



FUNDAMENTOS PRIMORDIAIS DE APRENDIZAGEM LABORATORIAL

Conhecendo um laboratório de biologia parasitária: desde as boas práticas em pesquisa às descobertas científicas

Ketelyn Laranjeiras Mendes, Mariana Borges Costa Brioschi, Danilo Ciccone Miguel

A leishmaniose é uma doença infecciosa não contagiosa, causada por parasitos do gênero *Leishmania*. Sua transmissão ocorre durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos infectados. A doença acomete, em sua maioria, as populações mais carentes, devido ao habitat do vetor. No hospedeiro, os parasitos vivem e se reproduzem no interior de células de sistema fagocitário mononuclear, principalmente os macrófagos. Há várias manifestações clínicas da leishmaniose, sendo as 3 principais: cutânea; mucocutânea e visceral. Quanto ao tratamento da doença, os fármacos utilizados são tóxicos e necessitam de longos ciclos de administração, que é parenteral. Dessa forma, é importante compreender melhor a infecção pelo parasito para a busca de novos alvos para o desenvolvimento de novos fármacos.

Os ácidos graxos são componentes essenciais das membranas biológicas, que são importantes para o desenvolvimento do parasito dentro da célula. No entanto, sob condições adversas, como doenças, pode ocorrer uma variação na proporção destas moléculas lipídicas. Já foi demonstrado, no caso do parasito *Leishmania*, que há um agrupamento recrutamento de ácido graxo

para dentro do vacúolo parasitóforo, onde o parasito se encontra no interior da célula hospedeira. O *cd36* é um gene que codifica uma proteína de membrana, na qual permite a entrada de ácidos graxos na célula. Esta proteína atua juntamente com a proteína FABP4, que é abundante em adipócitos e macrófagos. Seu papel está relacionado com o recrutamento e transporte de ácidos graxos da membrana plasmática para as organelas. Seguindo esse raciocínio, participei de um projeto da doutoranda Mariana B. Costa onde pude avaliar a expressão de *cd36* enquanto ela estudava os níveis de FABP4 na célula infectada. O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis de transcritos de *cd36* em macrófagos infectados com *Leishmania braziliensis* e *L. amazonensis*, principais espécies causadoras da leishmaniose cutânea no Brasil. Para avaliar a diferença de expressão, foi utilizada a técnica de PCR em tempo real para analisarmos os níveis de transcritos do gene de interesse em macrófagos derivados de medula óssea infectados ou não com espécies de *Leishmania*. Os métodos usados para realizar a pesquisa podem ser simplificado a partir dos seguintes passos: cultivo de macrófagos e parasitos; infecção de macrófagos; extração de RNA; síntese de DNA complementar (cDNA) e, finalmente, técnica q-PCR.

A partir desta metodologia, foi obtido um gráfico de expressão do gene *cd36* em relação a gene endógeno *hprt-1*. Visivelmente, foi possível observar que houve um aumento de *cd36* após 48 horas de infecção com *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. Porém, esse aumento não é muito significativo para *L. braziliensis*. Após 72 horas, há uma diminuição da expressão, tornando-a próxima ao valor do macrófago não infectado. Geralmente, quando o parasito entra na célula, este permanece dentro do vacúolo parasitóforo para deixar o

ambiente favorável para a sua sobrevivência. Para isso, ele sinaliza que precisa de ácidos graxos e ocorre um aumento da expressão de genes envolvidos nesse recrutamento. Portanto, pode haver um aumento da proteína CD36 que permite a entrada de ácidos graxos na célula, que será transportado para o vacúolo a partir da FABP4. Sugere-se que estabelecida sua infecção, consegue a quantidade necessária deste nutriente para se replicar, sendo que possivelmente a quantidade se normaliza ao longo da infecção *in vitro*, ficando constante, o que poderia explicar a diminuição após 72 horas.

Os macrófagos infectados com *L. amazonensis* tiveram um maior aumento da expressão de *cd36* em relação à *L. braziliensis*, visto que são espécies diferentes. Por exemplo, na questão do vacúolo, *L. amazonensis* possui um vacúolo parasitóforo grande com vários parasitos juntos, já *L. brzsilienses* não, vive isoladamente, apenas um parasito por vacúolo. Desse modo, como teoria, o tamanho do vacúolo pode interferir também na expressão destes genes. Tal observação pode explicar que possivelmente exista maior recrutamento de ácidos graxos para a espécie *L. amazonensis*.