde à fase mid-log, a qual por sua vez corresponde ao período em que esperamos uma maior expressão de mRNA nos clones superexpressos; dia 5 ou fase log tardia; dia 7 que corresponde à fase estacionária, que, conforme dados de literatura, é a fase em que se observa nos parasitas selvagens uma maior ligação à anexina V; e dia 10 que corresponde à fase estacionária tardia de cultura, fase em que encontramos mais parasitas mortos.

Nesse experimento inicial, apenas parasitas selvagens foram utilizados nos quatro tempos de cultura para observar o perfil de expressão dos genes. Os mutantes transfectados foram testados em fase mid log de cultura e comparados com esses resultados dos parasitas selvagens.

Figura 48- qPCR de RNA transcrito dos alvos em A: *abcc8* e B: *gtp*, normalizados pelo transcrito do gene *gapdh*. Amostras de cDNA foram utilizadas para a realização da PCR quantitativa.

De acordo com os resultados, é possível observar que há diferença estatística na quantidade de mRNA do gene *gtp* (Figura 48 B) nos quatro diferentes dias da cultura. Já no gene *abcc8* (48 A), não há diferença nos diferentes dias da curva de crescimento.

5. Discussão

5.1 Estratégia experimental

A estratégia experimental inicial deste trabalho foi a utilização de uma biblioteca genômica de *L. (L.) amazonensis*⁵⁵, construída em vetor cLHYG, *shuttle* de expressão em *Leishmania* e *E.coli*, que apresenta resistência aos antibióticos higromicina e ampicilina⁵³.

A partir dessa biblioteca buscamos obter parasitas, contendo um cosmídeo que expressasse a informação e conferisse o fenótipo de se ligar à anexina V-FITC. Como a *Leishmania* apresenta maior ligação à anexina V-FITC na fase estacionária, que é a fase promastigotas metacíclica infectiva desse parasita^{63,28}, resolvemos verificar se havia um perfil de superexpressão de ligação à anexina V-FITC antecipado, dado pela presença do cosmídeo mantido sob pressão, ou seja, na fase mid-log.

Obtivemos uma população de transfectantes, denominada Cos 3, que apresentou maior ligação à anexina V-FITC na fase mid-log, quando comparado ao parasita selvagem. Tivemos problemas de manter essa população de parasitas que perdiam o perfil de superexpressão após o congelamento, provavelmente, por apresentarem alterações na sua estrutura lipídica, e por consequência, na estrutura da membrana plasmática, quando congeladas esses parasitas não sobreviviam ao congelamento. Outra explicação reside na capacidade plástica do genoma de *Leishmania*.

Esta plasticidade é uma ferramenta adaptativa de *Leishmania*, ou seja, de rearranjar seu DNA, para se adaptar ao ambiente⁶⁴. E como realizamos a inserção episomal do DNA, ou seja, o DNA está contido no núcleo da célula, porém não está inserido no cromossomo, então à cada passagem do clone, nós extraíamos o DNA contido no parasita Cos 3 para poder armazená-lo e transfectar novamente em *L. (L.) amazonensis* selvagem (Tabelas 2 e 3).

Como a única característica do parasita que queríamos selecionar era a ligação à anexina V-FITC, não dispúnhamos de nenhuma estratégia de seleção positiva. Tentamos uma purificação por adsorção em coluna contendo anticorpo anti-anexina V, preso em *beads* magnéticos, sem sucesso na purificação de populações com comportamento homogêneo. A segunda proposta foi então partir para um fracionamento em FACs *Sorter* (Tabela 4).

As frações denominadas nessa tese como FITC positivas e FITC negativas, parâmetros escolhidos por apresentarem células ligantes ou não à anexina V separadas pelo *Sorter*, foram mantidas em cultura e depois foram plaqueadas em meio de cultura semi-sólido. Dessa forma obtivemos 5 clones FITC positivos e 2 clones FITC negativos (Tabela 5).

Os clones, novamente analisados em FACs, apresentaram o perfil super-expressor de ligação à anexina V-FITC desejado. Dessa forma, fizemos a purificação e caracterização do DNA do cosmídeo neles contidos e mostramos que entre os 5 clones obtidos os padrões de restrição eram similares (Figura 3). Esse fato é um bom indicativo de que a metodologia utilizada para a obtenção do clone, contendo a sequência desejada tenha sido adequada.

Nesse ensaio, adicionamos o comportamento do parasita em relação à presença de cálcio no ensaio. É sabido que a anexina V faz parte da família de anexinas que são proteínas ligantes de fosfolipídios de maneira cálcio dependentes³⁵. Mesmo na ausência de cálcio no tampão de tratamento das células, apresentou em torno de 1% de ligação maior à anexina V-FITC, confirmando que o parasita contendo o cosmídeo Cos 3, super-expressa informação cuja expressão difere do parasita selvagem em relação à ligação à anexina V – FITC (Figura 4).

Após os resultados confirmarem que a fração Cos 3 apresentou maior ligação à anexina V-FITC, realizamos o sequenciamento do DNA do cosmídeo contido no parasita (Figura 7), para verificar os possíveis genes alvos, que estariam relacionados ao fenótipo observado, e à síntese de fosfolipídios, aumento de cálcio intracelular e/ou presença de proteína translocadora de fosfolipídios.

Esta última, poderia ser uma flopase (proteína ATP dependente que catalisa o movimento de externalização do fosfolipídio) ou então uma escramblase (proteína cálcio dependente, que catalisa o movimento bidirecional dos fosfolipídios entre as faces da membrana plasmática)⁵⁶.

A nossa hipótese era que seria uma escramblase, pois como descrito, a ligação à anexina V-FITC não é específica à um tipo de fosfolipídio, e sim à presença de cálcio⁶⁵.

Iniciamos a caracterização do DNA contido no Cos 3, e com o DNA extraído e confirmada a superexpressão de ligante à anexina V-FITC, realizamos

o sequenciamento parcial do DNA, ou seja, sintetizamos iniciadores para amplificar os fragmentos gênicos que flanqueiam o sítio em que o fragmento da biblioteca foi clonado no vetor cLHYG.

Após o sequenciamento dessa amostra, iniciamos a localização desse fragmento gênico dentro do genoma total de *Leishmania (L.) mexicana* pois, possui maior proximidade filogenética à *L. (L.) amazonensis*. Essa abordagem foi necessária pela ausência da anotação do genoma de *L. (L.) amazonensis*.

Quando as sequências obtidas foram comparadas com o genoma de *L. (L.) mexicana*, realizamos o alinhamento com o cromossomo 33 desse organismo, disponível no site GeneDB.org, localizando dessa maneira a região cromossômica contida no Cos 3. Com essa região mapeada, realizamos uma varredura dos genes contidos na sequência, e escolhemos 3 genes que poderiam atuar na expressão do fenótipo de ligante de anexina: *abcc8*, *gtp* e *pi4k*.

O gene *abcc8*, possui aproximadamente 6.2 kb, é um gene da superfamília ATP *binding cassette*, família essa descrita desde leveduras até mamíferos. Essa família possui domínios super conservados, é descrita por, em sua grande maioria, catalisar movimento de flopase nos fosfolipídios, ou seja, da face interna da bicamada lipídica da membrana plasmática para a face externa, sendo ATP dependente⁶⁶.

Já o gene *gtp* está relacionado com a apoptose e transdução de sinais principalmente de hormônios. As subunidades de *gtp* ligam-se à membrana via lipídios presentes na mesma. Como esse gene também estava dentro da fração sequenciada do Cos 3, escolhemos também esse alvo⁶².

O gene *pi4k* é o precursor de uma cascata de sinalização contido na espécie de fosfatidilinositol, que tem sido há muito bem caracterizada na literatura, por participar de diversas sinalização no interior da célula⁵⁷.

Após a escolha dos genes, realizamos por PCR a amplificação dos fragmentos gênicos desses alvos *abcc8*, *gtp* e *pi4k*, que foram ligados em vetor pGEM-T easy (figura 9, 45 e 46), porém, após realizar a digestão do fragmento gênico e separá-lo do pGEM-T easy, não obtivemos sucesso na ligação do fragmento gênico no vetor de expressão *shuttle* pSNBR.

Alteramos os iniciadores, para conter um sítio de restrição para enzimas de restrição (para *gtp* e *pi4k* *EcoRI* e *BamHI*, e para *abcc8* *EcoRI* e *HindIII*).

Então quando realizamos a PCR, o fragmento gênico amplificado teria uma espécie de "âncora" que facilitaria a ligação no vetor pSNBR, pois cada extremidade da fita do fragmento gênico tinha um sítio de ligação diferente, e a ligação seria realizada de forma coesiva.

Realizamos a amplificação dos fragmentos gênicos *abcc8* (figura 42) e *gtp* (figura 43), porém, não obtivemos sucesso na ligação em vetor pSNBR, com esses fragmentos. Uma possível explicação é o tamanho final do plasmídeo, uma vez que os fragmentos têm um grande tamanho (*gtp* possui tamanho de 2.5 kb e *abcc8* possui o tamanho aproximado de 6.2 kb), dificultando a transformação de *E. coli*, ou sua manutenção (replicação) na bactéria.

Apresentamos então os dados mostrando que a amplificação do fragmento gênico de *pi4k* (figuras 9 e 10) e a ligação no vetor de expressão pSNBR foi bem-sucedida. Provavelmente, obtivemos sucesso na clonagem de *pi4k* em pSNBR pelo tamanho do fragmento gênico ser 1.8 kb.

O DNA resultante da ligação de *pi4k*- pSNBR foi então transfectado em *L. (L.) amazonensis* e após seleção com pressão do antibiótico neomicina, e seleção em meio de cultura M 199 semissólido, obtivemos 3 clones de *Leishmania* expressando esse gene.

Como obtivemos clones de apenas 1 dos genes contidos no Cos 3, resolvemos adicionar mais duas estratégias no projeto de doutorado, tentando obter informações de como é o mecanismo que exposição de fosfolípidios que leva à infectividade do parasita.

Primeiramente iniciamos a seleção de clones resistentes à miltefosina, uma vez que esse é um antibiótico análogo a PC. A informação era que quando o parasita se torna resistente a este antibiótico, diminuiria de forma significativa a tomada de PC mas, sabidamente, ainda conseguiria obter sucesso na infecção^{67,13}.

Então a nossa hipótese foi que, com a caracterização do perfil de tomada de NBD-lipídios, ligação à anexina V-FITC e sensibilidade aos antibióticos anfotericina B, duramicina e miltefosina, obteríamos informações importantes sobre a relação entre infectividade e exposição de fosfolípidios.

Iniciamos o processo de seleção de mutantes resistentes à miltefosina, e que esses mutantes, após atingirem 128 μ M molar de resistência à miltefosina, ou seja 10 vezes mais resistência que o parasita selvagem (figura 21),

realizamos a seleção de 3 clones, denominados nessa tese como Miltefosina 128. Após a seleção dos clones, retiramos a pressão de miltefosina desses parasitas mutantes durante 3 meses, e ao final do processo selecionamos novamente 3 clones, denominados nessa tese como Miltefosina⁻.

Nossa hipótese foi que o mutante sem a pressão do antibiótico miltefosina, retomaria (não totalmente) o perfil apresentado por parasitas selvagem, o que corroboraria com a informação de que a resistência à miltefosina é gerada de forma heterogênea na população, com mutações pontuais independentes⁶⁸.

Como controle, utilizamos um grupo de promastigota selvagem, mantendo o número de passagens durante esse processo de seleção do mutante miltefosina resistente (28 semanas). Dessa forma, também selecionamos 3 clones, denominados nessa tese como P28. A inclusão desses parasitas, residiram na hipótese que seriam menos infectivos, pois é sabido que parasitas que possuem um número de passagem alta em cultura, isto é, sem passar pelo hospedeiro mamífero (passagens de mais de 7 semanas), apresentam diminuição na infectividade, gerando um bom controle na comparação com parasita selvagem em passagem baixa.

A outra estratégia foi caracterizar um outro tipo de parasita selvagem, este purificado de infecção em macrófagos de linhagem RAW. Esse grupo de parasita foi denominado na tese como P1 RAW. Nossa pergunta nesse ensaio foi qual seria a diferença entre o parasita Selvagem, purificado de camundongos BALB/c em relação ao P1 RAW, purificado de macrófagos de linhagem RAW, ou seja, como seria a manutenção da infectividade de parasita mantidos *in vivo* e *in vitro*, com o enfoque no conteúdo no comportamento dos fosfolipídios.

Iniciamos então a caracterização dos parasitas P1 BALB/c, P28, P1 RAW, Cos 3, vetor cLHYG, vetor pSNBR, *pi4k*-pSNBR, Miltefosina 128 e Miltefosina⁻, analisando os parâmetros: infectividade, ligação à anexina V-FITC, tomada e efluxo de fosfolipídios e sensibilidade a antibióticos, cuja ação envolve esse tipo de moléculas.

5.2 Infectividade e ligação à anexina V

O parasita P1 RAW não apresentou diferença significativa em relação ao parasita P1 BALB/c em relação à infectividade (Figura 33), porém há o aumento

na ligação com anexina V-FITC que de acordo com os nossos resultados obtidos nesta tese não influenciam na infecção *in vitro* de macrófagos da linhagem RAW.

Nos ensaios de ligação à anexina V-FITC observamos que o parasita Cos 3 apresentou perfil semelhante ao *pi4k*-pSNBR (Figuras 4 e 16, respectivamente). Esse resultado fortalece a hipótese de ser o gene *pi4k* responsável pelo perfil de superexpressão de ligação à anexina V-FITC no Cos 3.

Isso pode se dar ao fato de que o gene *pi4k* é o precursor de phosphatidylinositol (4,5) biphosphate [PI(4,5)P₂], que está relacionado regulação de canais iônicos, podendo estar relacionado com aumento de nível de cálcio intracelular, isso pode estar relacionado com o aumento de ligação à anexina V-FITC^{69;70}.

Já o parasita contendo o vetor pSNBR vazio apresentou diminuição de 2% de ligação à anexina V-FITC (Figura 16), o que sugere que o perfil de superexpressão esteja ligado ao gene *pi4k*. Os parasitas P28 e P1 RAW apresentaram o mesmo perfil de ligação à anexina V-FITC e também quando comparados ao vetor pSNBR vazio (Figura 32).

Corroborando com dados da literatura, o parasita Miltefosina 128 (Figura 24), apresentou ligação significativamente superior (22%) à anexina V-FITC^{71,72}. Esses autores que demonstraram que células tratadas com miltefosina apresentam fragmentação de núcleo, maior ligação à anexina V-FITC, ou seja, sinais de células em apoptose. Quando comparado ao parasita Selvagem, o parasita Miltefosina, apresentou um perfil intermediário entre Miltefosina 128 e selvagem (Figura 24).

Quando realizamos os ensaios de infecção de 4, 24 e 48 horas, os parasitas contendo o vetor pSNBR vazio, *pi4k*-pSNBR, ou os parasitas resistentes à miltefosina mantidos sob pressão do antibiótico (Miltefosina 128) (Figuras 17 e 25 respectivamente), apresentaram diminuição significativa na infectividade, quando comparados ao parasita Selvagem.

Já o parasita P28 apresentou uma tendência de diminuição do índice infectividade em 4 horas após a infecção e diminuição significativa em 24 horas, corroborando com os dados da literatura em que o parasita selvagem com várias passagens diminui a infectividade (Figura 25)⁷³.

Os parasitas P1 RAW apresentaram perfil parecido de infectividade, quando comparado aos parasitas P1 BALB/c. (Figura 33). Porém, quando comparamos os parasitas resistentes à miltefosina que foram mantidos sem a pressão do antibiótico Miltefosina⁷⁴, observamos uma maior infectividade quando comparado aos parasitas P1 BALB/c.

Dessa forma, não conseguimos correlacionar a superexpressão de ligantes à anexina V-FITC com aumento de infectividade. Um grupo demonstrou que *L. (L.) amazonensis* expressando ligação à anexina V-FITC apresentavam uma diminuição significativa do índice de infecção em relação ao controle, quando previamente tratadas com anexina V⁷⁴.

Esses resultados sugerem que a *Leishmania* desenvolveu a estratégia de mimetismo apoptótico e a exposição do fosfolípido reconhecido pelo macrófago é muito importante para o estabelecimento da infecção de *Leishmania* nas células do hospedeiro vertebrado. Esse fosfolípido se liga à anexina V-FITC e quando o parasita é previamente tratado com essa proteína, o fosfolípido fica escondido do macrófago, diminuindo a infectividade.

Dessa forma o resultado apresentado nesta tese sugere que, os parasitas Miltefosina 128, não estão em processo de mimetismo apoptótico, mas sim de apoptose. Dessa forma, estão expondo as moléculas necessárias para a fagocitose do macrófago, mas não estabelecem a infecção como observada no parasita selvagem, por estarem em processo de morte celular programada.

Como miltefosina é um análogo de PC, os resultados são um indicativo que este fosfolípido envolvido no reconhecimento do parasita pelo macrófago, ou está envolvido no processo de mimetismo apoptótico.

5.3 Ensaio de tomada de fosfolipídios e NBD-lipídeos

A determinação da velocidade de tomada de fosfolipídios pode indicar quais, e em que grau, são as moléculas que apresentam afinidade por transportadores presentes na membrana plasmática do parasita. Realizamos ensaios com lipídeos-NBD marcados, para determinação dessa velocidade de tomada e também fizemos ensaios com fosfolipídios não marcados, de modo a determinar se havia competição pelo transportador.

Ou seja, quando há disponibilidade de duas espécies de fosfolipídios para a *L. (L.) amazonensis*, qual seria a preferencial para realizar a tomada. Os

ensaios foram todos realizados com amostras de promastigotas em fase estacionária de crescimento à 25°C.

Quando comparamos apenas o ensaio de tomada com NBD-PE, observamos que os parasitas P28 apresentou uma velocidade de tomada, pelo menos 2 vezes maior, quando comparado ao parasita P1 BALB/c (Figura 34). Os parasitas Miltefosina 128, Miltefosina⁻, P1 RAW e Cos 3 (Figuras 30, 34 e 5 respectivamente) apresentaram velocidade similar ao controle selvagem. Os resultados de tomada de NBD-PE corroboram com o publicado, em que a tomada de NBD-PE por *L. (L.) amazonensis* é significativamente inferior à PS e PC (Figura 26 e 27)²⁷.

Quando realizamos os ensaios de tomada de NBD-PS, observamos que apenas os parasitas Miltefosina 128 e Miltefosina⁻ (Figura 29) apresentaram diminuição significativa na velocidade de tomada de NBD-PS quando comparada com o parasita selvagem (aproximadamente 50% de diminuição), o que sugere que o gene associado à resistência à miltefosina, também pode estar associado à tomada de PS, podendo ser uma flipase (proteína ATP dependente responsável pela internalização do fosfolípido da face externa para a interna da bicamada lipídica da membrana plasmática), ou uma escramblase (proteína cálcio dependente, responsável pela translocação bidirecional dos fosfolípidios entre as duas faces da bicamada lipídica da membrana plasmática)⁷⁵.

Correlacionando os ensaios com tomada de NBD-fosfatidilcolina (NBD-PC), observamos que os parasitas Miltefosina 128 e Miltefosina⁻, apresentam uma diminuição significativa de velocidade em relação a todos os outros parasitas (P1 BALB/c, P28, P1 RAW, vetor pSNBR, *pi4k*-pSNBR e Cos 3) o que sugere que o translocador que gera a resistência à miltefosina não seja PC específico, uma vez que os parasitas Miltefosina 128 e Miltefosina⁻, como informado anteriormente, apresentaram diminuição na toma de NBD-PS.

Os parasitas que apresentaram uma tomada significativamente maior de PC, em relação ao controle selvagem foram: vetor pSNBR vazio, *pi4k*-pSNBR e Cos 3. E os parasitas P1 BALB/c, P28 e P1 RAW, apresentaram perfil de tomada de NBD-PC semelhantes.

A correlação dos resultados mostra que mesmo que o parasita apresente menor tomada de PC, pode não apresentar menor infectividade ou menor ligação à anexina V-FITC. Como mencionado anteriormente, os parasitas Miltefosina⁻

apresentaram o maior índice de infecção, o que corrobora com resultados publicados, que apresenta que a presença de células em apoptose, leva a um aumento na infectividade²⁸.

Também conseguimos correlacionar que uma velocidade de tomada de NBD-lipídio maior, quando comparado ao parasita selvagem, leva a uma diminuição da infectividade, como visto nos parasitas vetor pSNBR e *pi4k*-pSNBR.

Os ensaios de competição de tomada de fosfolipídios, de forma geral, demonstraram que PC ou PS quando competem pela tomada de NBD-PC e NBD-PS em *L. (L.) amazonensis*. Curiosamente, quando adicionamos PE não marcado no ensaio de tomada de NBD-PC e NBD-PS, não observamos competição, e sim um aumento na velocidade de tomada, indicando que PE é um facilitador de entrada dos outros fosfolipídios. Esta observação pode ser explicada pelo fato citado de PE possibilitar a formações de poros na membrana, o que facilitaria a entrada dos fosfolipídios marcados⁷⁶.

Quando analisamos os dados de tomada de NBD-PE, observamos que não há aumento dos parasitas quando adicionamos PE não marcado à NBD-PE, porém, observamos aumento significativo, quando adicionamos PS ou PC não marcados. Isso pode se dar ao fato de que PE não é uma molécula estável⁷⁷ e que, quando adicionada outra espécie de fosfolipídio, teria sua estabilidade aumenta, permitindo uma maior tomada por *Leishmania*. Há a discussão também que PE forma estruturas hexagonais e arranjos em forma cônica, ao redor da cavidade aquosa, conformação que prejudica a entrada dessa espécie de fosfolipídio na célula⁷⁷.

Mas como apresentado na figura 28 podemos observar que há a diminuição pela metade na velocidade de tomada de NBD-PC nos parasitas Miltefosina 128, e mesmo assim há uma diminuição significativa no índice de infectividade, quando comparado ao parasita selvagem.

5.4 Ensaio de sensibilidade aos antibióticos

Os ensaios foram realizados para compreender melhor como é a distribuição de PE e ergosterol na membrana dos mutantes, utilizando os antibióticos duramicina e anfotericina B, respectivamente. Também buscávamos

compreender melhor como se dá a sensibilidade à miltefosina em correlação com a tomada do fosfolípido PC.

A anfotericina B é um antifúngico, que se liga preferencialmente à ergosterol. Em *Leishmania*, ergosterol está relacionado à multiplicação dos parasitas, e está em maior concentração na forma promastigota procíclica, ou seja, a fase menos infectiva do parasita⁶³.

Quando comparamos os resultados de sensibilidade aos antibióticos entre os parasitas Miltefosina 128 e selvagem, observamos que os parasitas Miltefosina 128 apresentam 3 vezes mais resistência ao antibiótico anfotericina B (figura 31), corroborando com os resultados em *Leishmania donovani*⁷⁸.

Esse trabalho mostrou que após tratamento com anfotericina B, o ergosterol não foi detectado em preparação de lipídios totais dessa espécie de *Leishmania*. Na literatura, observamos que em *Leishmania*, quando há a diminuição da quantidade de ergosterol na membrana, há o aumento de colesterol. O colesterol está associado à forma promastigota metacíclica, ou seja, a forma infectiva do parasita⁷⁹.

Isso pode ser relacionado, quando os parasitas Miltefosina 128 apresentam maior resistência à anfotericina B. Na literatura encontramos que, quando nocauteado o gene da proteína *heat shock*, há um aumento na atividade de proteínas MDR (*multidrug resistance protein*). As proteínas de *heat shock* são associadas com a proteção dos mRNA quando há a alteração de temperatura entre o hospedeiro invertebrado e vertebrado e também está associada ao processo de diferenciação para fase infectiva do parasita⁸⁰.

O resultado sugere que, quando não há a alteração da temperatura nos parasitas, o gene de choque térmico diminui a sua expressão, corroborando com resultados da literatura^{81;82;83} aumentando assim a expressão de genes de resistência a drogas (por isso o aumento na resistência à miltefosina). Ainda, os níveis de ergosterol estão em concordância aos observados nos parasitas Selvagem, uma vez que apresentam o mesmo IC₅₀.

Esse resultado sugere que os parasitas vetor pSNBR e Miltefosina 128, apresentam maior ligação à anexina V-FITC e menor infectividade, provavelmente pelo fato de realizarem conseguirem entrar no macrófago de linhagem RAW, uma vez que apresentam colesterol na membrana, mas não conseguem se multiplicar com a mesma eficácia que o parasita selvagem.

Consequentemente, há a diminuição no índice de infectividade. Reitera-se que os parasitas contendo o vetor pSNBR vazio apresentam maior resistência à anfotericina B, ou seja, menor quantidade de ergosterol na membrana, mas também apresentam maior velocidade de tomada de PC em relação aos parasitas selvagem. PC está associado à proteção contra a apoptose, e isso pode ser também um indicativo na diminuição da infectividade, quando comparado ao parasita selvagem⁸⁴.

Como esperado, os parasitas Miltefosina 128 e Miltefosina^r apresentam resistência ao antibiótico miltefosina. Os parasitas P1 BALB/c, *pi4k*-pSNBR, P1 RAW, P28, Cos 3 e vetor cLHYG, apresentaram perfil similar entre eles.

Por fim, quando tratados com duramicina, um antibiótico que se liga preferencialmente à PE, os parasitas *pi4k*-pSNBR, Cos 3 e vetor cLHYG apresentaram perfil similar entre eles, quando comparado ao controle selvagem.

Os parasitas Cos 3 e *pi4k*-pSNBR apresentam perfil semelhante em ligação à anexina V-FITC, tomada de NBD-PC, PS, sensibilidade à duramicina entre eles, sugerindo que o gene *pi4k* pode ser implicado no fenótipo observado nos parasitas Cos 3.

5.5 Identificação do fosfolipídio externalizado pela *Leishmania* e reconhecido pelo macrófago para realizar a fagocitose

Nos ensaios de competição entre *Leishmania* e lipossomas construídos com uma única espécie de fosfolipídios, medidos pela entrada no macrófago, ou seja, pelo sucesso na infecção, demonstramos uma diminuição dose-dependente da infectividade quando na presença de lipossomas de PC. Esse tipo de diminuição não foi observado quando a competição se deu com lipossomas contendo PS ou PC:PE (1:1) (Figura 37 F e I, respectivamente).

Quando na presença de lipossomos constituídos por PC, a quantidade de amastigotas por macrófago é igual a aquela determinada na infecção controle, na ausência de lipossomas e também nos parasitas PS e PC:PE (1:1) (Figura 37 D e G). Esse resultado indica que PC não altera a replicação dentro do macrófago, mas sim a entrada do parasita no macrófago, de forma dose dependente (Figura 37 C).

Esse o resultado também pode sugerir que na presença de PC os promastigotas de *L. (L.) amazonensis* perdem o perfil de células em apoptose,

diminuindo assim a quantidade de parasitas fagocitados pelo macrófago. Esse tipo de ação de PC, revertendo um perfil apoptótico já havia sido mostrado em células epiteliais do intestino humano⁸⁴, e também pode ser pelo fato de que há a supressão de PC em células em apoptose⁴².

Como informado anteriormente, relataram que, após a extração de lipídios totais em *Leishmania donovani*, não houve a detecção de PS, porém há a ligação com anexina V. Realizamos a extração de lipídios totais em colaboração com o Prof. Dr. Thomas Günther Pomorski (dados não apresentados) e não foi localizado PS em outras espécies de *Leishmania*, incluindo *L. (L.) amazonensis*²⁴.

No conjunto, diferente do publicado anteriormente⁸⁵, os resultados sugerem que PS não é o fosfolipídio que compete com o macrófago pela entrada do parasita, mas sim, que PE seja o fosfolipídio mais reconhecido pelo macrófago.

Os dados apresentados nessa tese, sugerem que na verdade, o fosfolipídio reconhecido pelo macrófago para realizar a fagocitose é o PE. Como descrito anteriormente, o receptor CD300 presente na membrana de macrófago, reconhece PS e PE, e o vírus da dengue, quando reconhecido por esse receptor, aumenta a infectividade⁸⁶, porém não invalida os resultados apresentados, pois é apenas um fosfolipídio de espécie diferente, que participa da apoptose e também se liga à anexina V-FITC.

Foi demonstrado também que PE é detectado pelo receptor de PS, presente na membrana de macrófago que se liga à PE, em ensaios com o vírus ebola⁸⁷. Outros autores já apresentaram resultados comprovando que células em apoptose apresentavam externalização de PS e também PE⁸⁸.

6. Conclusões

- 1- A *L. (L.) amazonensis* apresenta maior velocidade de internalização de PC e, quando tratada com esse fosfolipídio, apresenta menor índice de infectividade em macrófagos RAW;
- 2- PS e PE são os fosfolipídeos que apresentam menor velocidade de tomada de *L. (L.) amazonensis*, sendo que PE é o menor quando comparado à PS, porém, quando há a presença de PC ou PS, há o aumento de tomada de PE por *L. (L.) amazonensis*;
- 3- Os mutantes resistentes à miltefosina com pressão e sem pressão da droga, apresentam menor velocidade de tomada de PC e PS; maior ligação à anexina V-FITC; maior resistência à anfotericina B e menor resistência à duramicina quando comparado ao parasita selvagem;
- 4- O parasita contendo o plasmídeo pSNBR-*pi4k* apresentou fenótipos similares ao parasita Cos 3, o que sugere que o gene *pi4k* é um forte candidato ao aumento da ligação à anexina V-FITC, observado inicialmente;
- 5- Caso não apresente equilíbrio na distribuição entre ergosterol e colesterol, a *Leishmania* apresenta infectividade de capacidade de multiplicação diminuídas, fatores importantes para obter sucesso na infecção de células no hospedeiro vertebrado;
- 6- Os fosfolipídios PE e PC, são importantes no estabelecimento da infecção de *L. (L.) amazonensis* no macrófago. PE é provavelmente responsável pela resposta não inflamatória do hospedeiro vertebrado, e PC impede o parasita de apresentar um perfil apoptótico.

7. Referências Bibliográficas

- ¹ROSS, R. FURTHER NOTES ON LEISHMAN'S BODIES. **Br Med J**, v. 2, n. 2239, p. 1401, Nov 1903. ISSN 0007-1447. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20761210> >.
- ²ROSS, R. NOTE ON THE BODIES RECENTLY DESCRIBED BY LEISHMAN AND DONOVAN. **Br Med J**, v. 2, n. 2237, p. 1261-2, Nov 1903. ISSN 0007-1447. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20761169> >.
- ³VAN ZANDBERGEN, G. et al. Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 37, p. 13837-42, Sep 2006. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16945916> >.
- ⁴ZUCKERMAN, A. **Leishmania**. LAINSON, R. Parasitic Protozoa: 57-133 p. 1977.
- ⁵CHANG, K. P.; FONG, D. Cell biology of host-parasite membrane interactions in leishmaniasis. **Ciba Found Symp**, v. 99, p. 113-37, 1983. ISSN 0300-5208. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6357669> >.
- ⁶KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 8, p. 604-15, Jul 2011. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21747391> >.
- ⁷MURRAY, H. W.; CARTELLI, D. M. Killing of intracellular Leishmania donovani by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -independent leishmanicidal activity. **J Clin Invest**, v. 72, n. 1, p. 32-44, Jul 1983. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6308049> >.
- ⁸MURRAY, H. W.; NATHAN, C. F. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral Leishmania donovani. **J Exp Med**, v. 189, n. 4, p. 741-6, Feb 1999. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9989990> >.
- ⁹MENON, J. N.; BRETSCHER, P. A. Parasite dose determines the Th1/Th2 nature of the response to Leishmania major independently of infection route and strain of host or parasite. **Eur J Immunol**, v. 28, n. 12, p. 4020-8, Dec 1998. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9862338> >.
- ¹⁰LAINSON, R. **The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy.** Rev Pan-Amaz Saude 13-32 p. 2010.

- ¹¹SCHERF, H. R. et al. Therapeutic activity of ET-18-OCH₃ and hexadecylphosphocholine against mammary tumors in BD-VI rats. **Lipids**, v. 22, n. 11, p. 927-9, Nov 1987. ISSN 0024-4201. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3444387> >.
- ¹²MUSCHIOLO, C. et al. Alkyl phosphocholines: toxicity and anticancer properties. **Lipids**, v. 22, n. 11, p. 930-4, Nov 1987. ISSN 0024-4201. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3444388> >.
- ¹³FERNANDEZ-PRADA, C. et al. Different Mutations in a P-type ATPase Transporter in Leishmania Parasites are Associated with Cross-resistance to Two Leading Drugs by Distinct Mechanisms. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 12, p. e0005171, Dec 2016. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27911896> >.
- ¹⁴PINTO-MARTINEZ, A. K. et al. Mechanism of Action of Miltefosine on Leishmania donovani Involves the Impairment of Acidocalcisome Function and the Activation of the Sphingosine-Dependent Plasma Membrane Ca. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 62, n. 1, Jan 2018. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29061745> >.
- ¹⁵MISHRA, J.; SINGH, S. Miltefosine resistance in Leishmania donovani involves suppression of oxidative stress-induced programmed cell death. **Exp Parasitol**, v. 135, n. 2, p. 397-406, Oct 2013. ISSN 1090-2449. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23968687> >.
- ¹⁶HEFNAWY, A. et al. Exploiting Knowledge on Leishmania Drug Resistance to Support the Quest for New Drugs. **Trends Parasitol**, v. 33, n. 3, p. 162-174, Mar 2017. ISSN 1471-5007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27993477> >.
- ¹⁷RAKOTOMANGA, M.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M.; LOISEAU, P. M. Alteration of fatty acid and sterol metabolism in miltefosine-resistant Leishmania donovani promastigotes and consequences for drug-membrane interactions. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 7, p. 2677-86, Jul 2005. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15980336> >.
- ¹⁸WORTMANN, G. et al. Liposomal amphotericin B for treatment of cutaneous leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 83, n. 5, p. 1028-33, Nov 2010. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21036832> >.
- ¹⁹YUAN, X. et al. Necrotic cells induce nonadherent peritoneal exudate cells to proliferate and differentiate into macrophage-like cells. **Immunol Invest**, v. 42, n. 7, p. 623-38, 2013. ISSN 1532-4311. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24004060> >.
- ²⁰CHAZAUD, B. Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration. **Immunobiology**, v. 219, n. 3, p. 172-8, Mar 2014. ISSN 1878-3279. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24080029> >.

- ²¹LÓPEZ-FERNÁNDEZ, M. P.; MALDONADO, S. Programmed cell death in seeds of angiosperms. **J Integr Plant Biol**, v. 57, n. 12, p. 996-1002, Dec 2015. ISSN 1744-7909. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25953251> >.
- ²²GOLDAR, S. et al. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 16, n. 6, p. 2129-44, 2015. ISSN 2476-762X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25824729> >.
- ²³LEE, N. et al. Characterization of metacaspases with trypsin-like activity and their putative role in programmed cell death in the protozoan parasite Leishmania. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 10, p. 1745-57, Oct 2007. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17715367> >.
- ²⁴WEINGÄRTNER, A. et al. Leishmania promastigotes lack phosphatidylserine but bind annexin V upon permeabilization or miltefosine treatment. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e42070, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22870283> >.
- ²⁵CRAUWELS, P. et al. Apoptotic-like Leishmania exploit the host's autophagy machinery to reduce T-cell-mediated parasite elimination. **Autophagy**, v. 11, n. 2, p. 285-97, 2015. ISSN 1554-8635. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25801301> >.
- ²⁶DAMATA, J. P. et al. Distinct Macrophage Fates after in vitro Infection with Different Species of Leishmania: Induction of Apoptosis by Leishmania (Leishmania) amazonensis, but Not by Leishmania (Viannia) guyanensis. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0141196, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26513474> >.
- ²⁷DOS SANTOS, M. G. et al. Transbilayer dynamics of phospholipids in the plasma membrane of the Leishmania genus. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e55604, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23383240> >.
- ²⁸WANDERLEY, J. L. et al. Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of Leishmaniasis. **PLoS One**, v. 4, n. 5, p. e5733, May 2009. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19478944> >.
- ²⁹WANDERLEY, J. L.; BARCINSKI, M. A. Apoptosis and apoptotic mimicry: the Leishmania connection. **Cell Mol Life Sci**, v. 67, n. 10, p. 1653-9, May 2010. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20140747> >.
- ³⁰SAVILL, J.; FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 784-8, Oct 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11048729> >.

- ³¹VAUX, D. L.; KORSMEYER, S. J. Cell death in development. **Cell**, v. 96, n. 2, p. 245-54, Jan 1999. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9988219> >.
- ³²TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 3, p. 231-41, Mar 2008. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18073771> >.
- ³³MCGILL, G. et al. Loss of matrix adhesion triggers rapid transformation-selective apoptosis in fibroblasts. **J Cell Biol**, v. 138, n. 4, p. 901-11, Aug 1997. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9265655> >.
- ³⁴BRATTON, D. L. et al. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. **J Biol Chem**, v. 272, n. 42, p. 26159-65, Oct 1997. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9334182> >.
- ³⁵BOUSTEAD, C. M.; BROWN, R.; WALKER, J. H. Isolation, characterization and localization of annexin V from chicken liver. **Biochem J**, v. 291 (Pt 2), p. 601-8, Apr 1993. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8484740> >.
- ³⁶QIU, M. et al. JS-K promotes apoptosis by inducing ROS production in human prostate cancer cells. **Oncol Lett**, v. 13, n. 3, p. 1137-1142, Mar 2017. ISSN 1792-1074. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28454225> >.
- ³⁷SUN, P. C. et al. Suberoylanilide hydroxamic acid induces apoptosis and sub-G1 arrest of 320 HSR colon cancer cells. **J Biomed Sci**, v. 17, p. 76, Sep 2010. ISSN 1423-0127. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20846458> >.
- ³⁸KOOPMAN, G. et al. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**, v. 84, n. 5, p. 1415-20, Sep 1994. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8068938> >.
- ³⁹STRAHL, H.; ERRINGTON, J. Bacterial Membranes: Structure, Domains, and Function. **Annu Rev Microbiol**, v. 71, p. 519-538, Sep 2017. ISSN 1545-3251. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28697671> >.
- ⁴⁰HONSHO, M.; ABE, Y.; FUJIKI, Y. Plasmalogen biosynthesis is spatiotemporally regulated by sensing plasmalogens in the inner leaflet of plasma membranes. **Sci Rep**, v. 7, p. 43936, Mar 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28272479> >.

- ⁴¹TRIPISCIANO, C. et al. Different Potential of Extracellular Vesicles to Support Thrombin Generation: Contributions of Phosphatidylserine, Tissue Factor, and Cellular Origin. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 6522, Jul 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28747771> >.
- ⁴²MORTON, C. C. et al. A mechanism for suppression of the CDP-choline pathway during apoptosis. **J Lipid Res**, v. 54, n. 12, p. 3373-84, Dec 2013. ISSN 1539-7262. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24136823> >.
- ⁴³DALEKE, D. L.; LYLES, J. V. Identification and purification of aminophospholipid flippases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1486, n. 1, p. 108-27, Jun 2000. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10856717> >.
- ⁴⁴POMORSKI, T.; MENON, A. K. Lipid flippases and their biological functions. **Cell Mol Life Sci**, v. 63, n. 24, p. 2908-21, Dec 2006. ISSN 1420-682X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17103115> >.
- ⁴⁵SMITH, J. D. et al. Evaluation of the role of phosphatidylserine translocase activity in ABCA1-mediated lipid efflux. **J Biol Chem**, v. 277, n. 20, p. 17797-803, May 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11893753> >.
- ⁴⁶WOEHLECKE, H. et al. Enhanced exposure of phosphatidylserine in human gastric carcinoma cells overexpressing the half-size ABC transporter BCRP (ABCG2). **Biochem J**, v. 376, n. Pt 2, p. 489-95, Dec 2003. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12946267> >.
- ⁴⁷ARAÚJO-SANTOS, J. M. et al. The overexpression of an intracellular ABCA-like transporter alters phospholipid trafficking in Leishmania. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 330, n. 1, p. 349-55, Apr 2005. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15781271> >.
- ⁴⁸WILLIAMSON, P.; SCHLEGEL, R. A. Transbilayer phospholipid movement and the clearance of apoptotic cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1585, n. 2-3, p. 53-63, Dec 2002. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12531537> >.
- ⁴⁹POMORSKI, T. et al. Tracking down lipid flippases and their biological functions. **J Cell Sci**, v. 117, n. Pt 6, p. 805-13, Feb 2004. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14963021> >.
- ⁵⁰DE FREITAS BALANCO, J. M. et al. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. **Curr Biol**, v. 11, n. 23, p. 1870-3, Nov 2001. ISSN 0960-9822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11728310> >.

- ⁵¹DOS SANTOS, M. G. et al. Biochemical characterization of serine transport in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 163, n. 2, p. 107-13, Feb 2009. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19041672> >.
- ⁵²VANCE, J. E. Eukaryotic lipid-biosynthetic enzymes: the same but not the same. **Trends Biochem Sci**, v. 23, n. 11, p. 423-8, Nov 1998. ISSN 0968-0004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9852760> >.
- ⁵³RYAN, K. A.; DASGUPTA, S.; BEVERLEY, S. M. Shuttle cosmid vectors for the trypanosomatid parasite *Leishmania*. **Gene**, v. 131, n. 1, p. 145-50, Sep 1993. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8370535> >.
- ⁵⁴CALLAHAN, H. L.; BEVERLEY, S. M. Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in *Leishmania*. **J Biol Chem**, v. 266, n. 28, p. 18427-30, Oct 1991. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1680861> >.
- ⁵⁵ULIANA, S. R. et al. *Leishmania*: overexpression and comparative structural analysis of the stage-regulated meta 1 gene. **Exp Parasitol**, v. 92, n. 3, p. 183-91, Jul 1999. ISSN 0014-4894. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10403759> >.
- ⁵⁶POMORSKI, T. G.; MENON, A. K. Lipid somersaults: Uncovering the mechanisms of protein-mediated lipid flipping. **Prog Lipid Res**, v. 64, p. 69-84, 10 2016. ISSN 1873-2194. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27528189> >.
- ⁵⁷BROWN, J. R.; AUGER, K. R. Phylogenomics of phosphoinositide lipid kinases: perspectives on the evolution of second messenger signaling and drug discovery. **BMC Evol Biol**, v. 11, p. 4, Jan 2011. ISSN 1471-2148. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21208444> >.
- ⁵⁸REAL, F. et al. The genome sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: functional annotation and extended analysis of gene models. **DNA Res**, v. 20, n. 6, p. 567-81, Dec 2013. ISSN 1756-1663. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23857904> >.
- ⁵⁹ELLENS, H.; BENTZ, J.; SZOKA, F. C. Destabilization of phosphatidylethanolamine liposomes at the hexagonal phase transition temperature. **Biochemistry**, v. 25, n. 2, p. 285-94, Jan 1986. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3954998> >.
- ⁶⁰GONZÁLEZ-PACHECO, H. et al. Pre-conditioning with CDP-choline attenuates oxidative stress-induced cardiac myocyte death in a hypoxia/reperfusion model. **ScientificWorldJournal**, v. 2014, p. 187071, 2014. ISSN 1537-744X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24578622> >.

- ⁶¹DABROWSKI, M.; TARASOV, A.; ASHCROFT, F. M. Mapping the architecture of the ATP-binding site of the KATP channel subunit Kir6.2. **J Physiol**, v. 557, n. Pt 2, p. 347-54, Jun 2004. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15004210> >.
- ⁶²KJELDGAARD, M.; NYBORG, J.; CLARK, B. F. The GTP binding motif: variations on a theme. **FASEB J**, v. 10, n. 12, p. 1347-68, Oct 1996. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8903506> >.
- ⁶³DA SILVA, R.; SACKS, D. L. Metacyclogenesis is a major determinant of Leishmania promastigote virulence and attenuation. **Infect Immun**, v. 55, n. 11, p. 2802-6, Nov 1987. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3666964> >.
- ⁶⁴STERKERS, Y. et al. Novel insights into genome plasticity in Eukaryotes: mosaic aneuploidy in Leishmania. **Mol Microbiol**, v. 86, n. 1, p. 15-23, Oct 2012. ISSN 1365-2958. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22857263> >.
- ⁶⁵WEINGÄRTNER, A. et al. Ca²⁺-activated transbilayer movement of plasma membrane phospholipids in Leishmania donovani during ionomycin or thapsigargin stimulation. **Mol Biochem Parasitol**, v. 179, n. 2, p. 59-68, Oct 2011. ISSN 1872-9428. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21684309> >.
- ⁶⁶DEAN, M.; ANNILO, T. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v. 6, p. 123-42, 2005. ISSN 1527-8204. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16124856> >.
- ⁶⁷PÉREZ-VICTORIA, F. J. et al. Phospholipid translocation and miltefosine potency require both L. donovani miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in Leishmania parasites. **J Biol Chem**, v. 281, n. 33, p. 23766-75, Aug 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16785229> >.
- ⁶⁸COELHO, A. C. et al. Multiple mutations in heterogeneous miltefosine-resistant Leishmania major population as determined by whole genome sequencing. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 2, p. e1512, 2012. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22348164> >.
- ⁶⁹BAUMLOVA, A.; GREGOR, J.; BOURA, E. The structural basis for calcium inhibition of lipid kinase PI4K IIalpha and comparison with the apo state. **Physiol Res**, v. 65, n. 6, p. 987-993, Dec 2016. ISSN 1802-9973. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27539108> >.

- ⁷⁰PRITCHARD, H. A. et al. Inhibitory role of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on TMEM16A-encoded calcium-activated chloride channels in rat pulmonary artery. **Br J Pharmacol**, v. 171, n. 18, p. 4311-21, Sep 2014. ISSN 1476-5381. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24834965> >.
- ⁷¹PARIS, C. et al. Miltefosine induces apoptosis-like death in Leishmania donovani promastigotes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 3, p. 852-9, Mar 2004. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14982775> >.
- ⁷²MARINHO, F. E. A. et al. Miltefosine induces programmed cell death in Leishmania amazonensis promastigotes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 507-9, Jun 2011. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21739043> >.
- ⁷³MOREIRA, D. et al. Impact of continuous axenic cultivation in Leishmania infantum virulence. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 1, p. e1469, Jan 2012. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22292094> >.
- ⁷⁴WANDERLEY, J. L. et al. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of Leishmania (L) amazonensis in mammalian hosts. **J Immunol**, v. 176, n. 3, p. 1834-9, Feb 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16424214> >.
- ⁷⁵LOPEZ-MARQUES, R. L. et al. P4-ATPases: lipid flippases in cell membranes. **Pflugers Arch**, v. 466, n. 7, p. 1227-40, Jul 2014. ISSN 1432-2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24077738> >.
- ⁷⁶LEITE, N. B. et al. PE and PS Lipids Synergistically Enhance Membrane Poration by a Peptide with Anticancer Properties. **Biophys J**, v. 109, n. 5, p. 936-47, Sep 2015. ISSN 1542-0086. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26331251> >.
- ⁷⁷YEAGLE, P. L.; SEN, A. Hydration and the lamellar to hexagonal II phase transition of phosphatidylethanolamine. **Biochemistry**, v. 25, n. 23, p. 7518-22, Nov 1986. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3801431> >.
- ⁷⁸DEEP, D. K. et al. Increased miltefosine tolerance in clinical isolates of Leishmania donovani is associated with reduced drug accumulation, increased infectivity and resistance to oxidative stress. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 6, p. e0005641, Jun 2017. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28575060> >.

- ⁷⁹PUCADYIL, T. J. et al. Cholesterol is required for Leishmania donovani infection: implications in leishmaniasis. **Mol Biochem Parasitol**, v. 133, n. 2, p. 145-52, Feb 2004. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14698427> >.
- ⁸⁰KRISHNAMURTHY, K. et al. Heat shock factor-1 knockout induces multidrug resistance gene, MDR1b, and enhances P-glycoprotein (ABCB1)-based drug extrusion in the heart. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 23, p. 9023-8, Jun 2012. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22615365> >.
- ⁸¹LARRETA, R. et al. The expression of HSP83 genes in Leishmania infantum is affected by temperature and by stage-differentiation and is regulated at the levels of mRNA stability and translation. **BMC Mol Biol**, v. 5, p. 3, Jun 2004. ISSN 1471-2199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15176985> >.
- ⁸²WIESGIGL, M.; CLOS, J. The heat shock protein 90 of Leishmania donovani. **Med Microbiol Immunol**, v. 190, n. 1-2, p. 27-31, Nov 2001. ISSN 0300-8584. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11770104> >.
- ⁸³MORALES, M. A. et al. Phosphoproteome dynamics reveal heat-shock protein complexes specific to the Leishmania donovani infectious stage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 18, p. 8381-6, May 2010. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20404152> >.
- ⁸⁴LEUCHT, K. et al. Sphingomyelin and phosphatidylcholine contrarily affect the induction of apoptosis in intestinal epithelial cells. **Mol Nutr Food Res**, v. 58, n. 4, p. 782-98, Apr 2014. ISSN 1613-4133. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24142587> >.
- ⁸⁵WANDERLEY, J. L. M. et al. Phosphatidylserine exposure on the surface of Leishmania amazonensis amastigotes modulates in vivo infection and dendritic cell function. **Parasite Immunol**, v. 35, n. 3-4, p. 109-119, 2013 Mar-Apr 2013. ISSN 1365-3024. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23163958> >.
- ⁸⁶CARNEC, X. et al. The Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine Receptor CD300a Binds Dengue Virus and Enhances Infection. **J Virol**, v. 90, n. 1, p. 92-102, Oct 2015. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26468529> >.
- ⁸⁷RICHARD, A. S. et al. Virion-associated phosphatidylethanolamine promotes TIM1-mediated infection by Ebola, dengue, and West Nile viruses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 47, p. 14682-7, Nov 2015. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26575624> >.
- ⁸⁸EMOTO, K. et al. Exposure of phosphatidylethanolamine on the surface of apoptotic cells. **Exp Cell Res**, v. 232, n. 2, p. 430-4, May 1997. ISSN 0014-4827. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9168822> >.