

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

PAPEL DE PI3K NA INVASÃO CELULAR E MATURAÇÃO DE
FAGOLISSOSSOMOS DE *L. (L.) amazonensis*

Renata Junqueira Rezende Guimarães

Uberlândia

Novembro -2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

PAPEL DE PI3K NA INVASÃO CELULAR E MATURAÇÃO DE
FAGOLISSOMOS DE *L. (L.) amazonensis*

Tese apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas
como requisito parcial para obtenção do
título de Doutor.

Renata Junqueira Rezende Guimarães

Janethe Deolina de Oliveira Pena, orientadora

Claudio Vieira da Silva, co-orientador

Uberlândia

Novembro -2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- G963m Guimarães, Renata Junqueira Rezende, 1977-
Maturação do fagolisossomo de *Leishmania amazonensis*
depende de PI3-kinase / Renata Junqueira Rezende Guimarães. –
2009.
62 f. : il.
- Orientadora: Janethe Deolina de Oliveira Pena.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Progra-
ma de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. *Leishmania* - Teses. 2. *Leishmania amazonensis*. I. Pena,
Janethe Deolina de Oliveira. II. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplica-
das. III. Título.

CDU: 576.893.161

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

Ao universo, pela minha existência

A Deus. “Se você não consegue ver Deus em tudo, não consegue ver Deus de forma alguma” YOGUI BHAJAN

Aos meus pais adotivos Azeret e Fernando; obrigado por todos os passos guiados para me conduzir ao caminho da retidão, pelo amor puro e valioso. Aos meus pais biológicos, honro eternamente a minha existência como fruto de uma união.

Ao meu esposo, Pedro pelo amor em gestos, mais grandiosos que palavras; pela substituição por horas sem questionamento ao cuidado de nossas filhas; por suportar minhas inúmeras ausências. Te amo.

Às minhas filhas Tainá e Adara; simplesmente pelas suas existências em minha vida, honro suas vidas, nossos momentos. Amo vocês eternamente !!!

Aos meus bisavós e avós, pelos grandes e pequenos instantes, experiência e geração de nossa linda família.

Aos meus animais de estimação, que cederam momentos de amor sem interesse, convívio puro e gracioso.

AGRADECIMENTOS

Ao meu co-orientador, Claudio, pelo respeito, esclarecimentos, dedicação e profissionalismo. Compartilho com você este título!

A minha orientadora Janethe, pelos ensinamentos, momentos de paciência e amizade, tornando o mundo mais fácil e grandioso.

Aos colegas da pós-graduação e dos laboratórios pelos momentos de companheirismo e amizade.

Aos colegas que contribuíram de várias maneiras para o encerramento deste trabalho, Mariane, Alexandre, Lilian, Fernanda, obrigado!

A meus amigos Cesar, Marcia, e Kelbya, pelos ensinamentos que não se aprende somente em livros, pelas curas da alma, por me tornar divina. À Kelbya, pela nossa sincera amizade.

À minha professora de inglês, Maria Cláudia pelos ensinamentos da língua e palavras de amizade.

A todas as pessoas que comigo conviveram; amigos, funcionários, parentes; que deixaram lembranças e contribuíram de alguma maneira para este trabalho e minha formação pessoal.

“Pode haver muitas viagens, mas só existe um caminho para alcançar a consciência superior; a maneira honrada de viver. Não há outro caminho, pois de qualquer outro modo, será uma piada. Mas, a partir do momento que você decidir, aconteça o que acontecer, vou dar a mim mesmo o caminho da retidão, e você ficará surpreso em ver que todas as coisas neste mundo estarão ao seu alcance”.

YOGI BHAJAN, mestre da Kundalini Yoga.

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt- família de proteínas, nas quais os membros são também chamados quinases.

DAG- diacilglicerol

DAPI- 4,6'-diamidino-2-phenylindole-dilactate

DMEM- meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium

Gab2- proteína codificada em humanos pelo gene GAB2, é uma proteína ligante associada a GRB2, serve como principal ativador de PI3K.

GAPs- Proteínas ativadas por GTPase

GFP-PLC- δ -PH - plasmídeo com domínio de PLC- δ com homologia com a região de

PI(4,5)P2 ligante de plestrina (PH), conjugado ao GFP

GTPases- grande família de enzimas hidrolases de pequeno peso molecular que se ligam e hidrolizam o GTP.

HEPES- 4- (2-hydroxyethyl) - ácido 1-piperazineethanesulfonic

IP3- inositol 1,4,5-trifosfato

Kir- canais de potássio

L.(L.) amazonensis – *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

LAMP-1 – Proteína de Membrana Associada a Lisossomo

LPG- lipofosfoglicana

LTA- Leishmaniose Tegumentar Americana

Meio LB- Meio Luria-Bertani

PBS- tampão fosfato salino

PDK1- enzima mitocondrial piruvato desidrogenase quinase- isozima 1,

PGN-saponina- PGN contendo saponina a 0,1 %

PGN- tampão fosfato, contendo 0,25% de gelatina e 0,1% de azida sódica

PI- fosfatidil-inositol

PI3K- fosfatidil-inositol 3-quinase

PIP2- fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato

PIP3- fosfatidil-inositol 3,4,5-trifosfato

PKC- proteína quinase C

PLC- enzima fosfolipase C

Rab7 - proteínas pertencem a superfamília GTPases, associado com endossomos tardios.

SFB- Soro Fetal Bovino

Tec- proteína tirosina-quinase

TLR- receptores Toll-like

TRP- receptor de canal transitório

SUMÁRIO

1- Introdução	1
1.1 <i>Leishmanioses</i>	2
1.2 <i>Fagocitose por macrófagos e biogênese do fagolisossomo</i>	5
1.3 <i>Actina</i>	8
1.4 <i>Filamentos de F-actina</i>	8
1.5 <i>Recrutamento de F-actina por Leishmania</i>	9
1.6 <i>Fosfolipídios de membrana e ativação de PI3-quinase (PI3K)</i>	9
1.7 <i>Inibidores da PI3K</i>	12
2- Objetivos	15
2.1 <i>Gerais</i>	16
2.2 <i>Específicos</i>	16
3- Material e Métodos	17
3.1 <i>Cultura de parasitas</i>	18
3.2 <i>Cultura de macrófagos peritoneais</i>	18
3.3 <i>Cultura de macrófagos J774</i>	19
3.4 <i>Infecção dos macrófagos e imunofluorescência</i>	19
3.5- <i>Transfecção</i>	21
3.5.1- <i>Transformação de bactérias DH5α</i>	21
3.5.2 <i>Purificação dos plasmídeos</i>	21
3.5.3- <i>Transfecção de macrófagos em cultura</i>	22
3.6- <i>Microscopia Confocal</i>	23
3.7- <i>Contagem e cinética</i>	24
3.8- <i>Análise estatística</i>	25
4- Resultados	26
5- Discussão	31
6- Conclusões	37
7- Referências Bibliográficas	39

RESUMO

A leishmaniose tegumentar, causada por *Leishmania (L.) amazonensis*, está amplamente distribuída em todo território nacional, manifestando-se como lesões graves disseminadas no homem e animais. Durante a invasão de microorganismos, células fagocíticas são ativadas, sendo que um dos eventos sinalizadores é a fosforilação de substratos pela enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), que mediante uma ampla variedade de estímulos extracelulares, gera produtos lipídicos específicos que propagam sinais intracelulares através de proteínas mediadoras subsequentes, gerando fluxos secundários de sinalização. No processo de invasão, ocorre o recrutamento do citoesqueleto e fusão com lisossomos para a formação do fagolisossomo. A modulação, por patógenos, da sinalização dependente da via PI3K na célula hospedeira é uma importante estratégia para estabelecimento da infecção e sobrevivência intracelular destes organismos. Objetivamos estudar a maturação de fagolisossomos de *L.(L.) amazonensis* através da marcação de F-Actina e Proteína de Membrana Associada a Lisossomos (LAMP-1), bem como o papel da PI3K no processo de invasão celular e maturação dos fagolisossomos de *L.(L.) amazonensis*. Macrófagos peritoneais murinos, tratados ou não com wortmanina (um inibidor da via PI3K), foram infectados com promastigotas de *L.(L.) amazonensis*. Para validar a participação desta via na invasão por esta espécie de *Leishmania*, os macrófagos foram transfectados com plasmídeo GFP-PLC- δ -PH, com homologia com a região de PI(4,5)P₂, um componente da via de fosforilação PI3K, após o qual foram infectados. Nossos resultados demonstraram que durante o processo de maturação de fagolisossomo de *L.(L.) amazonensis*, há primeiramente um recrutamento de F-actina para formação do fagossomo/endossomo precoce, sendo que a F-actina despolimeriza quando há fusão com lisossomos, evidenciado pelo recrutamento de LAMP-1, marcador de lisossomos. Os processos de invasão e fusão lisossomal de *L.(L.) amazonensis* demonstraram clara dependência da atividade de PI3K, evidenciado pela diminuição desses processos pelo inibidor de PI3K, a wortmanina.

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) amazonensis* is largely distributed throughout the country and can manifest as severe and disseminated lesions in man and other animals. During microorganism invasion phagocytes are activated and one of the signs of this activation is the phosphorylation of specific substrates by the enzyme phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), which is in its turn activated by a variety of extracellular signals, generating lipid products that will serve as mediator in signal transduction downstream. During parasite invasion of the host cells there is recruitment of cytoskeleton proteins to form a phagosome, followed by fusion with lysosomes to generate the phagolysosome, where the parasites will thrive. Modulation of PI3K signaling pathways by parasites are important strategies for the establishment of the infection and intracellular survival of intracellular parasites. In this study we aimed to investigate the maturation of the phagolysosome of *L. (L.) amazonensis* through the labeling of F-actin and LAMP-1, as well as to determine the role of PI3K on the invasion process by *L. (L.) amazonensis*. Murine peritoneal macrophages treated or not with wortmannin (an inhibitor of the PI3K pathway) were infected with *L. (L.) amazonensis* promastigotes. To validate the role of this pathway by this species of *Leishmania*, macrophages were transfected with GFP-PLC- δ -PH plasmid, which has homology with PI(4,5)P₂, a component of the PI3K pathway, after which they were infected. Our results demonstrated that, during the maturation of *L. (L.) amazonensis* phagosomes, there was initially F-actin recruitment to the nascent phagosome/endosome, which disappeared after fusion with lysosomes, as shown by the recruitment of LAMP-1, a lysosomal marker. The processes of invasion and lysosomal fusion of *L. (L.) amazonensis* demonstrated a clear dependency of PI3K activity, as it was demonstrated by the inhibition of these processes by the PI3K inhibitor wortmannin.

1= Introdução

1.1 - Leishmanioses

As leishmanioses são antroponoses consideradas um grande problema de saúde pública e representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano (Ministério da Saúde/FIOCRUZ).

A doença denominada leishmaniose é infecto-parasitária, causada por várias espécies de protozoário do gênero *Leishmania* ssp. e pode apresentar diferentes formas clínicas, com sintomas variando desde uma lesão cutânea limitada às formas disseminadas, cutânea difusa, mucocutânea ou leishmaniose visceral, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação parasita-hospedeiro (HERWALDT, 1999; GONTIJO, CARVALHO, 2003; AWASTHI et al., 2004; MAIA et al., 2007; GIUDICE, 2007; NADERER, MCCONVILLE, 2008).

Um total de aproximadamente 21 espécies de *Leishmania* foi identificado como patogênico para o homem (SINGH, 2006). Existem basicamente três formas clínicas da leishmaniose, dentre as várias espécies de *Leishmania*. A leishmaniose visceral (LV), causada por *L.(d) infantum*, *L. (d) donovani* e *L.(d) chagasi*, dissemina em órgãos como fígado, baço e medula óssea, podendo ser fatal se não tratada. A leishmaniose mucocutânea (LMC) que pode cursar com lesões extensivas e desfigurantes nas membranas mucosas do nariz, da boca e da garganta, sendo ocasionada pelas espécies *L. (viannia) braziliensis* e *L. (v) guyanensis*. A leishmaniose cutânea (LC) pode produzir numerosas úlceras na pele, causada pelas espécies *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana* e *L.(Leishmania) amazonensis*.

A leishmaniose tegumentar (LT) constitui um problema de saúde pública em 88 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos. É considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS-1997), como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo sua alta prevalência e capacidade de produzir deformidades (Ministério da Saúde/FIOCRUZ).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) ocorre nas Américas desde o Sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, sendo o foco mais importante sul-americano, que compreende todos os países, com exceção do Uruguai e do Chile (GONTIJO, CARVALHO, 2003).

No Brasil a LTA, tem como principal espécie envolvida e de maior prevalência no homem é a *L. (Viannia) braziliensis*, que foi a primeira espécie de *Leishmania* descrita e incriminada como agente etiológico da LT, de importância não só no Brasil, mas em toda a América Latina. Esta espécie possui ampla distribuição, desde a América Central até o norte da Argentina e no Brasil encontra-se amplamente distribuída em todo seu território. Outra espécie envolvida na LTA é a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, cuja doença tem aumentado nos últimos anos, com surtos epidêmicos nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e Amazônica (GONTIJO, CARVALHO, 2003; Ministério da Saúde/FIOCRUZ).

O ciclo de transmissão da *Leishmania (Leishmania) amazonensis* ocorre em áreas de florestas primárias e secundárias da Amazônia Legal (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Maranhão), e também é verificado nos estados das regiões Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Centro-Oeste (Goiás) e Sul (Paraná). Seu principal vetor, *Lutzomyia flaviscutellata*, apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontrado em diferentes *habitats* de países fronteiriços ao Brasil e nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará,

Rondônia, Roraima, Tocantins, Bahia, Ceará, Maranhão, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Minas Gerais e São Paulo, ocorrendo em matas úmidas, onde apresenta densidade elevada. A *L.(L.) amazonensis* causa úlceras cutâneas localizadas e, ocasionalmente, alguns indivíduos podem desenvolver o quadro clássico da leishmaniose cutânea difusa (LCD) (Ministério da Saúde/FIOCRUZ).

As espécies de *Leishmania* possuem um ciclo de vida digenético (heteroxênico), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados (forma amastigota) e insetos vetores, particularmente os mosquitos flebotomíneos da espécie *Lutzomyia* (forma promastigota). No intestino médio do mosquito, definem-se dois estágios de desenvolvimento: procíclico e metacíclico. No estágio procíclico o parasita ataca o epitélio das células do intestino do mosquito e possuem baixa virulência. Na fase metacíclica, os parasitas são virulentos, infectam a célula hospedeira no homem e animais e causam a doença (da SILVA, SACKS, 1987).

Promastigotas são inoculadas no interior da derme de mamíferos durante o repasto sanguíneo do mosquito e são fagocitadas por macrófagos nos quais se transformam em amastigotas. Esta diferenciação inicia-se em 4 horas após fagocitose e perdura no mínimo 5 dias (GALVÃO-QUINTAO et al., 1990; COURRET et al., 2001).

Após a infecção, muitas promastigotas de *Leishmania* são rapidamente mortas no espaço extracelular. Entretanto, algumas escapam do meio extracelular e sobrevivem infectando as células granulócitos polimorfonucleares (PMN), particularmente os neutrófilos (SUNDERKOTTER et al., 1993; SOLBACH, LASKAY, 2000) onde permanecem no estágio promastigota sem multiplicarem-se. Após 42 horas, macrófagos migram para o tecido infectado e fagocitam restos de PMN que sofreram apoptose e abrigam parasitas em

quantidade maior que o número de promastigotas livres extracelulares (AGA et al, 2002; VAN ZANDBERGEN, 2004).

1.2- Fagocitose por macrófagos e biogênese do fagolisossomo

Fagocitose é a forma pela qual macrófagos internalizam grandes partículas, um processo mediado por receptor e é iniciado pela interação entre ligantes intrínsecos da partícula (no caso de fagocitose não opsônica) ou opsoninas (tais como componentes do complemento e imunoglobulinas) com receptores do fagócito (ANDEREM, UNDERHILL, 1999; VIEIRA, et al., 2002). O vacúolo resultante, inicialmente formado pela invaginação da membrana plasmática, é denominado fagossomo. Estes, recentemente formados, passam por muitas transformações e interagem com organelas endocíticas, um processo referido como maturação do fagossomo, o qual leva à formação do fagolisossomo (ANDEREM, UNDERHILL, 1999; VIEIRA, et al., 2002).

A cinética de infecção por *L.(L.) amazonensis* visualizada por cinematografia revelou que, após o parasita ligar-se ao macrófago, observa-se um longo e tubular pseudópodo envolvendo firmemente seu corpo celular ou flagelo; ou então, formando um enrugamento semelhante a dobras ao redor da promastigota. Muitas vezes, parasitas são fagocitados com o corpo celular entrando primeiro, mas a ingestão se inicia principalmente pelo flagelo. Em alguns casos, promastigotas interagiram com macrófagos via seus flagelos (0 a 15 segundos), mas se viraram rapidamente (16 segundos) e finalmente entraram no macrófago pelo corpo celular em 37 a 61 segundos pós-infecção (COURRET et al., 2002).

A maioria, ou senão todas as promastigotas fagocitadas, estavam localizadas em organelas que rapidamente adquiriram propriedades fagolisossomais. Após 30 minutos,

LAMP-1 (Proteína de Membrana Associada a Lisossomo-1), macrosialina, catepsinas B e D foram detectadas em 70-98% destes compartimentos e aproximadamente 70% foram marcados pela proteína Rab7 (COURRET et al., 2002) que controla a agregação e fusão de lisossomos ou estruturas endocíticas tardias (CHAVIER et al., 1990; BUCCI et al., 2000). Catepsinas A e B são duas hidrolases ácidas concentradas principalmente em lisossomos de macrófagos (RODMAN et. al., 1990; CLAUS et. al., 1998). LAMP-1 é uma proteína altamente glicosilada constituinte de endossomos tardios e lisossomos. Nestes, LAMP-1 representando cerca de 50% das proteínas na membrana lisossomal (HUNZIKER, GEUZE, 1996; WINCHESTER, 2001).

Recentes estudos têm destacado a importância da função endossomo-lisossomo na diferenciação e virulência do parasita em macrófagos e linhagens de camundongos susceptíveis. Durante a transição através dos diferentes meios extra- e intracelular, *Leishmania* está exposta a diversas condições, como variações na disponibilidade e tipos de nutrientes, no pH, na temperatura e oxigênio (BESTEIRO et al., 2007).

Para sobreviver intracelularmente, parasitas utilizam diversas estratégias para alterar a atividade celular (SWANSON et al., 2002). Por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis* paralisa a maturação do fagossomo e replica em um vacúolo similar ao endossomo precoce (STURGILL-KOSZYCKI et al., 1994). No caso da *Leishmania*, associado ao uso de um ciclo bifásico adaptado para diferentes ambientes, promastigotas modulam a composição molecular do fagossomo precoce após sua formação (BESTEIRO et al., 2007).

Englobamento de promastigotas de *Leishmania* por macrófagos é iniciado pelo reconhecimento de moléculas receptoras de superfície pelo parasita e a célula hospedeira. Duas das principais moléculas do parasita, LPG (Lipofosfoglicana) e gp63, estão provavelmente envolvidas na ligação, visto que interagem com unidades C3b e C3bi do

complemento (ELHAY et al., 1990). No caso de fagossomos abrigando promastigotas de *L. donovani*, interações com endossomos tardios e lisossomos são inibidas (DESJARDINS, DESCOUTEAUX, 1997). Utilizando promastigotas mutantes defeituosas em fosfoglicanas, autores demonstraram que esta inibição da maturação do fagossomo é dependente de domínios de unidades repetitivas LPG e rapidamente os fagossomos contendo as promastigotas maturam rapidamente para fagolisossomos positivos para Rab7 e LAMP-1 (DESJARDINS, DESCOUTEAUX, 1997; SCIANIMANICO et al., 1999).

Enquanto promastigotas de *L. donovani* e *L. major* inibiram a maturação do fagossomo, não necessariamente isto ocorreu em todas as espécies de *Leishmania*. Um exemplo marcante é *L.(L.) amazonensis*, no qual macrófagos infectados demonstraram não sofrer o recrutamento de proteínas em suas membranas fagossomais ou reduzir a interação com vias endocíticas lisossomais (COURRET et al., 2002).

1.3- Actina

A actina é o maior componente dos filamentos finos das células musculares e do sistema citoesquelético de células não musculares, e está presente em todos os eucariontes.

A actina é uma proteína que, em conjunto com a miosina e moléculas de ATP, gera movimentos celulares e musculares. A actina polimerizada forma os microfilamentos de actina importantes na composição do citoesqueleto (WIKIMEDIA FOUNDATION, 2009).

Os microfilamentos podem interagir com um grande número de outras estruturas e adquirir propriedades através de várias moléculas (proteínas ligantes de actina). Este grupo de proteínas pode ainda mediar a interação dos microfilamentos com outras estruturas celulares,

membranas, ou funcionar como motores, agrupadas na família das miosinas.(WIKIMEDIA FOUNDATION, 2009)

1.4- Filamentos de F-actina

São constituídos pela polimerização da proteína globular actina G, originando os filamentos de actina F. O modelo mais aceitável é o de um filamento helicoidal formado por uma cadeia simples de monômeros. Os filamentos estão presentes no citoplasma das células eucariotas sob a forma de feixes de filamentos paralelos ou redes de filamentos anastomosados com 5-7 nm de diâmetro (WIKIMEDIA FOUNDATION, 2009).

1.5- Recrutamento de F-actina por Leishmania

Nos primeiros estágios da fagocitose, receptores reconhecem partículas antigênicas que levam a um acúmulo localizado de F-actina no sítio de internalização e início de um cálice fagocítico rico em F-actina ao redor do fagossomo (MAY, MACHESKY, 2001; CASTELLANO et al., 2001). Em alguns casos, protuberâncias do citoplasma, guiadas por componentes motores derivados de actina, também auxiliam no envolvimento da partícula (GREENBERG, 1999). Estes eventos iniciais são seguidos por ativação de quinases, mudanças no metabolismo de fosfolípidos e tráfegos de membrana (MAY, MACHESKY, 2001; CASTELLANO et al., 2001).

Um estudo realizado para determinar se a presença de F-actina varia com o estágio do parasita, macrófagos de camundongos Balb/c foram infectados com *L.(L.) amazonensis* e a

infecção avaliada em diferentes tempos com o marcador de actina fluorescente (faloidina). Os autores demonstraram que após 10 minutos, aproximadamente 40-55% de promastigotas metacíclicas ou amastigotas estavam circundadas por F-actina. Neste estágio, a maioria dos parasitas marcados por F-actina encontrava-se em processo de fagocitose. Após completa internalização, a percentagem de parasitas marcados por F-actina diminuiu rapidamente para 5-10% em 1-2 horas pós-infecção (COURRET et al., 2002).

Neste período, F-actina foi visualizada geralmente como um espesso/denso anel ao redor do corpo celular da promastigota e amastigota ou adotou a forma de uma “manga” ao redor do flagelo de promastigotas. Em promastigotas, F-actina estava frequentemente concentrada ou ao redor do corpo celular ou do flagelo e com menor frequência ao redor de ambas as partes. Isto sugere que F-actina sequencialmente polimeriza e despolimeriza ao longo do parasita durante sua internalização. Presença de actina nas “dobras” formadas no ponto de entrada de alguns parasitas foi também observada (COURRET et al., 2002)

1.6- Fosfolipídios de membrana e ativação de PI3-quinase (PI3K)

Fosfoinosítídeos são fosfolípidos ácidos da membrana celular com mio-inositol no grupo principal. O componente base, fosfatidilinositol (PI), pode ser fosforilado nas posições 3, 4 e 5 no anel inositol em cada combinação, dando origem a poli-fosfoinosítídeos de baixa abundância. Estes lipídeos encontram-se primariamente no folheto interno da membrana citoplasmática e marcam a identidade dos compartimentos de membrana sub-celulares específicos, servem como sítios de reconhecimento para proteínas citoplasmáticas específicas e atuam como segundo mensageiro, modulando a atividade de algumas proteínas de membrana (SUH, HILLE, 2008).

O termo PI3K (fosfatidil-inositol 3-quinase) é aplicado para a família das quinases que fosforilam a posição D-3 do anel inositol de lipídeos alvos (RAMEH, CANTLEY, 1999). PI3K é um eixo central, através do qual, muitos sinais são repassados antes de ser especializados em fluxos secundários de sinalização (MEDINA-TATO et al., 2007).

As enzimas da classe I de PI3K fosforilam fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PI[4,5]P2) para produzir fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PI[3,4,5]P3), um segundo mensageiro crítico que propaga sinais intracelulares através de proteínas mediadoras subsequentes na cascata de sinalização (RAMEH, CANTLEY, 1999) .

PIP2 é encontrado principalmente na membrana plasmática. Apesar de ser o mais abundante poli-fosfoinosítídeo presente na membrana, PIP2 corresponde a somente 1% dos lipídeos ácidos em toda a célula (MCLAUGHLIN et al., 2002; XU et al., 2003; HILGEMANN, 2007).

Iniciando no final dos anos 70, PIP2 recebeu bastante atenção como substrato para clivagem pela enzima fosfolipase C (PLC), uma reação que produz dois segundos mensageiros clássicos, inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) solúvel e diacilglicerol (DAG) ligado à membrana. Por sua vez, IP3 e DAG foram descobertos por sua atuação na liberação de Ca^{2+} dos armazenamentos intracelulares e para recrutar e ativar proteína quinase C (PKC), respectivamente, e deste modo os produtos da clivagem de PIP2 são componentes de duas principais vias de sinalização. Somente em 1990 o papel de PIP2 foi descoberto completamente (SUH, HILLE, 2008).

PIP2 é necessário para operação de determinados canais de íons e transportes na membrana plasmática e a temporária depleção de PIP2 durante sinalização por PLC paralisa temporariamente estas funções. Por exemplo, PIP2 é claramente conhecido para regular a

atividade de canais de potássio (Kir), canais de receptor de potencial transitório (TRP) e transportadores de íons como os canais de troca de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (SUH, HILLE, 2008).

Vários relatos da sensibilidade de PIP2 estão estabelecidos, mas sua relevância fisiológica ainda se encontra sob investigação. Na biologia celular, PIP2 também atua como uma âncora alvo para proteínas que catalisam endocitose e exocitose, para moléculas de pequeno peso molecular (GTPases), e para componentes do citoesqueleto de actina (SUH, HILLE, 2008).

PI(3,4,5)P3 atua como um sítio de armazenamento/ativação da membrana plasmática, recrutando e ativando proteínas contendo domínios ligados a fosfolípidos. Estes efeitos decorrentes de PI3K incluem proteínas quinases que promovem crescimento celular, sobrevivência e proliferação (como as Akt, PDK1 e a família de quinases Tec); as GAPs, que regulam a mobilidade celular mediada por GTPases e tráfego de membrana (WELCH et. al., 2002; SHINOHARA et al., 2002); proteínas de suporte (Gab2, p.ex.) que nucleiam a montagem de complexos chave de sinalização (VANHAESBROECK et. al., 2001; PARRY et. al., 2007).

A classe I PI3K é a mais estudada das PI3K e a maioria das pesquisas foca sobre esta isoforma. Comparativamente, pouco se conhece sobre a Classe II PI3Ks, suspeitando ter um papel no tráfego de vesículas associados à clatrina (DOMIN et. al., 2000), particularmente pelo fato de PI3K de classe II ser refratária a inibição por wortmanina e LY2940002, os mais amplamente inibidores utilizados de PI3K (DOMIN et. al., 1997). Finalmente, as PI3K de classe III não produzem aparentemente sinalização por inositol-lipídio, embora tenham sido recentemente sugeridas como importantes na sinalização de receptores Toll-like (TLR) (KUO et. al., 2006).

A classe I de PI3K é dividida em subclasses IA e IB baseada na subunidade reguladora. A classe de quinases IA são heterodímeros compostos de uma subunidade reguladora p85 e uma subunidade catalítica p110. A subunidade P85 liga a várias tirosinas quinases para ativar a subunidade p110 e moléculas subsequentes. A subunidade catalítica p110 compreende quatro isoformas, p110 α , β , γ e δ (HENNESSY et. al., 2005; VANHAESEBROECK et. al., 2005).

PI3K α é conhecida por desempenhar um importante papel na tumorigênese devido à alta frequência de mutações que foram detectadas no gene codificador da subunidade p110 α de PIK3CA em cânceres humanos (SAMUELS et al., 2004; LEVINE et al., 2005; WHYTE, HOLBECK, 2006); e esta isoforma também está envolvida na sinalização de insulina e metabolismo da glicose (KNIGHT et al., 2006). Foi demonstrado que PI3K β possui atividade de agregação plaquetária e por isso pode estar envolvida no desenvolvimento de doenças relacionadas à trombose (JACKSON et al., 2005) As quinases PI3K γ e PI3K δ desempenham papéis na inflamação e no sistema imune (HIRSCH et al., 2000; LI et al., 2000; SASAKI et al., 2000; SADHU et. al., 2003; BARBER et. al., 2005; CAMPS et. al., 2005).

1.7 Inibidores da PI3K

Em recentes anos, o desenvolvimento de inibidores específicos destas isoformas tem atraído atenção entre pesquisadores e companhias farmacêuticas, aguardando o surgimento de novas drogas candidatas especificamente para o tratamento do câncer (PI3K α), trombooses (PI3K β) e doenças inflamatórias (PI3K δ e PI3K γ) com mínimos efeitos colaterais (KONG, YAMORI, 2007). Os desafios terapêuticos são para alcançar o controle da ativação patológica, focando as individuais isoformas de PI3K, que poderão fornecer a chave para o entendimento

e controle de PI3K em doenças. Diante disto, o uso de inibidores farmacológicos específicos, bem como tecnologias moleculares e marcação gênica, têm promovido discernimento dos diferentes papéis de cada membro da família PI3K (MEDINA-TATO et al., 2007).

Diversos inibidores de PI3K foram reportados demonstrando efeitos anti-câncer *in vivo*. Inibidores de primeira geração LY294002 (VLAHOS et al., 1994) e wortmanina (OKADA et al., 1994) foram estudados e no entanto, falharam na triagem clínica por causarem toxicidade à pele e fígado, respectivamente (HU et al., 2000; IHLE et al., 2004). PX-866, um análogo da wortmanina, demonstrou diminuição da toxicidade hepática, mas causou hiperglicemia e decréscimo na tolerância à glicose (IHLE et al., 2005; KONG, YAMORI, 2007).

Wortmanina é um metabólito de fungo que foi primeiramente isolada de *Penicillium wortmanni* no início de 1957 (BRIAN et al., 1957) e sua estrutura foi elucidada 15 anos após (PETCHER, KIS, 1972). A droga foi primeiramente descrita pela atividade anti-inflamatória (WIESINGER, 1974). Relatos posteriores identificaram-na como um potente inibidor da PI3K (ARCARO, WYMAN, 1993; OKADA et al., 1994; POWIS et al., 1994) e também como inibidor da quinase da cadeia leve de miosina. Ao contrário de muitos inibidores de quinase, wortmanina inibe PI3K de maneira não competitiva com ATP por ligação covalente com PI3K (NAKANISHI et al., 1992; OKADA et al., 1994; POWIS et al., 1994).

Wortmanina demonstrou uma potente inibição no crescimento celular, com ação antitumoral *in vivo*, mas causou toxicidade hepática. Em adição, sua baixa solubilidade e estabilidade levaram à sua descontinuação antes dos ensaios clínicos (IHLE et al., 2004).

Entretanto, LY294002 e wortmanina têm sido usados amplamente como ferramenta para investigar diversos sinais no processo de transdução envolvendo PI3K. Nos últimos cinco anos, diversos inibidores específicos da PI3K têm sido desenvolvidos como NVP-BEZ235,

SF1126 e ZSTK474 que demonstraram serem drogas promissoras na terapia do câncer (KONG , YAMORI, 2008, 2009; KONG et al., 2009; LIU, 2009).

A atividade de PI3K durante invasão de células com promastigotas de *Leishmania* foi somente verificada em um estudo que demonstrou o papel da sinalização PI3K em conferir resistência da célula hospedeira para apoptose (RHULAND et al., 2007), sem esclarecer os processos de biogênese e maturação dos fagolisossomos neste processo.

2- Objetivos

2.1 Gerais

1. Verificar a maturação de fagolisossomos de *L.(L.) amazonensis* através da marcação de F-Actina e LAMP-1 em macrófagos murinos.
2. Determinar o papel da PI3K no processo de invasão celular e maturação dos fagolisossomos de *L.(L.) amazonensis* em macrófagos murinos.

2.2 Específicos

1. Observar a cinética de infecção por promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em macrófagos murinos Balb/C, susceptíveis à doença.
2. Observar a cinética de marcação de F-actina e LAMP-1 na infecção por *L.(L.) amazonensis*.
3. Verificar a biogênese e maturação do fagolisossomo através de marcador específico LAMP-1 durante a infecção.
4. Inibir a via PI3K pelo inibidor específico (wortmanina) na infecção por *L.(L.) amazonensis*.
5. Verificar o recrutamento de PIP2 em macrófagos transfectados com plasmídeo específico, na infecção por *L.(L.) amazonensis*.

3= Material e Métodos

3.1 Cultura de parasitas

Promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram cultivadas em garrafas de cultura estéreis contendo meio Schneider's Insect Medium (LGC Biotecnologia, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil), 100 µg/mL de gentamicina e 2mM de L-glutamina (Gibco, Gaithersburg, MD, EUA), a 23°C em caixas térmicas fechadas. Parasitas foram mantidos virulentos por inoculação periódica de 3×10^5 parasitas na pata traseira de hamsters. Os repiques da cultura foram realizados a cada 2 dias mantendo-se 1mL da cultura com boa viabilidade dos parasitos e adicionando-se 3 mL de novo meio Schneider's. Somente garrafas de cultura contendo promastigotas na fase estacionária foram utilizados nos experimentos de infecção.

3.2-Cultura de macrófagos peritoneais

Macrófagos inflamatórios peritoneais de 3 camundongos Balb/c machos, quatro a oito semanas de idade, foram colhidos com 3mL de meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) da cavidade peritoneal dos camundongos previamente estimulados, por 48 horas, com 1mL de meio tioglicolato de sódio 3% via intraperitoneal (Gibco). Os procedimentos de sacrifício e extração de células seguiram as normas do COBEA. As células foram centrifugadas e ajustadas para 1×10^6 /mL em meio DMEM suplementado com 12,5mM HEPES, 2g/L bicarbonato de sódio, 2mM de L-glutamina, 50µg de gentamicina/mL e 10% de soro fetal bovino inativado por calor, estéril (meio completo). A suspensão de células foi colocada sobre lamínulas de vidro de 13mm de diâmetro dispostas em placas estéreis de 24 poços (Corning Corporation, Cambridge, MA, USA) a uma densidade de 2×10^5 /500µL/poço e incubadas por 2 horas em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37°C para permitir a aderência das células. Após 24 horas, o meio contido nos poços das placas foram retirados e

posteriormente lavados (1 vez) com meio incompleto (sem SFB) para remoção de macrófagos que não aderiram à superfície da lamínula.

3.3-Cultura de macrófagos J774

Macrófagos murinos (células de linhagem J774 G8) foram cultivados, nas mesmas condições acima, a 37°C 5% de CO₂ em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, inativado por calor, estéril (SFB), 10mM Hepes, pH 7.2, 100 U/mL penicilina e 100/μg/ml estreptomicina.

3.4 Infecção dos macrófagos e imunofluorescência

Macrófagos inflamatórios murinos foram utilizados no ensaio para cinética de infecção com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, sendo que macrófagos foram infectados por 15 minutos, 30 minutos, 1, 3, 6, 12 e 24 horas. Em todos os tempos foi feita marcação de LAMP-1 e faloidina. Para os experimentos de tratamento ou não com wortmanina, foram utilizados os tempos de 30 minutos, 1 e 3 horas. Wortmanina foi acrescentada às culturas de macrófagos (1μM) 30 minutos antes da infecção com promastigotas. As culturas foram enxaguadas seis vezes com PBS e formas promastigotas (10 parasitas/célula) viáveis de *L.(L.) amazonensis*, na fase estacionária de crescimento, foram adicionadas em poços de cultura contendo macrófagos aderidos. As placas foram centrifugadas a 1500xg por 5 minutos, após os quais, os parasitas foram incubados com as células em câmara úmida, 37°C, 5% CO₂ por 15 minutos. Neste momento, as promastigotas que não aderiram foram removidas por três lavagens com PBS e as culturas foram novamente incubadas por 30 minutos, 1 ou 3 horas, quando as lamínulas foram fixadas com paraformaldeído a 3,5%. As lamínulas foram transferidas para outra placa e mantidas submersas nos poços das placas contendo solução PGN (tampão fosfato, pH 7,2

0,1M contendo 0,25% de gelatina e 0,1% de azida sódica) a 4°C até o momento da marcação (ideal após 24 hs) ou por no máximo 1 mês.

O processo de marcação foi realizado em gotas (10µL) dispostas sobre filme plástico (Parafilm-M, EUA) envolvendo a tampa da placa onde as lamínulas foram colocadas, com a face contendo as células em contato com a solução. Esta consistiu do marcador fluorescente desejado diluído em PGN contendo saponina a 0,1 % (PGN-saponina) de acordo com a indicação do fabricante ou teste de diluição prévio. Para as marcações, utilizou-se primeiramente o anticorpo monoclonal anti-LAMP-1 murina, produzido em rato, e diluído em solução PGN-saponina (1:10) durante 60 minutos, temperatura ambiente. Posteriormente, as lamínulas foram enxaguadas três vezes em PBS e dispostas por 60 minutos em temperatura ambiente e a placa protegida da luz, com solução de anticorpo secundário anti-rato Alexa-fluor 488 ou 568 diluídos (1:100), Falloidin Alexa-fluor 568 diluído (1:500), e DAPI (4,6'-diamidino-2-phenylindole-dilactate) diluído (1:50) (Invitrogen®) para as marcações de fagolisossomos contendo *Leishmania amazonensis*, F-actina e núcleo do macrófagos, respectivamente. Todos os anticorpos foram obtidos de Molecular Probes (EUA). Ao final da coloração, as lamínulas foram enxaguadas 3 vezes em PBS, secas em papel filtro por um leve toque e invertidas sobre lâmina de vidro contendo solução PBS pH 9, glicerol 0,01% e p-phenylenediamine (ppd) a 0,01% para montagem e conservação da marcação por 24 horas para posterior visualização em microscópio confocal de varredura a laser. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e em cada lamínula foram contadas pelo menos 100 células.

3.5 Transfecção

3.5.1 Transformação de bactérias *E. coli* DH5 α

O plasmídeo de PI(4,5)P2, GFP-PLC- δ -PH, é uma quimera, consistindo do domínio de PLC- δ com homologia com a região de PI(4,5)P2 ligante de plestrina (PH), conjugado ao GFP, que é uma proteína naturalmente fluorescente (HAUGH et al., 2000). Ao vetor plasmídeo (gentilmente doado por Ralph Isberg, PhD, HHFM, EUA) foram adicionadas 200 μ L de bactérias *E. coli* DH5 α quimicamente competentes, mantidas no gelo por 20 minutos, submetidas a choque térmico a 42°C por 90 segundos e novamente mantidas em banho de gelo por 2 minutos. As bactérias foram adicionadas a um tubo cônico contendo 1mL de meio LB (Luria-Bertani) sem antibiótico e incubadas em incubadora “shaker” a 37°C por 1 hora a 200rpm e, posteriormente, plaqueadas em meio sólido contendo antibiótico kanamicina a 0,015 μ g/mL, para seleção das bactérias. As placas foram mantidas estáticas a 37°C por 16-18 horas para crescimento das colônias.

3.5.2 - Purificação dos plasmídeos

Após crescimento das bactérias em meio sólido, colônias individuais foram coletadas e acrescentadas em 50 mL de meio LB contendo kanamicina 0,015 μ g/mL e mantidas em “shaker” a 37°C a 200rpm por 16-18 horas para crescimento das mesmas. Após crescimento, o meio contendo as bactérias foi centrifugado por 15 minutos a 4000xg. O pellet foi ressuspensão em 10 mL de PBS e a suspensão distribuída em 10 microtubos (1mL cada) e centrifugadas a 10.000xg por 1 minuto. Para isolar os plasmídeos das bactérias, o sobrenadante foi desprezado e o pellet foi homogeneizado em 100 μ L da solução tampão GTE

(glicose 0,9%, 50mM Tris-HCl pH 7,5, 10mM de EDTA pH 8, 0,100µg/mL RNase A). Foram adicionados 200µL da solução de lise (NaOH 0,2N e SDS 1%) misturados por inversão (2 vezes) e, após 3 a 5 minutos, adicionados 200µL da solução de neutralização (acetato de potássio 3M e ácido acético glacial 5M) e misturadas por inversão (8 vezes). A suspensão foi mantida em gelo por 20 a 30 minutos e centrifugada por 15 minutos a 10.000xg a temperatura ambiente. Foram coletados 400µL do sobrenadante e transferidos para tubo contendo 300µL de isopropanol, misturados por inversão quatro vezes. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 10.000xg, drenados em papel absorvente e incubados a 42°C por 15 minutos para evaporação do etanol. O material de cada microtubo foi ressuspensão em 20µL de água pura e os conteúdos reunidos para obter um volume final de 200µL e armazenado a 4°C. O DNA dos plasmídeos purificados foi dosado por espectrofotometria no comprimento de onda 260nm e a visualização foi feita em gel de agarose 1%.

3.5.3 Transfecção de macrófagos em cultura

Macrófagos J774 mantidos em cultura por 24 horas (5×10^5 células/500 µL/poço), com confluência inferior a 50%, foram transfectados com solução contendo 10µL de PLC δ PH, 4µL de lipossoma Eugene HD (Roche Applied Science, Alemanha) e 86µL de meio DMEM sem SFB e antibiótico (tubos individuais para um total de 100µL). Esta solução foi mantida em repouso em temperatura ambiente por 15 minutos e adicionada (50µL) em cada poço de cultura. As placas foram mantidas em cultura por 18 horas para posterior infecção com 1×10^7 promastigotas/poço/500µL. A transfecção de macrófagos peritoneais murinos não foi conduzida devido à sensibilidade destas células aos reagentes utilizados.

3.6 Microscopia Confocal

As imagens foram adquiridas através de microscopia confocal de varredura a laser (LSM 510 Meta-Zeiss) equipado com microscópio invertido Axiovert 200M (Zeiss) e analisadas através do software LSM 3.2. Para aquisição das imagens foram utilizadas objetivas Plan-Apochromat 63x com óleo de imersão para fluorescência e Plan-Apochromat 20x. Para excitação dos fluorocromos foi utilizada a lâmpada HBO 100 para visualização dos espécimes em microscopia de fluorescência comum.

Para a aquisição das imagens foram utilizados os lasers Argon/2, (comprimentos de onda de excitação 458, 488, 514nm), Helio Neônio (comprimento de onda de excitação 543nm). Ambos os lasers foram usados com potência de 20,1% e espelho dicróico HFT 488/543 (Helio Neônio) e HFT 488 (Argon/2).

Para excitação dos marcadores Alexa 488 e Phaloidin 568 (Faloidina), os comprimentos de onda de excitação/emissão foram respectivamente 491/515 nm e 550/575 nm. A fluorescência emitida foi selecionada por um conjunto de filtros através dos canais CHS, em “Single Track”. O filtro para o canal CHS1 (Alexa 488) teve como espectro de emissão o intervalo 489-542 nm e o canal CHS2 (faloidina) o intervalo entre 553-606 nm. Foram utilizados o canal ChD, e o laser Argon para obtenção da imagem em contraste de fase para demonstrar a infecção com o parasita *Leishmania amazonensis*.

No processo de escaneamento, as imagens foram escaneadas linha por linha no sentido unidirecional com velocidade de escaneamento variando entre sete e nove micro-segundos (μ s) varrendo em média quatro vezes por linha, para otimização da imagem e mínimo ruído (marcação inespecífica).

Foram realizadas aquisições de imagens de secção verticais por seccionamento apropriado no eixo Z, para visualização do espécime ou marcação em diferentes posições focais (“Z slices”), sendo as primeiras e as últimas imagens consideradas externas e as do centro/meio as internas.

A abertura do “pinhole” permitiu a aquisição de “slices” ópticos de 96µm para o canal CHS1 (Alexa 488) e 106µm para o canal CHS2 (faloidina). Outros parâmetros como detecção de ganho e retirada de ruídos, foram determinados de maneira a se obter imagens de boa qualidade. As imagens foram exibidas com resolução de 1024x1024 pixels.

A partir dos “Z slices”, utilizou-se o modulo “Projection” para projeção de uma única imagem a partir das secções obtidas no eixo Z, permitindo a visualização geral das estruturas estudadas, chamada de projeção P zero (P0). Esta projeção foi utilizada quando imagens de uma mesma marcação foram visualizadas em diferentes planos focais. O módulo 3D foi utilizado para a reconstrução espacial das imagens capturadas através dos “Z slices”.

Após aquisição das imagens em cada canal, pertencentes ao mesmo campo de observação, as mesmas foram sobrepostas através de uma ferramenta “process” do software. A função “Split” permitiu a visualização de cada canal, ou seja, que uma imagem composta de sobreposição de canais, seja visualizada de maneira seqüenciada ao retirar ou recolocar as imagens pertencentes aos demais canais. Esta função também confirma a ausência de interferência entre canais e permite visualização de marcação individual ou co-localização.

3.7 Contagem e cinética

Percentagens de marcação para F-actina e LAMP-1 e taxa de invasão foram obtidas pela contagem em microscopia de fluorescência em duplicata as formas promastigotas aderidas ou

em processo de internalização (0,5 e 1 hora) e amastigotas internalizadas (3 horas) após infecção, totalizando 200 células para cada tempo analisado.

As contagens foram realizadas em microscopia de fluorescência (HBO) em objetiva 63X, sendo a taxa de invasão observada pela marcação de DAPI no núcleo e cinetoplasto da promastigota ou amastigota em todos os campos analisados.

Os experimentos das células tratadas com wortmanina foram analisadas em duplo cego, sendo que o analisador não informado a qual grupo pertencia à lamínula que estava sendo contada (tratado ou não tratado).

3.8-Analise estatística

VassarStats (©Richard Lowry 1998-2006), software online foi utilizado para determinar diferenças estatisticamente diferentes por teste ANOVA-Post-test, nível de significância ($p < 0,05$).

4=Resultados

4.1-Cinética da infecção

A cinética de internalização, recrutamento de actina e fusão lisossomal foram estudados em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c nos tempos 15 e 30 minutos, 1, 3, 6, 12 e 24 horas pós-infecção por *L.(L.) amazonensis*. Em todos os tempos foi feita marcação de LAMP-1 e F-actina, sendo que o pico de fluorescência da F-actina foi com 15 e 30 minutos, enquanto para LAMP-1 o pico foi entre uma e 3 horas pós-infecção e manteve-se relativamente alto até 24 horas (Tabela). Por este motivo, os demais experimentos foram realizados até o tempo de 3 horas pós infecção. A taxa de infecção apresentou aumento percentual em relação ao tempo e valor máximo (100%) atingido após 1 a 3 horas de infecção. Após este período a taxa é inversamente proporcional, ocorrendo diminuição gradativa em 24 horas (35,5%).

Tabela. Percentual médio de macrófagos murinos infectados com *L.(L.) amazonensis* e marcados com LAMP-1 e F-actina. Taxa de infecção refere-se ao percentual de macrófagos infectados em cada tempo analisado.

Tempo de infecção (h)	Lamp-1(%)	F-actina (%)	Taxa de infecção (%)
15'	38,5	6	83,5
30'	69	16,5	85,5
1	88,5	8	96,5
3	98	0	100
6	63,5	1	74,5
12	67	0,5	70,5
24	35	-	35,5

4.2- Internalização e formação do fagolisossomo

Promastigotas de *L.(L.) amazonensis* aderiram aos macrófagos murinos freqüentemente via flagelo nos estágios iniciais da infecção (15 e 30 minutos), mas o contato também ocorreu pelo corpo celular, observado por uma evidente marcação de F-actina no ponto de contato

entre a célula e a promastigota (Figura 1). No momento da internalização, o macrófago lança pseudópodos, visíveis pelo citoesqueleto de F-actina que envolve o parasito (setas) sendo englobado, nesta figura representada pela marcação vermelha fluorescente (faloidina).

Aos 15 minutos pós-infecção a presença de LAMP-1 (marcador de membrana lisossomal, em verde), foi evidente em cerca de 40% de vacúolos parasitóforos, enquanto que aos 30 minutos pós-infecção, o recrutamento de lisossomos para o vacúolo parasitóforo torna-se ainda mais evidente, com 69% de vacúolos marcados com LAMP-1. Os fagolisossomos nestes dois tempos ainda apresentam formato fusiforme, semelhante ao corpo celular da forma promastigota de *Leishmania*. É interessante ressaltar que, ao mesmo tempo em que a marcação de F-actina diminui em torno do parasita, a marcação de LAMP-1 aumenta, sugerindo que uma vez formado o fagolisossomo, o citoesqueleto de F-actina começa a se despolimerizar (Figura 2).

Após uma (Figura 3) e três (Figura 4) horas de infecção praticamente todos os vacúolos parasitóforos mostravam marcação para LAMP-1 (setas descontínuas), significando o recrutamento de lisossomos e a formação de fagolisossomos.

Após 1 hora de invasão, F-actina está presente em alguns endossomos precoces, ainda sem marcação de LAMP-1 e com formato fusiforme (setas). Em alguns flagelos de promastigotas observam-se discretas marcações de F-actina, sendo que o corpo celular se encontra com evidente marcação por LAMP-1, demonstrado pela co-localização destas duas marcações (Figura 3)

Após três horas de infecção, os fagolisossomos apresentam um formato mais arredondado e a marcação de F-actina em torno dos fagolisossomos é ausente (Figura 4).

4.3- Tratamento da célula hospedeira com wortmanina inibiu a invasão por promastigotas de *L.(L.) amazonensis*

A percentagem de promastigotas marcadas por LAMP-1 foi significativamente menor após 30 minutos e 1 hora de infecção no grupo tratado x controle. Neste grupo, a percentagem de fusão com lisossomos foi de 69% e 88,5%, respectivamente. No grupo pré-tratado com wortmanina o percentual foi de 7,5% e 58,5% para os respectivos tempos de infecção. Após 3 horas de infecção, não houve diferença significativa entre os grupos controle (98%) e pré-tratado (96,5%) na percentagem de células marcadas com LAMP-1 (Figura 5).

As células tratadas com wortmanina, houve uma redução significativa de 66% na taxa de infecção, comparados ao grupo controle ($p=0,008$) após 30 minutos de infecção (Figura 7). Esta diferença ainda foi significativa e diminuiu após 1 hora da invasão (27%) ($p=0,02$) e se tornou insignificante após 3 horas da infecção, devido à reversibilidade da droga (Figura 7).

4.4 -PIP2 é recrutado para o nascente vacúolo parasitóforo de promastigotas

Para determinar a localização de PIP2 durante a invasão de macrófagos por promastigotas de *L.(L.) amazonensis*, foi utilizado um domínio homólogo de plectrina (PH) de PLC δ (PLC δ PH-GFP) que possui alta afinidade de ligação por PIP2 da membrana plasmática. Macrófagos murinos da linhagem J774 transfectadas com PLC δ PH-GFP foram infectadas por 15 minutos. Como demonstrado na Figura 6 (tempo de 15 minutos), PIP2 foi encontrado circundando o parasita invaginado visualizado pela evidente marcação de cor verde (GFP) no macrófago transfectado. Esta observação ocorreu após 15 e 30 minutos de infecção sendo que, 1 hora após a invasão, observou-se ausência da marcação ao redor das amastigotas (dado não demonstrado).

A atividade de PI3K está associada à invasão celular, conforme mostrado na Figura 7, demonstrado pela inibição significativa na taxa de invasão por promastigotas de *L. (L.) amazonensis* após 0,5 e 1 hora de invasão.

Um fato a ser considerado é que o recrutamento de F-actina ao redor do parasita não foi significativamente afetado na célula transfectada em relação ao controle, ou seja, o recrutamento de actina e PIP2 são mecanismos que ocorreram ao mesmo tempo e podem ser observados co-localizados em uma mesma célula (Figuras 8 e 9).

5- Discussão

A doença leishmaniose tegumentar está amplamente distribuída em todo território brasileiro, e devido ao seu caráter zoonótico e importância na saúde pública, bem como o risco de morte ou por causar lesões graves disseminadas no homem e animais, as espécies envolvidas nesta doença são investigadas principalmente nos países onde residem o parasita e o mosquito transmissor. No Brasil, a espécie *Leishmania (L.) amazonensis* apresenta ampla distribuição geográfica, de acordo com as condições ambientais e transmissibilidade (Ministério da Saúde/FIOCRUZ). No entanto, a escassez de estudos sobre esta espécie tem sido motivo de empenho para os pesquisadores na busca de maiores informações sobre o comportamento e mecanismos envolvidos na doença tegumentar ocasionada pela *L. (L.) amazonensis*.

A internalização de parasitas e a formação do vacúolo parasitóforo são etapas fundamentais para o sucesso da infecção por parasitas intracelulares, que tendem a desenvolver uma série de mecanismos de escape ao sistema imunológico, dependendo de como o parasita é internalizado pela célula hospedeira.

Neste estudo, procuramos determinar a cinética da internalização e da biogênese do fagolisossomo de *L.(L.) amazonensis*, uma das espécies causadoras da leishmaniose cutânea. Nossos resultados demonstraram que a internalização dos parasitas ocorre rapidamente, sendo que após 15 minutos de infecção observamos várias células com parasitas intracelulares (83,5%). Verificamos ainda que o vacúolo parasitóforo nascente recrutava F-actina, cuja marcação decrescia à medida que havia maturação do fagossomo, de maneira similar ao descrito por COURRET et al. (2002) em experimentos com *L.(L.) amazonensis*. Entretanto, diferentemente desses autores, em nosso estudo a fusão de fagossomos com lisossomos ocorreu mais tardiamente. Enquanto no estudo de COURRET e colaboradores (2002), o pico de recrutamento de LAMP-1 ocorreu após 30 minutos de infecção, no presente trabalho,

observamos o pico de recrutamento entre uma e três horas após a infecção dos macrófagos, que poderia ser explicado pela diferença de origem dos macrófagos: enquanto COURRET e colaboradores (2002) utilizaram macrófagos derivados da medula óssea pré-estimulados com IFN- γ , utilizamos em nosso estudo macrófagos peritoneais pré-estimulados com tioglicolato.

Neste estudo, a percentagem de vacúolos parasitóforos que recrutou F-actina foi maior após 15 e 30 minutos de infecção, enquanto LAMP-1 foi recrutada mais significativamente após 1 a 3 horas de infecção, o que sugere que vacúolos nascentes recrutam F-actina, provavelmente como parte do processo de invaginação das membranas durante a fagocitose, formando um endossomo/fagossomo precoce. À medida que este endossomo segue a via de maturação, vai se fundir com o lisossomo para formar o fagolisossomo e, neste momento, o citoesqueleto de actina filamentar se despolimeriza, já que as vesículas estão completamente formadas. Assim, no presente trabalho, à medida que ocorre a maturação do fagolisossomo, desaparece a marcação de F-actina e ocorre o recrutamento de LAMP-1, que é um marcador de membrana lisossomal. Enquanto após 15 e 30 minutos de infecção observávamos que os vacúolos parasitóforos apresentavam marcação para F-actina, entre 1 hora e três horas de infecção observávamos a maioria dos vacúolos parasitóforos marcados somente para LAMP-1, sugerindo que neste momento a maioria dos parasitas já estava em fagolisossomos maduros, onde se sabe que sobrevivem e se multiplicam por longo tempo, causando a patologia cutânea típica da leishmaniose (AGA et al, 2002; van ZANDBERGEN, 2004).

Em nosso estudo, a taxa de infecção dos macrófagos apresentou aumento percentual em relação ao tempo e a taxa máxima de infecção (100%) foi atingida após 1 a 3 horas de infecção, correspondendo ao pico de marcação de LAMP-1, indicando que os fagolisossomos já estão maduros (ADEREM, UNDERHILL, 1999; VIEIRA et al., 2002). Tal fato também

pode ser evidenciado pelo formato arredondado dos fagolisossomos após 3 horas de infecção, indicando que as formas promastigotas já se transformaram em amastigotas prontas para a replicação no interior dos fagolisossomos. Considerando outros estudos que mostram que o papel biológico na restrição transitória da fusão de fagossomos contendo *L. major* ou *L. donovani* não é óbvio (TURCO et al., 2001), nossas observações sugerem que a maturação do fagossomo não ocorre necessariamente da mesma forma em todas as espécies de *Leishmania* mas sim, que cada espécie de *Leishmania* desenvolve ou estabelece estratégias de sobrevivência específicas em macrófagos, conforme já descrito por outros autores.

No intuito de elucidar alguns dos mecanismos celulares envolvidos na biogênese dos fagolisossomos, buscamos determinar se havia ativação de PI3K durante invasão celular por promastigotas de *L.(L.) amazonensis*. Para tal, realizamos ensaio de invasão em macrófagos inflamatórios murinos pré-tratados ou não com wortmanina, um potente inibidor de PI3K (ARCARO, WYMAN, 1993; OKADA et al., 1994; POWIS et al., 1994; WYMAN et al., 1996). Nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento com wortmanina bloqueou a fusão lisossomal com o vacúolo parasitóforo durante os primeiros 30 minutos e parcialmente após 1 hora de infecção, evidenciado pela diminuição da marcação de LAMP-1. Após 3 horas de invasão, a fusão lisossomal foi completamente restabelecida, provavelmente devido à recuperação da atividade de PI3K, uma vez que a wortmanina não é um inibidor permanente. A percentagem de fagossomos recrutando F-actina não foi alterada com o tratamento pela wortmanina, comprovando a especificidade de ação do inibidor em uma via específica, que não é dependente da mesma via de sinalização de organização do citoesqueleto. Assim, nossos dados fortalecem a importância da ativação de PI3K durante invasão celular por promastigotas de *L.(L.) amazonensis*, uma vez que o processo de maturação requer uma evidente e precoce etapa sensível à wortmanina.

Sabe-se que a via de sinalização por PI3K é ativada por uma ampla variedade de estímulos extracelulares para gerar produtos lipídicos específicos que propagam sinais intracelulares através de proteínas mediadoras subsequentes, gerando fluxos secundários de sinalização (RAMEH, CANTLEY, 1999; MEDINA-TATO et al., 2007). A modulação, por patógenos, da sinalização dependente da via PI3K na célula hospedeira é uma importante estratégia para estabelecimento da infecção e sobrevivência intracelular destes organismos. A ativação da PI3K promove a internalização de *Yersinia* (SCHULTE et al., 1998) e *Listeria* (IRETON et al., 1996) enquanto que espécies de *Escherichia coli* enteropatogênicas impedem sua própria fagocitose bloqueando a sinalização de PI3K em macrófagos (CELLI et al., 2001). Além disto, foram recentemente identificados novos mecanismos dependentes da PI3K na invasão celular por *T. cruzi* e maturação do vacúolo (WOOLSEY et al., 2003). Estudos de LINK e colaboradores (2006) verificaram que a atividade de PI3K é requerida na degradação de *T. gondii* após invasão de macrófagos ativados. Em adição, SILVA et al. (2009) verificaram que PI3K desempenha um importante papel durante invasão de taquizoítas de *T. gondii* em células fagocíticas. Neste último estudo, PIP2 foi observado ao redor do *T. gondii* no momento da invasão, demonstrado pela indução indireta da ativação de PIP5-quinase por ARF6 (GTPase). No presente estudo, demonstramos que a atividade PI3K é requerida na invasão de macrófagos murinos por promastigotas de *L.(L.) amazonensis*. De acordo com a literatura disponível, a ativação de PI3K durante a invasão de células por *L.(L.) amazonensis*, é importante não somente para conferir resistência contra apoptose (RUHLAND, KIMA, 2007), mas também possui um efeito dominante negativo na produção de IL-12 por macrófagos. Assim, o microambiente adequado para a infecção por *Leishmania* é promovido.

A fosforilação de PIP2 por PI3K gera PIP3, um importante mediador celular (MEDINA-TATO, 2007; KONG, YAMORI, 2008). Síntese e reorganização de PIP2 tem sido

implicados em uma variedade de sinais celulares, atuando com principal via de sinalização de diversos componentes celulares como tráfego de membrana, particularmente endocitose e exocitose (MARTIN, 1997; SUH, HILLE, 2008), controle da polimerização de actina (JANMEY, 1994) e ativação de canais e transporte de íons (SUH, HILLE, 2008). A transdução do sinal pela ativação de PIP2 serve como substrato para enzima fosfolipase C (PLC), atuando na liberação de Ca^{2+} e ativação da proteína quinase C (PKC).

No presente estudo, o recrutamento de actina e PIP2 ocorreu simultaneamente, demonstrado pelos experimentos de co-localização de F-actina e PIP2 em macrófagos murinos da linhagem J774 transfectados com PLC δ PH-GFP. Diante disto, demonstramos que a via da PI3K foi utilizada para ativação de PIP2 durante a infecção de macrófagos murinos por promastigotas de *L.(L.) amazonensis*.

Dessa maneira, neste estudo demonstramos uma clara dependência da atividade PI3K para fusão lisossomal com o vacúolo parasitóforo para formar compartimentos permanentes ácidos ricos em marcadores lisossomais no quais amastigotas sobrevivem no interior da célula hospedeira de mamíferos. O surgimento de novas drogas inibidoras específicas das isoformas de PI3K, com efeitos colaterais mínimos, poderão alcançar o controle da ativação patológica (KONG,YAMORI, 2007; MEDINA-TATO et al., 2007) e alterar o curso da leishmaniose cutânea.

6= Conclusões

1. Durante o processo de maturação de fagolisossomo de *L.(L.) amazonensis*, há primeiramente um recrutamento de F-actina para formação do fagossomo/endossomo precoce, e mais tardiamente fusão com lisossomos, evidenciado pelo recrutamento de LAMP-1 e despolimerização da F-actina.
2. Os processos de invasão e fusão lisossomal de *L.(L.) amazonensis* demonstraram clara dependência da atividade de PI3K, evidenciado pela diminuição desses processos pelo inibidor de PI3K, a wortmanina.
3. Ocorrem ativação e recrutamento de PIP2 durante a infecção de macrófagos murinos por promastigotas de *L.(L.) amazonensis*.

7- Referências Bibliográficas

ADEREM, A.; UNDERHILL, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* v.17, p.593– 623, 1999.

AGA, E.D.M.; KATSCHINSKI, G.; van ZANDBERGEN, H.; LAUFS, B.; HANSEN, K.; MÜLLER, W.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J. Immunol.* v.169, p.898-903, 2002.

ARCARO, A.; WYMAN, M.P. Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem J*, v. 296, p. 297-301, 1993.

AWASTHI, A.; MATHUR, R.K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. *J. Indian Med. Res.* v.119, p.238-258, 2004.

BARBER, D.F.; BARTOLOME, A.; HERNANDEZ, C. *et al.* PI3K γ inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus. *Nat Med*; v.11, p.933- 935, 2005.

BESTEIRO, S.; WILLIAMS, R.A.M.; COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J. C. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int. J. Parasitol.* v.37, p.1063-1075, 2007.

BRIAN P.W.C.P., HEMMING, H.G.; NORRIS, G.L.F. Wortmannin, an antibiotic produced by *Penicillium wortmanni*. *Trans Br Mycol Soc*; v.40; p 365-368, 1957.

CAMPS, M.; RUCKLE, T.; Ji, H. *et al.* Blockade of PI3K suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* v. 11, p. 936- 943, 2005.

carcinoma growth inhibition by a phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor (LY294002). *Clin Cancer Res*; v. 6, p.880-886, 2000.

CASTELLANO, F.; CHAVRIER, P.; CARON, E. Actin dynamics during phagocytosis. *Semin. Immunol.* v.13, p.347– 355, 2001.

CELLI, J.; OLIVIER, M.; FINLAY, B.B. Enteropathogenic *Escherichia coli* mediates antiphagocytosis through the inhibition of PI 3-kinase-dependent pathways. *EMBO J.* v.20, p.1245–1258, 2001.

COLOMER-GOULD, V.; GALVAO-QUINTAO, L.; KEITHLY, J.; NOGUEIRA, N. A common major surface antigen on amastigotes. *J. Exp. Med.* V.162, p.902-916, 1985.

COURRET, N.; FRÉHEL, C.; GOUHIER, N.; POUCHELET, M.; PRINA, E.; ROUX, P.; ANTONIE, J-C. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *J. Cell. Science* v.115, p.2303-2316, 2002.

DA SILVA R.; SACKS, D.L. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infect Immun.* v.55, p.2802-2806, 1987.

DESJARDINS, M.; DESCOTEAUX, A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* V.185, p.2061– 2068, 1997.

DESJARDINS, M.; DESCOTEAUX, A. (1997). Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* 185, 2061– 2068.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* v.95, p.239-243, 2001.

DOMIN J., GAIDAROV, I.; SMITH, M.E.K.; KEEN, J.H.; WATERFIELD, M.D. The class II phosphoinositide 3-kinase PI3K-C2alpha is concentrated in the trans-Golgi network and present in clathrin-coated vesicles. *J. Biol. Chem.*, v.275, p.11943-11950, 2000.

DOMIN, J., PAGES, F.; VOLINIA, S., et al. Cloning of a human phosphoinositide 3-kinase with a C2 domain that displays reduced sensitivity to the inhibitor wortmannin. *Biochem. J.* v.326, p.139-147, 1997.

ELHAY, M.; KELLEHER, M.; BACIC, A.; MCCONVILLE, M.J.; TOLSON, D.L.; PEARSON, T.W.; HANDMAN, E. Lipophosphoglycan expression and virulence in ricin-resistant variants of *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* v.40, p.255– 267, 1990.

ELHAY, M.; KELLEHER, M.; BACIC, A.; MCCONVILLE, M.J.; TOLSON, D.L.; PEARSON, T.W.; HANDMAN, E. (1990). Lipophosphoglycan expression and virulence in ricin-resistant variants of *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 40, 255– 267.

GIUDICE, A.; CAMADA, I.; LEOPOLDO, P.T.G.; PEREIRA, J.M.B.; RILEY, L.W.; WILSON, M.E.,HO; J.L., JESUS; A.R., CARVALHO, E.M.; ALMEIDA, R.P. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentar Leishmaniasis. *BMC Infect Disease* 7: 7, 2007.

GONTIJO, B.; CARVALHO,M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. *Ver. Soc. Br. Med Trop.* v.36, p.71-80, 2003.

GREENBERG, S. Modular components of phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.* v. 66, p.712– 717, 1999.

HAUGH, J.M.; CODAZZI, F.; TERUEL, M.; MEYER, T. Spatial sensing in fibroblasts mediated by 3' phosphoinositides. *J. Cell. Biol.* v.151, p.1269-1280, 2000.

HENNESSY, B.T.; SMITH, D.L.; RAM, P.T.; LU, Y.; MILLS, G.B. Exploiting the PI3-k/Akt pathway for cancer drug discovery. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, v.4, p.988-1004, 2005.

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. *Lancet* v.354, p.1191-1199, 1999.

HILGEMANN, D.W.; Local PIP2 signal: when, where, and how? *Pflugers Arch.*, v. 455, p.55-67, 2007.

HIRSCH, E.; KATANAEV, V.L.; GARLANDA, C. *et al.* Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase γ in inflammation. *Science*; v.287, p. 1049- 1053, 2000.

HU, L.; ZALOUDEK, C.; MILLS, G.B.; GRAY, J.; JAFFE, R.B. *In vivo* and *in vitro* ovarian carcinoma growth inhibition by a phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor (LY294002). *Clin. Cancer Res.* v.6, p.800-806, 2000.

IHLE, N.T., PAINE-MURRIETA, G., BERGGREN, M.I. *et al.* The phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor px-866 overcomes resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib in A-549 human non-small cell lung cancer xenografts. *Mol Cancer Ther*; v. 4, p.1349-1357, 2005.

IHLE, N.T.; WILLIAMS, R.; CHOW, S. *et al.* Molecular pharmacology and antitumor activity of PX-866, a novel inhibitor of phosphoinositide-3-kinase signaling. *Mol Cancer Ther*; v.3, p. 763-772, 2004.

IRETON, K.; PAYRASTRE, B.; CHAP, H.; OGAWA, W.; SAKAUE, H.; KASUGA, M.; COSSART, P. A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. *Science* v.274, p.780–782, 1996.

JACKSON, S.P.; SCHOENWAEELDER, S.M.; GONCALVES, I. *et al.* PI 3-kinase p110 β : a new target for antithrombotic therapy. *Nat Med*; v.11, p. 507- 514, 2005.

JANMEY, P.A. Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly. *Annu. Rev. Physiol.* v.56, p.169–191, 1994.

KNIGHT, Z.A.; GONZALEZ, B.; FELDMANN, M.E. *et al.* A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110 α in insulin signaling. *Cell*, v.125, p.733-747, 2006.

KONG, D.; YAMORI, T. ZSTK474 is an ATP-competitive inhibitor of class I phosphatidylinositol 3 kinase isoforms. *Cancer Sci.* v. 98, p. 1638-1642, 2007.

KONG, D.; YAMORI, T. Advances in development of phsphatidylinositol 3-kinase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* v.16, p.2839-2854, 2009.

KONG, D.; OKAMURA, M.; YOSHIMI, H.; YAMORI, T. Antiangiogenic effect of ZSTK474, a novel phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor. *Eur. J. Cancer.* v.45, p.857-865, 2009.

KUO, CC.; LIN, W.T; LIANG, C.M. Class I and II phosphotidylinosotol 3'-kinase play distinct roles in TLR signaling pathway. *J. Immunol.* v.176, p.5943-5949, 2006.

LEVINE, D.A.; BOGOMOLNLY, F.; YEE, C.J. et al. Frequent mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancers. *Clin. Cancer Res.*, v.11, p.2875-2878, 2005.

LI, Z.; JIANG, H.; XIE, W.; ZHANG, Z.; SMRCKA, A.V.; Wu, D. Roles of PLC- β 2 and - β 3 and PI3K γ in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science*; v.287, p. 1046- 1049, 2000.

LING, Y.M.; SHAW, M.H.; AYALA, C.; COPPENS, I.; TAYLOR, G.A.; FERGUSON, D.J.; YAP, G.S. Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages. *J. Exp. Med.* V.203, p.2063–2071, 2006.

LIU, T.J.; KOUL, D.; LaFOURTUNE, TIAO, N.; SHEN, R.J.; MAIRA, S.M.; GARCIA-ECHEVERRIA, C.; YUNG, W.K. NVP-BEZ235, a novel dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor, elicits multifaceted antitumor activities in human gliomas. *Mol. Cancer Ther.* v. 8, p. 2204-2210, 2009.

MAIA, C.; ROLÃO, N.; NUNES, M.; GONÇALVES, L.; CAMPINO, L. Infectivity of Five different types of macrophages by *Leishmania infantum*. *Acta Tropica* v.103, p.150-155, 2007.

MAY, R.C.; MACHESKY, L.M. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* v.114, p.1061-1077, 2001.

McLAUGHLIN, S.; WANG, J.; GAMBHIR, A.; MURRAY, D. PIP2 and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, v. 31, p.151-175, 2002.

MEDINA-TATO, D.A.; WARD, S.G.; WATSON, M.L. Phosphoinositide 3-kinase in lung disease: leucocytes and beyond. *Immunology*, v.121, p.448-461, 2007.

MINISTERIO DA SAÚDE/FIOCRUZ Disponível em
<http://www4.ensp.fiocruz.br/Leishmaniose>. Acesso em: 06/11/2009

NADERER, T.; MCCONVILLE, M.J. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cell. Microbiol.* v.10, p.301-308, 2008.

NAKANISHI, S; KAKITA, S.; TAKAHASHI, I. *et al.* Wortmannin, a microbial product inhibitor of myosin light chain kinase. *J Biol Chem*; v. 267, p. 2157-2163, 1992.

OKADA, T.; SAKUMA, L.; FUKUI, Y.; HAZEKI, O.; UI, M. Blockage of chemotactic peptide-induced stimulation of neutrophils by wortmannin as a result of selective inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*; v.269 p.3563-3567, 1994.

PARRY, R.V.; RILEY, J.L.; WARD, S.G. Signaling to suit function: tailoring phosphoinositide 3-kinase during T-cell activation. *Trends Immunol.*, v.28, p.161-168, 2007.

PETCHER, T.J.W.H; KIS, Z. Crystal structure and absolute configuration of wortmannin and of wortmannin *p*-bromobenzoate. *J Chem Soc Chem Commun.* p.1061-1062, 1972.

POWIS, G.; BONJOUKLIAN, R; BERGGREN, M.M. *et al.* Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res.* v. 54, p.2419-2423, 1994.

RAMEH, L.E.; CANTLEY, L.C. The roles of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J. Biol. Chem.*, v.274, p.8347-8350, 1999.

RUHLAND, A., KIMA, P. E. Activation of PI3K/Akt signaling has a dominant negative effect on IL-12 production by macrophages infected with *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Exp. Parasitol.* v.122, p.28 – 36, 2009.

RUHLAND, A.; LEAL, N.; KIMA, P.E. *Leishmania* promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis. *Cell. Microbiol.* v.9, p.84–96, 2007.

SADHU, C.; MASINOVSKY, B.; DICK, K.; SOWELL, C.G.; STAUNTON, D.E. Essential role of phosphoinositide 3-kinase δ in neutrophil directional movement. *J Immunol.* v.170, p. 2647- 2654, 2003.

SAMUELS, Y.; WANG, Z.; BARDELLI, A. et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*, v.304, p.554, 2004.

SASAKI, T; IRIE-SASAKI, J.; JONES, R.G. *et al.* Function of PI3K γ in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science*; v.287, p.:1040-1046, 2000.

SCHULTE, R.; ZUMBIHL, R.; KAMPIK, D.; FAUCONNIER, A.; AUTENRIETH, I.B. Wortmannin blocks *Yersinia* invasin-triggered internalization, but not interleukin-8 production by epithelial cells. *Med. Microbiol. Immunol.* v.187, p.53–60. 1998.

SCIANIMANICO, S.; DESROSIERS, M.; DERMINE, J.-F.; ME'RESSE, S.; DESCOTEAUX, A.; DESJARDINS, M. . Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes. *Cell. Microbiol.* v.1, p.19– 32, 1999.

SHINOHARA, M.; TERADA, Y.; IWAMATSU, A. et al. SWAP-70 is a guanine-nucleotide-exchange factor that mediates signaling of membrane ruffling. *Nature*, v.416, p.759-763, 2002.

SILVA, C. V.; SILVA, E.; CRUZ, M.; CHAVRIER, P.; MORTARA, R. . ARF6, PI3-kinase and host cell actin cytoskeleton in *Toxoplasma gondii* cell invasion. *BBRC* v.378, p.656-661,2009.

SINGH, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.* v.123, p.311-330, 2006.

SOLBACH, W.; LASKAY, T. The host response to Leishmania infection. *Adv. Immunol.* 74, 275-317. 2000

STURGILL-KOSZYCKI, S.; SCHLESINGER, P.H.; CHAKRABORTY, P.; HADDIX, P.L; COLLINS, H.L.; FOK, A.K.; ALLEN, R.D.; GLUCK, S.L.; HEUSER, J.; RUSSELL, D.G. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* v.263, p.678–681, 1994.

SUH, B-C.; HILLE, B. PIP2 is a necessary cofactor for ion channel function: How and why? *Annu. Rev. Biophys.*, v.37, p.175-195, 2008.

SUNDERKOTTER, C.; KUNZ, M.; STEINBRINK, K.; MEINARDUS-HAGER, G.; GOEBELER, M.; BILDAN, H., SORG, C. Resistance of mice to experimental leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophage in vitro and in vivo. *J. Immunol.* v. 151, p.4891-4901, 1993.

SWANSON, M.S.; FERNANDEZ-MOREIRA, E.; FERNANDEZ-MOREIA, E. A microbial strategy to multiply in macrophages: the pregnant pause. *Traffic* v.3, p.170– 177, 2002.

TURCO, S.J.; SPÄTH, G.F.; BEVERLEY, S.M. Is a lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. *Trends Parasitol.* 17, 223-226, 2001.

VAN ZANDBERGEN G.; KLINGER, M.; MÜLLER, A.; DANNENBERG, S.; GEBERT, A.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Cutting Edge: Neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J. Immunol.* v.173, p.6521-6525, 2004.

VANHAESEBROECK, B.; ALI, K.; BILANCIO, A.; GEERING, B.; FOUKAS, L.C. Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice. *Trends Biochem. Sci.*, n.30, p.194-204, 2005.

VANHAESEBROECK, B.; LEEVERS, S.J.; AHMADI, K., et al. Synthesis and function 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu. Rev. Biochem.*, v.70, p.535-602, 2001.

VIEIRA, O.V.; BOTELHO, R.J.; GRINSTEIN, S. Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem. J.* v.366, p.689– 704, 2002.

VLAHOS, C.J.; MATTER, W.F.; HUI, K.Y.; BROWN, R.F. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem*; v.269, p. 5241-5248, 1994.

WELCH, H.C.;C.O.,ADWEL, W.J.; ELLSON, C.D et al. P-Rex1, a PtdIns (3,4,5)P3- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell.*, v.108, p.809-821, 2002.

WHYTE, D.B.; HOLBECK, S.L. Correlation of PIK3CA mutations with gene expression and drug sensitivity in NCI-60 cell lines. *Biochem. Biophys Res. Commun.* v.340, p.469-475, 2006.

WIESINGER, D.; GUBLER, H.U.; HAEFLIGER, W.; HAUSER, D. Antiinflammatory activity of the new mould metabolite 11-desacetoxy-wortmannin and of some of its derivatives. *Experientia*, v.30, p.135-136, 1974.

WIKIMEDIA FOUNDATION. Wikipédia, a enciclopédia livre. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Actina>. Acesso em 20/12/2009.

WOOLSEY, A.M.; SUNWOO, L.; PETERSEN, C.A.; BRACHMANN, S.M.; CANTLEY, L.C.; BURLEIGH, B.A. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *J. Cell Sci.* v.116, p.3611–3622, 2003.

WYMAN, M.P.; BULGARELLI-LEVA, G.; ZVELEBIL, M.J. *et al.* Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol Cell Biol.* v. 16, p 1722-1733, 1996.

XU, C.; WATRAS, J.; LOEW, L.M. Kinetic analysis of receptor-activated phosphoinositide turnover. *J. Cell. Biol.*, v.161, p.779-791, 2003.