



LABORATÓRIO DE BIOLOGIA PARASITÁRIA – PARTE 2: DESDE AS BOAS PRÁTICAS E DESCOBERTAS CIENTÍFICAS – A INTERFACE COM A QUÍMICA – Expressão de *cd36* em macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis*

Palavras-Chave: Leishmaniose, PCR, *cd36*

Autores/as:

Ketelyn Laranjeiras Mendes [UNICAMP]

Msc. Mariana Borges Costa Brioschi [UNICAMP]

Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel (orientador/a) [UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

O Laboratório de Estudos de Biologia da Infecção por *Leishmania* (LEBIL) contribui com seu espaço para a realização das atividades de iniciação científica PIBIC-EM. Em virtude da atual pandemia, as aulas tiveram suas devidas modificações, passando a ser esquematizados em encontros semanais ou quinzenais de modo virtual.

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 grande maioria, as populações mais carentes devido ao hábitat do vetor. No hospedeiro, os parasitos vivem e se reproduzem no interior de células do sistema fagocitário mononuclear, majoritariamente os macrófagos. Existem algumas manifestações clínicas da leishmaniose, sendo as 3 principais: cutânea, mucocutânea e visceral. Referente ao tratamento da doença, os fármacos usados são tóxicos e necessitam de administração parenteral. Desse modo, é importante compreender e analisar melhor a infecção pelo parasito para a procura de novos alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novos fármacos (LEISHMANIOSE, 2007; PEARSON, 2017).

Os ácidos graxos são componentes essenciais para composição e sinalização celular, relevantes 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 recrutamento de ácido graxo para o vacúolo parasitóforo, local em que o parasito se encontra no interior de célula hospedeira. O *cd36* é um gene que codifica uma proteína de membrana, que permite a entrada de ácidos graxos na

célula. Esta proteína, também denominada CD36, opera em conjunto com a proteína FABP4, que é abundante em adipócitos e macrófagos. Seu papel está relacionado com o recrutamento e deslocamento de ácidos graxos da membrana plasmática para as organelas (AZEVEDO, 2013; COSTA, 2020).

Seguindo essa linha, participei do projeto da doutoranda Mariana B. C. Brioschi, no qual pude avaliar a expressão de *cd36* na célula infectada. O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis de transcritos de *cd36* em macrófagos oriundos de camundongos WT e nocauteados para FABP4, infectados com *Leishmania amazonensis*. Além disso, foram realizadas infecções *in vivo* e as amostras das patas infectadas foram utilizadas para quantificação de *cd36* também.

METODOLOGIA:

Todos os experimentos foram realizados pelos alunos de pós-graduação do laboratório, que nos passaram em aulas remotas as etapas de cada processo. Foram utilizados camundongos C57/BL6 selvagens (WT) e nocauteados para FABP4. Após a eutanásia destes animais, foi retirada a medula óssea de fêmures e tíbias para diferenciação em macrófagos. Estes foram então infectados com amastigotas de *L. amazonensis* durante 1 e 48 horas. Desta infecção *in vitro*, foram obtidas lamínulas para contagem de macrófagos infectados ou não, e amostras de RNA.

Para o experimento *in vivo*, dois grupos com 3 animais cada (WT e nocauteado) foram utilizados para a infecção. Os animais foram infectados na pata posterior esquerda com promastigotas de *L. amazonensis* e essas patas foram medidas durante 9 semanas. Depois deste período, os animais foram eutanasiados e as patas foram utilizadas para extração de RNA.

A partir do RNA foi realizada a síntese de DNA complementar e análise da expressão de *cd36* por PCR em tempo real utilizando o gene endógeno *hprt1* (Figura 1).

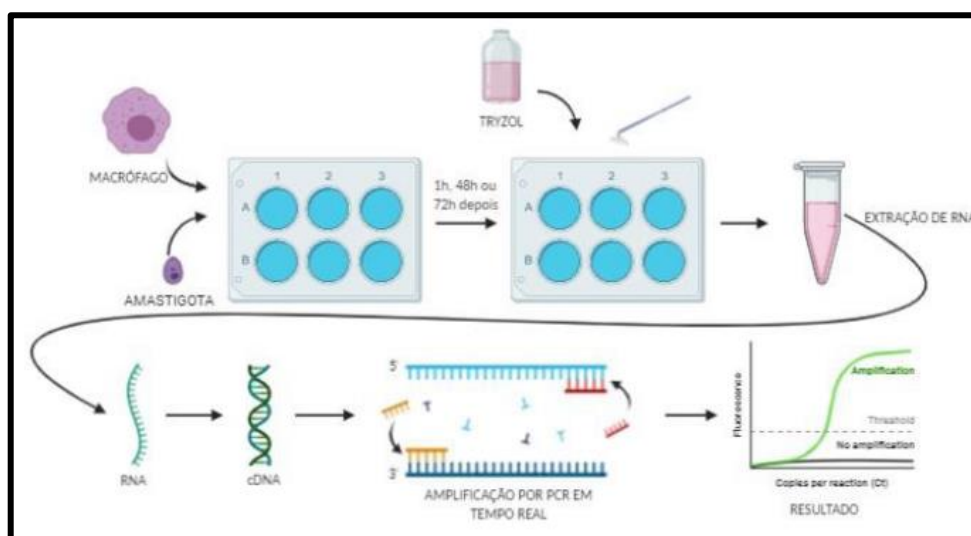


Figura 1: Resumo do experimento realizado. Representação da infecção *in vitro*, extração de RNA, síntese de cDNA e PCR em tempo real. Fonte: imagem criada em BioRender.com.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Na infecção *in vitro*, houve diferença significativa na contagem de macrófagos infectados. Houve uma diminuição na taxa de infecção em macrófagos oriundos de camundongos nocauteados assim como no número de parasitos a cada 100 macrófagos infectados. Porém, a expressão de *cd36* não apresentou diferenças entre os dois grupos celulares infectados.

Já na infecção *in vivo*, foi possível observar um aumento do tamanho das patas dos camundongos nocauteados em relação aos WT na 6ª semana após infecção. Em relação a expressão de *cd36*, não houve diferenças entre os dois grupos.

Já foi demonstrado que a proteína FABP4 pode ser importante durante a infecção por *Leishmania*. Como outras proteínas também estão envolvidas com a FABP4, tornou-se importante avaliá-las também. Neste caso foi escolhida a proteína CD36, uma proteína de membrana responsável pela entrada de ácidos graxos no interior das células. Porém, mesmo com a alteração da expressão de *fabp4* durante a infecção, a expressão de *cd36* não altera. Há trabalhos que indicam que pode haver outras proteínas atuando no transporte de ácidos graxos na célula, dessa forma, mesmo sem a FABP4, é possível que outras proteínas exerçam sua função para suprir sua falta (HOTAMISLIGIL e BERNLOHR, 2015).

CONCLUSÕES:

Com este projeto foi possível observar que a expressão de *cd36* não altera mediante a ausência de FABP4 em macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Mesmo assim, o trabalho foi de grande importância para o conhecimento de diferentes técnicas utilizadas no laboratório, principalmente o PCR em tempo real, muito utilizado para diagnóstico de COVID-19 durante a pandemia.

BIBLIOGRAFIA

AZEVEDO, Alana Freire de. **Perfis de ácidos graxos em isolados de *Leishmania* spp. com resistência natural ao óxido nítrico e ao trivalente**. 2013. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2013.

COSTA, Mariana Borges. **Relação entre a proteína transportadora de ácidos graxos tipo 4 e a biologia de vacúolos macrófagos infectados com *Leishmania***. 2020. 76f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal – Relações Antrópicas, Meio ambiente e Parasitologia) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2020.

HOTAMISLIGIL, Gökhan S.; BERNLOHR, David A. Metabolic functions of FABPs—mechanisms and therapeutic implications. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 11, n. 10, p. 592-605, 2015.

LEISHMANIOSE. Biblioteca Virtual da Saúde. **Ministério da Saúde**, 2007. Disponível em <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/dicas/126leishmaniose.html>. Acesso em 11 de Outubro de 2021.

PEARSON, R. D. Leishmaniose. **Manual MSD, Versão para profissionais da saúde**, 2017. Disponível em <https://www.msmanuals.com/pt/profissional/doen%C3%A7as-infecciosas/protozo%C3%A1rios-extraintestinais/leishmaniose>. Acesso em 10 de Outubro de 2021.