



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO
PARASITO-HOSPEDEIRO

CARLOS HENRIQUE DA SILVA MOTA

ANÁLISE FUNCIONAL DA 7-DESIDROCOLESTEROL
REDUTASE NA RESPOSTA IMUNE DURANTE A INFECÇÃO
POR *Leishmania* spp.

Goiânia

2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Carlos Henrique da Silva Mota

3. Título do trabalho

Análise funcional da 7-desidrocolesterol redutase na resposta imune durante a infecção por *Leishmania* spp.

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Saar Gomes, Professor do Magistério Superior**, em 14/03/2025, às 13:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Henrique Da Silva Mota, Discente**, em 14/03/2025, às 14:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5234611** e o código CRC **538A64C9**.

Referência: Processo nº 23070.006658/2025-63

SEI nº 5234611

CARLOS HENRIQUE DA SILVA MOTA

**ANÁLISE FUNCIONAL DA 7-DESIDROCOLESTEROL REDUTASE NA
RESPOSTA IMUNE DURANTE A INFECÇÃO POR *Leishmania* spp.**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre.

Área de Concentração: Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro

Linha de Pesquisa: Estudo dos mecanismos imunológicos e processos patológicos gerais na relação parasito-hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Saar Gomes

**Goiânia
2025**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Mota, Carlos Henrique da Silva

Análise funcional da 7-desidrocolesterol redutase na resposta imune durante a infecção por *Leishmania* spp. [manuscrito] / Carlos Henrique da Silva Mota. - 2025.

13, 52 f.: il.

Orientador: Prof. Rodrigo Saar Gomes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2025.
Bibliografia.

1. *Leishmania* spp.. 2. 7-desidrocolesterol redutase. 3. macrófagos.
4. resposta imune. I. Gomes, Rodrigo Saar, orient. II. Título.

CDU 612.017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE CARLOS HENRIQUE DA SILVA MOTA - Aos vinte e quatro dias do mês de fevereiro do ano de 2025 (24/02/2025), às 14h00min, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. **RODRIGO SAAR GOMES** (UFG), **SIMONE GONÇALVES DA FONSECA** (UFG) e **MURILO BARROS SILVEIRA** (UniCambury) para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada por WEBCONFERÊNCIA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: “**Análise funcional da 7-desidrocolesterol redutase na resposta imune durante a infecção por *Leishmania spp.***”, em nível de MESTRADO, área de concentração em **BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, de autoria de **CARLOS HENRIQUE DA SILVA MOTA**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo Orientador, Prof. Dr. **RODRIGO SAAR GOMES**, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou o Candidato sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1492/2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o candidato **Aprovado** ou **Reprovado**:

Banca Examinadora	Aprovado / Reprovado
Prof. Dr. Rodrigo Saar Gomes	Aprovado
Profa. Dra. Simone Gonçalves da Fonseca	Aprovado
Prof. Dr. Murilo Barros Silveira	Aprovado

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato **Habilitado**, cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, na área de concentração em **BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16h30min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, **HELOÍSA DE SOUSA VIEIRA**, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Saar Gomes, Professor do Magistério Superior**, em 14/03/2025, às 10:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Murilo Barros Silveira, Usuário Externo**, em 14/03/2025, às 14:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Simone Goncalves Da Fonseca, Professora do Magistério Superior**, em 14/03/2025, às 18:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5233934** e o código CRC **D94C52ED**.

Referência: Processo nº 23070.006658/2025-63

SEI nº 5233934

**Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da
Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Carlos Henrique Da Silva Mota

Orientador (a): Dr Rodrigo Saar Gomes

Membros:

1. Prof. Dr. Rodrigo Saar Gomes

2. Profa. Dra. Simone Gonçalves da Fonseca

3. Dr. Murilo Barros Silveira

Data: 28/02/2025

ESTE TRABALHO É DEDICADO A DEUS E A MINHA AVÓ EM ESPECIAL VEREDIANA ALVES DA SILVA, E TIA VALDA ALVES DA SILVA QUE ZELOU DA MINHA VIDA ATÉ MINHA MAIORIDADE E ME FORNECEU TODO O APOIO EDUCACIONAL DURANTE ESSES ANOS E SEMPRE ACREDITOU DE QUE EU SERIA CAPAZ.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus; em seguida ao meu orientador Dr. Rodrigo Saar Gomes, por todo o apoio prestado durante a pesquisa; ao nosso responsável técnico de laboratório; Dr. Murilo Barros Silveira, sempre presente para nos auxiliar; a professora Dra. Fátima Ribeiro Dias, que colaborou com toda a estrutura do Laboratório de Imunidade Natural (LIN); a todos os meus colegas de laboratório, em especial a Ana Luísa, por sermos um grupo unido e pronto pra dar suporte ao próximo; ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro; ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) e aos laboratório multiusuário; a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), contribuindo com uma bolsa que foi suporte durante o período de pesquisa; em especial também a toda minha família e amigos próximos que estiveram comigo durante todo esse árduo processo acadêmico; a minha oftalmologista Dra. Ericka Campos Freitas, por me apoiar mesmo com a minha acuidade visual, sempre mostrando que não existe limitação pra quem tem determinação.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Aspectos gerais das leishmanioses.....	14
1.2 Resposta Imune nas Leishmanioses.....	17
1.3 Metabolismo de Colesterol e a Resposta Imune.....	20
2 JUSTIFICATIVA.....	23
3 OBJETIVOS.....	24
4 MÉTODOS.....	25
4.1 Aspectos éticos.....	25
4.2 Análise de dados de transcriptoma <i>in silico</i>	25
4.3 Infecções <i>in vitro</i>	25
4.4 MTT (teste de viabilidade celular)	26
4.5 Avaliação da Resposta Imune.....	26
4.6 Análises Estatísticas.....	26
5 RESULTADOS.....	27
5.1 Análise de transcriptoma de pacientes com LCL.....	27
5.2 Avaliação do papel dos inibidores da DHCR7 no controle de <i>Leishmania</i> spp. em macrófagos humanos.....	29
5.3 Avaliação do papel dos inibidores da DHCR7 na resposta imune de macrófagos humanos infectados com <i>Leishmania</i> spp.....	31
6 DISCUSSÃO.....	33
7 CONCLUSÕES.....	37
8 REFERÊNCIAS.....	38

FIGURAS

Figura 1. Número de casos de Leishmaniose cutânea no Brasil entre 2015-2020.	15
Figura 2. Ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	16
Figura 3. Perfil da linhagem celular de macrófagos durante a resposta imune.....	20
Figura 4. Expressão do transcrito de DHCR7 a partir de biópsia de pacientes com leishmaniose cutânea e sangue periférico.....	27
Figura 5. Correlação da expressão de DHCR7 com moléculas envolvidas no processo inflamatório.....	28
Figura 6. Viabilidade celular de macrófagos humanos tratados com inibidores farmacológicos de DHCR7.	29
Figura 7. Os inibidores de DHCR7 induzem o controle de <i>Leishmania</i> spp em macrófagos humanos.....	30
Figura 8. Inibidores de DHCR7 induzem a produção de ROS em macrófagos humanos infectados com <i>Leishmania</i> spp	31
Figura 9. Inibidores de DHCR7 induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos humanos infectados com <i>Leishmania</i> spp.	32

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

7-DHC: 7-desidrocolesterol
DHCR7: 7-desidrocolesterol redutase
FDA : Agência Nacional Americana
GFP: *Green fluorescent protein*
IFN- γ : Interferon gama
IL- 32: Interleucina-32
IL-1: Interleucina-1
IL-10: Interleucina-10
IL-12: Interleucina-12
IL15: Interleucina-15
IL-1 β : Interleucina-1-Beta
IL-23: Interleucina-23
IL-6: Interleucina-6
IL-8: Interleucina-8
IRF3: Fator regulador de interferon 3
IRFs: Fatores reguladores de interferon
LCL: Leishmaniose cutânea localizada
LT: Leishmaniose tegumentar
LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana
LV: Leishmaniose visceral
M1: Macrófago classicamente ativado
M2: Macrófago alternativamente ativado
MAPKs: Proteína- quinases ativadas por mitógenos
MFI: Média de intensidade de fluorescência do GFP
MHC: Complexo principal de histocompatibilidade
MTT: Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NF-K β : Fator nuclear kappa B
NO: Óxido nítrico
NLRs: NOD-like receptors
OMS: Organização mundial da saúde
PAMPs: Moléculas associadas ao patógeno
PGE2: Prostaglandina E2

PMA: Phorbol-12- miristato-13-acetato
PRRs: Receptores de reconhecimento de padrões
ROS: Espécies reativas de oxigênio
RPMI: Roswell Park Memorial Institute
SFB: Soro fetal bovino
SLOS: Síndrome de Smith-Lemli-Opitz
Th1: T-helper-1
Th17: T-helper-17
Th2: T-helper-2
THP-1: Monócitos humanos
TNF: Fator de necrose tumoral
TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa
TLRs *Toll-like receptor*

RESUMO

As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania* spp. e são doenças parasitárias negligenciadas com amplo espectro clínico, cujos tratamentos são tóxicos e apresentam falhas e resistência. *Leishmania braziliensis* (*Lb*) e *Leishmania amazonensis* (*La*) são espécies altamente prevalentes no Brasil. O metabolismo do colesterol afeta as respostas imunes. A 7-desidrocolesterol redutase (DHCR7) converte 7-desidrocolesterol (7-DHC) em colesterol e esta enzima regula a polarização dos macrófagos em direção ao perfil M2. O objetivo principal é avaliar o papel da DHCR7 na resposta imune e no controle de infecções por *Leishmania* spp. Macrófagos humanos derivados de células THP-1 foram infectados com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* expressando proteína verde fluorescente (GFP) por 24 horas e tratados com inibidores farmacológicos de DHCR7 (tamoxifeno e AY9944) por adicionais 24 horas para análise por citometria de fluxo. Análise de transcriptoma público demonstrou que DHCR7 é menos expressa em lesões de pacientes com leishmaniose tegumentar comparado com pele de controles saudáveis. DHCR7 é negativamente correlacionada com a expressão de moléculas pró-inflamatórias nas lesões de pacientes. A inibição da DHCR7 reduziu a infecção por ambas as espécies de *Leishmania* em macrófagos humanos. Além disso, os inibidores de DHCR7 promoveram um aumento na produção de intermediários reativos de oxigênio (ROS) e na produção de TNF e IL-1 β por macrófagos humanos infectados com *Leishmania* spp, avaliados por CBA no sobrenadante. Esses dados sugerem que os inibidores de DHCR7 controlam a infecção por *Leishmania* spp. e abrem caminho para novas abordagens terapêuticas para essa doença negligenciada.

Palavras-chaves: *Leishmania* spp, 7-desidrocolesterolredutase, macrófagos, resposta imune.

ABSTRACT

Leishmaniasis is caused by protozoa of the genus *Leishmania* spp. and is a neglected parasitic disease with a broad clinical spectrum, whose treatments are toxic and present failures and resistance. *Leishmania braziliensis* (Lb) and *Leishmania amazonensis* (La) are highly prevalent species in Brazil. Cholesterol metabolism affects immune responses. 7-dehydrocholesterol reductase (DHCR7) converts 7-dehydrocholesterol (7-DHC) into cholesterol and this enzyme regulates the polarization of macrophages towards the M2 profile. The main objective is to evaluate the role of DHCR7 in the immune response and in the control of *Leishmania* spp. infections. Human macrophages derived from THP-1 cells were infected with *L. amazonensis* or *L. braziliensis* expressing green fluorescent protein (GFP) for 24 h and treated with pharmacological inhibitors of DHCR7 (tamoxifen and AY9944) for an additional 24 h for flow cytometric analysis. Public transcriptome analysis demonstrated that DHCR7 is less expressed in lesions from patients with cutaneous leishmaniasis compared with skin from healthy controls. DHCR7 is negatively correlated with the expression of pro-inflammatory molecules in lesions from patients. Inhibition of DHCR7 reduced infection by both *Leishmania* species in human macrophages. Furthermore, DHCR7 inhibitors promoted an increase in the production of reactive oxygen intermediates (ROS) and in the production of TNF and IL-1 β by human macrophages infected with *Leishmania* spp., assessed by CBA in the supernatant. These data suggest that DHCR7 inhibitors control *Leishmania* spp. infection and pave the way for new therapeutic approaches for this neglected disease.

Keywords: *Leishmania* spp, 7-dehydrocholesterol reductase, macrophages, immune response.

1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, com amplo espectro de formas clínicas e que representam um sério problema de saúde pública (OMS 1990). O primeiro relato do parasito foi feito na Índia, por William Leishman, em 1903, durante uma autópsia em um soldado internado no hospital de Netley com disenteria e hepatoesplenomegalia (Akhoundi et al. 2016). No Brasil, os primeiros casos de leishmaniose cutânea e mucocutânea foram descritos em São Paulo, em 1909, adquiridos em áreas florestais (Benchimol et al. 2019). As manifestações clínicas da leishmaniose podem ser na forma tegumentar e visceral, que vão ser influenciadas pela espécie de *Leishmania* envolvida, a resposta imunológica do hospedeiro e fatores ambientais. As diferentes manifestações clínicas são atribuídas à diversidade de espécies e diferenças intraespecíficas do parasito, bem como à variedade de respostas imunes do hospedeiro (Alvar et al. 2012, Anversa et al. 2018).

As infecções causadas por *L. braziliensis* podem causar lesões cutâneas localizadas (LCL, com 1 a 10 lesões ulceradas), disseminadas (LD, com mais de 10 lesões em diferentes partes do corpo) e cutâneo-mucosas (LCM, com lesões desfigurantes na mucosa nasal, oral ou nasofaríngea). As infecções por *L. amazonensis* podem causar, além da LCL, a leishmaniose cutânea difusa (LCD), caracterizada por numerosas lesões verrucosas, raramente ulceradas, com resposta imune anérgica (ausência de resposta das células T) e de difícil tratamento (Ashford 2000, Gontijo & de Carvalho 2003, Silveira et al. 2009). No caso da Leishmaniose visceral, causada pela *L. infantum* (LV), o parasito tem tropismo por órgãos internos, causando hepatoesplenomegalia, febre, perda de peso, anemia, pancitopenia e hipergamaglobulinemia (Alvar et al. 2012, Anversa et al. 2018, Azevedo et al. 2019). A forma mais agressiva e mutilante é a leishmaniose mucocutânea, caracterizada pela infiltração, ulceração e destruição dos tecidos da cavidade nasal, faringe e/ou laringe, apresentando alto risco de deformidades permanentes, sendo o diagnóstico precoce essencial para a eficácia do tratamento e prevenção de sequelas.

Estima-se que ocorram 1 milhão de novos casos de leishmaniose tegumentar (LT) e 400 mil novos casos de leishmaniose visceral (LV) anualmente em todo o mundo. O Brasil registra aproximadamente 12-16% dos novos casos de LT (conhecida nas Américas como Leishmaniose Tegumentar Americana - LTA) e 1-1,5% dos novos casos de LV a cada ano. Embora as taxas de incidência de LV sejam menores que as de LT, as taxas de mortalidade associadas à LV são mais altas, ocorrendo em cerca de 7% dos casos (Anversa et al. 2018). No Brasil, a *Leishmania*

(*Viannia braziliensis* e a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* são as principais espécies causadoras da LT, enquanto a *Leishmania (Leishmania) infantum* é a espécie causadora da LV (Alvar et al. 2012, Anversa et al. 2018). Nacionalmente, são registrados cerca de 20.000 casos por ano (Figura 1), com um coeficiente de incidência de 10,3 casos por 100.000 habitantes nos últimos 5 anos. Em 2015, a região Norte apresentou o maior coeficiente (51,1 casos por 100 mil habitantes), seguida pelas regiões Centro-Oeste (19,0 casos por 10.000 habitantes) e Nordeste (9,1 casos por 100.000 habitantes) (Borges et al. 2018). Há a necessidade de políticas públicas para o enfrentamento das leishmanioses, além da necessidade de maior investimento em pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos (Ponte-Sucre et al. 2017).

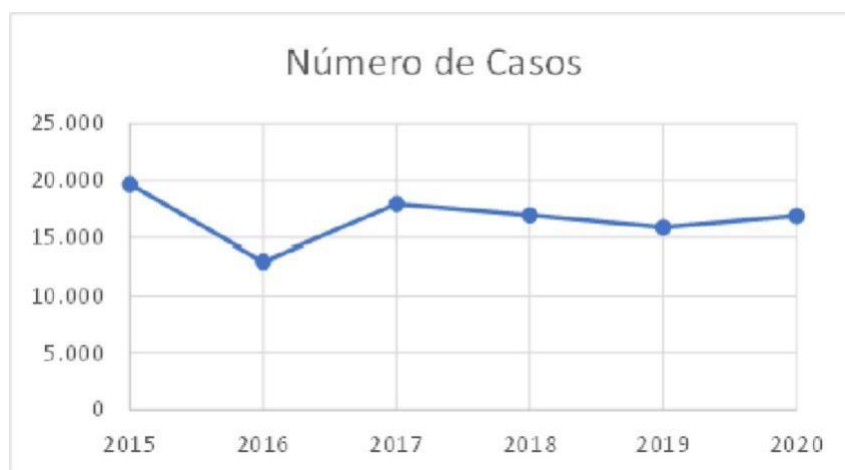


Figura 1. Número de casos de Leishmaniose cutânea no Brasil entre 2015-2020. Fonte: DATASUS (2022).

Os hospedeiros vertebrados das várias espécies de *Leishmania* incluem mamíferos, como roedores, canídeos, marsupiais, primatas e humanos. Os vetores são as fêmeas dos insetos conhecidos como flebotomíneos, pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, nos países do Velho Mundo, e gênero *Lutzomyia*, no Novo Mundo. Cerca de 700 espécies de flebotomíneos foram descritas, das quais aproximadamente 30 são vetores confirmados das leishmanioses e mais de 40 são suspeitas de serem vetores (Soong et al. 2012). Durante o repasto sanguíneo, as fêmeas de fletomíneo infectadas inoculam promastigotas metacíclicas de *Leishmania*. As formas promastigotas metacíclicas são fagocitadas por células, especialmente macrófagos, e, no interior desses macrófagos, são diferenciadas em formas amastigotas, que sofrem multiplicação por divisão binária, podendo infectar outras células e outros insetos vetores (Ashford 2000, Akhoundi et al. 2016, Scott &

Novais 2016) (Figura 2).

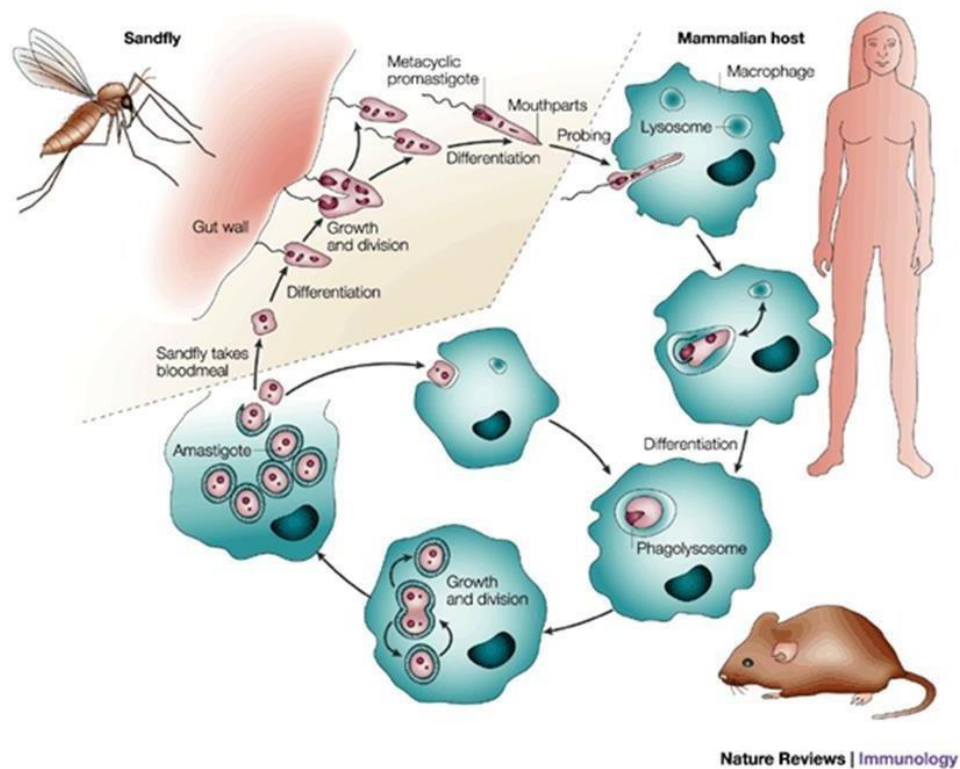


Figura 2. Ciclo biológico da *Leishmania* spp. Fonte: Sacks e Trauth. Nat Rev Immunol 2 , 845–858 (2002).

Várias são as estratégias de tratamento nas leishmanioses, tais como quimioterapia, termoterapia e crioterapia. Não existem vacinas disponíveis para as leishmanioses. O tratamento, no Brasil, é realizado com antimoniato de meglumina, isetionato de pentamidina e anfotericina B (desoxicolato e lipossomal), todas de uso sistêmico (Almeida & Santos 2011, Oliveira et al. 2011, Ponte-Sucre et al. 2017). O uso desses medicamentos pode resultar em disfunções renais, hepáticas, pancreáticas e cardíacas. Em casos em que não há resposta ao tratamento com antimônio ou na impossibilidade de seu uso, a anfotericina B e o isetionato de pentamidina são as drogas de segunda escolha. No entanto, o uso de anfotericina B está associado a altos índices de toxicidade cardíaca e renal (Almeida & Santos 2011, Oliveira et al. 2011, de Menezes et al. 2015, Ponte-Sucre et al. 2017, Anversa et al. 2018). A eficácia do tratamento da leishmaniose é complexa e depende de vários fatores do hospedeiro, como características genéticas, resposta imunológica, forma clínica da doença, dose dos fármacos, efeitos colaterais e características do parasito, como espécie e resistência às drogas (de

Menezes et al. 2015, Ponte-Sucre et al. 2017).

Recentemente incluída pelo Ministério da Saúde como alternativa terapêutica para as leishmanioses no Brasil, a miltefosina é o único fármaco de administração oral e é considerado uma opção mais segura em relação aos fármacos de uso sistêmico. No entanto, a miltefosina pode ter efeitos teratogênicos, causando danos ao embrião durante a gravidez, o que limita seu uso por mulheres grávidas ou lactantes (Soto & Soto 2006, Machado et al. 2010, Pijpers et al. 2019). Devido à prevalência da leishmaniose em regiões mais pobres e de difícil acesso no Brasil, como o Centro-Oeste, Nordeste e Norte, a adesão ao tratamento pode ser aumentada com a inclusão de uma droga de uso oral e efetiva contra a leishmaniose, em comparação com drogas administradas sistemicamente. Apesar dos efeitos adversos mais leves, a miltefosina deve ser usada com cuidado por pacientes com hipersensibilidade à substância ativa ou a qualquer dos excipientes, danos graves e pré-existentes de função hepática ou renal, Síndrome de Sjogren-Larsson, problemas hereditários raros de intolerância à galactose, deficiência de lactase ou má absorção de glucose-galactase e mulheres em idade fértil devido ao seu agravo a gestação, sendo necessário o uso concomitante de métodos anticoncepcionais. A Agência Nacional Americana (FDA) classificou a miltefosina como uma droga de Categoria D, com risco à gravidez, com base em estudos que demonstram tamanha perigosidade. No entanto, como é um medicamento necessário, os benefícios do tratamento podem superar os riscos (Costa Filho et al. 2008, Pijpers et al. 2019)

1.2 Resposta Imune nas Leishmanioses

As infecções por *Leishmania* desencadeiam uma ativação específica da resposta imune do hospedeiro. A forma flagelada, promastigota, pode ser encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, enquanto a forma sem flagelo aparente, amastigota, é intracelular obrigatória e pode ser encontrada nas células do sistema fagocitário dos hospedeiros vertebrados, especialmente nos macrófagos (Gontijo & de Carvalho 2003, Soong et al. 2012, Scott & Novais 2016). A saliva dos vetores contém biomoléculas, como o maxadilán, que facilitam a transmissão do parasito ao favorecer o processo de hematofagia. Além disso, essas biomoléculas do vetor favorecem o parasitismo pois possuem propriedades imunomoduladoras que interferem na apresentação de antígenos aos macrófagos e inibem a produção de citocinas como TNF- α , IFN- γ e IL-12, que são responsáveis pelo combate ao parasito no organismo humano (Soong et al. 2012).

Após a inoculação das formas promastigotas do parasito na pele, durante a hematofagia pelos flebotomíneos, inicia-se o processo de escape do parasito das defesas complemento após

entrar na pele. No entanto, as formas promastigotas metacíclicas possuem moléculas de glicoconjugados e glicoproteínas na membrana plasmática, conferindo-lhes resistência à ação lítica do complemento e representando uma barreira de proteção contra a lise. As interações entre o protozoário e os macrófagos, principais células hospedeiras desses parasitos, por meio da resposta imune inata, envolvem receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), presentes nas células (Kane & Mosser 2000, Murray et al. 2005, Scott & Novais 2016). Essas interações levam ao reconhecimento do patógeno pelos fagócitos devido à interação entre os PRRs e os PAMPs (moléculas associadas ao patógeno), ativando fatores de transcrição que induzem a expressão de citocinas nas células apresentadoras de antígenos (APCs) e a produção de espécies reativas de oxigênio que podem levar à morte do parasito (Handman & Bullen 2002, Tomiotto-Pellissier et al. 2018, Atri et al. 2018). Os receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês *Toll-like receptors*) e os receptores do tipo NOD (NLRs, do inglês *NOD-like receptors*) são os principais receptores responsáveis pelo reconhecimento de *Leishmania* e pela ativação da resposta imune protetora e pró-inflamatória (Handman & Bullen 2002, Moreira & Zamboni 2012).

A ligação de antígenos aos TLRs ativa vias como NF- κ B (fator nuclear kappa B), IRFs (fatores reguladores de interferon) e MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógenos), levando à produção de citocinas pró-inflamatórias e moléculas microbidas pelos macrófagos. No entanto, nem todos os TLRs reconhecem os antígenos de *Leishmania*. O TLR2, TLR4 e o TLR9 parecem estar associados principalmente às interações de macrófagos com *L. braziliensis*, enquanto a *L. amazonensis* interage especialmente com o TLR9 (Campos et al. 2018). A interação dos parasitos com os TLRs pode induzir a produção de citocinas como interleucina-(IL)-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-23, IL-32 e fator de necrose tumoral (TNF). As citocinas são importantes mediadoras das respostas imune inata e adaptativa, constituindo uma rede complexa de resposta imune na defesa inicial contra patógenos (Kawai & Akira 2007, Kawasaki & Kawai 2014).

Além das interações dos receptores TLRs dos macrófagos com os antígenos de *Leishmania*, os NLRs também estão envolvidos na resposta imune inata às leishmanioses. Os NLRs são receptores intracelulares que geram resposta inflamatória diretamente pela ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B e das MAPKs, e também sinalizam vias de ativação para a produção de outras citocinas pró-inflamatórias e moléculas microbidas dos macrófagos. NOD1 e NOD2 utilizam a via de sinalização da RIPK2 (RIP2/RICK, proteína quinase contendo domínio CARD), associada às vias NF- κ B e MAPK, enquanto outros NLRs induzem o inflamassoma dependente de caspase-1 e -11, como o NLRP3 (*nod-like receptor family pyrin domain containing 3*), que ativa a secreção das citocinas IL-1 β e IL-18 (Moreira & Zamboni

2012). Nosso grupo demonstrou que o NOD2 é fundamental para a resposta imune de macrófagos humanos infectados por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* (Dos Santos et al. 2017a).

Dentro dos macrófagos, as formas promastigotas se diferenciam em formas amastigotas no vacúolo parasitóforo, sem flagelo aparente, com capacidade de multiplicação e infecção de novas células. Esse vacúolo se funde com os lisossomos para formar os fagolisossomos, onde as formas amastigotas se multiplicam (Kane & Mosser 2000, Handman & Bullen 2002). As formas amastigotas são mais resistentes à atividade microbicida dos macrófagos devido à capacidade de inibição das enzimas hidrolíticas e da produção de óxido nítrico (NO). *Leishmania* possui várias estratégias de escape à defesa imunológica do hospedeiro, incluindo a indução de moléculas imunossupressoras, como prostaglandina E2 (PGE2), TGF- β e IL-10, a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, TNF- α , IL-6) e da ativação dos linfócitos T (IL-12), e a interferência na apresentação de antígenos do parasito a outros componentes do sistema imune, através da inibição na expressão de moléculas MHC de classe II (Handman & Bullen 2002, Tomiotto-Pellissier et al. 2018, Anversa et al. 2018).

Dessa forma, a forma amastigota consegue superar os mecanismos microbicidas do macrófago, e sua sobrevivência depende da capacidade de resistir aos mecanismos da resposta imune celular. A resposta do sistema imunológico depende da espécie de *Leishmania*, pois diferentes espécies podem evocar respostas diferentes. O principal mecanismo de defesa do organismo é a imunidade celular, embora a imunidade humoral, representada pelo sistema complemento e pelos anticorpos, também possa ajudar a destruir o parasito. O controle da resposta imune para essa infecção envolve a participação de células do sistema imune inato e adaptativo, como neutrófilos, macrófagos, monócitos e linfócitos T CD4+, incluindo os subgrupos Th1 e Th2. As células T CD4+ desempenham uma função central no sistema imunológico, promovendo respostas adaptativas adequadas a patógenos específicos. A leishmaniose provoca uma inflamação granulomatosa nas lesões desses pacientes, atraindo células como macrófagos, linfócitos e plasmócitos, entre outras células do sistema imunológico (Soong et al. 2012, Scott & Novais 2016).

O controle da infecção depende da resposta imune do tipo Th1, das citocinas inflamatórias interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF) alfa e beta. A susceptibilidade à infecção está associada com a produção das interleucinas 4 e 10 (IL-4 e IL-10), por células Th2, que inibem Th1. Uma resposta exacerbada de Th1, no entanto, pode resultar em destruição tecidual, caracterizando a forma clínica mucocutânea. Estudos também mostram que a *L. braziliensis* atua em um subtipo celular chamado Th17, associado à produção de IL-17, uma citocina que eleva a produção de diversos mediadores inflamatórios, como IL-1,

IL-6, TNF- α e NOS2, que auxiliam os linfócitos Th1 em patógenos resistentes (Soong et al. 2012, Novais et al. 2015, Scott & Novais 2016, Campos et al. 2018).

Os macrófagos, componentes do sistema mononuclear fagocitário, são células conhecidas por sua grande plasticidade, podendo apresentar diferentes perfis fenotípicos em resposta a diferentes estímulos do microambiente (Tomiotto-Pellissier et al. 2018, Atri et al. 2018). Nas infecções por *Leishmania* podemos observar a diferenciação e manutenção de macrófagos no fenótipo M1 são essenciais para o controle e eliminação dos parasitos. Os macrófagos denominados M1, ou classicamente ativados, apresentam atividade pró-inflamatória em resposta ao estímulo de IFN- γ e ativação de TLRs e NLRs, produzindo citocinas como IL-1, IL-12 e TNF- α , e moléculas microbicidas como NO (óxido nítrico) e ROS (espécies reativas de oxigênio) Por outro lado, os macrófagos denominados M2, ou alternativamente ativados, produzem citocinas anti-inflamatórias ou reguladoras, como IL-10 e TGF- β , e expressam altos níveis de arginase, uma enzima que inibe a produção de NO.(Figura 3) (Robbin, 2013), (Tomiotto-Pellissier et al. 2018, Atri et al. 2018) Diferentes espécies de *Leishmania* podem subverter a resposta imune dessas células, induzindo o perfil de macrófagos M2, que são suscetíveis à infecção (Kumar et al. 2018).

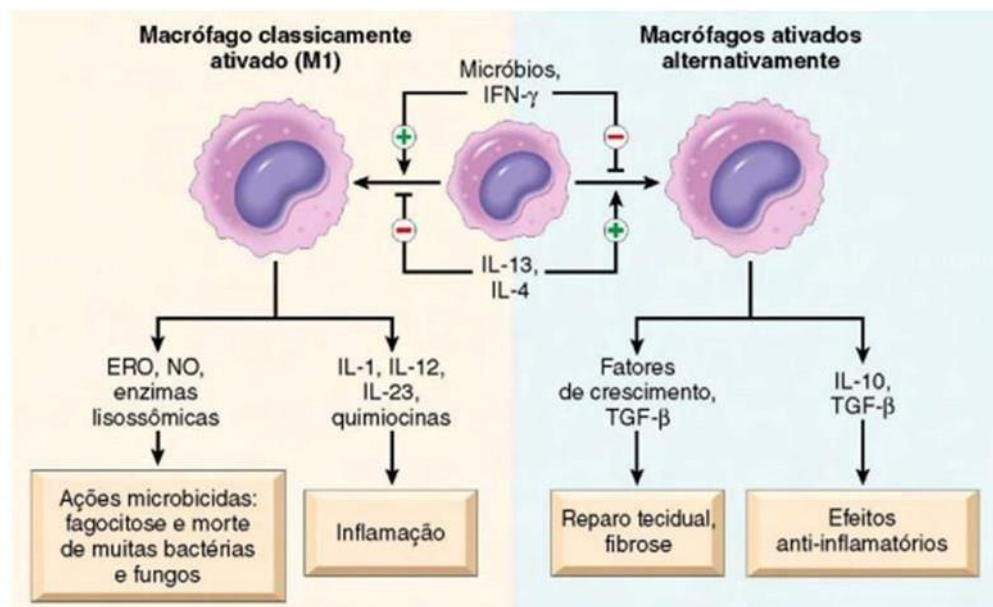


Figura 3. Perfil de macrófagos durante a resposta imune. Fonte: Robbin. Patologia básica, 2013.

Metabolismo de Colesterol e a Resposta Imune

O metabolismo do colesterol desempenha um papel crucial na resposta imune, sendo

necessário para a função das células imunes e para a regulação da resposta inflamatória (Liu et al. 2008, Spann & Glass 2013, Xiao et al. 2020). O colesterol é o lipídio mais abundante nas células de mamíferos e desempenha um papel crítico na regulação das propriedades biofísicas e bioquímicas das membranas. O colesterol é um componente fundamental das membranas celulares para o transporte de substâncias e um precursor de hormônios esteroides, ácidos biliares e vitamina D (metabolismo cálcio, produção de peptídeos antimicrobianos, papel antioxidante), todos essenciais para a saúde e função adequada do sistema imunológico (Spann & Glass 2013). As células do sistema imune, como os macrófagos e os linfócitos T, requerem colesterol para a formação de suas membranas celulares. Durante a ativação imune, os macrófagos podem aumentar sua captação de colesterol, resultando na formação de estruturas chamadas de "espumas de colesterol". Essas estruturas são visíveis em condições inflamatórias, como na aterosclerose, onde os macrófagos capturam lipoproteínas de baixa densidade (LDL) oxidadas, transformando-se em células espumosas ricas em colesterol (Spann & Glass 2013, Tall & Yvan-Charvet 2015).

Além de sua função estrutural, o colesterol também desempenha um papel na modulação da resposta imune. O colesterol pode influenciar a sinalização de receptores de superfície celular, como os TLRs, que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos e desencadeiam a resposta imune. A presença de colesterol nas membranas celulares pode afetar a organização desses receptores e sua capacidade de sinalização (Spann & Glass 2013, Tall & Yvan-Charvet 2015). A 7-deidrocolesterol redutase (DHCR7) é uma enzima chave na síntese do colesterol, catalisando a redução do 7-desidrocolesterol (7-DHC) para colesterol (Moebius et al. 1998, Lalovic et al. 2004, Tall & Yvan-Charvet 2015). A deficiência desta enzima está associada à Síndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLOS), uma doença genética rara caracterizada por anormalidades congênitas, retardo no desenvolvimento neurológico e problemas de comportamento, entre outros sintomas (Lalovic et al. 2004). Além de sua importância no metabolismo do colesterol, a DHCR7 também pode desempenhar um papel na resposta imune (Tall & Yvan-Charvet 2015, Xiao et al. 2020).

O colesterol, derivado da 7-DHC pela ação da DHCR7, tem a capacidade de inibir a ativação do fator regulador de interferon 3 (IRF3), um fator de transcrição fundamental na resposta imune. Esse efeito sugere que a inibição da DHCR7 poderia representar uma estratégia terapêutica viável para potencializar a resposta imune (Liu et al. 2008, Xiao et al. 2020, Korade et al. 2022). De fato, o acúmulo do precursor 7-DHC está associado com a ativação da resposta imune, seja diretamente pela ativação de fatores como IRF3 e AKT (Xiao et al. 2020), seja como precursor da vitamina D, que é conhecidamente importante na regulação positiva da resposta imune, incluindo no controle das infecções por *L. braziliensis* (Silva et al. 2020). A conversão

de 7-DHC em colesterol está ligado a polarização de macrófagos para o perfil M2 (Ky et al. 2018) e o metabolismo do colesterol e a expressão de DHCR7 está correlacionado com indução de um perfil de resposta imune menos inflamatório (Li et al. 2015, Xiao et al. 2020, Korade et al. 2022).

2 JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são doenças amplamente negligenciadas, sem perspectivas terapêuticas definitivas e, ainda, sem uma vacina disponível. Os esforços para compreender os mecanismos imunológicos envolvidos no controle do parasito ou na evasão do sistema imunológico são fundamentais para desenvolver estratégias eficazes de combate à doença. Esse projeto de pesquisa investiga a expressão da enzima DHCR7 em pacientes com leishmaniose cutânea, cujos dados preliminares indicam uma expressão reduzida desta enzima. Essa redução pode levar ao acúmulo de 7-DHC em macrófagos, estimulando vias pró- inflamatórias durante a infecção por *Leishmania*. A inibição dessa enzima pode estar relacionada a uma resposta imune protetora contra a leishmaniose, sugerindo que a DHCR7 pode ser um alvo terapêutico promissor para futuros tratamentos. É crucial compreender o metabolismo do colesterol para entender o funcionamento da DHCR7 e suas interações moleculares e bioquímicas nas vias pró- inflamatórias. A integração dos conhecimentos existentes com os resultados desse estudo pode aprimorar nossa compreensão da fisiopatologia do parasito e potencialmente fornecer estratégias para interferir nos seus mecanismos de escape, limitando sua sobrevivência e melhorando a qualidade de vida dos pacientes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo principal é avaliar o papel da DHCR7 na resposta imune e no controle de infecções por *Leishmania* spp.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão do transcrito de DHCR7 no sangue e nas lesões de pacientes com leishmaniose cutânea e controles saudáveis utilizando dados públicos disponíveis;
- Correlacionar o transcrito de DHCR7 com a expressão de genes envolvidos na resposta imune no sangue e na lesão de pacientes com leishmaniose cutânea;
- Avaliar se a inibição de DHCR7 favorece o controle da infecção por *Leishmania* spp. em macrófagos humanos;
- Avaliar se a inibição de DHCR7 altera a resposta imune de macrófagos humanos infectados com *Leishmania* spp.

4 MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Esse estudo dispensa aprovação de comitê de ética de pesquisa por ser realizado com dados presentes em repositórios públicos, previamente publicados, e macrófagos humanos de linhagem celular imortalizada (THP-1).

4.2 Análise de dados de transcriptoma *in silico*

O conjunto de dados estão disponíveis no banco de dados GEO para acesso público e consistem em transcriptomas de amostras de sangue total de pacientes infectados com *L. braziliensis* (n = 50) e de indivíduos não infectados (n = 14) (GSE162760) e biópsias da lesão de pacientes infectados com *L. braziliensis* (n = 21) e pele saudável de indivíduos não-infectados (n = 7) (GSE127831). A expressão gênica (*log₂ expression*) de DHCR7 e a associação com genes de citocinas e moléculas microbidas foram apresentadas por meio de mapas de calor construídos com auxílio do software GraphPad Prism.

4.3 Infecções *in vitro*

Promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/2003/M2904) e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) expressando a proteína verde fluorescente GFP (abreviatura do inglês *green fluorescent protein*) foram cultivadas em meio de Grace (Sigma-Aldrich), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco - Life Technologies), 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (todos reagentes Sigma-Aldrich), a 26°C. Os parasitos foram cultivados em placas de 24 poços (Corning-Costar) por, no máximo, 6 passagens, sendo utilizados, nos experimentos, na fase estacionária do crescimento (6º dia de cultivo). Células da linhagem imortalizada monocítica humana THP-1 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), suplementado com 50 µg/mL gentamicina e 2 mM L- glutamina (Sigma-Aldrich), e 10% de SFB (Gibco) inativado. As células THP-1 (1×10^6 células/mL) foram diferenciadas com 100 ng/mL de Phorbol-12- miristato-13-acetato (PMA; Sigma-Aldrich) por 24 h, a 37 °C/5% CO₂, lavadas com meio RPMI suplementado, e permitidas descansar por adicionais 24 horas (Dos Santos et al. 2017b). As células THP-1 diferenciadas em macrófagos foram infectadas com formas promastigotas de fase estacionária de *L. braziliensis*-GFP ou *L. amazonensis*-GFP (MOI 5:1), por 24 h, e tratadas com diferentes concentrações dos inibidores de DHCR7 tamoxifeno (Sigma-Aldrich) e AY9944 (Santa Cruz Biotechnology) (Korade et al. 2022), por

adicionais 24 h. As taxas de infecção foram avaliadas por citometria de fluxo (BD Accuri C6). A porcentagem de macrófagos infectados (GFP⁺) e a média de intensidade de fluorescência do GFP (MFI) foram analisadas.

4.4 MTT (teste de viabilidade celular)

Macrófagos derivados de células THP-1 (1×10^6 células/mL) foram tratadas com diferentes concentrações de tamoxifeno ou AY9944 por 24h e incubadas com 10 μ L de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio brometo; Sigma-Aldrich) a 5 mg/mL por 3 h, a 37 °C/5% CO₂. O sobrenadante foi substituído por 100 μ L de DMSO (Dimetilsulfóxido; Sigma-Aldrich). Após 1 hora a absorbância foi lida a 570 nm em espectofotômetro (Alonso et al. 2019, 2020).

4.5 Avaliação da Resposta Imune

As produções das citocinas TNF, IL-10, IL-12, IL-6, IL-8 e IL-1 β foram avaliadas por CBA (BDTM *Cytometric Bead Array*), nos sobrenadantes das culturas de células. A produção de ROS foi avaliada pela marcação das células THP-1 infectadas utilizando a sonda fluorescente 2',7'-diacetato de diclorodi-hidrofluoresceína, conforme orientações do fabricante, e analisada por citometria de fluxo (BD Accuri C6).

4.6 Análises Estatísticas

Os dados de análise de transcriptoma foram apresentados em valores individuais e medianas e analisados pelo teste de Mann-Whitney; correlações entre os dados foram realizadas por teste de Spearman e apresentados por mapas de calor. Os dados *in vitro* foram apresentados como média \pm desvio padrão (SD). Os testes t de Student, One-way ou Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, foram utilizados para as análises estatísticas. A significância foi estabelecida em $p < 0,05$

5 RESULTADOS

5.1 Análise de transcriptoma de pacientes com LCL

Para avaliar a expressão de DHCR7 durante a leishmaniose tegumentar utilizamos dados de transcriptoma de controles saudáveis e pacientes com LCL. Não há alterações na expressão de DHCR7 no sangue de pacientes com LCL (Figura 4A). No entanto, lesões de pacientes com LCL apresentam menor expressão de DHCR7 comparados à pele de controles saudáveis (Figura 4B).

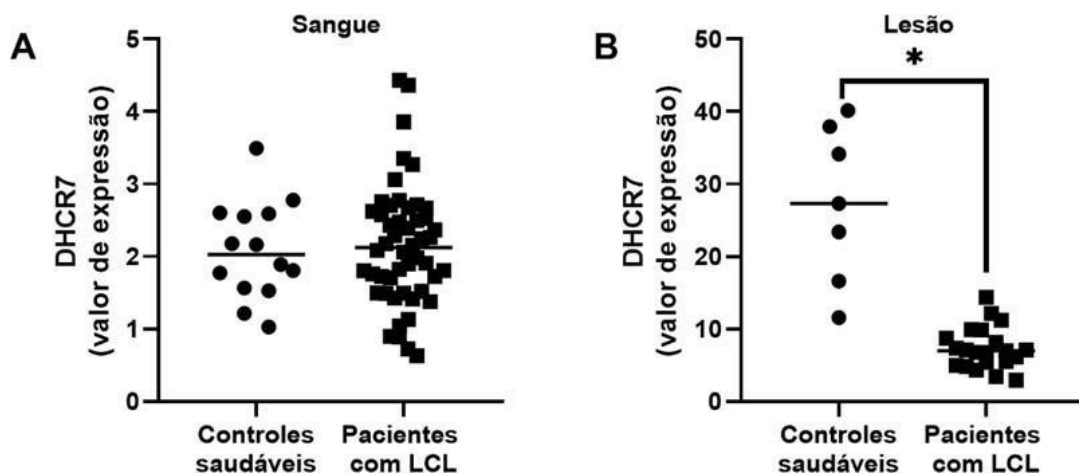


Figura 4. Expressão do transcrito de DHCR7 a partir de fragmentos de pele de pacientes com leishmaniose cutânea (LC) e sangue periférico. Expressão de DHCR7 em sangue periférico de pacientes com LCL e controles saudáveis (4A). Expressão de DHCR7 nas lesões de pacientes com LCL (n=21) e controle saudáveis, (n = 7) (4B). Os dados são apresentados em valores individuais e mediada. *p<0,05, pelo teste Mann Whitney.

Nós avaliamos se a expressão de DHCR7 está correlacionada com moléculas envolvidas na resposta imune durante as leishmanioses. Em sangue periférico de pacientes com LCL (Figura 5A), a expressão de DHCR7 é positivamente correlacionada com a expressão de IL1B ($r = 0,40072$; $p = 0,003929$), IL32 ($r = 0,396744$; $p = 0,004337$) e CYBB ($r = 0,449086$; $p = 0,00107$). No entanto, nas lesões, a expressão de DHCR7 é negativamente correlacionada com as expressões de TNF ($r = -0,56364$; $p = 0,007793$), IL15 ($r = -0,44675$; $p = 0,042324$) e IL32 ($r = -0,44935$; $p = 0,042324$), e positivamente correlacionada com a expressão de ARG1 ($r = 0,82987$; $p < 0,001$)-(Figura 5B).

Os dados sugerem que, em pacientes com leishmaniose, a expressão reduzida de DHCR7 deve favorecer a resposta imune pró-inflamatória

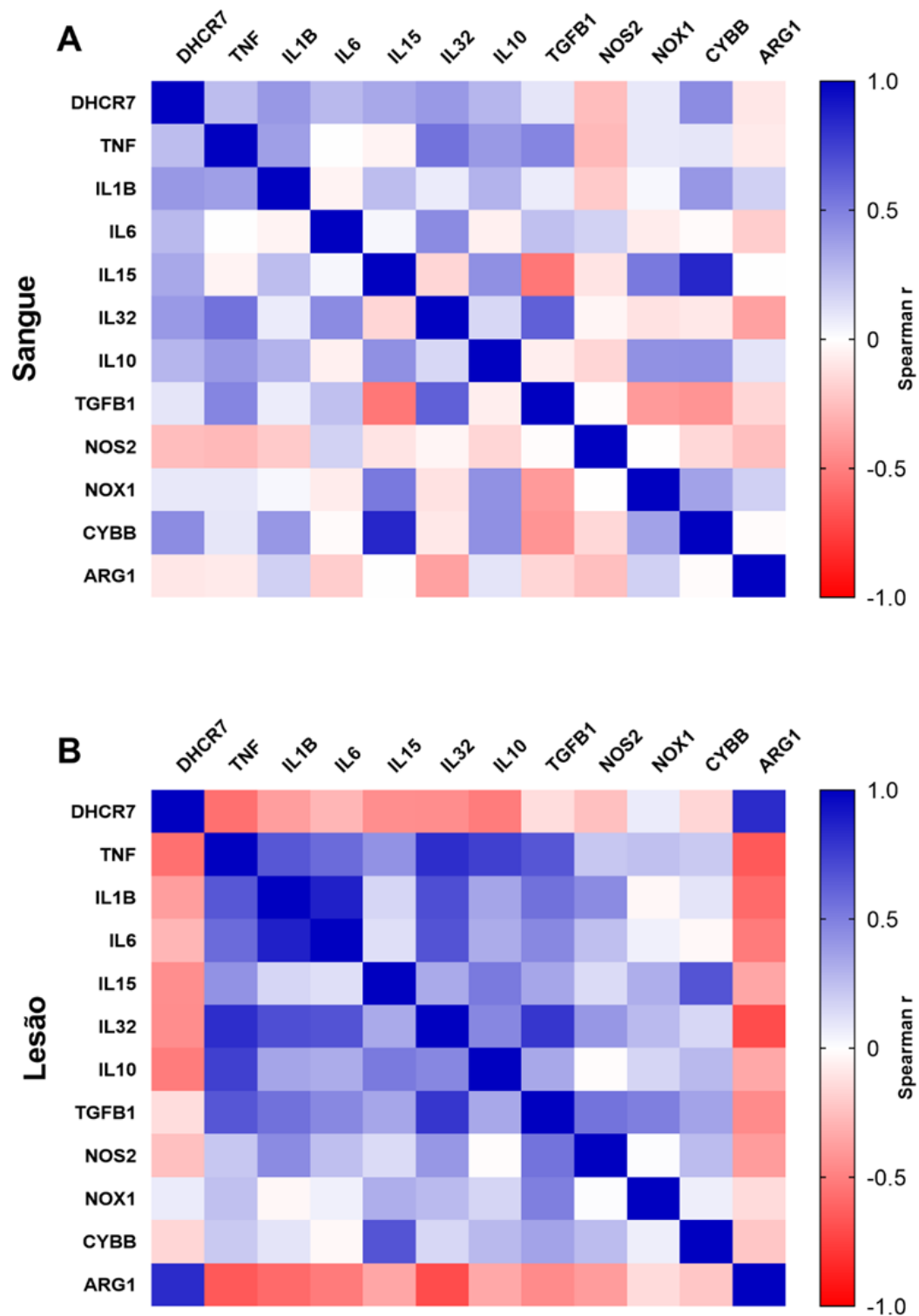


Figura 5. Correlação da expressão de DHCR7 com moléculas envolvidas no processo inflamatório. As correlações (Spearman)-A e B de DHCR7 e moléculas envolvidas no processo inflamatório e no controle de leishmanioses foram avaliadas em (A) sangue periférico e (B) lesões de pacientes com leishmaniose cutânea. Os mapas de calor apresentam o valor de r (correlação de Spearman), entre -1 (vermelho) e +1 (azul).

5.2 Avaliação do papel dos inibidores da DHCR7 no controle de *Leishmania* spp. em macrófagos humanos

Uma vez que a expressão de DHCR7 é inversamente correlacionada com moléculas pró-inflamatórias nas lesões de LCL, nós hipotetizamos que a inibição dessa enzima pode favorecer a resposta imune pró-inflamatória e o controle do parasito em macrófagos. Inicialmente avaliamos se inibidores farmacológicos da DHCR7 (tamoxifeno e AY9944) alteram a viabilidade de macrófagos humanos. Tamoxifeno e AY9944 não reduziram significativamente a viabilidade de macrófagos humanos derivados de células THP-1 até a concentração de 10 μM (Figura 6). Somente a partir de 20 μM os fármacos reduziram drasticamente a porcentagem de células viáveis (Figura 6), e essa concentração não foi utilizada nos demais experimentos.

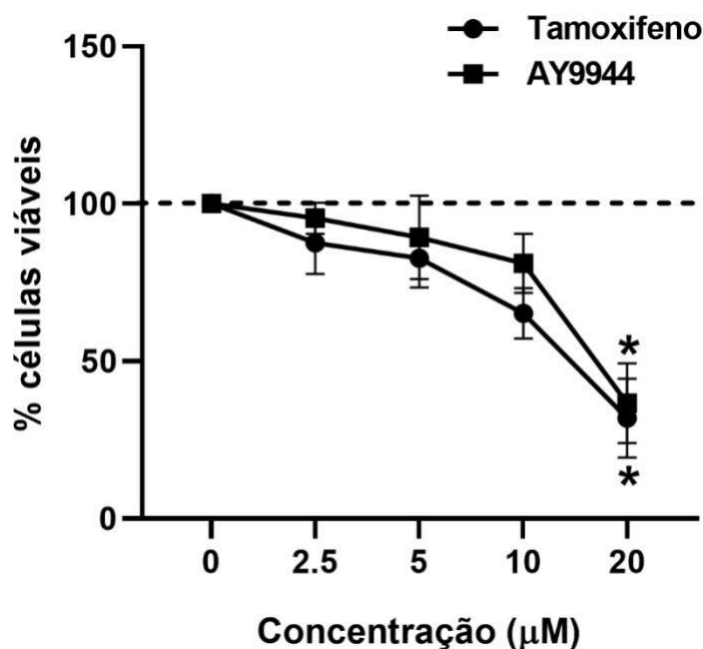


Figura 6. Viabilidade celular de macrófagos humanos tratados com inibidores farmacológicos de DHCR7. Macrófagos humanos derivados de células THP-1 (10^6 células/mL) foram tratados por 24h na presença de diferentes concentrações de tamoxifeno ou AY9944, e a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT. * $p < 0,05$, comparado com controle não tratado (0 μM), por two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Sidak

O tratamento com o inibidor da DHCR7 tamoxifeno reduziu o percentual de macrófagos humanos infectados com *L. amazonensis* nas concentrações de 2,5, 5 e 10 μM , enquanto o tratamento com o AY9944 reduziu a porcentagem de células infectadas com *L. amazonensis* nas concentrações de 5 e 10 μM (Figura 7A). Os dois inibidores de DHCR7 reduziram o número

de parasitas nas células (MFI) a partir da concentração de 2,5 μ M (Figura 7B). O IC50 do tamoxifeno foi de 1,681 μ M e do AY9944 foi de 2,039 μ M na infecção por *L. amazonensis*. O tamoxifeno e o AY944 também reduziram o percentual de células infectadas por *L. braziliensis* (Figura 7C) e a intensidade média de fluorescência (Figura 7D), iniciando na concentração de 2,5 μ M. O IC50 do tamoxifeno foi de 2,674 μ M e do AY9944 foi de 2,911 μ M na infecção por *L. braziliensis*. Esses dados sugerem que os inibidores de DHCR7 controlam *Leishmania* spp. em macrófagos humanos.

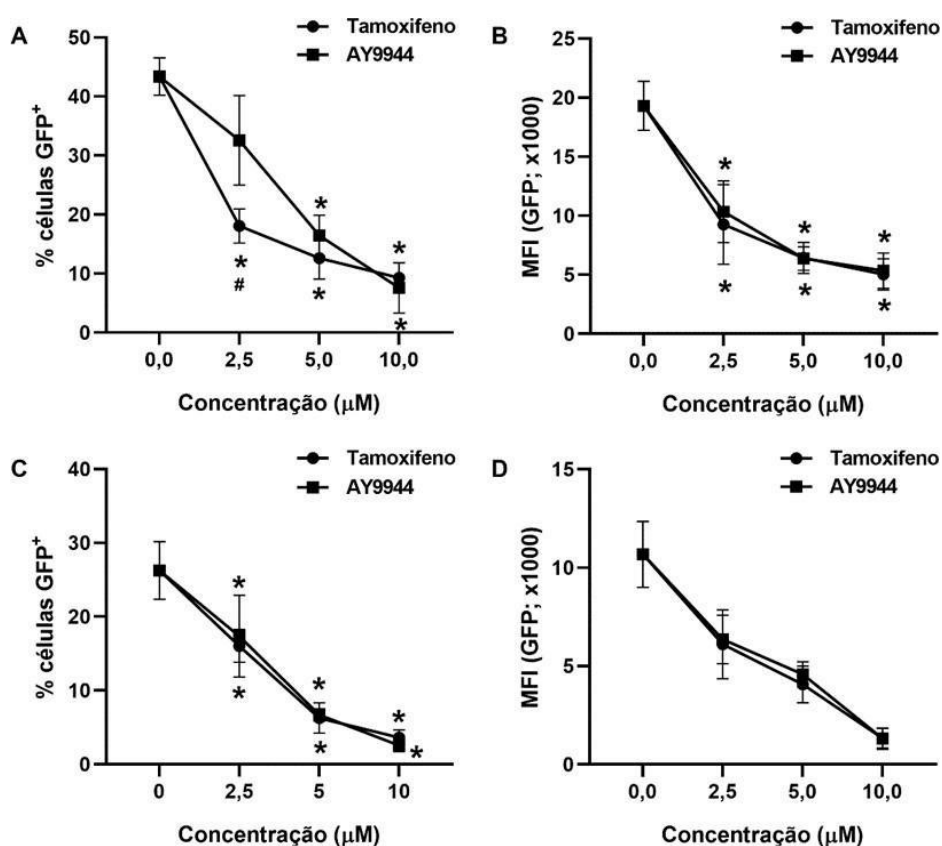


Figura 7. Os inibidores de DHCR7 induzem o controle de *Leishmania* spp em macrófagos humanos.

Macrófagos humanos derivados de células THP-1 (1X10⁶ células/mL) foram infectados com *L. amazonensis*-GFP (7A e 7B) ou *L. braziliensis*-GFP (7C e 7D), MOI 5:1, por 24h e tratados com diferentes concentrações de tamoxifeno ou AY9944 por mais 24 horas. A porcentagem de células infectadas (GFP +; 7A e 7C) e intensidade média de fluorescência (MFI; 7B e 7D) foram analisadas por citometria de fluxo. *p<0,05, comparado ao controle não tratado (0 μ M), e p<0,05, tamoxifeno vs. AY9944, na mesma concentração, por two-way ANOVA, seguida por pós-teste de Sidak.

5.3 Avaliação do papel dos inibidores da DHCR7 na resposta imune de macrófagos humanos infectados com *Leishmania* spp.

Avaliamos os possíveis mecanismos envolvidos no controle de *Leishmania* em macrófagos humanos induzidos por inibidores de DHCR7. Tanto o tamoxifeno quanto o AY9944 induziram um aumento na produção de ROS por macrófagos humanos infectados com *L. amazonensis* (Figura 8A) e *L. braziliensis* (Figura 8B) de maneira dose-dependente.

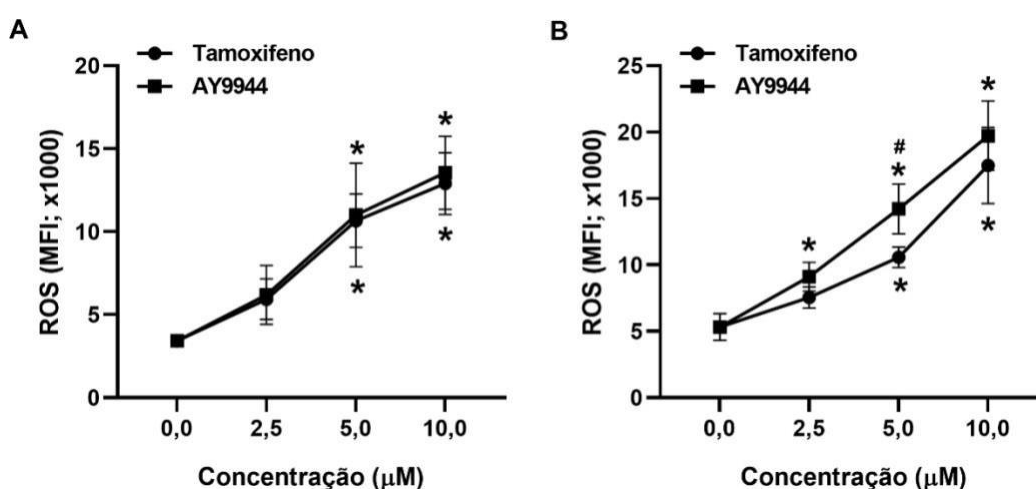


Figura 8. Inibidores de DHCR7 induzem a produção de ROS em macrófagos humanos infectados com *Leishmania* spp. Macrófagos humanos derivados de células THP-1 (10^6 células/mL) foram infectados com *L. amazonensis* (A) ou *L. braziliensis* (B), MOI 5:1, por 24h e tratadas com diferentes concentrações de tamoxifeno ou AY9944 por mais 24 horas. A produção de ROS foi avaliada por CM-H2DCFDA (indicadores de espécie reativos de oxigênio em células) e analisado em citômetro de fluxo. * $p < 0,05$, comparado ao controle não tratado (0 µM), e # $p < 0,05$, tamoxifeno vs. AY9944, na mesma concentração, por two-way ANOVA seguida de pós-teste de Sidak.

Já que a inibição do DHCR7 parece estar associada ao aumento da resposta imune pró-inflamatória e à polarização de macrófagos em direção ao perfil M1, nós avaliamos a produção de TNF e IL-1 β através do método de CBA (BD™ Cytometric Bead Array) no sobrenadante de macrófagos infectados e tratados com tamoxifeno e AY9944. Os inibidores de DHCR7 aumentaram a produção de TNF e IL-1 β em macrófagos infectados com *L. amazonensis* (Figura 9A e 9B) e *L. braziliensis* (Figura 8C e 8D).

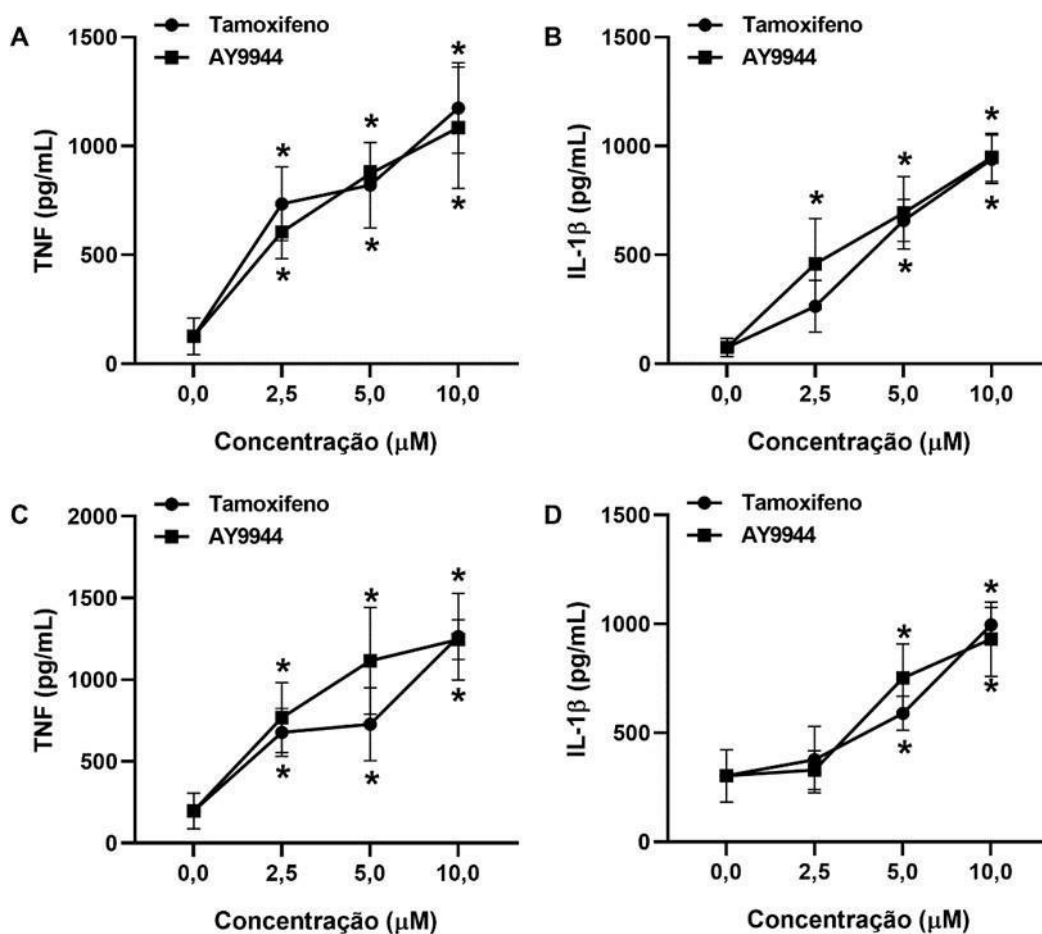


Figura 9. Inibidores de DHCR7 induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos humanos infectados com *Leishmania* spp. Macrófagos humanos derivados de células THP-1 (10^6 células/mL) foram infectados com *L. amazonensis* (9A e 9B) ou *L. braziliensis* (9C e 9D), MOI 5:1, por 24h e tratados com diferentes concentrações de tamoxifeno ou AY9944 por mais 24h. A produção de TNF e IL-1 β foi avaliada no sobrenadante da cultura utilizando kit CBA. * $p < 0,05$, em comparação com o controle não tratado (0 μ M), e $p < 0,05$, por two-way ANOVA, seguida de pós-teste de Sidak.

6 DISCUSSÃO

Há um número de crescentes evidências científicas que destacam a relevância do metabolismo do colesterol na regulação da resposta imune inata, especialmente no contexto de infecções parasitárias e virais. O colesterol desempenha papéis essenciais em diversos processos fisiológicos celulares, incluindo os que ocorrem nos macrófagos, células cruciais na defesa imunológica contra *Leishmania*. A enzima DHCR7 (7-desidrocolesterol redutase) é fundamental para a conversão do 7-desidrocolesterol (7-DHC) em colesterol, e sua atividade está associada a múltiplos aspectos da função celular. Estudos prévios (Moebius et al. 1998, Li et al. 2015, Akula et al. 2016) já demonstraram a importância dessa enzima em diferentes contextos biológicos. Neste trabalho, mostramos que inibidores farmacológicos de DHCR7, como o tamoxifeno e o AY9944, são eficazes em induzir um aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e citocinas pró- inflamatórias em macrófagos humanos. Além disso, esses inibidores se mostraram capazes de controlar a infecção por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* nesses mesmos macrófagos. Em pacientes com leishmaniose cutânea localizada (LCL), observou-se que a expressão da DHCR7 apresenta uma correlação inversa com a resposta imune pró-inflamatória, sugerindo fortemente que a inibição dessa enzima pode exercer efeitos imunomoduladores benéficos, aumentando a eficácia da resposta imune contra o parasito.

Os macrófagos desempenham um papel central no combate à *Leishmania*, sendo as principais células hospedeiras desse parasito intracelular. Essas células são responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IL-1 β , além de moléculas microbidas como óxido nítrico (NO) e ROS, que contribuem diretamente para o controle do parasito (Handman & Bullen 2002, Scott & Novais 2016, Tomiotto-Pellissier et al. 2018, Atri et al. 2018). A ativação dos macrófagos é amplificada pela ação das células T auxiliares do tipo 1 (Th1), que secretam interferon-gama (IFN- γ), uma citocina crítica para o controle da replicação da *Leishmania* nos macrófagos infectados (Scott et al. 1988, Scott & Novais 2016). Nesse contexto, os inibidores de DHCR7 emergem como ferramentas promissoras para modular a resposta imune e aumentar a eficácia do combate ao parasito.

Além das infecções por *Leishmania* spp., os inibidores de DHCR7 já foram testados com sucesso no tratamento de várias infecções virais, incluindo aquelas causadas pelo vírus da estomatite vesicular (VSV), citomegalovírus murino (MCMV), enterovírus e vírus Zika. A inibição da DHCR7 resulta no acúmulo do precursor 7-DHC nas células, o que está associado à ativação da via PI3K-AKT3-IRF3 em macrófagos e outras células imunes (Xiao et al. 2020, Korade et al. 2022, Wang et al. 2023). Por exemplo, o uso do inibidor AY9944 promoveu uma

forte ativação do fator regulador de interferon-3 (IRF3) e genes estimulados por interferon (ISGs), e aumentou significativamente a produção de interferon-beta (IFN-β), um mediador crucial na defesa antiviral. Estudos apontam que o aumento dos níveis intracelulares de 7-DHC pode interferir diretamente na replicação viral. O ZIKV utiliza a proteína não estrutural NS4B para interagir com a DHCR7, aumentando sua expressão e suprimindo vias imunológicas críticas, como a fosforilação das proteínas TBK1 e IRF3 (Xiao et al. 2020, Korade et al. 2022, Wang et al. 2023). A inibição farmacológica da DHCR7 reverte esse efeito, bloqueando a replicação viral e fortalecendo as defesas imunológicas do hospedeiro. Além disso, os efeitos antivirais dos inibidores da DHCR7 foram observados em outros modelos virais, como o VSV. O uso desses compostos resultou em uma redução significativa na carga viral em células infectadas.

A capacidade dos inibidores de alterar o perfil lipídico celular ao acumular 7-DHC também parece contribuir para estabilizar estruturas celulares contra danos oxidativos induzidos por infecções (Xiao et al. 2020, Korade et al. 2022, Wang et al. 2023). Os efeitos de inibidores da DHCR7 também foram observados na inibição da replicação do protozoário *Toxoplasma gondii* (Fan et al. 2024). Além disso, foi demonstrado que a inibição da DHCR7 está associada ao aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e ROS (Speen et al. 2019, Xiao et al. 2020). A DHCR7 também regula transcricionalmente os macrófagos M2 (Xue et al. 2014, Ky et al. 2018), cuja polarização anti-inflamatória favorece a replicação de patógenos como *Leishmania* spp., tornando sua inibição uma estratégia relevante para combater infecções persistentes (Tomiotto-Pellissier et al. 2018, Atri et al. 2018).

Outro aspecto interessante é que a inibição da DHCR7 resulta no acúmulo intracelular de 7-DHC, uma molécula que pode ser fotoconvertida em pré-vitamina D3 sob exposição à luz solar (Bikle 2011, Young et al. 2021). A vitamina D desempenha um papel bem estabelecido na modulação da resposta imune em macrófagos e no controle de diversos patógenos intracelulares, incluindo vírus e bactérias como *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium tuberculosis*, além do protozoário *L. braziliensis* (Montoya et al. 2014, Zdrengeha et al. 2017, Kim et al. 2018, Zavala et al. 2018, Silva et al. 2020, Wu et al. 2022). A vitamina D aumenta a produção de peptídeos antimicrobianos, como a catelicidina, que ajudam na destruição de patógenos fagocitados pelos macrófagos. Além disso, ela estimula a autofagia, um processo que facilita a eliminação de microrganismos intracelulares, como *M. tuberculosis* em fagossomos. A ativação dos TLRs por patógenos estimula os macrófagos a expressarem mais VDR (receptor de vitamina D) e enzimas como CYP27B1, potencializando os efeitos imunomoduladores da vitamina D. Essa interação também reforça a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, fundamentais para a atividade microbicida (Montoya et al.

2014, Zdrengeha et al. 2017, Kim et al. 2018, Zavala et al. 2018, Silva et al. 2020, Wu et al. 2022).

Nosso grupo demonstrou que exposição de macrófagos humanos à citocina IL-32 γ aumenta significativamente a capacidade microbicida dessas células, mas esse efeito foi observado apenas na presença de altas concentrações de vitamina D (25D3), não ocorrendo em condições de baixos níveis dessa vitamina. Quando o IL-15 foi combinado com o IL-32 γ , observou-se um controle ainda mais eficiente da infecção por *Leishmania braziliensis*, desde que as concentrações de vitamina D fossem elevadas. Nessa situação, os efeitos promovidos pelo IL-32 γ foram mediados pela produção de NO e ROS, que desempenharam papéis cruciais na atividade microbicida dos macrófagos, potencializando o controle da infecção de forma dependente das altas concentrações de vitamina D (Silva et al. 2020). Os inibidores de DHCR7 podem aumentar os níveis intracelulares de vitamina D nos macrófagos humanos durante a exposição ao sol, potencializando tanto a resposta imune quanto o controle da replicação de *Leishmania* spp., configurando um efeito duplo imunomodulador e antiparasitário. Além disso, variações genéticas no gene DHCR7 podem influenciar os níveis séricos de vitamina D (Zhang et al. 2012), sendo que polimorfismos nesse gene já foram associados à suscetibilidade à tuberculose pulmonar (Zhang et al. 2021).

O tamoxifeno é outro composto promissor que já foi avaliado experimentalmente no tratamento da leishmaniose em modelos murinos tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Miguel et al. 2008, Zewdie et al. 2022). Notavelmente, a *Leishmania* não desenvolve resistência ao tamoxifeno com facilidade (Coelho et al. 2015), o que contrasta com os problemas recorrentes de resistência observados nos tratamentos convencionais disponíveis para leishmaniose (Ponte-Sucre et al. 2017). Até onde sabemos, nosso estudo é pioneiro ao identificar inibidores de DHCR7 como indutores eficazes da produção de citocinas pró- inflamatórias e ROS em macrófagos humanos infectados por *Leishmania* spp., além de destacar seus efeitos imunomoduladores adicionais ao efeito leishmanicida direto previamente descrito para o tamoxifeno contra várias espécies do parasito *in vitro* (Miguel et al. 2007). Contudo, é importante reconhecer que esses compostos apresentam perfis inibitórios complexos característicos dos moduladores da via lipídica (Xiao et al. 2020, Korade et al. 2022, Peeples et al. 2024), e mais estudos são necessários para compreensão definitiva do papel dos inibidores de DHCR7 no tratamento das leishmanioses.

A leishmaniose continua sendo um desafio significativo devido aos efeitos adversos laboratoriais e clínicos associados aos tratamentos disponíveis atualmente contra essa doença negligenciada (Oliveira et al. 2011). O aumento das falhas terapêuticas e o surgimento de resistência aos medicamentos reforçam a necessidade urgente de reavaliar as diretrizes

terapêuticas existentes e desenvolver novas estratégias terapêuticas mais eficazes e seguras (Ponte-Sucre et al. 2017). Nossos resultados demonstram que os inibidores da DHCR7 representam potenciais ferramentas terapêuticas inovadoras para tratar leishmaniose cutânea localizada ao aumentar a resposta imune em macrófagos infectados por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* e controlar efetivamente o parasitismo nessas células hospedeiras humanas infectadas por *Leishmania* spp. Esses achados abrem caminho para novas abordagens baseadas na modulação imunometabólica no tratamento da leishmaniose e sugerem o reaproveitamento estratégico de medicamentos já utilizados em outras condições clínicas para combater infecções parasitárias persistentes com maior eficácia e segurança clínica aprimorada.

6 CONCLUSÕES

A expressão do transcrito de DHCR7 nas lesões de pacientes com LCL é diminuída em comparação aos controles saudáveis e a expressão de DHCR7 é inversamente correlacionada com a resposta imune pró-inflamatória nas lesões dos pacientes. A inibição do DHCR7, através dos inibidores tamoxifeno e AY9944, reduziu a infecção por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* em macrófagos humanos e aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), TNF e IL-1 β . Esses achados destacam a importância de políticas públicas e maior investimento em pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos e tratamentos para a leishmaniose. A inibição do DHCR7 surge como uma possível abordagem terapêutica, promovendo respostas inflamatórias que podem ajudar no controle da infecção por *Leishmania*.

7 REFERÊNCIAS

- Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, Sereno D 2016. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis* 10: e0004349.
- Akula MK, Shi M, Jiang Z, Foster CE, Miao D, Li AS, Zhang X, Gavin RM, Forde SD, Germain G, Carpenter S, Rosadini CV, Gritsman K, Chae JJ, Hampton R, Silverman N, Gravalles EM, Kagan JC, Fitzgerald KA, Kastner DL, Golenbock DT, Bergo MO, Wang D 2016. Control of the innate immune response by the mevalonate pathway. *Nat Immunol* 17: 922–929.
- Almeida OLS, Santos JB 2011. Advances in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the new world in the last ten years: a systematic literature review. *An Bras Dermatol* 86: 497–506.
- Alonso L, Cardoso ÉJS, Gomes RS, Mendanha SA, Dorta ML, Alonso A 2019. Antileishmanial and cytotoxic activities of ionic surfactants compared to those of miltefosine. *Colloids Surf B Biointerfaces* 183: 110421.
- Alonso L, Menegatti R, Gomes RS, Dorta ML, Luzin RM, Lião LM, Alonso A 2020. Antileishmanial activity of the chalcone derivative LQFM064 associated with reduced fluidity in the parasite membrane as assessed by EPR spectroscopy. *Eur J Pharm Sci* 151: 105407.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Boer M den, WHO Leishmaniasis Control Team 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7: e35671.
- Amorim CF, Novais FO, Nguyen BT, Mistic AM et al. Variable gene expression and parasite load predict treatment outcome in cutaneous leishmaniasis. *Sci Transl Med* 2019 Nov 20;11(519).
- Amorim Sacramento L, Farias Amorim C, G Lombana C, Beiting D et al. CCR5 promotes the migration of pathological CD8⁺ T cells to the leishmanial lesions. *PLoS Pathog* 2024 May;20(5):e1012211.

- Anversa L, Tiburcio MGS, Richini-Pereira VB, Ramirez LE 2018. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. *Rev Assoc Med Bras (1992)* 64: 281–289.
- Ashford RW 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 30: 1269–1281.
- Atri C, Guerfali FZ, Laouini D 2018. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int J Mol Sci* 19: E1801.
- Azevedo TS de, Lorenz C, Chiaravalloti-Neto F 2019. Risk mapping of visceral leishmaniasis in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 52: e20190240.
- Benchimol JL, Gualandi F da C, Barreto DC dos S, Pinheiro L de A 2019. Leishmanioses: sua configuração histórica no Brasil com ênfase na doença visceral nos anos 1930 a 1960. *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Ciênc. hum.* 14: 611–626.
- Bikle DD 2011. Vitamin D metabolism and function in the skin. *Mol Cell Endocrinol* 347: 80–89.
- Borges AF, Gomes RS, Ribeiro-Dias F 2018. Leishmania (Viannia) guyanensis in tegumentary leishmaniasis. *Pathog Dis* 76.
- Campos MB, Lima LV do R, Lima ACS de, Vasconcelos Dos Santos T, Ramos PKS, Gomes CM de C, Silveira FT 2018. Toll-like receptors 2, 4, and 9 expressions over the entire clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis due to Leishmania(V.) braziliensis and Leishmania (L.) amazonensis. *PLoS One* 13: e0194383.
- Coelho AC, Trinconi CT, Senra L, Yokoyama-Yasunaka JKU, Uliana SRB 2015. Leishmania is not prone to develop resistance to tamoxifen. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 5: 77–83.
- Costa Filho AV da, Lucas IC, Sampaio RNR 2008. [Comparative study between oral miltefosine and parenteral N-metil glucamine antimoniate for the treatment of experimental leishmaniasis caused Leishmania (Leishmania) amazonensis]. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 424–427.
- Dos Santos JC, Damen MSMA, Oosting M, Jong DJ de, Heinhuis B, Gomes RS, Araújo CS, Netea MG, Ribeiro-Dias F, Joosten LAB 2017a. The NOD2 receptor is crucial

- for immune responses towards New World Leishmania species. *Sci Rep* 7: 15219.
- Dos Santos JC, Heinhuis B, Gomes RS, Damen MSMA, Real F, Mortara RA, Keating ST, Dinarello CA, Joosten LAB, Ribeiro-Dias F 2017b. Cytokines and microbicidal molecules regulated by IL-32 in THP-1-derived human macrophages infected with New World Leishmania species. *PLoS Negl Trop Dis* 11: e0005413.
- Fan Y-M, Zhang Q-Q, Pan M, Hou Z-F, Fu L, Xu X, Huang S-Y 2024. Toxoplasma gondii sustains survival by regulating cholesterol biosynthesis and uptake via SREBP2 activation. *J Lipid Res* 65: 100684.
- Farias Amorim C, O Novais F, Nguyen BT, Nascimento MT et al. Localized skin inflammation during cutaneous leishmaniasis drives a chronic, systemic IFN- γ signature. *PLoS Negl Trop Dis* 2021 Apr;15(4):e0009321
- Gontijo B, Carvalho M de LR de 2003. [American cutaneous leishmaniasis]. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 71–80.
- Handman E, Bullen DVR 2002. Interaction of Leishmania with the host macrophage. *Trends Parasitol* 18: 332–334.
- Kane MM, Mosser DM 2000. Leishmania parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr Opin Hematol* 7: 26–31.
- Kawai T, Akira S 2007. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13: 460–469.
- Kawasaki T, Kawai T 2014. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol* 5: 461.
- Kim EW, Teles RMB, Haile S, Liu PT, Modlin RL 2018. Vitamin D status contributes to the antimicrobial activity of macrophages against Mycobacterium leprae. *PLoS Negl Trop Dis* 12: e0006608.
- Korade Z, Tallman KA, Kim H-YH, Balog M, Genaro-Mattos TC, Pattnaik A, Mirnics K, Pattnaik AK, Porter NA 2022. Dose-Response Effects of 7-Dehydrocholesterol Reductase Inhibitors on Sterol Profiles and Vesicular Stomatitis Virus Replication. *ACS Pharmacol Transl Sci* 5: 1086–1096.

- Kumar A, Das S, Mandal A, Verma S, Abhishek K, Kumar A, Kumar V, Ghosh AK, Das P 2018. Leishmania infection activates host mTOR for its survival by M2 macrophage polarization. *Parasite Immunol* 40: e12586.
- Ky G, Er G, A G, Sj W, S Y, Em J 2018. Transcriptional profiling identifies novel regulators of macrophage polarization. *PloS one* 13.
- Lalovic A, Merkens L, Russell L, Arsenault-Lapierre G, Nowaczyk MJM, Porter FD, Steiner RD, Turecki G 2004. Cholesterol metabolism and suicidality in Smith-Lemli-Opitz syndrome carriers. *Am J Psychiatry* 161: 2123–2126.
- Li X, Roberti R, Blobel G 2015. Structure of an integral membrane sterol reductase from *Methylomicrobium alcaliphilum*. *Nature* 517: 104–107.
- Liu C-I, Liu GY, Song Y, Yin F, Hensler ME, Jeng W-Y, Nizet V, Wang AH-J, Oldfield E 2008. A cholesterol biosynthesis inhibitor blocks *Staphylococcus aureus* virulence. *Science* 319: 1391–1394.
- Machado PR, Ampuero J, Guimarães LH, Villasboas L, Rocha AT, Schriefer A, Sousa RS, Talhari A, Penna G, Carvalho EM 2010. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e912.
- Menezes JPB de, Guedes CES, Petersen AL de OA, Fraga DBM, Veras PST 2015. Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. *Biomed Res Int* 2015: 815023.
- Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JKU, Andreoli WK, Mortara RA, Uliana SRB 2007. Tamoxifen is effective against *Leishmania* and induces a rapid alkalization of parasitophorous vacuoles harbouring *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes. *J Antimicrob Chemother* 60: 526–534.
- Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JKU, Uliana SRB 2008. Tamoxifen is effective in the treatment of *Leishmania amazonensis* infections in mice. *PLoS Negl Trop Dis* 2: e249.
- Moebius FF, Fitzky BU, Lee JN, Paik YK, Glossmann H 1998. Molecular cloning and expression of the human delta7-sterol reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 1899–1902.

- M, Bloom BR, Modlin RL 2014. IL-32 is a molecular marker of a host defense network in human tuberculosis. *Sci Transl Med* 6: 250ra114.
- Moreira LO, Zamboni DS 2012. NOD1 and NOD2 Signaling in Infection and Inflammation. *Front Immunol* 3: 328.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet*
- Novais FO, Carvalho LP, Passos S, Roos DS, Carvalho EM, Scott P, Beiting DP 2015. Genomic profiling of human *Leishmania braziliensis* lesions identifies transcriptional modules associated with cutaneous immunopathology. *J Invest Dermatol* 135: 94–101.
- Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira RV, Marzochi MC, Andrade CA 2011. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Tropica* 118: 87–96.
- Peeples ES, Mirnics K, Korade Z 2024. Chemical Inhibition of Sterol Biosynthesis. *Biomolecules* 14: 410.
- Pijpers J, Boer ML den, Essink DR, Ritmeijer K 2019. The safety and efficacy of miltefosine in the long-term treatment of post-kala-azar dermal leishmaniasis in South Asia - A review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 13: e0007173.
- Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin J-C, Barrett MP, López-Vélez R, García-Hernández R, Pountain AW, Mwenechanya R, Papadopoulou B 2017. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl Trop Dis* 11: e0006052.
- Sacks, D., Noben-Trauth, N. A imunologia da suscetibilidade e resistência à *Leishmania major* em camundongos. *Nat Rev Immunol* 2 , 845–858 (2002). <https://doi.org/10.1038/nri933>
- Sacramento LA, Farias Amorim C, Campos TM, Saldanha M et al. NKG2D promotes CD8 T cell-mediated cytotoxicity and is associated with treatment failure in human cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 2023 Aug;17(8):e0011552.
- Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A 1988. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong

- to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J Exp Med* 168: 1675–1684.
- Scott P, Novais FO 2016. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol* 16: 581–592.
- Silva LL de L, Gomes RS, Silva MVT, Joosten LAB, Ribeiro-Dias F 2020. IL-15 enhances the capacity of primary human macrophages to control *Leishmania braziliensis* infection by IL-32/vitamin D dependent and independent pathways. *Parasitol Int* 76: 102097.
- Silveira FT, Lainson R, De Castro Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CEP 2009. Immunopathogenic competences of *Leishmania* (V.) *braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology* 31: 423–431.
- Soong L, Henard CA, Melby PC 2012. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. *Semin Immunopathol* 34: 735–751.
- Soto J, Soto P 2006. Miltefosine: oral treatment of leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 4: 177–185.
- Spann NJ, Glass CK 2013. Sterols and oxysterols in immune cell function. *Nat Immunol* 14: 893–900
- Speen AM, Hoffman JR, Kim H-YH, Escobar YN, Nipp GE, Rebuli ME, Porter NA, Jaspers I 2019. Small Molecule Antipsychotic Aripiprazole Potentiates Ozone-Induced Inflammation in Airway Epithelium. *Chem Res Toxicol* 32: 1997–2005.
- Tall AR, Yvan-Charvet L 2015. Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 15: 104–116.
- Tomiotto-Pellissier F, Bortoleti BT da S, Assolini JP, Gonçalves MD, Carloto ACM, Miranda-Sapla MM, Conchon-Costa I, Bordignon J, Pavanelli WR 2018. Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. *Front Immunol* 9: 2529.
- Wang H, Cui B, Yan H, Wu S, Wang K, Yang G, Jiang J, Li Y 2023. Targeting 7-

- dehydrocholesterol reductase against EV-A71 replication by upregulating interferon response. *Antiviral Res* 209: 105497.
- Wu Y, Lin X, Song F, Xue D, Wang Y 2022. Vitamin D3 promotes autophagy in THP-1 cells infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Exp Ther Med* 23: 240.
- Xiao J, Li W, Zheng X, Qi L, Wang H, Zhang C, Wan X, Zheng Y, Zhong R, Zhou X, Lu Y, Li Z, Qiu Y, Liu C, Zhang F, Zhang Y, Xu X, Yang Z, Chen H, Zhai Q, Wei B, Wang H 2020. Targeting 7-Dehydrocholesterol Reductase Integrates Cholesterol Metabolism and IRF3 Activation to Eliminate Infection. *Immunity* 52: 109-122.e6.
- Xue J, Schmidt SV, Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, De Nardo D, Gohel TD, Emde M, Schmidleithner L, Ganesan H, Nino-Castro A, Mallmann MR, Labzin L, Theis H, Kraut M, Beyer M, Latz E, Freeman TC, Ulas T, Schultze JL 2014. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* 40: 274–288.
- Young AR, Morgan KA, Harrison GI, Lawrence KP, Petersen B, Wulf HC, Philipsen PA 2021. A revised action spectrum for vitamin D synthesis by suberythemal UV radiation exposure in humans in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118: e2015867118.
- Zavala K, Gottlieb CA, Teles RM, Adams JS, Hewison M, Modlin RL, Liu PT 2018. Intrinsic activation of the vitamin D antimicrobial pathway by *M. leprae* infection is inhibited by type I IFN. *PLoS Negl Trop Dis* 12: e0006815.
- Zdrenghea MT, Makrinioti H, Bagacean C, Bush A, Johnston SL, Stanciu LA 2017. Vitamin D modulation of innate immune responses to respiratory viral infections. *Rev Med Virol* 27.
- Zewdie KA, Hailu HG, Ayza MA, Tesfaye BA 2022. Antileishmanial Activity of Tamoxifen by Targeting Sphingolipid Metabolism: A Review. *Clin Pharmacol* 14: 11–17.
- Zhang T-P, Chen S-S, Zhang G-Y, Shi S-J, Wei L, Li H-M 2021. Association of vitamin D pathway genes polymorphisms with pulmonary tuberculosis susceptibility in a Chinese population. *Genes Nutr* 16: 6.
- Zhang Y, Wang X, Liu Y, Qu H, Qu S, Wang W, Ren L 2012. The GC, CYP2R1 and DHCR7 genes are associated with vitamin D levels in northeastern Han Chinese

children. *Swiss Med Wkly* 142: w13636.