

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia – Instituto de  
Ciências Biológicas**

Luiza Valença Barreto

**CITÓLISE MEDIADA POR LIPÍDEOS DE *LEISHMANIA (LEISHMANIA)*  
*AMAZONENSIS*: indícios da formação de poros mediada por  
lisofosfatidilcolinas e seu envolvimento na invasão celular por promastigotas**

Belo Horizonte  
2020

Luiza Valença Barreto

**CITÓLISE MEDIADA POR LIPÍDEOS DE *LEISHMANIA (LEISHMANIA)*  
*AMAZONENSIS*: indícios da formação de poros mediada por  
lisofosfatidilcolinas e seu envolvimento na invasão celular por promastigotas**

Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Dra. Maria de Fátima Martins  
Horta

Co-orientador: Dr. Thiago de Castro Gomes

Belo Horizonte  
2020

043 Barreto, Luiza Valença.  
Citólise mediada por lipídeos de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*:  
indícios da formação de poros mediada por lisofosfatidilcolinas e seu  
envolvimento na invasão celular por promastigotas [manuscrito] / Luiza Valença  
Barreto. – 2020.  
78 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadores: Dra. Maria de Fátima Martins Horta. Dr. Thiago de Castro  
Gomes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de  
Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. *Leishmania*. 3. Morte Celular. 4.  
Lisofosfatidilcolinas. I. Horta, Maria de Fátima Martins. II. Gomes, Thiago de  
Castro. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências  
Biológicas. IV. Título.

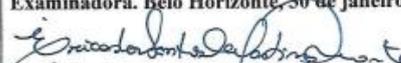
CDU: 577.1



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado DE LUIZA VALENÇA BARRETO. Aos trinta dias do mês de janeiro de 2020 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "'Citólise mediada por lipídeos de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: indícios da formação de poros mediada por lisofosfatidilcolinas e seu envolvimento na invasão celular por promastigotas"', requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Maria de Fátima Martins Horta, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Érika Martins Duarte (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Artur Santos Miranda (Universidade Federal do Estado de São Paulo), aprovada; Dr. Thiago de Castro Gomes - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Maria de Fátima Martins Horta - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA  
 REPROVADA

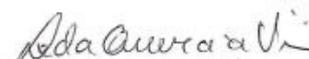
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 30 de janeiro de 2020.

  
 Dr. Érika Martins Duarte (UFMG)

  
 Dr. Artur Santos Miranda (Universidade Federal do Estado de São Paulo)

  
 Dr. Thiago de Castro Gomes - Coorientador (UFMG)

  
 Dr. Maria de Fátima Martins Horta - Orientadora (UFMG)

  
 Adilson de Almeida  
 Instituto de Biologia Roberto Alcântara da Universidade Federal de Minas Gerais  
 Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha - Belo Horizonte - MG  
 31270-901 - Belo Horizonte - MG  
 (31) 3409-2615

*Dedico este trabalho aos meus pais, por acreditarem que sou uma cientista, por serem professores e por terem me dado todo o suporte e condição para que eu pudesse realizar este trabalho.*

Este trabalho recebeu auxílio financeiro das seguintes instituições: **CAPES – CNPq**  
**– FAPEMIG**

## **AGRADECIMENTOS**

Bom, não sei por onde exatamente começar, pois são várias as pessoas que me ajudaram neste processo e neste trabalho, foram muitos percalços e hoje consigo me sentir grata por ter chegado até aqui. Então, primeiramente, agradeço à Professora Dra. *Maria de Fátima Horta, Patiu*, que me acolheu quando eu bati em seu laboratório, quando eu apenas queria um estágio pra ter alguma experiência e tentar o mestrado. Dispôs-se a me orientar, mesmo eu não tendo naquela época, experiência com laboratório de pesquisa científica. Mais do que isso, foi uma espécie de mãe, amiga, boa ouvinte, capaz de entender meus anseios e responder a meus questionamentos. *Patiu*, sem sombras de dúvidas é uma das melhores professoras deste departamento que sabe ter e manter relação aluno/orientador. Agradeço especialmente por sempre me lembrar (das vezes que eu não acreditava), que eu era pertencente a esse lugar, ao laboratório, à pós-graduação, à UFMG. Agradeço pela sua humanidade de entender que precisamos de tempo, que precisamos de férias e que precisamos cuidar da nossa saúde. Agradeço por me deixar independente para que eu aprendesse a criar disciplina, a caminhar sozinha e ter rotinas, entendeu que, assim como ela, somos da noite e as últimas a sair do laboratório.

Sou grata também ao Professor *Thiago Gastro Gomes, Thíthi*, meu segundo orientador que embarcou nesse projeto, realizando mil coisas ao mesmo tempo e ainda assim, pode me ensinar vários experimentos, ensinar filtrar meio, a olhar se as células e *leishmanias* estavam boas, devo quase tudo desta parte prática a você (e teórica também). *Thiago*, além de ser um excelente orientador, tem as convicções políticas e ideológicas parecidas com as minhas (no surprise). E, no meio do caos, e muita das vezes do desânimo, ele, com toda sua energia e acelerado do jeito que é, punha a gente pra frente. Nós acreditamos que fazer ciência é o que pode nos levantar e levantar esse país.

Como deixar de agradecer às minhas meninas *Anna Luiza da Silva Moreira, Mariana Costa Reginaldo e Thamires Queiroz de Oliveira*, que sempre estiveram

dispostas a ajudar, colaborar e doar parte do seu tempo e ainda tomar café na Hildinha; meninas vocês brilham muito. Agradeço ao *Elimar Faria, Eli*, por ser um doce de pessoa, simples, excelente profissional, um ombro amigo e que, em várias das tardes, compartilhávamos histórias, experiências e sabedoria de vida. Orgulho-me e sinto satisfeita de ter feito parte desse grupo.

Agradeço à *Paula Rhana Queiroz Araújo* e ao Professor *Jader dos Santos Cruz*, que colaboram com o nosso grupo em experimentos que me deram base pra entender muita coisa. *Paulinha*, obrigada por toda a paciência de me explicar por diversas vezes como funcionava o aparelho que realizava o *pacth-clamp*.

Quero agradecer a todos os meus colegas e amigos do curso de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia, com quem compartilhei o desespero de ter quatrocentos mil artigos para ler e seminários para apresentar, mas também algumas cervejas geladas na sexta-feira, no decorrer da disciplina de Bases Moleculares.

Bom, agora vão os agradecimentos às pessoas que não estavam diretamente ligadas a este trabalho, mas foram fundamentais na minha caminhada. Agradeço imensamente a minha mãe, *Claudia Maria Jacobis* por todo seu amor, carinho e compreensão, quando eu decidi não trabalhar para estudar para o mestrado, por entender minhas escolhas, por me dar meu sustento, igualmente ao meu pai, *Mauricio Valença Barreto* que, por morarmos longe, me trouxe inúmeras vezes para a UFMG e ainda me ajudou com o inglês para que eu pudesse me aperfeiçoar mais, gratidão que não cabe em uma vida.

Agradeço aos meus amigos, *Augusto Cavalcante, Dolores Maria, Marina Goulart, Mateus Lara* e *Werik Gonçalves*, por me apoiarem incondicionalmente, por aguentarem a barra e o ouvido nos desabafos, pelos não de às vezes não poder sair e por eu poder compartilhar os momentos mais felizes da vida com vocês.

Por último, não menos importantes, agradeço, aos Orixás que me regem, que me sustentaram e me sustentam até hoje, especialmente a Yemanjá, Odociaba.

*“Along the way*

*In this great future, you can't forget your past*

*So dry your tears, I said*

*No, woman, no cry”*

**BOB MARLEY**

## RESUMO

Trabalhos anteriores do nosso grupo descreveram e caracterizaram uma atividade citolítica, cujo mecanismo é por formação de poros na membrana de células-alvo, tendo a molécula responsável por esta atividade sido denominada leishporina. Embora já tenham sido determinadas várias características da leishporina, a identidade molecular desta citolisina ainda permanece desconhecida. Trabalhos anteriores, também do nosso grupo, mostraram que lisofosfatidilcolinas (LPCs) purificadas a partir de extratos de promastigotas possuem atividade citolítica. No presente trabalho, estudamos a atividade citolítica de lipídeos de promastigotas de *Leishmania amazonensis*, na tentativa de contribuir para a identificação da leishporina e na confirmação desse mecanismo na lise mediada por lipídeos. Assim, demonstramos que extratos lipídicos (ext-lip) de promastigotas de *L. amazonensis*, totalmente destituídos de proteínas, são citolíticos, lisando hemácias humanas. Verificamos que ext-lip detêm toda a atividade hemolítica presente no extrato total (ext-t) e no extrato de membranas (ext-m) de promastigotas, sugerindo que os lipídeos são os responsáveis pela formação de poros e que a fração proteica não possui atividade hemolítica. Esses resultados foram corroborados pelo fato de que o perfil de atividade hemolítica dos ext-lip durante os dias de cultivo de promastigotas *in vitro* segue o mesmo perfil da atividade dos ext-t e ext-m.. Confirmando resultados anteriores, verificamos que ext-t e ext-m são termolábeis, sugerindo a participação de proteínas na atividade hemolítica ou em sua regulação, enquanto os lipídeos hemolíticos são, como esperado, termorresistentes. Isto nos fez hipotetizar que a leishporina seja um complexo lipoproteico, cuja parte lipídica seja a responsável pela atividade formadora de poro ou que alguma proteína do ext-t ou ext-m, seja importante para a formação de poros quando na presença do lipídeo lítico. Um achado importante foi à demonstração que a hemólise mediada por ext-lip de promastigotas é do tipo colóido-osmótica, sugerindo fortemente que o mecanismo de hemólise pelos lipídeos totais do parasito seja por formação de poros, e corroborando achados anteriores de que a hemólise mediada por LPCs purificados é do tipo colóido-osmótica. Sabendo que fosfolipases do tipo A são as enzimas responsáveis pela síntese de LPCs, utilizamos o inibidor de Rosenthal, que inibe fosfolipases A1 e A2, na cultura de promastigotas. Demonstramos que ext-t de

promastigotas assim tratadas perde totalmente sua atividade hemolítica. Esses resultados sugerem assim que os LPCs são, de fato, a leishporina. Utilizando promastigotas tratadas ou não com o inibidor de Rosenthal, verificamos ainda que os parasitos sem atividade hemolítica são menos invasivos para macrófagos ou fibroblastos do que os parasitas hemolíticos, sugerindo que a leishporina seja importante no processo de invasão de células fagocíticas e não fagocíticas pelos parasitos. A obtenção desse fenótipo de promastigotas, totalmente destituído de atividade citolítica, foi um passo importante para estudos futuros da função da leishporina.

Palavras-chaves: *Leishmania amazonensis*, leishporina, citólise.

## ABSTRACT

Previous work by our group have described and characterized a cytolytic activity, whose mechanism is by pore formation in the membrane of target cells, the molecule responsible for this activity being called leishporin. Although several features of leishporin have already been determined, the molecular identity of this cytolytic is still unknown. Previous work, also from our group, has shown that lysophosphatidylcholines (LPCs) purified from extracts of promastigotes are lytic. In the present work, we have studied the cytolytic activity of lipids from *Leishmania amazonensis* promastigotes, in an attempt to contribute to the identification of leishporin and the confirmation of this mechanism in lipid-mediated lysis. We have thus demonstrated that lipid extracts (ext-lip) of *L. amazonensis* promastigotes, totally devoid of proteins, are cytolytic, lysing human red blood cells. We found that ext-lip retain all the hemolytic activity present in the total extract (ext-t) and in the membrane extract (ext-m) of promastigotes, suggesting that lipids are responsible for the formation of pores and that the protein fraction lacks hemolytic activity. These results were corroborated by the fact that the profile of hemolytic activity of ext-lip during the days of cultivation of promastigotes *in vitro* follows the same profile of the activity of ext-t and ext-m. Confirming previous results, we have verified that ext-t and ext-m are thermolabile, suggesting the participation of proteins in hemolytic activity or in its regulation, while hemolytic lipids are, as expected, thermoresistant. This made us hypothesize that leishporin is a lipoprotein complex, the lipid part of which is responsible for the pore-forming activity or that some ext-t or ext-m protein is important for the formation of pores when in the presence of lytic lipid. An important finding was the demonstration that ext-m-mediated hemolysis of promastigotes is colloid-osmotic, strongly suggesting that the mechanism of hemolysis by the total lipids of the parasite is by pore formation, and corroborating previous findings that purified LPCs-mediated hemolysis is colloid-osmotic. Knowing that type A phospholipases are the enzymes responsible for the synthesis of LPCs, we have used the Rosenthal's inhibitor, which inhibits phospholipases A1 and A2, in the promastigotes culture. We have demonstrated that ext-t of treated promastigotes entirely lose its hemolytic activity. These results thus suggest that LPCs are, in fact, leishporin. Using promastigotes treated or not with Rosenthal inhibitor, we have also found that parasites without hemolytic activity are less invasive for macrophages or

fibroblasts than hemolytic parasites, suggesting that leishporin is important in the process of phagocytic and non-phagocytic cell invasion by the parasites. Obtaining this phenotype of promastigotes, completely devoid of cytolytic activity, was an important step for future studies of leishporin function.

Keywords: *Leishmania amazonensis*, leishporin, cytolysin.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**BSA** - Albumina de Soro Bovino

**CHAPS** – (3-[(3-cholamidopropil)-dimentilamonio]-1propano-sulfonato)

**CDC** - citolisina dependentes de colesterol

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**DOPC** – Dioleifosfatidilcolina

**DPPC** – Dipalmitoifosfatidilcolina

**Ext-I** - Extrato solubilizado da fração de lipídeos do parasito

**Ext-m** - Extrato solubilizado da fração de membrana do parasito

**Ext-t** – Extrato solubilizado da fração total do parasito

**kDa** – quiloDalton

**LAMP** - lysosome-associated membrane protein

**LPCs** – Lisofosfatidilcolina – Lisofosfolípídeo - Lisofosfolípídeo de colina

**MAC** – Complexo ataque à membrana

**MACPF** – Complexo de ataque a membrana e perforina

**MEF** – Mouse Embryonic Fibroblasts

**mM** - milimolar

**mL** - mililitros

**M/Z** – Razão Massa/Carga

**mA** – miliAmpère

**NK** – Nature killer

**nm** - nanômetro

**PEG** - Polietileno Glicol 8000

**PBS** – Solução salina tamponada com sulfato e

**PF** - perforina

**PFP** – Peptídeo ou proteína formador(a) de poros

**PLA1** - Enzimas fosfolipases A1

**PLA2** - Enzimas fosfolipases A2

**PLAs** - Fosfolipases

**PM** – Peso molecular

**PPLPs** - Plasmodium perforin-like protein

**RFP** - Red Fluorescent Protein

**Rosenthal** - Dimethyl-DL-2,3-distearoyloxypropyl(2-hidroxyethyl)ammonium acetate

**SMF** – Sistema monocítico fagocitário

**VP** - Vacúolo parasitóforo

**μL** – micromolar

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Atividade hemolítica de Ext-t com diferentes atividades hemolíticas e cálculo da H50.	39
<b>Figura 2</b> - Quantificação de proteínas nos extratos de promastigotas.	42
<b>Figura 3</b> - Atividade hemolítica dos Ext-t, Ext-m e Ext-lip de promastigotas.	43
<b>Figura 4</b> – Atividade hemolítica de Ext-lip a partir de Ext-t ou Ext-m de promastigotas	44
<b>Figura 5</b> - Atividade hemolítica do Ext-lip durante o cultivo de promastigotas <i>in vitro</i> .	46
<b>Figura 6</b> - Efeito da temperatura na lise dos Ext-m e Ext-lip.	47
<b>Figura 7</b> - Proteção osmótica por PEG 8000.	49
<b>Figura 8</b> - Tratamento de promastigotas com inibidor de Rosenthal.	51
<b>Figura 9</b> - Atividade enzimática das fosfolipases A1 e A2.	52
<b>Figura 10</b> - Atividade hemolítica presente nos extratos totais de <i>L.amazonensis</i> após tratamento com inibidor Rosenthal A1 e A2 e viabilidade dos parasitos.	54
<b>Figura 11</b> - Inibição das fosfolipases A1 e A2 de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> reduz a infectividade dos parasitos para macrófagos e fibroblastos.	55

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1 Protozoários do gênero <i>Leishmania</i>.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2 Citolisinas formadoras de poros.....</b>	<b>20</b>
<b>1.2.1 Moléculas proteicas.....</b>	<b>21</b>
<b>1.2.2 Moléculas Não Proteicas .....</b>	<b>23</b>
<b>1.2.3 Citolisinas formadoras de poros em protozoários patogênicos.....</b>	<b>24</b>
<b>1.3 Justificativa.....</b>	<b>29</b>
<b>1.4 Objetivos .....</b>	<b>30</b>
<b>1.4.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>30</b>
<b>1.4.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>30</b>
<b>2 - MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
<b>2.1 Parasitos e células murinas.....</b>	<b>32</b>
<b>2.1.1 Cultivo e estoque de promastigotas.....</b>	<b>32</b>
<b>2.1.2 Cultivo de fibroblastos (MEF) e macrófagos (RAW) embrionários de camundongos.....</b>	<b>33</b>

<b>2.2 Experimentos de Infecção.....</b>	<b>33</b>
<b>2.2.1 Quantificação da Infecção por citometria de fluxo.....</b>	<b>34</b>
<b>2.3 Preparo dos extratos.....</b>	<b>34</b>
<b>2.4 Quantificação de proteínas dos extratos.....</b>	<b>35</b>
<b>2.5 Determinação da atividade hemolítica .....</b>	<b>35</b>
<b>2.5.1 Padronização de hemácias.....</b>	<b>35</b>
<b>2.5.2 Ensaio hemolítico.....</b>	<b>35</b>
<b>2.5.3 Ensaio de Proteção Osmótica.....</b>	<b>36</b>
<b>2.6 Inibição de Fosfolipases do tipo A em <i>Leishmania Amazonensis</i>.....</b>	<b>37</b>
<b>2.6.1 Quantificação da Atividade de Fosfolipases do tipo A1 e A2.....</b>	<b>37</b>
<b>2.7 Replicatas.....</b>	<b>38</b>
<b>3 – RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1 Atividade Hemolítica de extratos de promastigotas de <i>L. Amazonensis</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1.1 Atividade hemolítica de extratos totais (ext-t) de extratos de membrana (ext-m) e de extratos lipídicos (ext-lip) de promastigotas.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1.2 O perfil da atividade hemolítica ao longo dos dias de cultivo de promastigotas é o mesmo em ext-t, ext-m e ext-lip.....</b>	<b>45</b>
<b>3.2 Efeito da temperatura na atividade hemolítica de ext-m e ext-lip.....</b>	<b>45</b>

<b>3.3 A proteção osmótica na hemólise mediada pelo ext-lip indica que o mecanismo de lise é por formação de poros.....</b>	<b>48</b>
<b>3.4 A inibição de fosfolipases (PLA) 1 e 2 em promastigotas abole a atividade hemolítica.....</b>	<b>50</b>
<b>3.5 A inibição de PLA1 e PLA2 em promastigotas inibe a sua capacidade invasão em células hospedeiras fagocíticas e não fagocíticas.....</b>	<b>53</b>
<b>4 – DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>5 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
<b>6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>68</b>

## 1- INTRODUÇÃO

### 1.1- Protozoários do gênero *Leishmania*

Os protozoários do gênero *Leishmania* são zooflagelados pertencentes à Família Trypanosomatidae da Ordem Kinetoplastida e são caracterizados pela presença de uma região rica em DNA, localizada em sua única mitocôndria, denominada cinetoplasto. Nesse gênero, encontramos tanto parasitos extracelulares intestinais de invertebrados quanto parasitos intra ou extracelulares de vertebrados. Outra característica marcante é a presença de uma densa rede de microtúbulos de tubulina subpeliculares, que confere ao parasito unicelular suas formas morfológicas características: a amastigota intracelular, encontrada notadamente no macrófago e a promastigota extracelular que vive e se replica no trato intestinal de insetos flebotomíneos (Rupper & Barnes, 1996). Esses parasitos são os agentes etiológicos de doenças conhecidas como leishmanioses, que acometem diversas espécies de vertebrados, incluindo o homem e animais domésticos e silvestres, sendo transmitido aos hospedeiros via picada pelo inseto vetor portador das formas promastigotas. Nos seres humanos, as leishmanioses são classificadas em leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar, esta última se apresentando sob três formas distintas: cutânea, mucocutânea e cutânea difusa.

As espécies do gênero *Leishmania* já foram classificadas de maneiras diversas devido ao grande número e localidades diferentes onde predominam. Em 1987, Lainson & Shaw propuseram uma divisão do gênero *Leishmania* em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, baseada no sítio de desenvolvimento do hospedeiro invertebrado, que seria nas porções média e anterior do tubo digestivo do inseto e na porção posterior com migração para as partes média e anterior do tubo digestivo do flebotomíneo, respectivamente. No Novo Mundo, dentro do subgênero *Viannia* encontram-se as espécies *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) brasiliensis* que estão dentro do complexo *brasiliensis* e são causadoras das leishmanioses cutânea e mucocutânea, sendo que no subgênero *Leishmania* encontram-se as espécies do complexo *mexicana* como *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana*, responsáveis pela leishmaniose cutânea e cutânea difusa (Grimaldi & Tesh 1993; Lainson & Shaw 1987).

As leishmanioses são zoonoses com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica, atingindo 76 países, sendo que pelo menos 12 estão no continente americano. No Brasil, quase 18.000 novos casos de leishmaniose tegumentar e cerca de 4.000 casos de leishmaniose visceral são reportados a cada ano. A Leishmaniose visceral é causada por espécies como a *L. (L.) donovani* no Velho Mundo e a *L. infantum/chagasi* no Novo Mundo. As principais espécies causadoras da leishmaniose tegumentar são: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi*, no Novo Mundo, e *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) aethiopica*, no Velho Mundo. Os quadros clínicos variam de lesões cutâneas ulceradas, a lesões em órgãos internos como fígado, baço e linfonodos. O tipo de lesão e gravidade da infecção variam de acordo com a espécie e a distinção entre formas clínicas é influenciada pelo estado imune do hospedeiro (Ministério Saúde, 2017).

A forma promastigota é extracelular, possui um único flagelo, que permite seu movimento, localizado próximo ao cinetoplasto, em uma estrutura denominada bolsa flagelar sendo que a forma amastigota é intracelular, arredondada e sem movimentos. Os vetores que transmitem esses parasitos para os hospedeiros vertebrados são insetos flebotomíneos fêmeas que são hematófagos. *Leishmania* spp. tem o ciclo de vida do tipo heteroxeno, no qual um flebotomíneo do Gênero *Lutzomyia* (no Novo Mundo) ou *Phlebotomus* (no Velho Mundo) pica um hospedeiro vertebrado que esteja infectado e ingere as formas amastigotas presentes no momento do repasto. Após o repasto, o parasita se re-transforma em promastigotas flageladas que se multiplicam no trato intestinal do vetor. O que parece ocorrer então é que a multiplicação das promastigotas é tão alta que êmbolos de parasitos podem se formar no proventrículo intestinal do inseto, impedindo o repasto sanguíneo, fazendo com que o mesmo os regurgite na derme, no sítio de picada (Ruppert & Barnes, 1996).

Inoculadas no hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas terminam por infectar macrófagos, as principais células que abrigam o parasito na fase crônica da doença, embora outros tipos celulares também sejam encontrados contendo amastigotas, incluindo células não fagocíticas (Horta *et al.*, 2020). Em macrófagos, as amastigotas vivem no interior do vacúolo parasitóforo (VP) que

é um compartimento membranoso formado pela junção de lisossomos com o vacúolo fagocítico, chamado também de fagolisossomo, no interior do qual as amastigotas se multiplicam ocupando de 70 a 80% do volume da célula. As amastigotas eventualmente são liberadas dos macrófagos, e infectam outras por mecanismos ainda não completamente esclarecidos. A hipótese que foi mais considerada no passado para a liberação dos parasitos, foi pelo rompimento passivo da célula hospedeira causada por uma superpopulação de amastigotas (Chang *et al.*, 1985; Molineux & Killick-Kendrick, 1987; Hommel, 1999; Lipoldová & Demant, 2006; Kaye & Scott, 2011). No entanto, ainda não há evidências da ruptura de macrófagos, e outros mecanismos têm sido propostos por experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*. Rittig & Bogdan (2000), por exemplo, descreveram a liberação de amastigotas de *L. major* por um mecanismo similar à exocitose, com os vacúolos migrando para a periferia da célula hospedeira, liberando os parasitos livres para o exterior da célula sem rompimento de sua membrana plasmática. Recentemente, ainda, foi demonstrado que amastigotas de *L. amazonensis* podem ser transferidas de células infectadas para células saudáveis por extrusão do parasita liberados dentro de estruturas contendo LAMP (*lysosome-associated membrane protein*) capazes de serem capturadas por macrófagos vizinhos, permitindo a propagação das amastigotas (Real *et al.*, 2014). Uma outra hipótese, conhecida como a do cavalo de Tróia, sugerida por experimentos *in vitro* (Laskay *et al.*, 2003; van Zandbergen *et al.*, 2004) e *in vivo* (Peters *et al.*, 2008) é a fagocitose de células já infectadas, como neutrófilos (e, possivelmente macrófagos também). Já foi mostrado *in vitro* que neutrófilos (Laskay *et al.*, 2003) e macrófagos (daMata *et al.*, 2015) entram em apoptose após infecção com *L. major* ou *L. amazonensis*, respectivamente.

## 1.2 Citolisinas formadoras de poros

As citolisinas formadoras de poros constituem um grupo de moléculas que interagem com a membrana lipídica, formando canais transmembrana, causando um colapso no potencial de membrana e permitindo a passagem de íons e outras moléculas dependendo do tamanho do poro. Em hemácias, esse desequilíbrio osmótico, que leva ao influxo de água, o que gera à ruptura/lise

celular (lise coloido-osmótica). Em células nucleadas, pode tanto haver ruptura por lise coloido-osmótica, levando à necrose, como também o inchaço, sem ruptura, mas com eventual morte celular ou ainda o reparo da membrana plasmática, dependendo do tamanho da lesão (Lukoyanova *et al.*, 2016).

Citolisinas formadoras de poro estão envolvidas em processos biológicos muito importantes para vários organismos, seja ruptura celular, apoptose ou comunicação dentro da célula. Essas moléculas estão presentes em vários tipos de organismos vivos, incluindo vírus, bactérias, protozoários, insetos e vertebrados (Bhakdi & Trantum-Jensen, 1988; Ludwig, 1996; Ojcius & Young, 1990; Horta, 1997; Zitzer *et al.*, 1997; Almeida-Campos *et al.*, 2002). Abaixo separamos essas moléculas com atividade formadora de poros em dois grandes grupos: moléculas proteicas e não proteicas, trazendo informações sobre as mesmas e sobre os organismos que as produzem.

### **1.2.1 Moléculas proteicas**

As chamadas Proteínas Formadoras de Poros (PFPs) estão presentes em vários sistemas na natureza e em diversos tipos de organismos, como por exemplo, na composição de vários venenos e toxinas, no sistema imune de vários organismos, sendo também produzidas por vários patógenos intra e extracelulares. Inúmeras PFPs já foram descritas (Bischofberger *et al.*, 2012; Tweten *et al.*, 2015) sendo que várias atuam rompendo membranas, embora inúmeras outras funções têm sido atribuídas a essas moléculas (Almeida-Campos *et al.*, 2002).

Na maioria dos casos, o mecanismo de ação das PFPs envolve sua ligação, inserção e polimerização circular dos seus monômeros na bicamada lipídica (Horta, 1997; Almeida-Campos *et al.*, 2002; Gilbert *et al.*, 2014; Dal Peraro & Van Der Goot, 2016). Uma classificação recente mostra pelo menos dois tipos de PFPs muito diversas que atuam imunidade de vertebrados bem como na patogênese de várias doenças bacterianas: as citolisinas dependentes de colesterol (CDCs) e as não dependentes de colesterol. Nesta última, enquadram-se superfamília chamada de MACPF, que tem como principais representantes as proteínas do complexo de ataque à membrana (MAC) e perfurina (PF), que dão nome à superfamília, e a segunda,

(Lukoyanova et al., 2016). O MAC, do sistema do complemento composto das proteínas C5b, C6, C7, C8 e C9, assim como a perforina, molécula presente em grânulos de células citotóxicas como os linfócitos T citotóxicos e as células NK (*natural killer*) em vertebrados participam de importantes mecanismos efetores do sistema imune. Proteínas desta família já foram descritas em protozoários, como mencionado adiante. A família CDC inclui importantes fatores de virulência de bactérias. As maiores das CDCs ligam-se a membranas contendo colesterol por um domínio C-terminal semelhante a imunoglobulinas (Tweten, 2005). Esta interação inicial com a membrana, junto com a união dos oligômeros é crucial para desencadear as mudanças estruturais que levam à formação do poro. Várias dessas PFPs já são bem descritas e têm suas estruturas e mecanismos de ação bem estudados. Dentre os membros dessa família, destacam-se a estreptolisina O, listeriolisina, pneumolisina e perfringolisina, sendo proteínas secretadas, com exceção da pneumolisina. Em geral formam poros grandes de 25-30 nm de diâmetro e contendo 35-50 monômeros (Lukoyanova et al., 2016).

Há ainda peptídeos formadores de poros, como os peptídeos antimicrobianos que atuam formando poros que desestabilizam as membranas de bactérias apresentando também atividade hemolítica. São exemplos desses peptídeos a melitina de *Apis mellífera* e alameticina do fungo *Trichoderma viride*. Como exemplos de peptídeos formadores de poros de protozoários temos os amoebapores e nagleriaporos produzidos pelas amebas *Entamoeba histolytica* e *Naegleria fowleri* (Andrä et al., 2004), respectivamente, como descrito mais adiante.

Podemos ainda encontrar peptídeos formadores de poros bem menores, como as piscidinas, peptídeos formadores de poros do sistema da imunidade inata de alguns peixes (Campagna et al., 2006) que apresentam 22 resíduos de aminoácidos e as temporinas, um peptídeo citolítico de apenas 13 resíduos de aminoácidos da rã *Rana temporaria* que possui atividade citolítica contra eritrócitos humanos (Mangoni et al., 2005).

Ainda, em plantas, foi caracterizada e purificada uma PFP de *Enterolobium contortisiliquum* com peso molecular de 54 kDa. A seqüência de aminoácidos dessa proteína, denominada enterolobina, apresenta altas similaridade e identidade com as seqüências de aminoácidos das aerolisinas

de *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas sobria*. A estrutura da enterolobina é rica em folhas  $\beta$  e muitos dos resíduos envolvidos na oligomerização da aerolisina são conservados na enterolobina. A enterolobina forma poros pela hexamerização de monômeros (Sousa *et al.*, 1994; Fontes *et al.*, 1997).

### 1.2.2 Moléculas Não Proteicas

Vários relatos confirmam a formação de poros como mecanismo lítico de inúmeros compostos não proteicos. Um exemplo desse tipo de composto são os lisofosfolídeos, intermediários metabólicos estáveis e anfipáticos gerados pela degradação de diversos fosfolídeos, como aqueles que compõem a membrana plasmática. O influxo de íons cálcio, a ruptura celular e a lise coloido-osmótica de hemácias podem ser causados por lisofosfolídeos (Sarker *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2006; Shimuta *et al.*, 2009; Ogita *et al.*, 1997). Um exemplo já demonstrado é o da bactéria *Serratia Marcescens* que apresenta uma atividade lítica dependente da ação direta de lisofosfolídeos produzidos pela enzima fosfolipase A1 (Shimuta *et al.*, 2009). Estes compostos apresentam altíssima atividade lítica e os poros por eles produzidos podem ser detectados por *patch-clamp* (Wilson-Ashworth *et al.*, 2004). Lisofosfolídeos foram ainda caracterizados como os mediadores da lise por contato provocada por tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* em eritrócitos incubados com o parasita (Luján & Bronia, 1994). Outro exemplo de lipídeos capazes de formar poros em biomembranas são os lipídeos catiônicos chamados BHHD-TADC e BHTD-TADC, cujos poros são formados de maneira ótima em pH de 6,5 (Chanturiya *et al.*, 2003). Em 2010, nosso grupo de pesquisa, também mostrou que lisofosfatidilcolinas (LPCs) presentes em extratos de promastigota de *L. amazonensis* possuem atividade hemolítica (Castro-Gomes, 2010), como será descrito adiante. No entanto, não foi mostrado que a hemólise pelos LPCs é por formação de poros, sendo esta uma das perguntas que foram investigadas neste trabalho.

Outros compostos como glicofosfolídeos, sais poliméricos de alquil piridínium, e até compostos inorgânicos como o elemento gadolínium, entre outros, estão sendo reportados na literatura como formadores de poros (Helsel *et al.*, 2008; McClelland *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 1999; Pluzhnirov *et al.*, 2006).

### 1.2.3 Citolisinas formadoras de poros em protozoários patogênicos

Há inúmeras evidências de que os parasitos intracelulares produzem e utilizam citolisinas formadoras de poros durante a interação com a célula hospedeira. Já foi demonstrado que essas citolisinas desempenham papéis importantes na patogênese das doenças por eles provocadas, seja comprometendo diretamente a membrana da célula hospedeira, seja facilitando a evasão do sistema imune. Citolisinas formadoras de poros presentes em protozoários patogênicos, em sua maioria proteínas, ao que tudo indica, executam alguns papéis importantes para a biologia desses parasitos auxiliando na sua sobrevivência, podendo ser fatores de virulência importantes (Ojcius & Young, 1990; Horta, 1997; Noronha *et al.*, 1996; Almeida-Campos *et al.*, 2002). Abaixo, descreveremos as principais características de cada uma delas, resumidas na tabela I.

Dentre as PFPs de protozoários patogênicos, a mais bem caracterizada é a amebaporo, molécula proteica com 77 resíduos de aminoácidos e três isoformas produzidas por *E. histolytica* (Young *et al.*, 1982; M. Leippe, 1997; Leippe & Herbst, 2004; Hecht *et al.*, 2004). A ameba de vida livre *N. fowleri*, causadora de uma meningocefalite humana, também produz PFPs denominadas naegleriaporos, moléculas que parece estar envolvida nos danos teciduais encontrados em hospedeiros infectados, também com 3 isoformas de massas moleculares de 7, 10 e 13 kDa (Herbst *et al.*, 2004).

Foi ainda descrita uma citolisina *T. cruzi*, cujo mecanismo é por formação de poros, que foi chamada de Tc-TOX, com peso molecular de 70 kDa. Algumas evidências sugerem que sua atividade lítica parece estar relacionada ao mecanismo de escape do vacúolo parasitóforo para o citoplasma, como também já demonstrado para a *L. monocitogenes*. Ainda que sua identidade molecular não tenha sido elucidada, a Tc-TOX tem uma similaridade antigênica com o C9, parte do MAC do sistema do complemento, e com a perfurina de camundongos em vertebrados (Andrews, 1990; Andrews 1994). Em 2001 Manning-Cela e colaboradores clonaram um gene em *T. cruzi*, denominado *Lyt1*, que codifica uma proteína cuja mutação diminui a hemólise

mediada pelo parasito (Manning-Cela *et al.*, 2001). Essa proteína possui tamanho semelhante à Tc-TOX e, como ela, é similar ao componente C9 do

**Tabela 1: Citolisinas formadoras de poros de protozoários patogênicos.**

Protozoário	PFP – características	Função
<p><i>Entamoeba histolytica</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. Young <i>et al.</i> (1982)</li> <li>. Leippe <i>et al.</i> (1991)</li> <li>. Leippe (1997)</li> <li>. Hecht <i>et al.</i> (2004)</li> </ul>	<p><b>Amoebapores</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. ~ 8 kDa</li> <li>. localizada em vesículas citoplasmáticas</li> <li>. pH ótimo= ácido</li> <li>. tamanho do poro= 2 nm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Citólise mediada por contato</li> <li>. Lesão tecidual</li> <li>. Alimentação (?)</li> <li>. Defesa (?)</li> </ul>
<p><i>Naegleria fowleri</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. Young &amp; Lowrey (1989)</li> <li>. Herbst <i>et al.</i> (2002)</li> </ul>	<p><b>Naegleriapores</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. 10-13 kDa</li> <li>. pH ótimo=ácido</li> <li>. associada a membrane</li> </ul>	<p>Citólise</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. Meningo-encefalite invasiva - dano tecidual</li> <li>. Alimentação (?)</li> <li>. Defesa (?)</li> </ul>
<p><i>Plasmodium falciparum</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. Kaiser <i>et al.</i> (2004)</li> <li>. Ishino <i>et al.</i> (2005)</li> <li>. Ecker <i>et al.</i> (2007)</li> <li>. Sullivan Jr. (2014)</li> </ul>	<p><b>Spect2</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. localizada em micronemas.</li> <li>. similar a proteínas da família MACPF</li> </ul> <p><b>Hemolisina III</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. localizada no vacúolo digestivo</li> <li>. poro de aproximadamente 3,2nm</li> <li>. atividade ótima a 37°C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Evasão do parasita dos capilares sanguíneos e entrada no hepatócito;</li> <li>. Lise de eritrócitos não infectados;</li> </ul>
<p><i>Toxoplasma gondii</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. Kafsack <i>et al.</i> (2009)</li> </ul>	<p><b>Tg-PLP</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. localizada em micronemas.</li> <li>. similar a proteínas da família MACPF</li> <li>. provavelmente maior que 40 nm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Escape do vacúolo parasitóforo</li> </ul>
<p><i>Trypanosoma cruzi</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. Andrews <i>et al.</i> (1990)</li> <li>. Andrews <i>et al.</i>, (1994)</li> <li>. Manning-Cela <i>et al.</i> (2001)</li> </ul>	<p><b>TcTOX/LYT1 (?)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. ~ 70 kDa</li> <li>. antigenicamente homóloga a C9</li> <li>. secretada por amastigotas</li> <li>. pH ótimo = ácido</li> <li>. tamanho do poro = ~ 10 nm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Escape do vacúolo parasitóforo</li> </ul>
<p><i>Leishmania sp.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. Noronha <i>et al.</i> (1994)</li> <li>. Noronha <i>et al.</i> (1996)</li> <li>. Horta (1997)</li> <li>. Noronha <i>et al.</i> (2000)</li> <li>. Almeida-Campos &amp; Horta (2000)</li> <li>. Almeida-Campos <i>et al.</i> (2002)</li> <li>. Castro-gomes <i>et al.</i> (2009)</li> <li>. Almeida-Campos <i>et al.</i> (2013)</li> </ul>	<p><b>Leishporina</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. capaz de lisar macrófagos</li> <li>. pH ótimo: ácido</li> <li>. precisa ser ativada</li> <li>. tamanho do poro: 1.6 a 6.1nm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Propiciar invasão dependente de Ca<sup>2+</sup>(?)</li> <li>. Ruptura do macrófago (?)</li> <li>. Apoptose (?)</li> <li>. Transporte de nutrientes (?)</li> <li>. Obtenção de nutrientes no hospedeiro invertebrado (?)</li> </ul>

complemento, sendo uma candidata a exercer a atividade previamente descrita da Tc-TOX. No entanto, ainda não foi determinado se as duas correspondem à mesma molécula.

O genoma do parasita *Plasmodium falciparum*, um dos agentes causadores da malária humana, codifica 5 proteínas denominadas PPLPs (*Plasmodium perforin-like protein*), todas envolvidas no rompimento de barreiras celulares (revisado por Roiko & Carruthers, 2009; Kafsack & Carruthers, 2010). Esta família de genes codifica proteínas com domínios semelhantes ao da família MACPF, possuem o *motif* (Y/W)-X6-(F/Y)GTH(F/Y)-X6-GG, conhecido como a assinatura deste grupo de proteínas (*MACPF-like domains*) (Kaiser Camargo *et al.*, 2004, Chinzei *et al.*, 2005). Foi demonstrado que as citolisinas PPLP3, PPLP4 e PPLP5 participam da travessia do epitélio intestinal do inseto vetor pelo oocineto (Kadota *et al.*, 2004; Ecker *et al.*, 2007, Christine C. Wirth *et al.*, 2015), enquanto a PPLP1 participa da travessia do endotélio dos capilares sinusóides pelos esporozoítos com posterior infecção dos hepatócitos (Ishino *et al.*, 2005). A proteína descoberta mais recentemente, PPLP2, é crucial para o rompimento dos eritrócitos do hospedeiro por sua atividade membranolítica (Wirth *et al.*, 2015). Outra proteína, a TgPLP1 de *Toxoplasma gondii*, também apresenta uma alta similaridade com o domínio MACPF de mamíferos, bactérias e protozoários, apresentando o motivo assinatura deste grupo de proteínas. TgPLP1 apresenta um papel central no escape do parasito do vacúolo parasitóforo, uma vez que parasitos com deficiência da proteína não conseguem sair de seus vacúolos parasitóforos (Kafsack *et al.*, 2009; Blackman *et al.*, 2013). Por conterem o domínio MACPF, assume-se que o mecanismo de escape do *P. falciparum* e do *T. gondii*, seja por formação de poros.

Mais recentemente, Moonah e colaboradores demonstraram que a hemolisina III de *P. falciparum* é capaz de lisar eritrócitos por formação de poros transmembrana. A atividade lítica desta proteína é ótima a 37°C, sendo que ela se localiza no vacúolo digestivo do parasito e o poro formado tem aproximadamente 3,2 nm. Os autores sugerem que esta hemolisina tem um papel importante na lise de eritrócitos não infectados resultando em severa anemia em pacientes com malária (Moonah *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, nosso grupo descreveu e caracterizou em *L. amazonensis* uma atividade formadora de poros, cujas moléculas responsáveis ainda não identificadas, denominamos leishporina. Em trabalhos anteriores, nosso grupo demonstrou que extratos de promastigotas de *L. amazonensis* são capazes de lisar hemácias e células nucleadas, incluindo o macrófago, a célula hospedeira deste parasita. A atividade citolítica de *L. amazonensis* é encontrada tanto em promastigotas como em amastigotas (Noronha *et al.*, 1996). A atividade hemolítica também foi demonstrada em promastigotas de *L. major*, *L. guyanensis* e *L. panamensis* (Noronha *et al.*, 1996; Almeida-Campos, 2000), não tendo sido testada em amastigotas dessas espécies.

A atividade ótima dessa citolisina ocorre em pH 5,0-5,5 e a 37°C, condições encontradas dentro do vacúolo parasitóforo dos macrófagos, mas é também ativa a pH 7,0 e a 25°C, embora consideravelmente menos. Foi ainda demonstrado que a atividade citolítica não é devida à uma ação de proteases, de fosfolipases ou ação detergente e que a lise de hemácias é do tipo colóido-osmótica, típica da formação de poros. Posteriormente, utilizando a técnica de *patch clamp*, foi, de fato, confirmado que a citolisina de *L. amazonensis* danifica macrófagos por formar poros não-seletivos em sua membrana (Noronha *et al.*, 2000), sendo que esses poros foram também visualizados por microscopia de força atômica (Castro-Gomes, 2010). A leishporina localiza-se na fração de membranas do extrato de promastigotas de *L. amazonensis* não sendo encontrada nenhuma atividade lítica em sua fração solúvel.

Para que a lise mediada pela leishporina ocorra, pelo menos duas etapas distintas foram demonstradas em hemácias: 1) ligação da citolisina à membrana da célula-alvo, etapa independente da temperatura, ocorrendo mesmo a 0 e 2°C) lise propriamente dita, que só acontece em temperaturas mais altas e cuja temperatura ótima de ação é 37°C (Noronha *et al.*, 2000; Castro-Gomes *et al.*, 2009). Foi ainda demonstrado que a ligação da leishporina à membrana de hemácias humanas é independente de proteínas, carboidratos ou colesterol, ocorrendo via interação direta com os fosfolípidos da membrana (Castro-Gomes *et al.*, 2009). Além disso, nosso grupo ainda verificou que para expressar sua atividade, a leishporina parece requerer a remoção de um oligopeptídeo inibidor, tanto por proteases quanto por condições dissociantes. Extratos de *L. amazonensis* recém preparados já são

hemolíticos, provavelmente por contarem com essas condições em sua preparação, enquanto que extratos de *L. guyanensis* recém preparados são hemoliticamente inativos, precisando ser ativados pelo tratamento com uma dessas duas substâncias (Almeida-Campos & Horta, 2000; Almeida-Campos *et al.*, 2013). A dissociação desse inibidor não apenas aumenta a eficiência da leishporina de se ligar a lipídeos como também confere à citolisina a capacidade de formar poros.

Devido às condições ótimas de ativação e ação da leishporina, como pH ácido e temperatura de 37°C, que se assemelham às encontradas no interior do fagolisossomo, inicialmente havíamos postulado que ela estivesse envolvida com uma possível ruptura do macrófago pelo parasita, e a consequente liberação das formas amastigotas, contribuindo para a amplificação da infecção, hipótese mais considerada na época. No entanto, a leishporina também expressa sua atividade citolítica em pH neutro e a temperaturas mais baixas, embora em menor grau, como encontrado no meio extracelular do hospedeiro vertebrado ou no flebotomíneo. Assim, outras funções potenciais adicionais que nosso grupo já postulou para a leishporina (Noronha, 1996; Horta, 1997; Noronha *et al.*, 2000; Almeida-Campos *et al.*, 2000; Almeida-Campos *et al.*, 2002; Castro-Gomes *et al.*, 2009; Almeida-Campos *et al.*, 2013) incluem: 1) lesão da membrana plasmática da célula hospedeira no momento da invasão, crucial para a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , que aumentaria o processo de invasão tanto por fagocitose como por exocitose de lisossomos, esta última descrita recentemente pelo nosso grupo (Cavalcante-Costa *et al.* 2019); 2) o transporte de nutrientes dentro do fagolisossomo, como já mostrado para o *P. falciparum* e o *T. gondii* (Desai, 1999); 3) o rompimento de hemácias no interior do hospedeiro invertebrado, para a obtenção de nutrientes; 4) indução de apoptose em macrófagos infectados, morte celular que nosso grupo já demonstrou *in vitro* (daMata *et al.*, 2015).

Evidências anteriores, como perda da atividade hemolítica do extrato de promastigotas, por aquecimento a 100°C e por tratamento com enzimas proteolíticas apontam para a natureza proteica da molécula formadora de poros. Esse dado é corroborado por outros resultados do nosso grupo mostrando que promastigotas de *L. major*, superexpressando genes codificadores de proteínas anotadas como hemolisinas do tipo III de *Bacillus*

*cereus*, apresentam atividade citolítica, provavelmente por formação de poros, maior do que parasitos do tipo selvagem (Miranda, 2016), o que demonstra a participação de uma proteína no processo lítico. No entanto, posteriormente, foram purificadas, por uma série de cromatografias líquidas, frações completamente livres de proteínas, mas com atividade hemolítica, as quais foram identificadas por espectrometria de massa como sendo LPCs (Castro-Gomes, 2010). Assim, podemos vislumbrar pelo menos duas possibilidades: 1) que a atividade formadora de poros seja mediada por LPCs e que alguma proteína seja importante para essa atividade e 2) que existam dois tipos de moléculas com atividade hemolítica, uma mediada por LPCs e outra por uma proteína, possivelmente a proteína que tem semelhanças a hemolisinas do tipo III de *B. cereus*.

O estudo do envolvimento de lipídeos na atividade da leishporina, particularmente dos LPCs, será objeto deste estudo.

### 1.3 Justificativa

Pelo fato de ser endêmica em vários países, de ser de difícil tratamento e de se manifestar com uma variedade de sintomas e formas, algumas das quais fatais, a leishmaniose é ainda uma preocupação mundial da saúde pública. Embora já tenha sido publicada uma grande massa de informação com relação à interação parasita-hospedeiro e a resposta imune do hospedeiro, quase nada é sabido sobre moléculas particulares envolvidas na patogênese desta doença.

A leishporina é uma citolisina formadora de poros que o nosso grupo descreveu em *L. amazonensis* capaz de, *in vitro*, lisar macrófagos, as células hospedeiras finais desse parasita e efetoras do sistema imune. Como mostrado acima, já definimos várias características dessa molécula em duas espécies de *Leishmania*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, sendo que a grande maioria dos estudos do nosso grupo foi feita com *L. amazonensis*. Citolisinas formadoras de poros já foram descritas em uma variedade de organismos vivos, incluindo os parasitos, possuindo, em todos os casos, um papel importante na interação parasita-hospedeiro e na patogênese da doença, seja por lisar diretamente as

células hospedeiras, seja por permitir o escape de parasitas intracelulares do fagolisossomo para o citoplasma e a evasão à resposta imune.

Nosso objetivo maior e a longo prazo é conhecer a função desta atividade citolítica formadora de poros em *Leishmania*. Para isto é necessário que conheçamos a natureza da(s) molécula(s) que chamamos leishporina, o que se configura o nosso objetivo imediato. Como nossos resultados anteriores mostraram que LPC de *L. amazonensis* são hemolíticos, é possível que esses LPCs possam ser as moléculas responsáveis pela formação de poros. Desta forma, resolvemos investigar se os lipídios totais de promastigotas de *L. amazonensis* são líticos por si só e estudar as características desta lise na tentativa de relacioná-la à formação de poros, investigando se a inibição da fosfolipase A, enzima responsável pela síntese de LPC, poderia alterar o fenótipo hemolítico de promastigotas de *L. amazonensis* e sua capacidade de invadir células hospedeiras.

Conhecendo a natureza molecular da leishporina, é possível, a médio e longo prazo, estabelecer o papel biológico dessa molécula na interação com células do hospedeiro e no ciclo de vida do parasito, determinando seu papel potencial na virulência dos mesmos e na patogênese da leishmaniose. A possibilidade de construir outras formas de parasitos *knockdown* ou *knockout* e estudar seu fenótipo abre uma ampla perspectiva para determinar se esta citolisina contribui para as diferentes manifestações da doença. Esse conhecimento poderá permitir compreensão dos mecanismos de interação parasito-hospedeiro e como eles poderiam estar envolvidos patogênese da doença.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo Geral**

Baseados na hipótese de que LPCs de *L. amazonensis* possam ter atividade hemolítica por formação de poros, resolvemos iniciar investigando se lipídios totais de promastigotas são hemolíticos e, em caso positivo, caracterizar esta atividade, verificando se é por formação de poros e

investigando o efeito de um inibidor de fosfolipases A1 e A2, responsável pela síntese de LPCs, nos fenótipos hemolítico e infectante de promastigotas.

#### **1.4.2 Objetivos Específicos**

- 1) Purificar lipídeos de promastigotas.
- 2) Verificar a atividade hemolítica de lipídeos de promastigotas.
- 3) Investigar cinética da atividade hemolítica de lipídeos de promastigotas durante seu crescimento axênico *in vitro*.
- 4) Verificar a termosensibilidade da atividade hemolítica de lipídeos de promastigotas.
- 5) Investigar se a natureza da lise é por formação de poros.
- 6) Verificar o efeito da inibição de fosfolipases A no fenótipo hemolítico de promastigotas e infectante para macrófagos *in vitro*.

## 2 – MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 – Parasitos e células murinas

#### 2.1.1 – Cultivo e estoque de promastigotas

A espécie de leishmania utilizada neste trabalho foi a *L. amazonensis* (LLa), cepa PH8, código internacional (IFLA / BR / 1967 / PH8) WT cedida pela Dra. Maria Norma Melo do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil. As amostras preservadas em nitrogênio líquido eram descongeladas e inoculadas em meio de cultura Schneider (Sigma) acrescido de 10% v/v de soro fetal bovino. A *L. amazonensis* expressando Proteína Fluorescente Vermelha (LLa-RFP) foi gentilmente cedida pelo Dr. David Sacks (NIH, Bethesda, EUA) e cultivada como descrito por Carneiro *et al.*, 2018. Estes parasitos foram obtidos via transfecção com um plasmídeo contendo a proteína vermelha fluorescente e o gene de resistência para o antibiótico geneticina (Carneiro *et al.*, 2018). Promastigotas de LLa-RFP foram cultivadas como descrito para as promastigotas do tipo selvagem (WT), mas com adição de 50 µg/ml do antibiótico geneticina (G418) (Life Technologies), para a seleção de parasitos resistentes, logo, expressando a RFP. O crescimento dos parasitos era acompanhado ao microscópio invertido (Olympus) para certificação do bom desenvolvimento da cultura e da ausência de contaminação. Os parasitos utilizados eram semeados com inóculo de  $1 \times 10^5$  parasitos/mL de meio de cultura e eram colhidos preferencialmente no quinto dia de cultivo, onde alcançavam seu ponto máximo de crescimento e a onde a atividade hemolítica é máxima (Noronha *et al.*, 1996). A contagem de promastigotas era feita utilizando uma alíquota de 10 µL retirada das garrafas de cultura. Essa alíquota era diluída em paraformaldeído 4% para fixação dos parasitos e 10 µL dessa diluição eram aplicados em câmara hematocimétrica de Neubauer e a contagem de promastigotas era feita em microscópio óptico. A média aritmética dos quatro quadrantes para contagem de leucócitos era obtida e multiplicada pelo inverso da diluição efetuada e por  $10^4$ , o fator de correção do volume da câmara. Ao final era obtido o número de parasitas por mL de cultura. O número

máximo de passagens às quais que as promastigotas foram submetidas foi de dez, pois sabe-se que quando mantidas em cultura *in vitro* por um longo período, esses parasitos perdem algumas de suas características, incluindo a virulência. Após cultivo, os parasitos eram lavados cinco vezes com PBS, estocados em alíquotas  $1 \times 10^9$  parasitas/tubo/mL e congeladas a  $-80^\circ\text{C}$ . Estes parasitos assim obtidos e estocados foram utilizados para o preparo dos extratos utilizados nos experimentos apresentados.

### **2.1.2 – Cultivo de fibroblastos e macrófagos embrionários de camundongos.**

Os fibroblastos embrionários de camundongo (MEF - *mouse embryonic fibroblasts*) e os macrófagos embrionários de camundongo (RAW) foram provenientes do laboratório do Dr. Paul Saftig (Biochemisches Institut, Christian Albrechts-Universität, Kiel, Alemanha). Os mesmos foram cultivados em meio Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO) contendo 10% de soro fetal bovino inativado (GIBCO) em estufa de cultivo com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ , com rotina de repiques a cada 48 horas e cultivados em condições de sub-confluência. As células eram semeadas em placas de cultivo 24 horas antes de cada experimento. Culturas subconfluentes foram utilizadas para experimentos de infecção por citometria de fluxo. Nos experimentos descritos aqui, usamos placas de 6 poços (KASVI) e as células plaqueadas 24h antes do experimento nas concentrações de  $3 \times 10^5$  células por poço para os experimentos de quantificação da infecção por citometria de fluxo.

## **2.2 – Experimentos de Infecção**

Promastigotas de *Lla*-RFP foram adicionados aos MEFs e em células RAW aderentes em DMEM contendo 10% de FBS (GIBCO) que foram centrifugados a  $500 \times g$  por 10 minutos a  $15^\circ\text{C}$  para sincronizar o contato do parasito com as monocamadas de células, seguido de incubação a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , por 4 horas. Todos os experimentos foram realizados utilizando uma multiplicidade de infecção de 25 parasitos por MEF e 10 parasitos para a RAW.

### 2.2.1 – Quantificação da Infecção por citometria de fluxo

Após infecção por *LLa*-RFP, as células eram lavadas, tratadas com 0,25% de tripsina (Gibco) para separar células e parasitos não internalizados e removê-las da placa. Eram transferidas para tubos de citometria de fluxo, fixadas e analisadas ao citômetro de fluxo FACSCAN II (Becton 51 Dickinson). Todas as aquisições foram feitas para 10.000 eventos (MEFs e RAW) e as análises foram realizadas utilizando o software Flow-Jo.

### 2.3 – Preparo dos extratos

Alíquotas de  $2 \times 10^9$  promastigotas de *L. amazonensis* eram ressuspensas em 1 mL de tampão ácido bórico-NaOH pH 7,0. Para rompimento dos parasitos essa suspensão era submetida a cinco ciclos de congelamento e descongelamento utilizando freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  e banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$ . Esse extrato total era então submetido a uma centrifugação a  $1000 \times g$  durante 5 minutos para sedimentação e remoção de núcleos e parasitos íntegros. O sobrenadante, o extrato total (ext-t) era então transferido para outro tubo Eppendorf e centrifugado durante uma hora a  $10.000 \times g$  para de obter uma fração rica em membranas. Em seguida o sobrenadante era desprezado e o sedimento era ressuspensado para o volume inicial em mesmo tampão, acrescido de 0.4% de CHAPS ( $\{3-[(3\text{-colamidopropil})\text{-dimentil-amônio}]\text{-1-propanosulfato}\}$ ) (Sigma), concentração sub-lítica para as hemácias e então se obtinha o extrato de membrana solúvel (ext-m), como descrito anteriormente (Castro-Gomes *et al.*, 2009). Para se obter o extrato lipídico (ext-lip) o sedimento rico em frações de membranas era ressuspensado para o volume inicial de 1 mL em solução de extração de lipídios contendo metanol (Merck), clorofórmio (Merck) e água destilada na concentração (Bligh & Dyer, 1959) de 2:1:0,8 v/v. Em seguida, o extrato era submetido à centrifugação a  $3000 \times g$  por 20 minutos, após eram acrescidos ao volume inicial de solução de clorofórmio e água destilada 1:1 v/v, a suspensão era então novamente centrifugada a

3000 x *g* por 30 minutos. Nas fases separadas obtidas, a fração de lipídios totais é encontrada junto ao clorofórmio, na fase mais densa presente no tubo. Esta fração era transferida para um tubo de vidro onde era feita a evaporação do clorofórmio através de um fluxo direcionado de ar comprimido. Para fins de comparação com ext-t e ext-m, os ext-lip assim obtidos eram ressuspendidos e solubilizados com o mesmo volume inicial em tampão ácido bórico-NaOH pH 7,0.

## **2.4 – Quantificação de proteínas dos extratos**

Para quantificação de proteína foi utilizado o kit Prontein Assay Concentrate (Bio-Rad) executado em placas de micro-ensaio de 96 wells (KASVI). A curva padrão era sempre obtida utilizando as concentrações de 0,05, 0,1, 0,2, 0,4 e 0,6 mg/mL de albumina de soro bovino (BSA) e as placas eram lidas a 595 nm em leitor de ELISA (Spectra Max, Molecular Devices).

## **2.5 – Determinação da atividade hemolítica**

### **2.5.1 – Padronização de hemácias.**

Hemácias humanas eram colhidas e mantidas diluídas em solução preservativa de Alsever (glicose 100 mM, citrato de sódio 30 mM, NaCl 70 mM, pH 6,0) na proporção 1:3, onde ficavam guardadas a 4°C por até três semanas. Antes de serem utilizadas nos ensaios hemolíticos as hemácias eram lavadas três vezes com PBS. O número de células era determinado de modo indireto pela liberação da hemoglobina na lise em água. Após a última lavagem, 100 µL do sedimento de hemácias eram colocados em 900 µL de PBS e 100 µL dessa nova suspensão de uso eram colocados em 1400 µL de água destilada para o rompimento das células. O produto da lise era então lido a 545 nm e a densidade óptica era utilizada para determinar o número de hemácias, sabendo-se que 0,700 unidades de absorbância correspondem a  $1 \times 10^9$  hemácias.

### **2.5.2 – Ensaio hemolíticos**

A atividade hemolítica dos extratos ou frações era determinada fazendo-se a diluição de série (1:2) do mesmo em placa de micro-ensaio de 96 wells com fundo redondo. Após a diluição, 200  $\mu$ L de tampão acetato (tampão acetato de sódio-ácido acético 20 mM, pH 5,5 com 150 mM de cloreto de sódio) contendo  $5 \times 10^6$  hemácias eram acrescentados em cada poço da placa. Após incubação de 30 minutos a 37°C, a placa era então centrifugada a 500 x g para sedimentar as hemácias não rompidas e 100  $\mu$ L do sobrenadante de cada poço contendo a hemoglobina liberada eram transferidos para uma placa de 96 wells de fundo chato para se efetuar a leitura da absorbância a 414 nm no leitor de ELISA (Spectra Max, Molecular Devices) e determinar a lise. Para os cálculos de porcentagem de lise, a quantidade total de hemoglobina liberada era obtida provocando-se a lise da mesma quantidade de hemácias de cada compartimento com 10  $\mu$ L de solução Triton X-100 a 0,25%. Eram ainda reservados compartimentos que continham somente hemácias e tampão para fazer o controle da lise espontânea que era sempre deduzida dos resultados. A lise espontânea dos experimentos relatados aqui não ultrapassou 8%. Os resultados foram expressos em gráficos utilizando o software GraphPad Prism onde no eixo das abscissas foram expressos a diluição dos extratos do parasita e no eixo das coordenadas as porcentagens de lise. As curvas de hemólise do extrato de promastigotas têm um perfil típico em diluições seriadas, usando a escala de Log 2 que é o que utilizamos para compararmos as diferentes atividades (ver Fig. 1). Em vários dos experimentos utilizamos também o que chamamos de H50 que é o inverso da diluição que causa 50% de lise, obtida por regressão linear das curvas de titulação (ver Fig.1). Cada experimento era feito em duplicata e os resultados são provenientes de um experimento típico repetido pelo menos três vezes. Os ensaios hemolíticos com extratos aquecidos a 100°C usando água e ebulidor elétrico, os extratos eram mantidos na água fervendo por 10 minutos, tempo necessário para desnaturação de proteínas presentes naqueles extratos.

### **2.5.3 – Ensaios de Proteção Osmótica**

Os ensaios de proteção osmótica de hemólise foram realizados. Antes da diluição dos extratos em 200  $\mu$ L de tampão acetato (tampão acetato de

sódio-ácido acético 20 mM, pH 5,5 com 150 mM de cloreto de sódio) contendo  $5 \times 10^6$  hemácias em cada poço da placa, acrescentava-se 30 mM de Polietileno Glicol-PEG 8000 (Sigma) obtendo o valor da sua massa de acordo com a fórmula que molaridade é igual a massa (g) em razão do peso molar do PEG (8000) multiplicado pelo seu volume (1000 mL). Após incubação de 30 minutos a 37°C, a placa era então centrifugada a 500 x g para sedimentar as hemácias não rompidas. A primeira leitura era feita com 100 µL do sobrenadante de cada poço contendo a hemoglobina liberada eram transferidos para uma placa de fundo chato para se efetuar a leitura da absorbância a 414 nm no leitor de ELISA (Spectra Max, Molecular Devices) e determinar a lise. Como prova de princípio, após a primeira leitura, eram retirados os 100 µL restantes e adicionados mais 100 µL de tampão acetato sem o PEG e então era feita uma segunda leitura, após a remoção do protetor osmótico.

## **2.6 – Inibição de Fosfolipases do tipo A em promastigotas de *L. amazonensis***

Para a inibição das enzimas das fosfolipases do tipo A1 e A2 os parasitos eram cultivados como descrito no item 2.1.1 adicionando inibidor de fosfolipases do tipo A chamado Rosenthal - Dimethyl-DL-2,3-distearoyloxypropyl(2-hidroxyethyl)ammonium acetate (Sigma). A solução estoque de 40 mM era obtida pela solubilização do reagente em 1000 µL de Dimetilsulfóxido-DMSO (Merck). A partir da solução estoque eram acrescentados no meio de cultura Schneider (Sigma Chem. Co) de forma diluída 1:10 em 20 mL de meio para que DMSO não fosse tóxico para os parasitos. Utilizamos as concentrações finais de 20 µM e 50 µM.

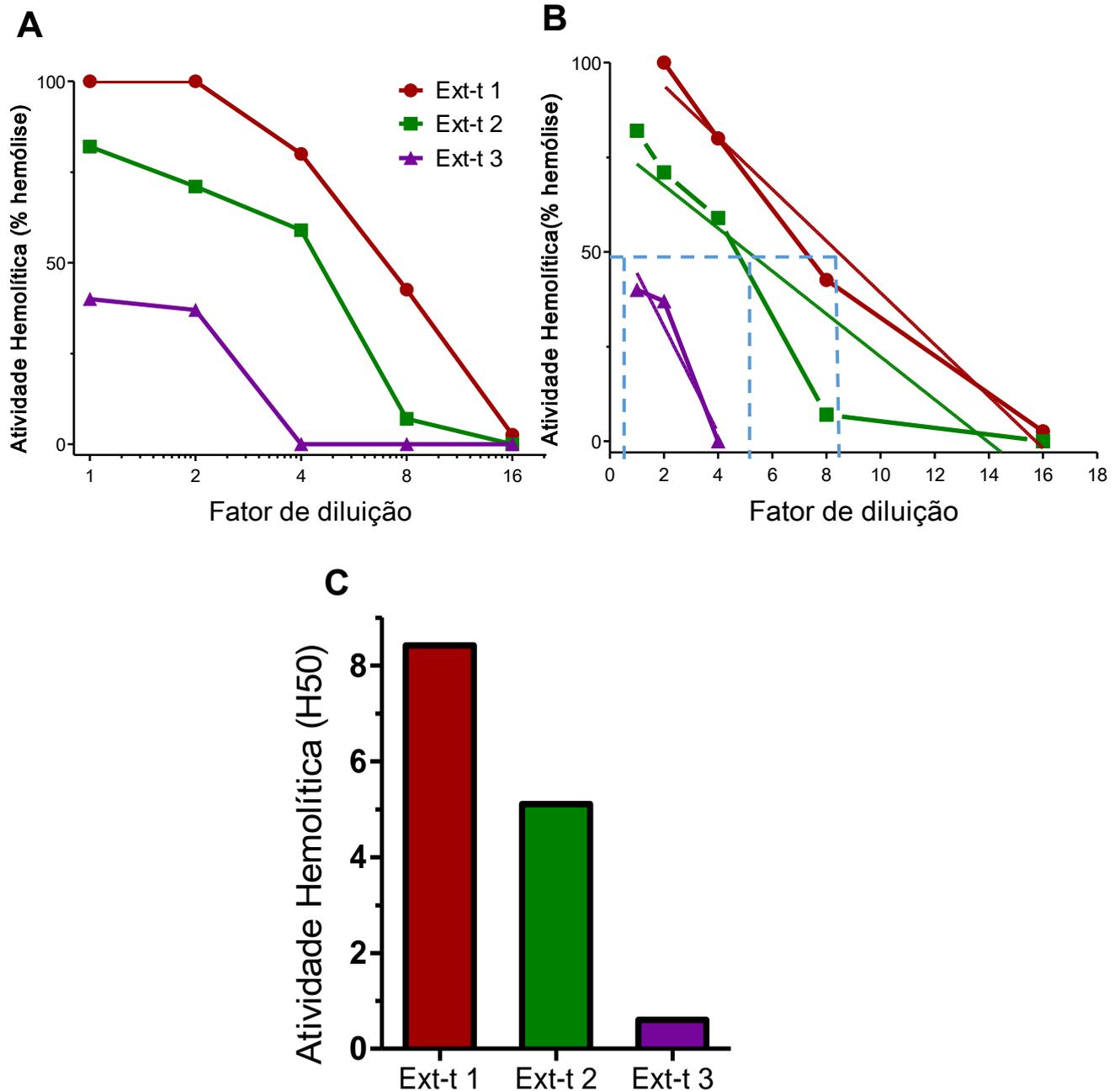
### **2.6.1 – Quantificação da Atividade de Fosfolipases do tipo A1 e A2**

Para verificar a inibição das enzimas fosfolipases A1 e A2 os extratos obtidos de parasitos cultivados na presença do inibidor Rosenthal foram submetidos a ensaios enzimáticos baseados em emissão de fluorescência feitos com os kits EnzChek® Phospholipase A1 Assay Kit e EnzChek®

Phospholipase A2 Assay Kit (Molecular Probes) que fornece um método fluorométrico simples contínuo em tempo real das atividades das enzimas, projetado para o monitoramento contínuo da fosfolipases A1 e A2 no fluorímetro com excitação a 460 nm e emissão a 515 nm. Após incubação dos extratos com os reagentes em placas de micro ensaio de 96 wells e fundo chato, a reação foi acompanhada por 120 minutos e a fluorescência emitida lida em intervalos de 5 segundos.

## 2.7 – Replicatas e Representações

Os experimentos mostrados neste trabalho são representativos de pelo menos duas, a maioria de três, replicatas biológicas. As formas de representação para verificarmos a atividade dos extratos preparados para este trabalho, um ensaio hemolítico era realizado (experimento padrão) após cada preparação. Na figura 1A está o resultado representativo de atividades hemolíticas que, de modo geral, são encontradas nos extratos obtidos. A atividade hemolítica do ext-1 é a atividade do ext-t correspondente a  $2 \times 10^9$  parasitos/mL, logo após a sua preparação. As outras duas curvas foram obtidas de experimentos feitos durante o trabalho com concentrações diferentes (não determinadas) do extrato do parasito apenas para exemplificar as formas de representação utilizadas neste trabalho. As curvas de hemólise do extrato de promastigotas em diluições seriadas têm o perfil apresentado na figura 1, que é o que utilizamos usualmente para compararmos as diferentes atividades. Em vários dos experimentos seguintes utilizamos também o que chamamos de H50, que é o inverso da diluição do extrato que causa 50% de hemólise, obtida por regressão linear das curvas de titulação, como explicado na figura 1B e representado na figura 1C. Assim, confirmamos os resultados anteriores de que ext-t preparados por congelamento e descongelamento de promastigotas possuem atividade hemolítica.



**Figura 1- Atividade hemolítica de Ext-t com diferentes atividades hemolíticas e cálculo da H50.** Os extratos diluídos em série (1:2) eram incubados com  $5 \times 10^6$  hemácias humanas em 200 $\mu$ L de tampão acetato de sódio durante 30 minutos a 37°C. As hemácias eram sedimentadas e o sobrenadante era lido a 414nm para a determinação da hemoglobina liberada. A atividade hemolítica foi expressa em **(A)** porcentagem de hemólise, calculada em relação a lise obtida pela adição de Triton X-100 à mesma quantidade de hemácias ou **(C)** H50 que é o inverso da diluição que causa 50% de lise, obtida por regressão linear das curvas de titulação, como representado em **(B)**, cuja reta foi obtida após regressão linear. Experimento representativo de pelos vários experimentos semelhantes.

### 3- RESULTADOS

#### 3.1 Atividade Hemolítica de extratos de promastigotas de *L. amazonensis*

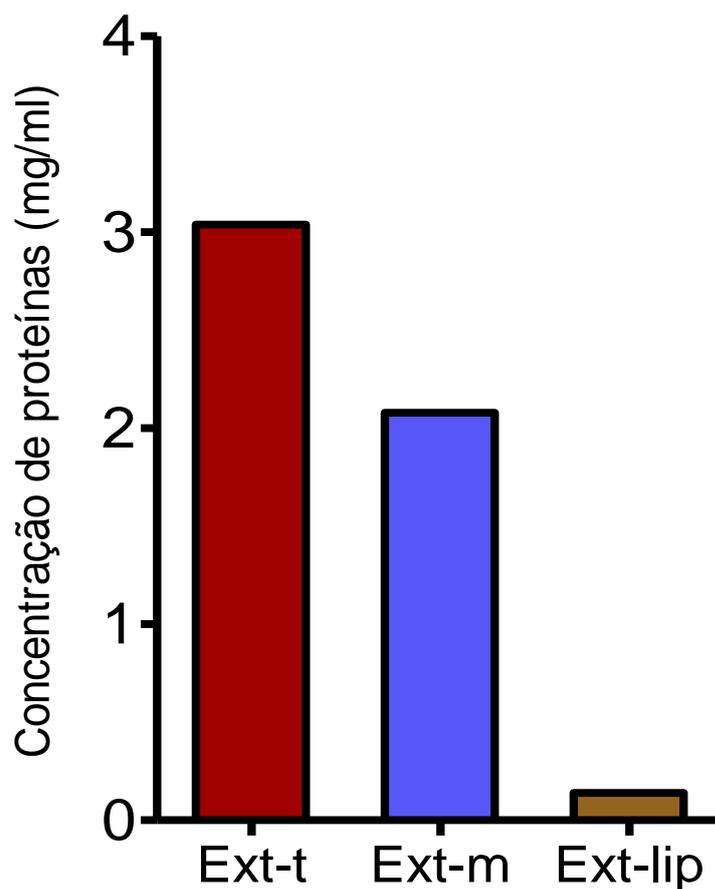
##### 3.1.1 Atividade hemolítica de extratos totais (ext-t) de extratos de membrana (ext-m) e de extratos lipídicos (ext-lip) de promastigotas

Como já visto anteriormente pelo nosso grupo, extratos de promastigotas de *L. amazonensis* possuem atividade hemolítica, já tendo sido mostrado que esses extratos danificam macrófagos por formar poros em sua membrana plasmática. Já havia sido também demonstrado pelo nosso grupo que essa atividade hemolítica está localizada na fração de membranas (ext-m) do ext-t do parasito (Noronha *et al.*, 1996). Como mencionado anteriormente, Castro-Gomes (2010) purificou frações hemolíticas de extratos de promastigotas, nas quais o único componente, totalmente destituído de proteínas, eram lipídeos pertencentes classe das lisofosfatidilcolinas (LPCs). Nossos primeiros objetivos foram tentar obter frações líticas a partir de extratos do parasito, para verificar se havia atividade hemolítica e, caso positivo, compará-la com a atividade original do ext-t e do ext-m. Assim, utilizando promastigotas no 5<sup>o</sup> dia de cultura axênica, extraímos lipídeos a partir do ext-m, que já sabíamos conter toda a atividade hemolítica do ext-t. Para verificar se o ext-lip estava destituído de proteínas, realizamos a dosagem de proteínas nos três extratos obtidos: ext-t, ext-m e ext-lip. Ao compararmos estes extratos verificamos que, de fato, a fração lipídica possui quantidades desprezíveis de proteínas em relação ao ext-t ou ext-m (Fig. 2).

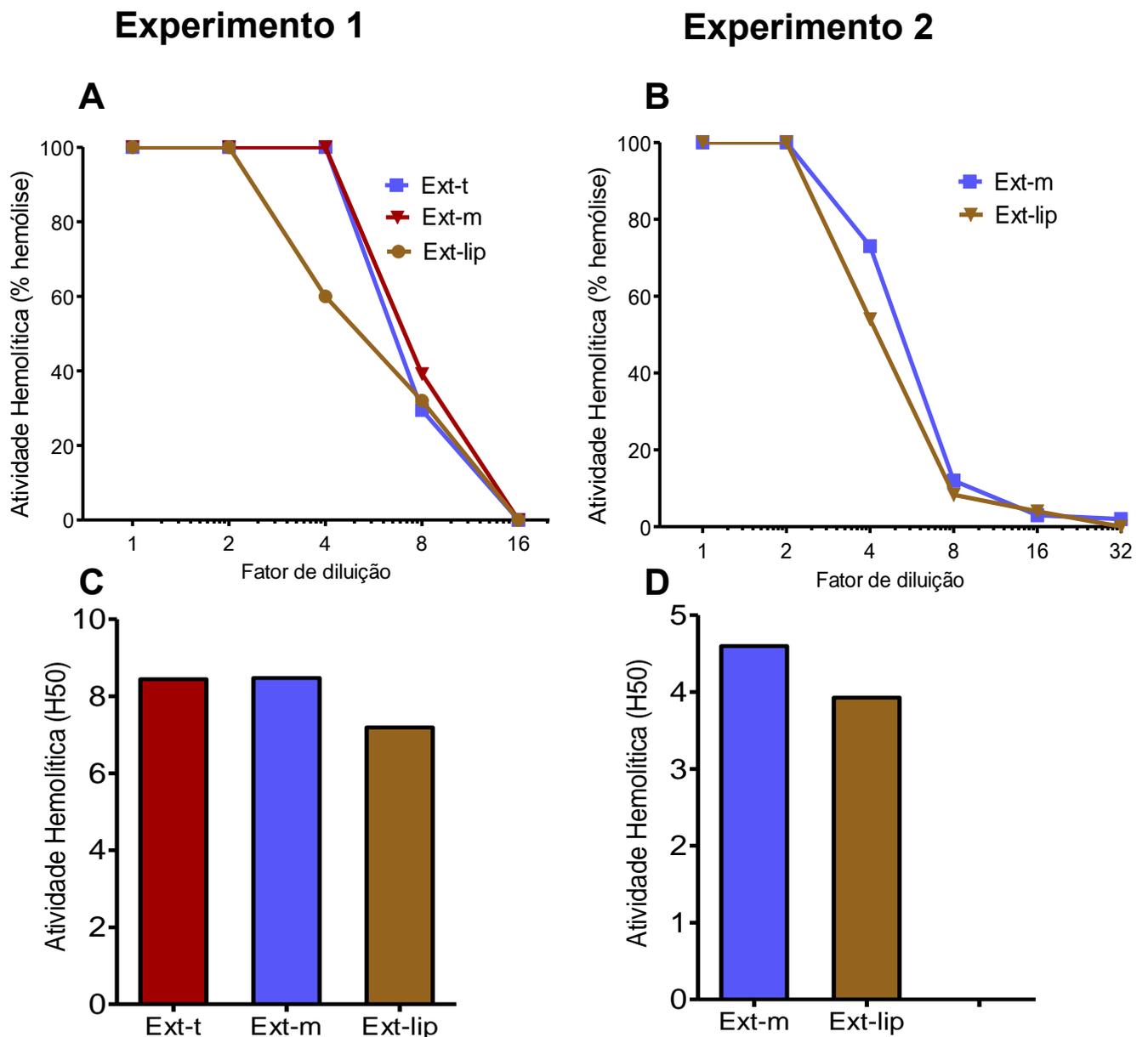
Avaliamos então a atividade hemolítica do ext-lip, comparando-a com a do ext-t e ext-m. Para isto, os ext-m e o ext-lip foram solubilizados em detergente, em concentração não hemolítica (utilizada como controle em todos os ensaios - resultados não mostrados). Ao ext-t foi adicionado detergente para a mesma concentração final. Na figura 3, mostramos dois experimentos onde, no primeiro, confirmamos resultados anteriores de que toda a atividade hemolítica do ext-t de promastigotas está na fração de membranas (ext-m). Nossos resultados também mostram pela primeira vez que a fração lipídica (ext-lip) de promastigotas de *L. amazonensis* reteve toda a atividade hemolítica

do ext-t e do ext-m, em ambos os experimentos. Estes resultados mostram que apenas lipídeos são responsáveis pela totalidade da atividade hemolítica presente no ext-t de promastigotas, corroborando resultados anteriores do nosso grupo que mostraram que LPCs purificados a partir de ext-m são hemolíticos por si só. Os resultados estão mostrados como curva de diluição (A e B) ou como H50 (C e D). Resultados anteriores também já haviam demonstrado que a fração solúvel obtida da preparação do ext-m é destituída de atividade hemolítica.

Avaliamos posteriormente se a extração de lipídeos diretamente de ext-t era igualmente eficiente, uma vez que facilitaria nos experimentos futuros. Na figura 4 mostramos que a extração de lipídeos feita a partir do ext-m parecia ser mais eficiente do que a extração feita diretamente do ext-t, uma vez que a atividade hemolítica de ext-lip obtido diretamente de ext-t parecia ser perdida durante o processo. Novamente verificamos que toda a atividade do ext-t era retida pelo ext-m e pelo ext-lip. Assim, mantivemos a extração a partir do ext-m.

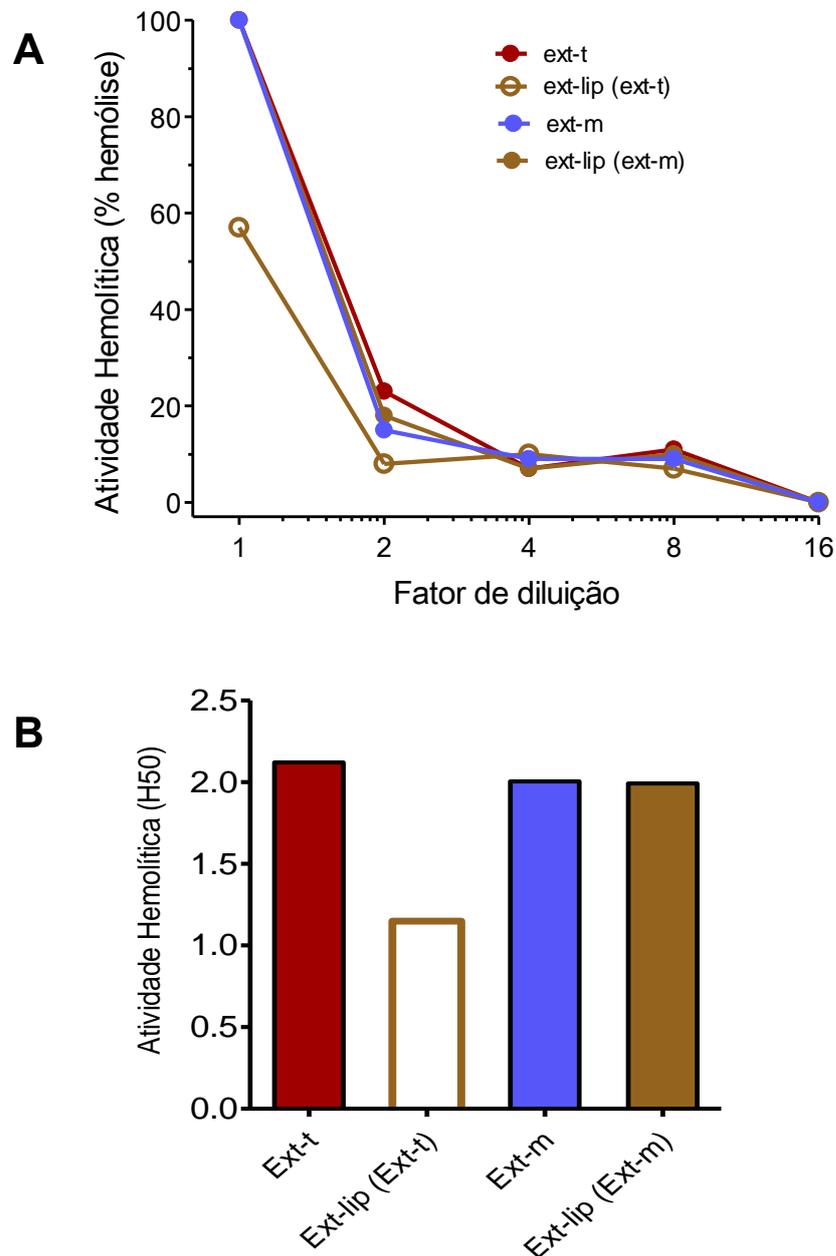


**Figura 2- Quantificação de proteínas nos extratos de promastigotas.** A concentração de proteínas do Ext-t, Ext-m Ext-lip foram determinada pelo Método de Bradford, adicionando 200  $\mu$ L do Prontein Assay Concentrate (BioRad) em 10  $\mu$ L do extrato. A curva padrão de concentração de proteínas foi feita com BSA nas concentrações de 5, 10 20, 40 e 60 mg/ml. A leitura da coloração era feita a 595 nm. Experimento representativo de pelo menos 2 experimentos semelhantes.



**Figura 3- Atividade hemolítica dos Ext-t, Ext-m e Ext-lip de promastigotas**

Os extratos diluídos em série (1:2) eram incubados com  $5 \times 10^6$  hemácias humanas em 200 $\mu$ L de tampão acetato de sódio durante 30 minutos a 37°C. As hemácias eram sedimentadas e o sobrenadante era lido a 414nm para a determinação da hemoglobina liberada. A atividade hemolítica foi expressa em **(A) e (B)** - percentagem de hemólise, calculada em relação a lise obtida pela adição de Triton X-100 à mesma quantidade de hemácias ou **(C) e (D)** - H50 que é o inverso da diluição que causa 50% de lise, obtida por regressão linear das curvas de titulação. Experimento representativo de pelo menos 3 experimentos.



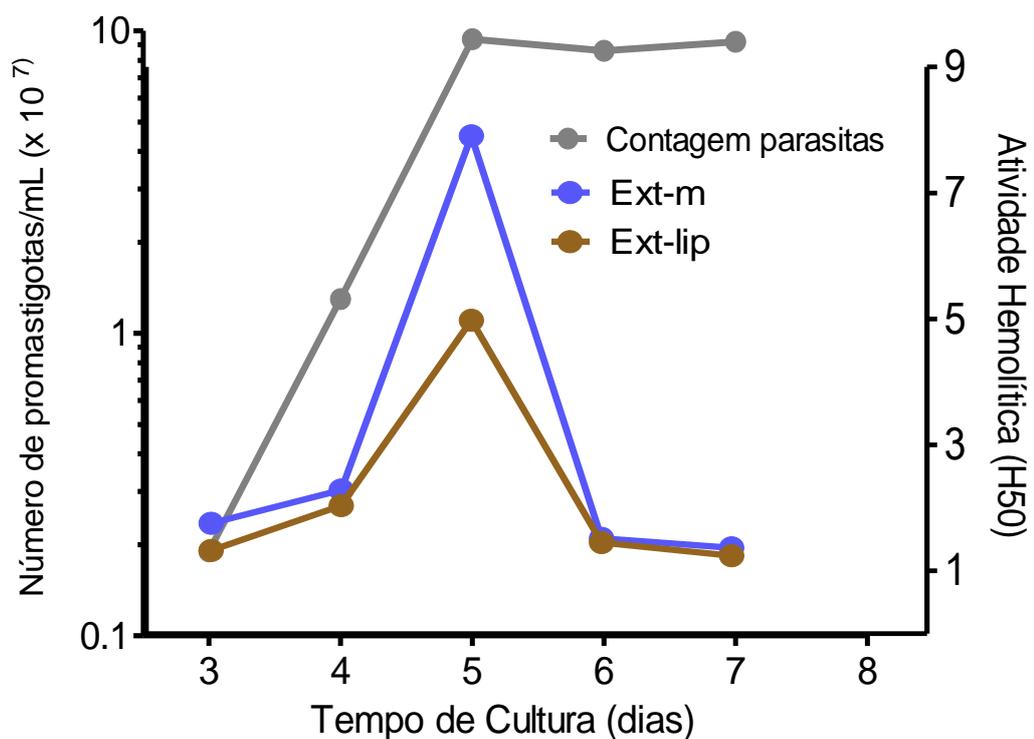
**Figura 4- Atividade hemolítica de Ext-lip a partir de Ext-t ou Ext-m de promastigotas.** Os extratos diluídos em série (1:2) eram incubados com  $5 \times 10^6$  hemácias humanas em 200 $\mu$ L de tampão acetato de sódio durante 30 minutos a 37°C. As hemácias eram sedimentadas e o sobrenadante era lido a 414nm para a determinação da hemoglobina liberada. **(A)** porcentagem de hemólise, calculada em relação a lise obtida pela adição de Triton X-100 à mesma quantidade de hemácias ou **(B)** H50 que é o inverso da diluição que causa 50% de lise, obtida por regressão linear das curvas de titulação. Experimento representativo de pelo 3 experimentos.

### **3.1.2 O perfil da atividade hemolítica ao longo dos dias de cultivo de promastigotas é o mesmo em ext-t, ext-m e ext-lip**

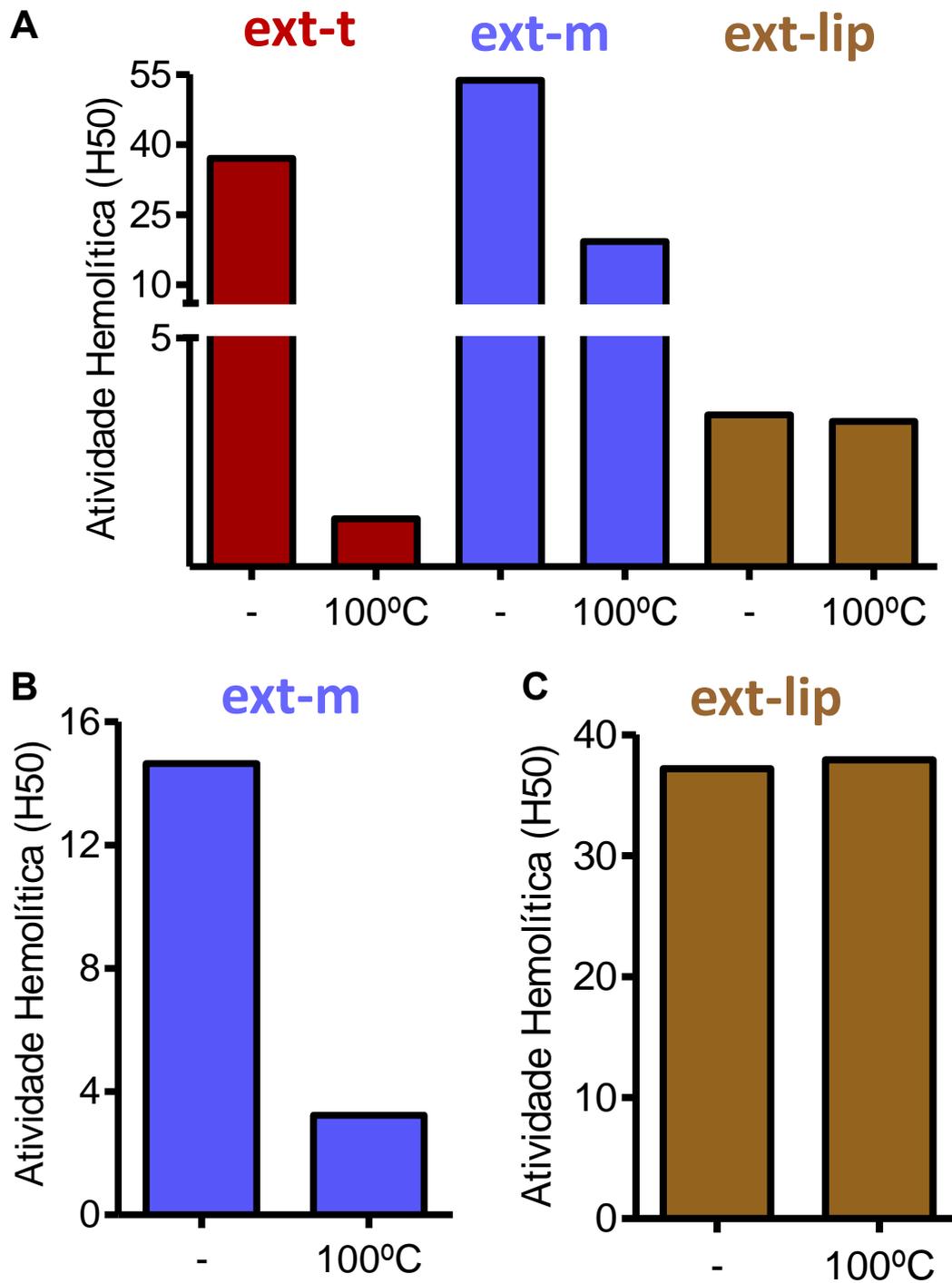
Resultados anteriores do nosso grupo mostraram que a atividade hemolítica de ext-t de promastigotas é diferencialmente expressa durante o crescimento de promastigotas em cultivo axênico. A atividade lítica é praticamente indetectável no segundo dia de cultivo e segue aumentando gradativamente ao longo do crescimento dos parasitos, atingindo um pico no 4<sup>o</sup>-5<sup>o</sup> dia, para depois decair aos níveis iniciais (Noronha, 1996). Assim, um de nossos objetivos foi verificar se o ext-m e o ext-lip também seguiria esta mesma cinética. Verificamos que tanto o ext-m como o ext-lip não apresentaram atividade hemolítica no início do cultivo, até o 3<sup>o</sup> dia, aumentando a partir do 4<sup>o</sup> dia, atingindo um pico no 5<sup>o</sup> dia e decaindo no 6<sup>o</sup> dia (Fig. 5). Desta forma, podemos ver que atividade lítica presente no ext-lip tem o mesmo perfil que o ext-m e o ext-t, reforçando a ideia de que a molécula citolítica responsável pela atividade hemolítica do ext-t seja mesmo um lipídeo (Fig. 5B).

### **3.2 Efeito da temperatura na atividade hemolítica de ext-m e ext-lip**

Estudos anteriores nosso grupo também já havia mostrado que a atividade hemolítica de ext-t é totalmente abolida quando aquecido a 100°C, indicando à época, que a leishporina era uma proteína. Resolvemos assim verificar a termolabilidade da atividade hemolítica encontrada em ext-lip, comparando com a termolabilidade da atividade hemolítica do ext-m e do ext-t. Assim, confirmamos os resultados anteriores de que a atividade hemolítica do ext-t, contendo lipídeos e proteínas, foi drasticamente diminuída pelo aquecimento do extrato a 100°C, durante 10 min., com perda de cerca de 97% da atividade hemolítica (Fig. 6A). Com o ext-m, obtivemos resultados variáveis e inesperados, com perdas de atividade hemolítica de 65% a 80%, dependendo da atividade hemolítica do extrato (Fig. 6A e B). Contudo, como



**Figura 5 – Atividade hemolítica do Ext-lip durante o cultivo de promastigotas *in vitro*.** A contagem dos parasitas era feita em por microscopia óptica em câmara hematocimétrica de Neubauer. Ext-m e Ext-lip obtidos do 3º ao 7º dia de cultivo dos das promastigotas eram diluídos em série (1:2) eram incubados com  $5 \times 10^6$  hemácias humanas em 200 $\mu$ L de tampão acetato de sódio durante 30 minutos a 37°C. A atividade hemolítica está representada em H50 que é o inverso da diluição que causa 50% de lise, obtida por regressão linear das curvas de titulação. Experimento representativo de pelo menos 3 experimentos semelhantes.



**Figura 6- Efeito da temperatura na lise dos Ext-m e Ext-lip.** Ext-m e Ext-lip foram aquecidos a 100°C, por fervera, durante 10 minutos antes do ensaio hemolítico. A atividade hemolítica está representada em H50.

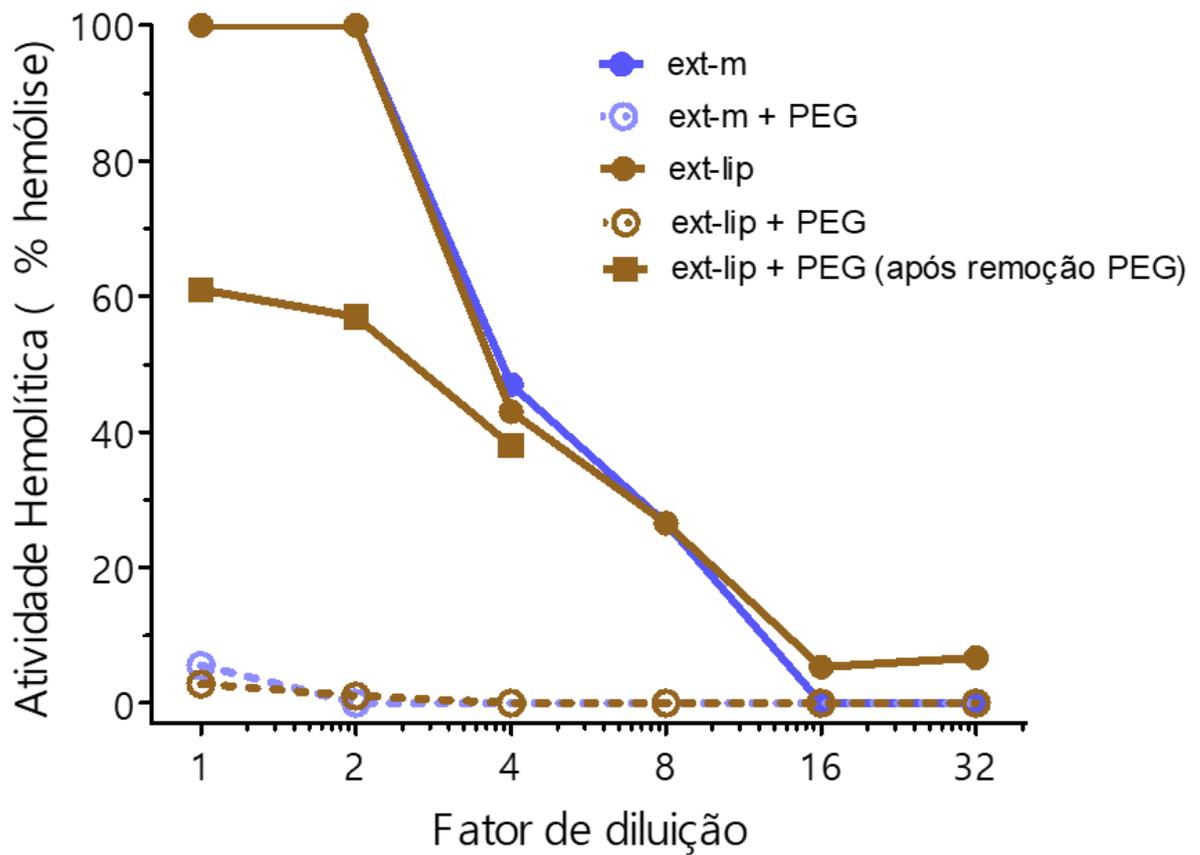
esperado para lipídeos, a atividade hemolítica do ext-lip não foi alterada pelo mesmo tratamento (Fig. 6A e B), independente da atividade hemolítica do extrato. Estes resultados mostram que a molécula lítica e o mecanismo de lise podem ser mais complexos do que se presume neste momento. No entanto, é possível fazer algumas especulações que serão discutidas mais adiante.

### **3.3 A proteção osmótica na hemólise mediada pelo ext-lip indica que o mecanismo de lise é por formação de poros**

Pela utilização da técnica de *patch-clamp*, nosso grupo já havia mostrado que o ext-t lisa macrófagos por formar poros na membrana plasmática desta célula, o gera aumentos bruscos da corrente de membrana indicando a típica da abertura de poros seguidos do colapso celular (Noronha *et al.*, 2000).

Por criar canais transmembrana na bicamada lipídica celular, íons e pequenas moléculas passam por eles e, devido à alta concentração de macromoléculas no interior da célula há um aumento da pressão osmótica causando um influxo de água, o que leva ao rompimento celular. Este processo, conhecido como lise colóido-osmótica, pode ser evitado pela adição de macromoléculas ao meio extracelular que compensa o desequilíbrio osmótico. Desta forma, a proteção osmótica conferida por macromoléculas é utilizada como um indício de que o mecanismo de lise é por formação de poros na bicamada lipídica (Bhakdi & Tranum-Jensen 1983, Young & Cohn 1987, Young 1989).

Já havia sido verificado pelo nosso grupo que macromoléculas como o polietilenoglicol (PEG) 6000 inibe totalmente a hemólise mediada por ext-m de promastigotas de *L. amazonensis* (Noronha *et al.*, 1996). Para então verificar o efeito de macromoléculas sobre a hemólise mediada pelo ext-lip de promastigotas de *L. amazonensis*, realizamos ensaios hemolíticos, desta vez na presença de polietilenoglicol PEG 8000. Como mostrado na figura 7, verificamos que esta macromolécula inibe completamente a hemólise mediada por Ext-lip de promastigotas da mesma forma que inibe a hemólise mediada



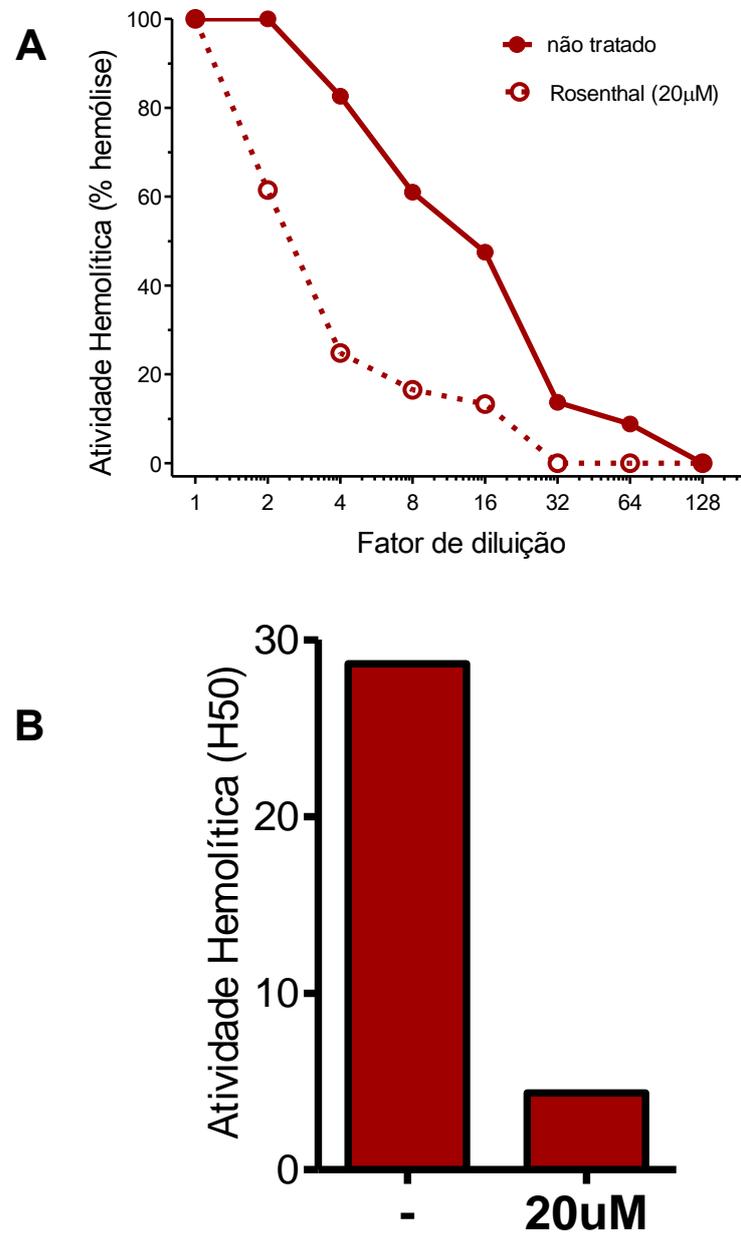
**Figura 7- Proteção osmótica por PEG 8000.** Em hemácias diluídas em tampão acetato contendo ou não 30mM PEG 8000 foram acrescentados os extratos de promastigotas diluídos em série (1:2). As hemácias eram sedimentas e o sobrenadante era lido a 414nm para a determinação da hemoglobina liberada. Experimento representativo de pelo menos 3 experimentos semelhantes.

por ext-m. A inibição observada não é devida à inativação da molécula pelo PEG, porque a lise é restaurada após as hemácias serem lavadas e ressuspensas em tampão de lise sem PEG. Este resultado indica que a hemólise mediada por ext-lip é do tipo colóido-osmótica, sugerindo que os lipídeos hemolíticos de promastigotas de *L. amazonensis* causam a lise celular por formar poros na membrana plasmática das hemácias.

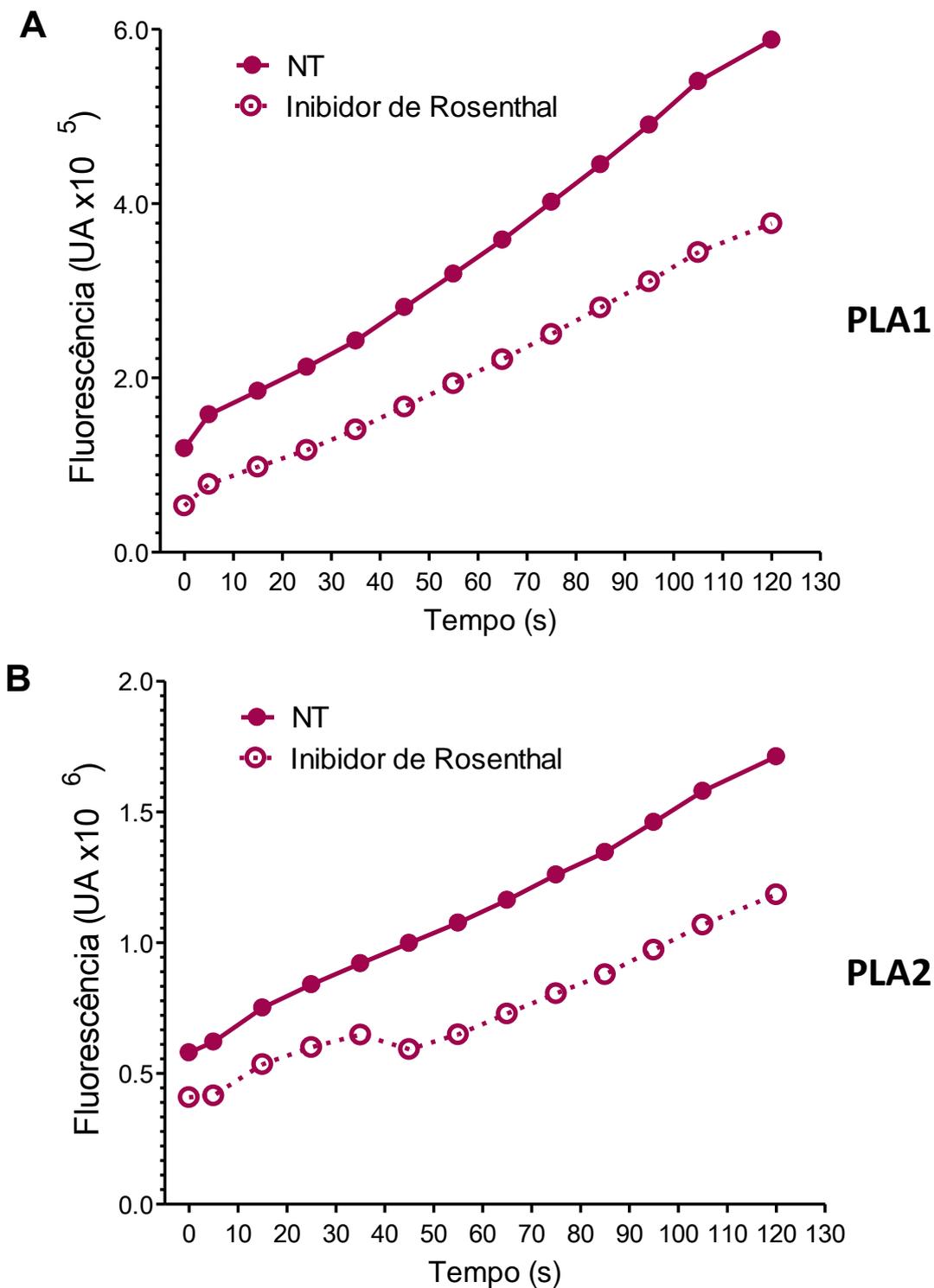
No Departamento de Bioquímica e Imunologia no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, realizamos uma colaboração da aluna Paula Rhana Queiroz Araújo, sob a orientação do Prof. Jader dos Santos Cruz, experimentos utilizando a técnica de *patch-clamp*. Embora várias tentativas tenham sido feitas, ainda não obtivemos sucesso.

### **3.4 A inibição de fosfolipases (PLA) 1 e 2 em promastigotas abole a atividade hemolítica**

Os LPCs são gerados pela ação das enzimas PLA1 e PLA2 que clivam fosfolipídeos em lisofosfolipídeos. Resolvemos então usar um inibidor das enzimas PLA1 e PLA2, o acetato de dimetil-*dl*-2,3-distearoilpropil-2'-hidroxietil amônio, um análogo de uma fosfatidilcolina com uma cabeça polar invertida, que se liga ao sítio ativo dessas enzimas, conhecido como inibidor de Rosenthal (Rosenthal & Greyer, 1960), para verificar o efeito da inibição da geração de LPCs sobre a atividade hemolítica de extratos de promastigotas. Num primeiro momento utilizamos o inibidor em uma concentração de 20  $\mu$ M adicionado à cultura de promastigotas, que ficaram sob o efeito da droga até o 5º dia de cultivo, quando preparamos os extratos. Nessa concentração, já podemos ver uma queda considerável da atividade hemolítica do ext-t obtido de promastigotas cultivados na presença do inibidor, como visto na figura 8. Decidimos então, cultivar os parasitos na presença dessa mesma concentração do inibidor durante duas passagens e também de uma concentração menor (10  $\mu$ M) para avaliarmos a que melhor inibiria totalmente a atividade hemolítica dos extratos. Para avaliarmos a inibição das PLAs, suas atividades foram determinadas na presença ou na ausência de 20  $\mu$ M do inibidor. Na figura 9 podemos observar que, durante duas passagens nessa concentração, a atividade das PLA1 e PLA2 foram parcialmente inibidas (não avaliamos a



**Figura 8- Tratamento de promastigotas com inibidor de Rosenthal.** Promastigotas foram tratadas com 20µM (concentração final) de inibidor de Rosenthal durante os 5 dias de cultivo. Ext-t dos parasitas tratados ou não eram ensaiados quanto à sua atividade hemolítica. Os resultados estão expressos em **(A)** porcentagem de hemólise ou **(B)** H50. Experimento representativo de pelo menos 2 experimentos semelhantes.

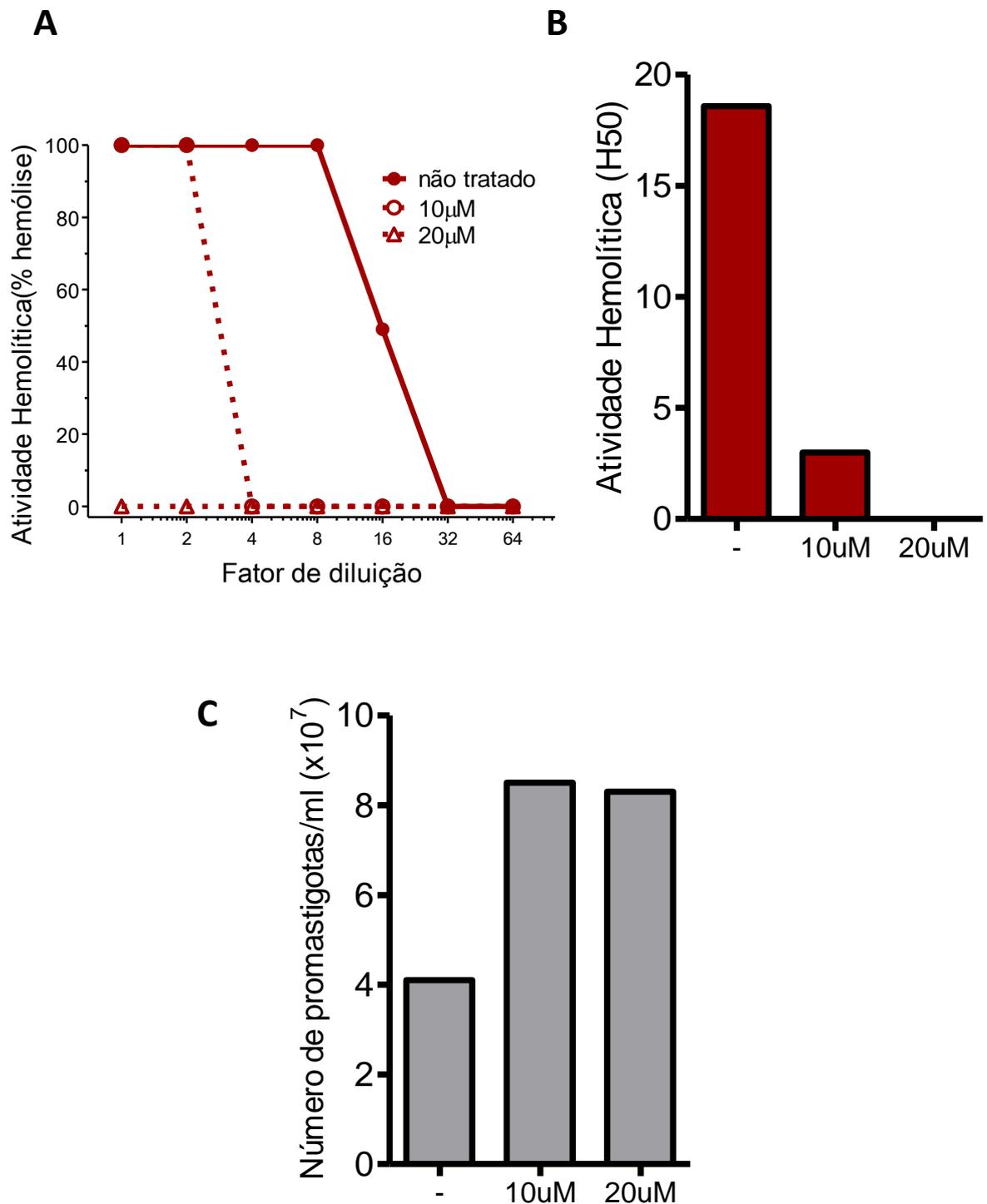


**Figura 9- Atividade enzimática das fosfolipases A1 e A2.** Perfil da atividade de fosfolipases A1 (**A**) e A2 (**B**) presente em extratos totais de promastigotas de *L. amazonensis* (NT) ou em extratos totais obtidos de promastigotas cultivadas com o inibidor Rosenthal. Após incubação dos extratos com os respectivos substratos, a reação foi acompanhada por 120 e a fluorescência emitida registrada.

atividade enzimática na concentração de 10  $\mu\text{M}$ ). No entanto, esta inibição parcial obtida com 20  $\mu\text{M}$  foi suficiente para a inibição total da atividade hemolítica, enquanto 10  $\mu\text{M}$  foram capazes de inibir cerca de 84% (Fig. 10 A e B). O tratamento dos parasitos com o inibidor de Rosenthal não afetou a viabilidade dos parasitos, uma vez que no 5<sup>o</sup> dia de cultura, no qual foram feitos os extratos, o crescimento dos parasitos foi compatível com o esperado (Fig. 10 C, compare com Fig. 5). Esses resultados mostram que a inibição da enzima que gera LPC abole totalmente a hemólise mediada por Ext-t corroborando resultados anteriores de que os LPCs são as moléculas hemolíticas do extrato de promastigotas. Não foi ainda possível quantificar o LPC no extrato de promastigotas tratados com inibidor de Rosenthal.

### **3.5 A inibição de PLA1 e PLA2 em promastigotas inibe a sua capacidade invasão em células hospedeiras fagocíticas e não fagocíticas**

Resolvemos ainda investigar se a inibição das PLA1 e PLA2 com a perda da atividade hemolítica teriam algum efeito na invasão de promastigotas em macrófagos e células não fagocíticas. Como a atividade das PLA1 e PLA2 não haviam sido totalmente inibidas na concentração de 20  $\mu\text{M}$ , resolvemos aumentar a concentração do inibidor de Rosenthal. Assim, para a avaliação da capacidade de invasão de parasitos, utilizamos promastigotas expressando o gene da RFP. RFP-promastigotas de *L. amazonensis* (*Lla*-RFP) foram cultivadas em meio de cultura contendo 50  $\mu\text{M}$  do inibidor de Rosenthal durante duas passagens do cultivo axênico. A invasão celular foi avaliada por citometria de fluxo, após 4 horas de contato da célula hospedeira com o parasito. Verificamos que a invasão tanto de macrófagos (células RAW 264.7) quanto de células não fagocíticas (MEF) é diminuída pela inibição das PLAs. Em macrófagos, a invasão diminuiu cerca de 20 % (Fig. 11A), sendo que em células não fagocíticas a invasão caiu para cerca da metade (Fig.11B).



**Figura 10-** Atividade hemolítica presente nos extratos totais de *L.amazonensis* após tratamento com inibidor Rosenthal A1 e A2 e viabilidade dos parasitos. **(A)** Atividade hemolítica de parasitos não tratados ou cultivados na presença de 10 e 20  $\mu$ M do inibidor de fosfolipases A1 e A2. **(B)** representação em H50 dos resultados apresentados A. **(C)** Número de parasitos obtidos ao quinto dia de cultivo.

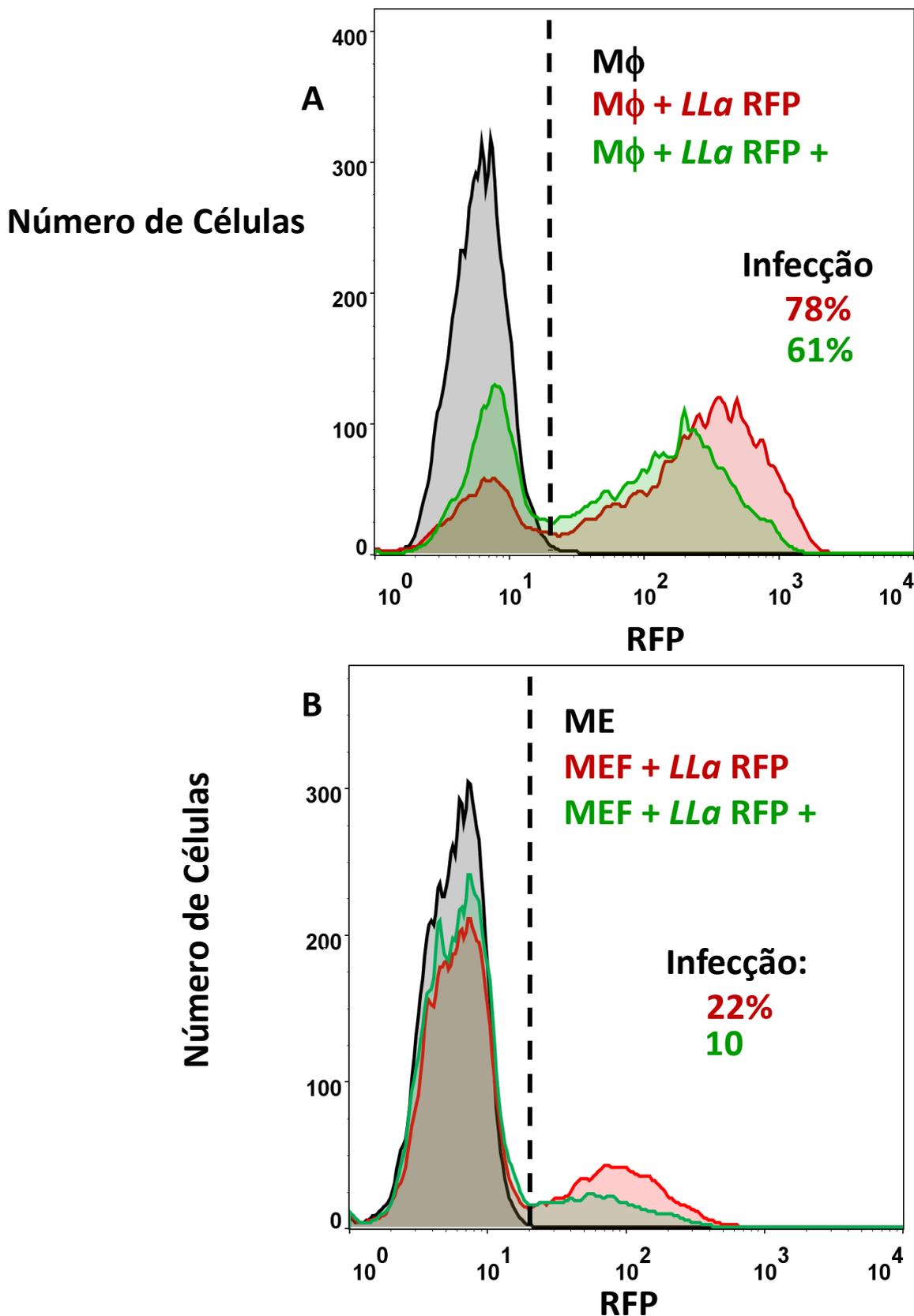


Figura 11- Inibição das fosfolipases A1 e A2 de promastigotas de *L.amazonensis* reduz a infectividade dos parasitos para macrófagos e fibroblastos. (A) Macrófagos (Mf) ou (B) fibroblastos (MEF), foram incubados com promastigotas de *L.amazonensis*-RFP (*LLα* RFP) não tratadas (NT) ou cultivadas na presença do inibidor Rosenthal (RTL). Após análises de citometria de fluxo e medida a fluorescência RFP emitida pelas células, a porcentagem de infecção foi determinada como indicado.

#### 4- DISCUSSÃO

Há vários anos, nosso grupo descreveu e vem estudando uma atividade citolítica no gênero *Leishmania*. Essa atividade foi bastante caracterizada em extratos de promastigotas de *L. amazonensis*, utilizando essencialmente hemácias como células-alvo, mas verificando também que células nucleadas, como macrófagos murinos ou leucócitos humanos, também morriam quando em contato com ext-t de promastigotas de *L. amazonensis*. A atividade hemolítica foi também detectada em promastigotas de *L. major*, *L. guyanensis* e *L. panamensis*, bem como em amastigotas de *L. amazonensis* e *L. major*, não tendo sido investigada em promastigotas ou amastigotas de outras espécies. Praticamente toda a caracterização realizada foi com a espécie *L. amazonensis*, embora algumas das características tenham sido estudadas também em *L. guyanensis* (Almeida-Campos & Horta, 2000). Utilizando a técnica de *patch-clamp*, mostramos que Ext-t de *L. amazonensis* formam poros transmembranas em macrófagos, a principal célula hospedeira desse protozoário (Noronha *et al.*, 2000). Por este motivo essa citolisina foi denominada de leishporina, antes mesmo do conhecimento de sua identidade molecular (Horta, 1997; Almeida-Campos *et al.*, 2002). Outros achados importantes sobre a leishporina foram: 1) sua atividade ótima ocorre a pH 5,5 e a 37°C (Noronha *et al.*, 1994; Noronha *et al.*, 1996); 2) para formar poros a leishporina liga-se diretamente a fosfolipídeos de membrana, não necessitando de proteínas, carboidratos ou colesterol da membrana da célula-alvo (Castro-Gomes *et al.*, 2009); 3) para formar poros, a leishporina precisa ser previamente ativada (Almeida-Campos & Horta, 2000); 4) a ativação da leishporina parece ocorrer pela dissociação e/ou proteólise de um oligopeptídeo inibidor não covalentemente ligado à citolisina, o que resulta em um aumento da afinidade da citolisina para fosfolipídeos e na aquisição da capacidade de formar poros (Almeida-Campos *et al.*, 2013).

As citolisinas formadoras de poro já foram descritas e caracterizadas em vários microrganismos patogênicos e, para várias dessas moléculas, já foi descrito a participação na patogênese das doenças causadas pelos mesmos (Horta, 1997; Almeida-Campos *et al.*, 2002; Parker & Feil, 2005; Ishino *et al.*, 2005; Herbst *et al.*, 2004). Assim, nossa pergunta óbvia com relação à

leishporina tem sido qual seria o papel dessa citolisina no ciclo de vida do parasita ou na patogênese da leishmaniose, o que até o momento não foi possível responder. Várias hipóteses ainda a serem testadas foram propostas pelo nosso grupo, as quais enumeramos aqui: 1) lesão da membrana plasmática da célula hospedeira no momento da invasão, crucial para a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , o que aumentaria o processo de invasão tanto por fagocitose como por exocitose de lisossomos, esta última descrita pela primeira vez recentemente pelo nosso grupo (Cavalcante-Costa *et al.*, 2019); 2) ruptura fagolisossomo (e, posteriormente da membrana plasmática) do macrófago pelo parasita (devido às condições ótimas de ação serem a pH 5,5 e 37°C) com a consequente liberação das formas amastigotas, contribuindo para a amplificação da infecção, como já demonstrado para o *T. gondii* (Kafsack *et al.*, 2009) e também para as bactérias *L. monocitogenes* (Bielecki *et al.*, 1990) e *L. pneumophila* (Gao & Kwaik, 2000) e sugerido para *T. cruzi* (Andrews *et al.*, 1990); nosso grupo já demonstrou que *L. guyanensis*, por exemplo, causa necrose de macrófagos *in vitro* com lesão de sua membrana plasmática (daMata *et al.*, 2015); 3) necrose tecidual, consequentemente aumentado a lesão, tornando-a mais virulenta 4) o rompimento de hemácias no interior do hospedeiro invertebrado, para a obtenção de nutrientes; 5) indução de apoptose em macrófagos infectados, tipo de morte celular que nosso grupo já demonstrou *in vitro* para *L. amazonensis* (daMata *et al.*, 2015); 6) necrose tecidual na lesão causada pela doença. Assim, é fundamental que a identidade molecular da leishporina seja desvendada para a descoberta e o estudo de sua(s) função(ões).

As primeiras evidências obtidas pelo nosso grupo levaram à interpretação de que a leishporina seria uma proteína: a fervura a 100°C ou o tratamento com enzimas proteolíticas, a saber pronase e tripsina, abole ou reduz cerca de 80%, respectivamente, a atividade hemolítica do ext-t de promastigotas de *L. amazonensis* (Noronha *et al.*, 1996). Essa interpretação foi posteriormente corroborada pelo fato de que a superexpressão de proteínas de *L. major* anotadas como hemolisinas do tipo III (semelhantes à de *Bacillus cereus*), aumenta a atividade hemolítica de ext-t desta espécie, sugerida também ser por formação de poros por experimentos de proteção osmótica (Miranda, 2016).

No entanto, surpreendentemente, resultados posteriores, em que ext-t de promastigotas de *L. amazonensis* foram submetidos a uma série de cromatografias líquidas no intuito de purificar a molécula citolítica, mostraram que as únicas frações purificadas que tinham atividade hemolítica eram destituídas de proteínas e continham apenas componentes de massas moleculares (M/Z 518 e M/Z 520) que corresponderiam aos LPCs, como demonstrado por espectrometria de massa (Castro-Gomes, 2010). Essas moléculas, quando fragmentadas no espectrômetro de massa, foram identificadas por suas cargas como sendo dois fosfolipídeos de fosfatidilcolina, um de ácido linoleico e outro de ácido linolênico (Castro-Gomes, 2010). Isto nos indicou que as moléculas formadoras de poro de *L. amazonensis* pudessem ser os LPCs, uma vez que foram as únicas moléculas líticas encontradas ao final da cromatografia.

Esses dois tipos de resultados, aparentemente contraditórios, nos fizeram pensar em duas hipóteses. A primeira, de que a atividade formadora de poros seja mediada por LPCs, mas que seja aumentada ou facilitada por uma proteína, e a segunda de que duas moléculas diferentes, uma lipídica e outra proteica, tenham atividades citolíticas formadoras de poros. Essas hipóteses serviram para alimentar a ideia que a leishporina possa ser uma molécula lipídica. Assim, no presente trabalho, resolvemos caracterizar a atividade citolítica de lipídeos de promastigotas, investigando o mecanismo da lise de hemácias, bem como a importância de LPCs na atividade lítica de ext-t de promastigotas e na capacidade de infecção de células hospedeiras por promastigotas. Utilizamos a *L. amazonensis*, uma vez que a grande maioria dos resultados anteriores foi obtida com esta espécie. Utilizamos também durante todo o trabalho o ensaio hemolítico para a detecção e o estudo da atividade citolítica mediada por lipídeos.

Para este estudo, preparamos extratos de promastigotas que fossem ricos em lipídeos e livres de proteínas. Antes da obtenção desses extratos, os ext-t eram sempre avaliados previamente quanto à sua atividade hemolítica. As curvas de hemólise mediada pelo ext-t possuem um perfil característico quando usamos diluições seriadas desse extrato e são o que utilizamos para compararmos as diferentes atividades. Em vários experimentos utilizamos também o que chamamos de H50 que é o inverso da diluição que causa 50%

de lise, obtida por regressão linear dessas curvas de titulação (Fig. 1) que quantifica a atividade hemolítica.

No início deste trabalho, testamos alguns protocolos para a extração de lipídeos livres de proteínas e verificamos que a melhor maneira de se obter o ext-lip, com maior rendimento foi pela obtenção sequencial de ext-t, ext-m e ext-lip (Fig. 4), tendo comprovado que o ext-lip obtido do ext-m é praticamente destituído de proteínas (Fig. 2), como se fazia necessário para avaliarmos a atividade hemolítica apenas dos lipídeos.

Assim, verificamos pela primeira vez que ext-lip possuía praticamente a mesma atividade hemolítica do ext-t ou do ext-m (Fig. 3). Esse resultado foi importante, pois mostra que a atividade hemolítica de promastigotas reside toda na fração de lipídeos de promastigotas de *L. amazonensis*. Esses resultados são corroborados pelos experimentos de cinética da expressão da atividade hemolítica durante o crescimento *in vitro* de promastigotas. Já havia sido mostrado anteriormente que a leishporina é expressa em maior quantidade antes de entrar na fase estacionária, com o ápice de atividade geralmente no 5º dia de cultivo. O fato de que a fração contendo apenas lipídeos segue a mesma cinética de expressão da atividade hemolítica do ext-m (Fig. 5) reforça a ideia de que a leishporina possa ser, de fato, um lipídeo ou fazer parte de um grupo de moléculas, sendo uma delas, um lipídeo. A menor atividade total observada para o ext-lip nesta série de experimentos pode ser devido a perdas ocorridas durante a obtenção do mesmo. Esses resultados mostrando que lipídeos, por si só, são hemolíticos são congruentes com os de Castro-Gomes (2010), que mostrou que altas concentrações de proteinase K não abole (e às vezes até aumenta) a atividade hemolítica de ext-m.

Como já mencionado, resultados anteriores do nosso grupo mostraram que o aquecimento do ext-t ou ext-m a 100°C por 5 minutos (Noronha *et al.*, 1996) ou a 56°C por 1 hora (Noronha, 1996) abole toda a atividade hemolítica desses extratos. Como no presente trabalho verificamos que a atividade hemolítica está toda contida no ext-lip, partimos do pressuposto de que à fervura, esses extratos não perderiam a atividade hemolítica, por serem destituídos de proteínas. Essa suposição foi de fato confirmada quando mostramos que a fervura do ext-lip (no caso 10 minutos) não acarretou a perda da atividade (Fig. 6A e C). No entanto, nossos resultados confirmam os

resultados anteriores de que ext-t perdem totalmente sua atividade hemolítica, enquanto que a perda da atividade do ext-m sob o mesmo aquecimento é ainda grande, mas menor do que a perda no ext-t (Fig. 6A e B). Esses resultados estão de acordo com os de Castro-Gomes (2010), mostrando que o tratamento com altas doses de proteinase K não só não abolia a atividade hemolítica do ext-m, mas tornava-a resistente ao aquecimento a 100°C por 5 minutos, anteriormente termolábil. Contraditórios com o que se havia mostrado antes com o tratamento com a tripsina e a pronase, que destruíam cerca de 80% da atividade hemolítica, os resultados do tratamento com a proteinase K são, no entanto, totalmente compatíveis com os resultados encontrados neste trabalho. Além disso, também como esperado, resultados anteriores de Castro-Gomes (2010) já haviam mostrado que as frações contendo LPCs puros não sofrem nenhuma perda da atividade hemolítica por fervura. Uma interpretação plausível para a perda da atividade lítica presente extrato na presença de proteínas e mediante fervura seria a ocorrência de um fenômeno de inibição. Após fervura, é possível que os núcleos hidrofóbicos das proteínas presentes e uma vez expostos pela desnaturação, poderia atrair e ou se ligar aos lipídeos, capturando-os. Esta hipótese é corroborada pelo fato de que extratos inativos após fervura recuperam sua atividade lítica quando tratados com agentes dissociantes como cloreto de guanidina ou uréia (Castro-Gomes, 2010).

A formação de poros em macrófagos pela leishporina de *L. amazonensis* já foi demonstrada por técnicas de *patch-clamp* utilizando ext-t (Noronha *et al.*, 2000). Esta técnica é a que permite concluir que poros tenham sido abertos na membrana da célula em questão. Neste trabalho, tentamos por várias vezes utilizar a técnica de *patch-clamp* utilizando o ext-lip e macrófagos da linhagem RAW, mas ainda sem sucesso. Como o ext-lip é solubilizado em detergente em concentração sublítica para hemácias, é possível que, para o ensaio de *patch-clamp*, esta concentração ainda seja alta para se observar os efeitos apenas dos lipídeos. Além disto, acreditamos que temos ainda que padronizar a concentração do próprio ext-lip para a detecção de poros na superfície da célula por duas razões: 1) a técnica de *patch-clamp* utiliza uma única célula para as medidas de condutividade, ao contrário do ensaio hemolítico que utiliza milhões de hemácias (cerca de  $5 \times 10^6$ ); 2) células nucleadas, no caso, macrófagos, possuem mecanismos de reparo da membrana plasmática, o que

faz com que a concentração de ext-lip deva talvez ter que ser maior do que a utilizada para as hemácias para que as mudanças de condutividade sejam observadas.

No entanto, outro tipo de ensaio é bastante utilizado para fornecer fortes indícios de que o mecanismo lítico é por formação de poros: o chamado de ensaio de proteção osmótica. A presença de macromoléculas no meio extracelular é capaz de impedir a lise do tipo colóido-osmótica causada pela abertura ou inserção de um poro na membrana plasmática por, contrabalançar a concentração de moléculas de alto peso molecular no interior da célula, impedindo a entrada de água e, conseqüentemente, a lise. Nessas condições, o poro é formado na membrana da célula, mas, o rompimento da mesma não acontece devido ao equilíbrio gerado pelas macromoléculas. Por isto, a inibição da lise neste tipo de ensaio é bastante indicativa de que o mecanismo lítico é por formação de poros. Uma macromolécula bastante utilizada para este tipo de ensaio é o polietilenoglicol (PEG) (Krasilnikov *et al.*, 1992). Assim, resolvemos verificar se o Ext-lip causaria hemólise por formação de poro, utilizando PEG 8000 como macromolécula. Nossos resultados de que o PEG 8000 inibiu totalmente a lise mediada por ext-lip, da mesma forma que ext-m (Fig. 7), sugere fortemente que a hemólise mediada por ext-lip se dá por formação de poros. A inibição da lise celular por macromoléculas implica na incapacidade dessa macromolécula de ser transferida do meio extracelular para o meio intracelular e o diâmetro efetivo da mesma é tido como maior do que o poro funcional. Uma vez que o PEG possui uma forma esférica em solução aquosa (Krasilnikov *et al.*, 1992), é possível estimar o tamanho do poro. Em trabalhos anteriores o tamanho do poro havia sido estimado utilizando o PEG 6000 nas mesmas condições aqui utilizadas como sendo menor que 6,1 nm de diâmetro (Noronha *et al.*, 1996; Noronha *et al.*, 2000). Neste trabalho, podemos dizer que, em 30 minutos e com as concentrações de ext-lip utilizadas, o diâmetro dos poros formados pela citolisina é maior do que 6,1, mas menor que 8,1 nm, diâmetro médio das moléculas de PEG 8000 (Schlumberger *et al.*, 2014). Resultados anteriores do nosso grupo também mostraram que a hemólise mediada por LPCs é totalmente inibida por PEG, sugerindo fortemente que são mesmo os LPCs as moléculas formadoras de poros (Castro-Gomes, resultados não publicados). Os resultados de proteção osmótica utilizando o ext-lip

fortalecem a hipótese de que os LPCs com atividade hemolítica são ou fazem parte da molécula que chamamos de leishporina. O fato de que a remoção do PEG causa hemólise não só mostrou que a inibição observada não foi devida à inativação da citolisina, confirmando resultados anteriores do nosso grupo (Noronha *et al.*, 1996) como também mostra que o lipídeo lítico se liga à membrana da célula alvo antes de causar lise, pois não é removido com a lavagem, também confirmando resultados anteriores do nosso grupo (Noronha *et al.*, 2000; Castro-Gomes *et al.*, 2009).

Os lisofosfolipídeos são produtos das fosfolipases que são hidrolisados por fosfolipases da classe A (PLA1 e PLA2). Os ácidos graxos sofrem hidrólise a partir dos fosfolipídeos na posição sn-1 para a fosfolipase A1 e sn-2 para a fosfolipase A2, resultando na liberação de ácidos graxos livres e na produção de lisofosfolipídeos. Como já mencionado, resultados anteriores mostraram que lisofosfatidilcolinas (LPCs) purificadas de ext-m de *L. amazonensis* são hemolíticos (Castro-Gomes, 2010), o que foi corroborado pelos resultados discutidos acima. Presumimos, assim, que a inibição de fosfolipases deveria abolir a atividade hemolítica de extratos de promastigotas. De fato, foi isto que verificamos de maneira concentração dependente quando tratamos os parasitas em cultura axênica com o inibidor de Rosenthal, que inibe PLA1 e PLA2, em doses que não comprometeram o crescimento dos parasitos (Fig. 8 e 10). Este efeito foi observado, ainda que, na concentração utilizada, a inibição de PLA1 e PLA2 foi parcial (Fig. 9). No entanto, anteriormente já havia sido observado que 50 $\mu$ M abolem a atividade da fosfolipase A2 (Castro-Gomes, resultados não publicados). Esses resultados de inibição de PLA1 e PLA2 deram um suporte adicional ao achado de que LPC é a molécula lítica de promastigotas de *L. amazonensis*. Os fatos de que 1) lipídeos totais de promastigotas de *L. amazonensis* causam lise presumivelmente por formação de poros (Fig.7), 2) LPCs livres de proteínas são hemolíticos e 3) a inibição da síntese de LPCs abole a atividade hemolítica de ext-t nos faz concluir que, muito provavelmente, são os LPCs as moléculas que chamamos leishporina, cujo mecanismo de lise é por formação de poros na membrana plasmática da célula-alvo. A suposição de que os LPCs são a leishporina é compatível com alguns achados anteriores como por exemplo: 1) a leishporina liga diretamente a fosfolipídeos de membrana da célula-alvo (Castro-Gomes *et al.*, 2009) 2) as

imagens de poros visualizados por AFM em hemácias e lipossomos tratados com ext-m (Castro-Gomes *et al.*, submetido) não se parecem com poros formados por proteínas mas sim com poros formados por moléculas muito menores como lipopeptídeos (Eeman *et al.*, 2006), dipeptídeos (Maherani *et al.*, 2012), peptídeos oligoméricos não-naturais (Khadka *et al.*, 2017) e o elemento gadolinium (Cheng *et al.*, 1999).

Já foi verificado que lisofosfolípídeos de bactérias podem causar hemólise em hemácias humanas. *Serratia marcescens*, por exemplo possui atividade hemolítica contra hemácias humanas e verificou-se que a mesma é dependente da produção de LPCs produzidos por fosfolipases A (Shimuta *et al.* 2009) o que parece ser exatamente o caso de nossos achados com *L. amazonensis*. Os lisofosfolípídeos são conhecidos por serem surfactantes, podendo ser o efector final na desestabilização da membrana de hemácias. Shimuta e colaboradores (2009) também verificaram que após a incubação de fosfolipases com vários fosfolípídeos, entre eles: fosfatidilcolina, cardiolipina, L-3-fosfatidilinositol, L- $\alpha$ -fosfatidiletanolamina e esfingomiéline, a fosfolipase A clivou as ligações éster em todos eles, menos em esfingomiéline e liberou ácidos graxos de maneira dependente da concentração (Shimuta *et al.*, 2009). As fosfolipases A não induzem diretamente a desestabilização das membranas celulares, mas os lisofosfolípídeos produzidos a partir do fosfolípídeo presente na membrana do parasito, mostra atividades hemolíticas e citolíticas, o que foi observado tanto por Shimuta *et al.* (2009), para *Serratia marcescens* quanto pelo nosso grupo para *L. amazonensis* (resultados não publicados).

Algumas bactérias patogênicas produzem fosfolipases, e elas demonstram ter um papel na virulência desses patógenos, acredita-se que aumentam o crescimento bacteriano, a colonização e a sobrevivência. Curiosamente, um dos fenótipos observados quando os parasitos foram cultivados na presença do inibidor Rosenthal foi exatamente um maior crescimento dos parasitos (resultados não mostrados). As fosfolipases associadas à membrana externa foram identificadas pela primeira vez em *E. coli* (Scandella *et al.*, 1971) e subsequentemente relatados em várias bactérias gram-negativas, incluindo *H. pylori* (Dorrell *et al.*, 1999). Foi relatado também em um filtrado de cultura de *Y. enterocolitica* atividade hemolítica dependente

de fosfolipídeos (Tsubokura *et al.*, 1979). Há na literatura lisofosfolipídeos descritos como compostos líticos (Zhou *et al.*, 2006) e como formadores de poros detectáveis por *patch-clamp* (Wilson-Ashworth *et al.*, 2004).

Um estudo conclusivo sobre a função da leishporina requer um investimento significativo nesse sentido e também depende fundamentalmente da identificação definitiva da molécula formadora de poros, o que achamos que dependerá do nosso sucesso em analisar a atividade formadora de poros dos LPCs hemolíticos de *L. amazonensis* por *patch-clamp*. No entanto, o fato de termos conseguido gerar um fenótipo de *L. amazonensis* totalmente destituída de atividade hemolítica pela inibição das PLA1 e PLA2 foi muito importante para indagarmos sobre a função dessa atividade hemolítica. Devido a resultados recentes do nosso grupo, uma pergunta inicial foi se a atividade citolítica de promastigotas teriam algum papel no início da infecção *in vitro* de células, fagocíticas ou não. Durante a infecção em vertebrados, as promastigotas são eventualmente capturadas pelos macrófagos, e são consideradas suas principais células no hospedeiro vertebrado e nos quais os parasitas intracelulares se replicam sob a forma amastigota. Nosso grupo desvendou recentemente o mecanismo pelo qual promastigotas invadem células não fagocíticas, como fibroblastos (Cavalcante-Costa *et al.*, 2019). Aqui, usando as células RAW (macrófagos) e MEFs (fibroblastos) mostramos que a entrada de *L. amazonensis* nessas células é reduzida cerca de 20% nos macrófagos e mais de 50% nos fibroblastos para promastigotas destituídos de atividade citolítica (Fig. 11) pelo tratamento com inibidor de Rosenthal. Esta redução diferencial não é surpreendente, uma vez que os mecanismos de invasão de células fagocíticas e não fagocíticas tem suas peculiaridades. As células fagocíticas tendem a internalizar o parasito por mecanismos já bastante conhecidos e eficientes envolvendo actina e conhecidos como fagocitose. Recentemente, nosso grupo demonstrou que a invasão de células não fagocíticas por promastigotas de *L. amazonensis* não envolve actina. Nesse trabalho, Cavalcante-Costa *et al.* (2019) mostraram que, diferentemente da entrada dos parasitas mediada por fagocitose que ocorre nos macrófagos, na invasão de MEFs *L. amazonensis* subverte um mecanismo que células nucleadas possuem para o reparo de lesões que venham a ocorrer nas membranas plasmáticas. Mediante lesões da membrana plasmática, como por

exemplo, a inserção de poros ou danos mecânicos, há um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para o meio intracelular que induz a migração de lisossomos para a membrana plasmática interna da célula que culmina com a fusão de suas membranas num processo de exocitose de seu conteúdo. Assim foi demonstrado nesse trabalho que promastigotas de *L. amazonensis* induzem lesões de membranas, provocando a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , recrutamento de lisossomos para o local de contato e sua a exocitose a que, nesse processo de fusão com a membrana plasmática no local de contato com as promastigotas, formam estruturas endocíticas que vão fazendo a internalização dos parasitos, da mesma forma que ocorre no caso do *Trypanosoma cruzi* (Fernandes *et al.*, 2011). Esta nova porta de entrada do parasito descrita por nosso grupo não envolve o citoesqueleto de actina sendo, assim, distinta da fagocitose, mas é favorecida pela lesão da membrana da célula hospedeira provocada pelo parasito (Cavalcante-Costa *et al.*, 2019). Assim, é bem possível que as lesões induzidas por promastigotas em MEFs sejam poros formados pelo parasito na superfície dessa célula hospedeira, o que explicaria que, em células não fagocíticas, a inibição da invasão por tratamento com inibidor PLAs é bem maior do que em células fagocíticas, onde outros mecanismos de invasão dos parasitos, particularmente a fagocitose, que não a invasão dependente de lesão de membrana e exocitose de lisossomos, estejam envolvidos. É interessante que um trabalho da literatura mostra que a lesão e o parasitismo na pele causada pela infecção com *L. amazonensis* de camundongos BALB/c tratados com bromoenol lactona, um inibidor de PLA2, são menores do que em camundongos não tratados (Bordon *et al.*, 2018). Esses resultados mostram que PLAs parecem ter, de fato, um papel na virulência e na manutenção da infecção.

Esses estudos sobre a infecção de promastigotas destituídos de atividade hemolítica, no entanto, são apenas o início de uma investigação mais sistemática a ser desenvolvida posteriormente para responder a várias outras questões relativas outras possíveis funções, já postuladas pelo nosso grupo e mencionadas anteriormente. Uma outra que vale ser investigada, pelas circunstâncias do modo de ação da leishporina é a ruptura do fagolisossomo e do macrófago (amplificação da infecção e dano tecidual). Embora outras formas de liberação de amastigotas do macrófago já tenham sido propostas, a

hipótese da ruptura do macrófago ou outras células pelas amastigotas por formação de poros é ainda plausível, já que este mecanismo já foi descrito para vários outros microrganismos intracelulares (Kafsack *et al.*, 2009; Bielecki *et al.*, 1990; Gao & Kwaik, 2000) e pelo fato de que a leishporina possui sua atividade ótima em pH 5,5 e a 37°C, condições exatas encontradas dentro do fagolisossomo. Já foi verificado também que a leishporina precisa ser ativada, e isto parece ocorrer por dissociação ou proteólise de um oligopeptídeo inibidor (Almeida-Campos *et al.*, 2013). Ambas as condições são também encontradas dentro do fagolisossomo: o pH ácido favorece a dissociação e inúmeras proteases lisossômicas poderiam degradar o inibidor. É interessante ressaltar que em vacúolos parasitóforos de macrófagos infectados com *L. amazonensis* há um aumento nos níveis de LPCs (Henriques *et al.*, 2003), o que também estaria em concordância com a hipótese de que LPCs possa ter um efeito lítico dentro desses vacúolos. Além disso, já demonstramos que *L. guyanensis*, por exemplo, induz necrose de macrófagos *in vitro*, com dano de membrana (daMata *et al.*, 2015), ao contrário de *L. amazonensis* que induz apoptose. É possível que a leishporina tenha outras funções e que elas possam ser diferentes dependendo das espécies.

Assim, é inevitável continuar a investigar a função da leishporina e indagar sobre seu envolvimento no ciclo de vida do parasito e na patogênese da leishmaniose. Nossos resultados reforçam a importância da realização de investigações futuras e mais precisas para confirmar a identidade molecular da leishporina. Assim, é preciso realizar experimentos definitivos, como *patch-clamp*, que confirmem os experimentos de proteção osmótica com o ext-lip (Fig. 7) e LPCs purificados (resultados não publicados) mostrando que são líticos por formarem poros em células nucleadas, para que possamos chamar os LPCs de leishporina. Seria interessante ainda utilizar anticorpos anti-lisofosfatidilcolina para revelar se de fato há um complexo lipoproteico e quais proteínas interagem com lisofosfolídeos líticos.

Até o momento, estes resultados, em conjunto com resultados anteriores do nosso grupo, apontam para que o LPC deva ser o que chamamos de leishporina ou que então ele faça parte de um grupo de moléculas, incluindo moléculas proteicas, que, em conjunto possa facilitar a formação de poros mediados por LPCs em membranas plasmáticas.

## 5- CONCLUSÕES

As seguintes conclusões podem ser tiradas deste trabalho sobre a atividade citolítica de promastigotas de *L. amazonensis*:

- 1) lipídeos puros de promastigotas de são hemolíticos;
- 2) toda a atividade hemolítica de extratos totais ou extrato de membrana está contida na fração de lipídeos, destituída de proteínas;
- 3) a expressão da atividade hemolítica de lipídeos de promastigotas segue a mesma cinética da de extratos de membrana;
- 4) a atividade hemolítica de extratos totais ou de membrana de promastigotas é termolábil, enquanto que a da fração lipídica é termoresistente;
- 5) a lise de hemácias mediada por lipídeos é coloido-osmótica, sugerindo que os mesmos são formadores de poros;
- 6) PLA1 e/ou PLA2, responsáveis pela síntese de LPCs são fundamentais para a expressão da atividade hemolítica em promastigotas;
- 7) promastigotas cujas PLA1 e PLA2 foram inibidas, sem atividade hemolítica, são menos invasivos para macrófagos ou fibroblastos;
- 8) obtivemos um fenótipo de promastigotas de *L. amazonensis* totalmente destituído de atividade citolítica, importante para o estudo da função desta atividade.

## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA-CAMPOS, F. R. Leishporina, uma proteína formadora de poros de *Leishmania*: mecanismos de ativação, de ligação à célula alvo e de resistência do parasita à autólise. **Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerias, Instituto de Ciências Biológicas, 2001.**

ALMEIDA-CAMPOS, F. R.; HORTA, M F. Proteolytic activation of leishporina: evidence that *Leishmania amazonensis* and *Leishmania guyanensis* have distinct inactive forms. **Molecular and Biochemical Parasitology. Vol. 111, P. 363-375, 2000.**

ALMEIDA-CAMPOS, F. R.; NORONHA, F. S. M.; HORTA, M. F. The multitasking pore-forming proteins of intracellular pathogens. **Microbes and Infection. Vol. 4, P. 741-750, 2002.**

ALMEIDA-CAMPOS, F. R.; CASTRO-GOMES, T.; FRÉZARD, F.; HORTA, M. F. Activation of *Leishmania spp.* leishporin: evidence that dissociation of an inhibitory oligopeptide not only improves its lipid-binding efficiency but also endows it with the ability to form pores. **Parasitology Res Vol. 112, P. 3305-3314, 2013.**

ALOUF, J. E. Thiol-dependent cytolytic bacterial toxins: streptolysin O and prominent toxins. **Arch. Inst. Pasteur Tunis Vol. 58, P. 355-373, 1981.**

AMINO, R.; MARTINS, R. M.; PROCOPIO, J.; HIRATA, I. Y.; JULIANO, M. A.; SCHENKMAN, S. Trialysin, a novel pore-forming protein from saliva of hematophagous insects activated by limited proteolysis. **The Journal of Biological Chemistry. Vol 277, P. 6207-6213, 2002.**

ANDRA, J.; BERNINGHAUSEN, O.; LEIPPE, M. Membrane lipid composition protects *Entamoeba histolytica* from self-destruction by its pore-forming proteins. **FEBS Letters. Vol. 564, P. 109-115, 2004.**

ANDREWS, N. W.; ABRAMS, C. K.; SLATIN, S. L.; GRIFFITHS, G. A T. cruzi-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. **Cell. Vol. 61 P. 1227-1287, 1990.**

ANDREWS, N. W. From lysosomes into the cytosol: the intracellular pathway of *Trypanosoma cruzi*. **Braz J Med Biol Res. Vol. 27, P. 471-475, 1994.**

ANDREWS, N. W. & WEBSTER, P. Phagolysosomal escape by intracellular pathogens. **Parasitol. Today Vol. 7, P. 335-340, 1991.**

ANDREWS, N. W. & WHITLOW, M. B. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. **Mol. Biochem. Parasitol. Vol. 33, P. 249-256, 1989.**

BARTA, M. L. The structures of coiled-coil domains from type III secretion system translocators reveal homology to pore-forming toxins. **J. Mol. Biol. Vol. 417, P. 395–405, 2012.**

BASHFORD, C. L., ALDER, G. M., GRAHAM, J. M., MENESTRINA, G., PASTERNAK, C. A. Ion modulation of membrane permeability: effect of cations on intact cells and on cells and phospholipid bilayers treated with pore-forming agents. **J. Membr. Biol. Vol. 103, P. 79–94, 1988.**

BAYLEY, H. Toxin structure: Part of a hole?. **Current Biology. Vol. 7, P. 1-12, 1997.**

BENTEL, M. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. **Proteomics Vol. 3, P. 1811–1829, 2003.**

BHADI, S., MACKMAN, N., NICAUD, J. M. & HOLLAND, I. B. *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. **Infect. Immun. Vol. 52, P. 63–69, 1986.**

BHAKDI, S.; TRANUM-JENSEN, J. Damage to cell membranes by pore-forming bacterial cytolysins. **Prog Allergy. Vol. 40, P.1-43,1988.**

BIELECI, J., YOUNGMAN, P., CONNELLY, P., PORTNOY, D. A. *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. **Nature Vol. 345, P. 175–176, 1990.**

BISCHOFBERGER, M., LACOVACHE, I, van der GOOT, F. G. Pathogenic pore-forming proteins: function and host response. **Cell Host Microbe. 12: 266-75, 2012**

BLACKMAN, M. J. & CARRUTHERS, V. B. Recent insights into apicomplexan parasite egress provide new views to a kill. **Curr. Opin. Microbiol. Vol. 16, P. 459–464, 2013.**

BORDON, M. L. A. C., LAURENTI, M. D., RIBEIRO, S. P., TOYAMA, M. H., TOYAMA, D. P. Effect of phospholipase A2 inhibitors during infection caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis. Vol. 24, P. 1-21, 2018.**

CASTRO-GOMES, T., VILELA, J. M., ANDRADE, M. S., BEIRÃO, P. S. L., FRÉARD, F., HORTA, M. F. Direct visualization of membrane-spanning pores formed by leishporin, a *Leishmania amazonensis* pore-forming cytolysin, as probed by atomic force microscopy. **BioRxiv, doi: <https://doi.org/10.1101/524686>.**

CASTRO-GOMES, T.; ALMEIDA-CAMPOS, F. R.; CALZAVARA-SILVA, C. E.; SILVA, R. A.; FRÉZARD, F.; HORTA, M. F. Membrane binding requirements for the cytolytic activity of *leishmania amazonensis* leishporina. **FEBS Lett. Vol. 583, P. 3209-3214, 2009.**

CASTRO-GOMES, T. Citólise Mediada pela Leishporina de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: Requisitos para a ligação da citolisina a membrana, a visualização de estruturas *pore-like* e estratégias para a sua ligação molecular. **Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas, 2009.**

CHANTURYA, A.; YANG, J.; SCARIA, P.; STANEK, J.; FREI, J.; METT, H.; WOODLE, M. New cationic lipids form channel-like pores in phospholipid bilayers. **Biophys J. Vol. 84, P. 1750-1755, 2003.**

CHENG, Y.; LIU, M.; LI, R.; WANG, C.; BAI, C.; WANG, K. Gadolinium induces domain and pore formation of human erythrocyte membrane: na atomic force microscopic study. **Biochim biophys Acta, Vol. 15, P. 249-260, 1999.**

CZAOWSKY, D. M.; HOTZE, E. M.; SHAO, Z.; TWETEN, R. K. Vertical colapse of a cytolyisin prepore moves its transmembrane beta-hairpins to the membrane. **EMBO J. Vol.18, P. 3206-3215, 2004.**

DAL PERARO, M. & VAN DER GOOT, F. G. Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion. **Nat. Rev. Microbiol. Vol. 14, P. 77–92, 2016.**

DESAI, S. A., KROGSTAD, D. J. & MCCLESEY, E. W. A nutrient-permeable channel on the intraerythrocytic malaria parasite. **Nature Vol. 362, P. 643–646, 1993.**

DORRELL, N. Characterization of Helicobacter pylori PldA, a phospholipase with a role in colonization of the gastric mucosa. **Gastroenterology Vol. 117, P. 1098–1104, 1999.**

EEMAN, M., DUFRÊNE, Y. F., PAQUOT, M., DUFOUR, S., DELEU., BERQUAND, A.M. Penetration of surfactin into phospholipid monolayers: Nanoscale interfacial organization. **Langmuir Vol. 22, P. 11337–11345, 2006.**  
EI FAHRY, Y., OUELLETTE, M., PAPADOPOULOU, B. A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in Leishmania infantum. **Proteomics Vol. 2, P. 1007–1017, 2002.**

FARAH, F. S., SAMRA, S. A., NUWAYRI-SALTI, N. The role of the macrophage in cutaneous leishmaniasis. **Immunology Vol. 29, P. 755-764, 1975.**

FEIL, S. C., ASCHER, D. B., KUIPER, M. J., TWETEN, R. K., PARKER, M. W. Structural studies of Streptococcus pyogenes streptolysin O provide insights into the early steps of membrane penetration. **J. Mol. Biol. Vol. 426, P. 785–792, 2014.**

FREITAG, N. E., YOUNGMAN, P., PORTNOY, D. A. Transcriptional activation of the Listeria monocytogenes hemolysin gene in Bacillus subtilis. **J. Bacteriol. Vol. 174, P. 1293–1298, 1992.**

- GAO, L. Y., ABU KWAIK, Y. Hijacking of apoptotic pathways by bacterial pathogens. **Microbes and Infection Vol. 2, P. 1705–1719, 2000.**
- GAO, L. Y., & KWAIK, Y. A. The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*. **Environ. Microbiol. Vol. 2, P. 79–90, 2000.**
- GENY, B. & POPOFF, M. R. Bacterial protein toxins and lipids: role in toxin targeting and activity. **Biol. Cell Vol. 98, P. 633–651, 2006.**
- GILBERT, R. J. C., DALLA S. M., FROEIIICH, C. J., WALLACE, M. I., ANDERLUH, G. Membrane pore formation at protein-lipid interfaces. **Trends Biochem. Sci. Vol. 39, P.510–516, 2014.**
- GILBERT, R. J. C. Cholesterol-dependent cytolysins. **Adv. Exp. Med. Biol. Vol. 677, P. 56–66, 2010.**
- GRIMALDI Jr., G & TESH, R. B. Leishmaniasis of the world current concepts and implications for future research. **Clinical and Microbiology. Vol. 6, P. 230-250, 1993.**
- HAYWARD, R. D. Cholesterol binding by the bacterial type III translocon is essential for virulence effector delivery into mammalian cells. **Mol. Microbiol. Vol. 56, P. 590–603, 2005. 14.**
- HELSEL, A. J.; BROW, A. L.; YAMATO, K.; FENG, W.; YUAN, L.; CLEMENTS, A. J.; HARDING, S. V.; SZABO, G.; SHAO, Z.; GONG, B. Highly conducting transmembrane pores formed by aromatic oligoamide macrocycles. **J Am Chem Soc. Vol. 130, P. 1574-1585, 2008.**
- HENRIQUES, C., ATELLA, G. C., BONILHA, V. L. & DE SOUZA, W. Biochemical analysis of proteins and lipids found in parasitophorous vacuoles containing *Leishmania amazonensis*. **Parasitol. Res. Vol. 89, P. 123–133, 2003.**
- HERBST, R. Pore-forming polypeptides of the pathogenic protozoon *Naegleria fowleri*. **J. Biol. Chem. Vol. 277, P. 22353–22360, 2002.**
- HERBST, R.; MARCIANO-CABRAL, F.; LEIPPE, M. Antimicrobial and pore-forming peptides of free-living and potentially highly pathogenic *Naegleria fowleri* are released from the same precursor molecule. **J. Biol. Chem. Vol. 279, P. 25955-25958, 2004.**
- HERTLE, R. *Serratia marcescens* hemolysin (ShIA) binds artificial membranes and forms pores in a receptor-independent manner. **Journal of membrane biology. Vol. 189, P.1-14, 2002.**
- HEUCK, A. P.; HOTZE, E. M.; TWETEN, R. K.; OHNSON, A. E. Mechanism of membrane insertion of a multimeric b-barrel protein: perfringolysin O creates a pore using ordered and coupled conformation changes. **Molecular Cell. Vol. 6, P.1233-1242, 2000.**

HOLBROOK, T. W. & PALCZUK, N. C. *Leishmania* in the chick embryo IV Effects of embryo age and hatching, and behavior of *L. donovani* in cultures of chick fibroblasts. **Exp. Parasitol. Vol. 37, P. 398–404, 1975.**

HOMMEL, M. Visceral leishmaniasis: Biology of the parasite. **J. Infect. Vol. 39, P. 101–111, 1999.**

HORTA, M. F. Pore-Forming Proteins In Pathogenic Protozoan Parasites. **Trends in Microbiology. Vol. 5, P. 363-366, 1997.**

HORTA, M. F., ANDRADE L. O., MARTINS-DUARTE, E. S., CASTRO-GOMES, T. Cell invasion by intracellular parasites: the many roads to infection. **Submetido Journal of Cell Science, 2019.**

HYBISKE, K. & STEPHENS, R. S. Exit strategies of intracellular pathogens. **Nature Reviews Microbiology Vol. 6, P. 99–110, 2008.**

ISHINO, T. CHINZEI, Y.; YUDA, M. A plasmodium sporozoite protein with a membrane attack complex domain is required for breaching the live sinusoidal cell layer prior to hepatocyte infection. **Cellular Microbiology. Vol. 7, P. 199-208, 2005.**

JOHNSON, B. B. & HEUCK, A. P. Perfringolysin O structure and mechanism of pore formation as a paradigm for cholesterol-dependent cytolysins. **Subcell. Biochem. Vol. 80, P. 63–81, 2014.**

KAFSACK, B. F.; PENA, J. D.; COPPENS, I.; RAVINDRAN, S.; BOOTHROYD, J. C.; CARRUTHERS, V. B. Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells. **Science. Vol. 323, P. 530-533, 2009.**

KAISER, K.; CAMARGO, N.; COPPENS, I.; MORRISEY, J. M.; VAIDYA, A. B.; KAPPE, S. H. I. A member of a conserved *Plasmodium* protein Family with membrane-attack complex/perforin (MACPF)-like domains localizes to the micronemes of sporozoites. **Molecular and biochemical parasitology. Vol. 133, P.15-26, 2004.**

KAYE, P. & SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology Vol. 9, P. 604- 615, 2011.**

KHADKA, N. K., TENG, P., CAI, J. & PAN, J. Modulation of lipid membrane structural and mechanical properties by a peptidomimetic derived from reduced amide scaffold. **Biochim. Biophys. acta. Biomembr. Vol. 1859, P. 734–744, 2017.**

KILLICK-KENDRICK, R. Absence of outer caudal setae on all larval instars of *Phlebotomus tobbi* from the Ionian Greek islands. **Med. Vet. Entomol. Vol. 3, P. 131–135, 1989.**

KILLICK-KENDRICK, R. LEANEY, A. J., PETERS, W., RIOUX, J. A., BRAY, R. S. Zoonotic cutaneous leishmaniasis in Saudi Arabia: The incrimination of *Phlebotomus papatasi* as the vector in the Al-Hassa Oasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** Vol. 79, P. 252–255, 1985.

KRASILNIKOV, O. V., SABIROV, R. Z., TERNOVSKY, V. I., MERZLIAK, P. G. & MURATKHODJAEV, J. N. A simple method for the determination of the pore radius of ion channels in planar lipid bilayer membranes. **FEMS Microbiol. Lett.** Vol. 105, P. 93–100, 1992.

LAINSON, R & SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In Peters, W. & Killick-Kendrick, R (eds.) The leishmaniasis in biology and medicine biology and epidemiology. **London Academic Press.** Vol. 1, P.1-120, 1987.

LASKAY, T., VAN ZANDBERGEN, G., SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes - Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends in Microbiology** Vol. 11, P.210–214, 2003.

LEIPPE, M., EBEL, S., SCHOENBERGER, O. L., HORSTMANN, R. D., MULLER-EBERHAR, H. J. Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** Vol. 88, P. 7659–7663, 1991.

LIPOLDOVÁ, M. & DEMANT P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. **Nature Reviews Genetics** Vol. 7, P. 294-305, 2006.

LUDWIG, A. Cytolytic toxins from gram-negative bacteria. **Microbiologia.** Vol. 12, P. 281-296, 1996.

LUJÁN, H. D.; BRONIA, D. H. Intra-membrane lipid transfer during *Trypanosoma cruzi* induced erythrocyte membrane destabilization, **Parasitology.** Vol. 108 P. 323-34, 1994.

LUKOYANOVA, N., HOOGENBOOM, B. W., SAIBIL, H. R. The membrane attack complex, perforin and cholesterol-dependent cytolysin superfamily of pore-forming proteins. **J. Cell Sci.** Vol. 129, P. 2125–2133, 2016.

MAHERANI, B., ARAB-TEHRANY, E., KHEIROLOMOOM, A., CLEYMAND, F. & LINDER, M. Influence of lipid composition on physicochemical properties of nanoliposomes encapsulating natural dipeptide antioxidant L-carnosine. **Food Chem.** Vol. 134, P. 632–640, 2012.

MCCLELLAND, D.; EVANS, R. M.; ABDIN, I.; SHARMA, S.; CHOUDHRY, F. Z. JASPARS, M.; SEPCIC, K.; SCOTT, R. H. Irreversible and reversible pore formation by polymeric alkylpyridinium salts (poly-APS) from the sponge *Reniera sarai*. **Br J Pharmacol.** Vol. 139, P. 1399-1408, 2003.

- MIRANDA, N. T. P. Caracterização e estudo funcional dos genes anotados como hemolisinas do tipo III em *Leishmania major*. **Tese Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, 2016.**
- MIZUKAWA M. K, CROMAR KR, SUDWEEKS S, BELL J. D. Formation of transiente non-protein calcium pores by lysophospholipids in S49 Lymphoma cells. **J Membr Biol. Vol. 200, P. 25-33, 2004.**
- MOLMERET, M. & ABU KWAIK, Y. How does *Legionella pneumophila* exit the host cell? **Trends in Microbiology Vol. 10, P. 258–260, 2002.**
- MOONAH, S., SANDERS, N. G., PERSICHETTI, J. K. & SULLIVAN, D. J. Erythrocyte lysis and *Xenopus laevis* oocyte rupture by recombinant *Plasmodium falciparum* hemolysin III. **Eukaryot. Cell Vol. 13, P. 1337–1345, 2014.**
- NAKAMURA, M.; SEINO, N.; IWAMOTO, M.; OHNO-YW ASHITA, Y. Interaction of  $\theta$ -toxin (Perfringolisina O), a cholesterol-binding cytolysin, with liposomal membranes: changes in the aromatic side chains upon binding and insertion. **Biochemistry. Vol. 34, P.6513-6520, 1995.**
- NORONHA, F. S. M.; RAMALHO-PINTO, F. J.; HORTA, M. F. Identification of a putative pore-forming hemolysin active at acid pH in *Leishmania amazonensis*. **Braz. J Med. Biol. Res. Vol. 27 P. 477-482, 1994.**
- NORONHA, F. S. M., RAMALHO-PINTO, F. J., BIOQUI, D. Cytolytic Activity in the Genus *Leishmania*: Involvement of a Putative Pore-Forming Protein. **Infect. Immun. Vol. 64, P. 3975–3982, 1996.**
- NORONHA, F. S. M. Identificação, caracterização e purificação de uma proteína formadora de poros de *Leishmania amazonensis*. **Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, 1996.**
- NORONHA, F. S. M.; CRUZ, J. S. BEIRÃO, P. S.L.; HORTA, M. F. Macrophage damage by *Leishmania amazonensis* cytolysin: evidence of pore formation on cell membrane. **Infection and Immunity, Vol. 68, P.4578-4584, 2000.**
- OGITA, T., TANAKA, Y., NAKAOKA, T., MATASUOKA, R., KIRA, Y., NAKAMURA, M., SHUMIZU, T., FUJITA, T. Lysophosphatidylcholine transduces  $ca^{2+}$  signaling via the platelet-activating fator receptor in macrophages. **Am J Physiol. Vol. 27, P.17-24, 1997.**
- OJCIUS, D. M. AND YOUNG, J. D. E. A role for pore-forming proteins in the pathogenesis by parasites? **Parasitol Today. Vol. 6, P. 163-165, 1990.**
- PARKER, M. W., AND FEIL, S. F. Pore-forming proteins toxins: from structure to function. **Progress in Biophysics & Molecular Biology. Vol. 88, P. 91-142, 2005.**

PLUZHNIKOV, K. A., BOCHAROV, D. N., KONONOVA, N. V., SUKHANOV, S. V., BALASHOVA, T. A., ARSEN'EV, A. S., GRISHIN, E. V. Identification and structural analysis of a glycopospholipid component from the venom of ant *Paraponera clavata*. **Bioorg Khim. Vol. 32(, P. 530-5377, 2006.**

PORTNOY, D. A., CHAKRABORTY, T., GOEBEL, W., COSSART, P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. **Infect. Immun. Vol. 60, P. 1263–1267, 1992.**

POTRICH, C. The influence of membrane lipids in *Staphylococcus aureus* gamma-hemolysins pore formation. **J. Membr. Biol. Vol. 227, P. 13–24, 2009.**

REAL, F., FLORENTINO, P. T. V., REIS, L. C., RAMOS-SANCHEZ, E. M., VERAS, P. S. T., GOTO, H., MORTARA, R. A. Cell-to-cell transfer of *Leishmania amazonensis* amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. **Cellular Microbiology Vol. 16, P. 1549–1564, 2014.**

RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitology Today. Vol. 16, P. 292-297, 2000.**

ROIKO, M. S. & CARRUTHERS, V. B. New roles for perforins and proteases in apicomplexan egress. **Cell. Microbiol. Vol. 11, P. 1444–1452, 2009.**

ROSENTHAL, A. F. & GEYER, R. P. A synthetic inhibitor of venom lecithinase A. **J. Biol. Chem. 235, 2202–2206, 1960.**

RUPPER, E. & BARNES, R. D. Zoologia dos Invertebrados. **6<sup>a</sup> ed. Editora Roca, São Paulo, 1996.**

SARKER, M. H., HU D. E., FRASER, P. A. Regulation of cerebrovascular permeability by lysophosphatidic acid. **Microcirculation. Vol. 17, P. 39-46, 2010.**

SCANDELLA, C. J. & KORNBERG, A. A membrane-bound phospholipase A1 purified from *Escherichia coli*. **Biochemistry Vol. 10, P. 4447–4456, 1971.**

SCHWAB, J. C., BECKERS, C. J. M. & JOINER, K. A. The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Vol. 91, P. 509–513, 1994.**

SCHLUMBERGER, S., KRISTAN, K. Č., OTA, K., FRANGEŽ, R., MOLGO, J., SEPČIĆ, K., BENOIT, E., MAČEK, P. Permeability characteristics of cell-membrane pores induced by ostreolysin A/pleurotolysin B, binary pore-forming proteins from the oyster mushroom. **FEBS Lett. Vol. 588, P. 35–40, 2014.**

SCHWARTMAN, J. D. & PEARSON, R. D. The interaction of *Leishmania donovani* promastigotes and human fibroblasts in vitro. **Am. J. Trop. Med. Hyg. Vol. 34, P. 850–855 1985.**

SCHNUPF P., ZHOU, J., VARSHAVSKY, A., PORTNOY, D. A. Listeriolysin O Secreted by *Listeria monocytogenes* into the Host Cell Cytosol Is Degraded by Scobie, H. M. Anthrax toxin receptor 2 determinants that dictate the pH threshold of toxin pore formation. **PLoS One Vol. 2, P. 1-8 2007.**

SHIMUTA, K., OHNISHI, M., IYODA, S., GOTOH, N., KOIZUMI, N., WATANABE, H. The hemolytic and cytolytic activities of *Serratia marcescens* phospholipase A (PhIA) depend on lysophospholipid production by PhIA. **BMC Microbiol. Vol. 16, P. 249:261, 2009.**

TERRY ALLI, O. A. Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithelial cells by *Legionella pneumophila*. **Infect. Immun. Vol. 68, P. 6431–6440, 2000.**

TILLEY, S. J., ORLOVA, E. V., GILBERT, R. J. C., ANDREW, P W., SAIBIL, H. R. Structural basis of pore formation by bacterial toxin pneumolysin. **Cell. Vol. 121, P. 247-256, 2005.**

TSUBOURA, M., OTSUKI, K., SHIMOHIRA, I., YAMAMOTO, H. Production of indirect hemolysin by *Yersinia enterocolitica* and its properties. **Infect. Immun. Vol. 25, P. 939–942, 1979.**

TWETEN, R. K. Cholesterol-dependent cytolysins, a Family of versatile pore-forming proteins toxins. **Infection and Immunity. Vol. 73, P. 6199-6209, 2005.**  
TWETEN, R. K., HOTZE, E. M., WADE, K. R. The Unique Molecular Choreography of Giant Pore Formation by the Cholesterol-Dependent Cytolysins of Gram-Positive Bacteria. **Ann. Rev. Microbiol. Vol.69, P. 323-340, 2015.**

VALEVA, A. Evidence that clustered phosphocholine head groups serve as sites for binding and assembly of an oligomeric protein pore. **J. Biol. Chem. Vol. 281, P. 26014–26021, 2006.**

VAN ZANDBERGEN, G. Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages . **J. Immunol. Vol. 173, P. 6521–6525, 2004.**

WILM, M. Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. **Nature Vol. 379, P. 466–469, 1996.**

WILSON-ASWORTH H.Á., JUDD, A. M., LAW, R. M., FREESTONR, B. D., TAYLOR, S., MIZUAWA, M. K., CROMAR, K. R., SUDWEEKS, S., BELL, D. Formation of transient non-protein calcium pores by lysophospholipids in s49 Lymphoma cells. **J Membr Biol. Vol. 200, P. 25-33, 2004.**

YOUNG, J. D. E. & LOWREY, D. M. Biochemical and functional characterization of a membrane-associated pore-forming protein from the

pathogenic ameboflagellate *Naegleria fowleri*. **J. Biol. Chem. Vol. 264, P. 1077–1083, 1989.**

YOUNG, J. D. E., YOUNG, T. M., LU, L. P., UNELESS, J. C., COHN, Z. A. Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*. **J. Exp. Med. Vol. 156, P. 1677–1690, 1982.**

ZHUOU, L., SHI, M., GUO, Z., BRISBON, W., HOOVER, R., YANG, H. Different cytotoxic injuries induced by lysophosphatidylcholine and 7-ketocholesterol in mouse endothelial cells. **Endothelium. Vol. 13, P. 213-226, 2006.**

ZITZER, A., WASSENAAR, T. M., WALEV, I., BHADI, S. Potent membrane-permeabilizing and cytotoxic action of *Vibrio cholerae* cytolysin on human intestinal cells. **Infect Immun. Vol. 65, P. 1293-1298, 1997.**