

MANOEL FONSECA SANTOS OLIVEIRA

Participação do Receptor para PAF e LPC na Biologia Celular
e Fisiologia Mitocondrial em *Trypanosoma cruzi*



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
JUNHO / 2021**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Angela Hampshire de Carvalho Santos Lopes e coorientação de Felipe Soares Coelho.

CIP - Catalogação na Publicação

O48p Oliveira, Manoel Fonseca Santos
 Participação do Receptor para PAF e LPC na
 Biologia Celular e Fisiologia Mitocondrial em
 Trypanosoma cruzi / Manoel Fonseca Santos Oliveira.
 -- Rio de Janeiro, 2021.
 49 f.

 Orientadora: Angela Hampshire de Carvalho Santos
 Lopes.
 Coorientador: Felipe Soares Coelho.
 Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
 Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
 de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
 Microbiologia e Imunologia, 2021.

 1. Lipídeos Bioativos. 2. ROS. 3. Morte Celular
 Programada. 4. Tripanossomatídeos. I. Lopes, Angela
 Hampshire de Carvalho Santos, orient. II. Coelho,
 Felipe Soares, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO
RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Manoel Fonseca Santos Oliveira**

DRE: 117055740

BANCA EXAMINADORA: Profa. Dirlei Nico (Presidente)
Dra. Isabel Cristina de Faria Moreira
Profa. Danielle Pereira Vieira Silveira
Profa. Ana Maria Mazotto de Almeida (Suplente)

Título da Monografia: **“Participação do receptor para PAF e LPC na biologia celular e fisiologia mitocondrial em *Trypanosoma cruzi*”**


Local: Sala virtual <https://meet.google.com/kcx-ajij-dpn>


Data e hora de início: **01 de junho de 2021 às 10:00h**

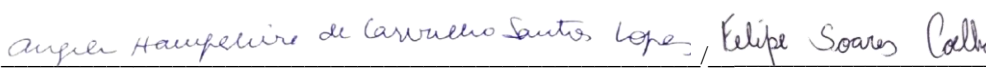
Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

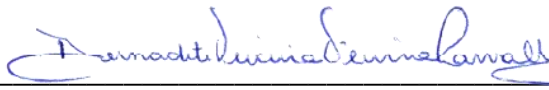
Rio de Janeiro, 01 de junho de 2021.

NOTA	Banca Examinadora:
10,0	Profa. Dirlei Nico
10,0	Dra. Isabel Cristina de Faria Moreira
10,0	Profa. Danielle Pereira Vieira Silveira
_____	Profa. Ana Maria Mazotto de Almeida

Presidente da banca: 
Profa. Dirlei Nico

Aluno: 
Manoel Fonseca Santos Oliveira

Orientador: 
Profa. Angela Hampshire de Carvalho Santos Lopes / Coorientador: Dr. Felipe Soares Coelho

Coordenador: 
de TCC Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, eu gostaria de agradecer à minha mãe Fátima e irmã Amanda, que sempre apoiaram minhas escolhas e nunca me pressionaram em nada. Eu tive muita sorte de crescer em um lar onde nunca houve julgamentos e com pessoas que me incentivaram em cada etapa da minha vida e em todos os meus objetivos, por mais confusos e inconstantes que eles pudessem ser. Certamente sem vocês dando todo o suporte que eu precisei pra chegar até aqui, hoje eu não estaria escrevendo essa monografia. Vocês são incríveis e parte fundamental disso. Agradeço à toda minha família pelo ambiente harmônico e acolhedor em que eu pude crescer e pelo apoio por todos esses anos.

Eu agradeço imensamente à professora Angela por ter aceitado me orientar lá no segundo período da faculdade, por me receber tão bem no seu laboratório e por enxergar em mim o que nem eu mesmo via. Agradeço também ao Felipe e à Camila por terem sido excelentes coorientadores e por estarem sempre dispostos a me ensinar e me ajudar no que quer que eu precisasse, estando ligado ou não ao laboratório. Também à Amanda, por ter sido uma grande parceira e amiga e ter dividido comigo os dias de luta e os dias de glória desse projeto; e à Isabel, que me recebeu muito bem no meu primeiro dia no LBM e esteve sempre solícita desde então, e por todas as tardes que saímos pra comprar besteiras pra comer e reclamar da vida junto com a Amanda e com o Felipe. Muito obrigado a todos os membros do LBM que eu pude conviver ao longo da minha iniciação científica – Angela, Felipe, Isabel, Amanda, Juliana, Camila, Inês, Ariane, Fernanda, Paulo, Adriana, Cíntia e Mariana. Vocês me acolheram e fizeram do laboratório uma segunda casa para mim. Se eu voltasse no tempo e tivesse que escolher um laboratório para IC novamente, eu não teria nenhuma hesitação a escolher o LBM.

Agradeço muito aos membros da banca e à suplente por terem aceitado avaliar essa monografia, e à Caroline Mendes e ao professor Marcus Fernandes pela colaboração e enriquecimento desse trabalho. Agradeço também às agências de fomento responsáveis pela contribuição financeira para a execução desse trabalho, principalmente ao CNPq, que contribuiu com o recurso que pagava a minha bolsa.

Agradeço também a todos os narutinhos – Thaís, Gustavo, Ariane, Giulia, Luis, Letícia e Lucas – que tornaram a graduação incrível mesmo com todos os perrengues que passamos. Agradeço por todos os passeios de Biodiversidade, pelos nossos quizes na véspera das provas, pelos resumos (que só eu mandava), pelas piadas e memes, por todas as conversas francas e desabafos e principalmente pela amizade, a qual eu sei que levaremos adiante no pós-faculdade,

independente dos rumos que iremos tomar daqui pra frente. Também agradeço à Mariana e à Ágatha, duas pessoas incríveis que eu tive o prazer de conhecer e conviver no Ensino Médio e que agora são companheiras de Fundão, embora em cursos distintos. Muito obrigado por terem estado comigo todos esses anos me apoiando e me incentivando. Obrigado por todas as reuniões que fizemos na casa de um de nós três pra comer, desabafar e falar mal da faculdade. Muito obrigado também às meninas do Pedro II – Nádia, Sara, Rachel, Mayra, Jayane, Rayane, Carina e Letícia – pelo apoio, desabafos, companheirismo e pela amizade que permanece intacta mesmo após anos.

Muito obrigado a todos que contribuíram com esse trabalho e com o meu bem estar durante a execução dele. Dado a todo preconceito e ignorância que ainda existem no mundo, ser um LGBT e ter um ambiente saudável e de suporte entre familiares, amigos e colegas de trabalho é um presente o qual eu sou muito grato.

And to the ones I love
Know that you're the reason why
I dare to live my life,
I dare to liberate my mind.
You're running through my veins.
Make me come alive.

Adrenaline - Rupaul

RESUMO

Manoel Fonseca Santos Oliveira

PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR PARA PAF E LPC NA BIOLOGIA CELULAR E FISIOLOGIA MITOCONDRIAL EM *TRYPANOSOMA CRUZI*

Orientador: Angela Hampshire de Carvalho Santos Lopes

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Trypanosoma cruzi é um protozoário parasita heteroxênico e agente etiológico da doença de Chagas, considerada uma doença negligenciada, que afeta de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo todo. Já foi visto que fosfolipídeos, tais como o fator de ativação de plaquetas (PAF) e a lisofosfatidilcolina (LPC), apresentam diversas funções em eucariotos, incluindo tripanossomatídeos, onde medeiam processos celulares como proliferação, diferenciação celular e infectividade. Nosso grupo identificou um receptor putativo para PAF e LPC em *T. cruzi* (TcPAFR) e produziu fenótipos mutantes *knockdown* (KD) e nocaute (KO) para o gene que codifica este receptor. A análise ultraestrutural prévia, feita por microscopia eletrônica de transmissão, revelou alterações na morfologia e na ultraestrutura mitocondrial dos parasitos KO quando comparadas com as células selvagens (WT). Desta maneira, o objetivo do presente trabalho é avaliar a importância desse receptor na biologia celular e em aspectos da fisiologia mitocondrial em *T. cruzi*. Comparando as curvas de crescimento durante 7 dias, os parasitos KO revelaram ter uma capacidade proliferativa significativamente inferior, em relação ao WT e KD, a partir do 5º dia. Embora tanto WT quanto os mutantes tenham se mostrado viáveis pela marcação com iodeto de propídio, observou-se um indicativo de maior taxa de células em apoptose-*like* entre os parasitos KO. Mesmo com as alterações ultraestruturais observadas na mitocôndria desses mutantes, não foi observada qualquer alteração no consumo de oxigênio quando comparados com o WT e KD. No entanto, os mutantes KO apresentaram redução no potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) e elevado teor de ROS. O conjunto desses resultados sugere a importância do TcPAFR no ciclo de vida do *T. cruzi*, e que sua deleção impacta sua proliferação. Sugerimos que os parasitos mutantes KO regulam sua fosforilação oxidativa por um mecanismo ainda a ser estudado, para sustentar um consumo de oxigênio a níveis normais e assim se manterem vivos. Este trabalho sugere a importância do receptor para PAF e LPC em mecanismos básicos de sobrevivência do *T. cruzi*, o que pode ser explorado como um alvo potencial para quimioterapia experimental contra a doença de Chagas.

Palavras Chaves: Lipídeos bioativos; ROS; morte celular programada; tripanossomatídeos.

ABSTRACT

Manoel Fonseca Santos Oliveira

PAF AND LPC RECEPTOR PARTICIPATION IN CELLULAR BIOLOGY AND MITOCHONDRIAL PHYSIOLOGY IN *TRYPANOSOMA CRUZI*

Orientador: Angela Hampshire de Carvalho Santos Lopes

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Trypanosoma cruzi is a heteroxenic parasitic protozoan and etiologic agent of Chagas disease, considered a neglected disease, which affects 6 to 7 million people worldwide. It has already been shown that phospholipids, such as platelet activating factor (PAF) and lysophosphatidylcholine (LPC), have several functions in eukaryotes, including trypanosomatids, where they mediate cellular processes such as proliferation, cell differentiation and infectivity. Our group identified a putative PAF and LPC receptor in *T. cruzi* (TcPAFR) and produced knockdown (KD) and knockout (KO) mutant phenotypes for the gene encoding this receptor. Previous ultrastructural analysis by means of transmission electron microscopy, showed changes in the morphology and mitochondrial ultrastructure of the KO parasites when compared to wildtype parasites (WT). Thus, the objective of the present work is to evaluate the importance of this receptor in cell biology and mitochondrial physiology in *T. cruzi*. Comparing the growth curves for 7 days, the KO parasites have a significantly lower proliferative capacity, in relation to the WT and KD parasites, beginning at the 5th day. Although both WT and the mutants were viable, as shown by the propidium iodide method, we observed an indication of a higher rate of apoptosis-like cells among KO parasites. Even with the ultrastructural changes observed in the mitochondria of these mutants, no changes in oxygen consumption were observed when compared with WT and KD. However, KO mutants showed a reduction in membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and high ROS contents. We suggest that the KO mutant parasites regulate their oxidative phosphorylation by a mechanism yet to be studied to sustain oxygen consumption at normal levels in order to stay alive. This set of results suggests the importance of PAF and LPC receptor in basic survival mechanisms of *T. cruzi*, such as proliferation and aerobic metabolism, which can be exploited as a potential target for experimental chemotherapy against Chagas disease.

Palavras Chaves: Bioactive lipids; ROS; programmed cell death; trypanosomatids.

RESUMO PARA PESSOAS LEIGAS

Manoel Fonseca Santos Oliveira

PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR PARA PAF E LPC NA BIOLOGIA CELULAR E FISILOGIA MITOCONDRIAL EM *TRYPANOSOMA CRUZI*

Orientador: Angela Hampshire de Carvalho Santos Lopes

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Trypanosoma cruzi é o causador da doença de Chagas, que embora seja uma doença que afeta o mundo todo, principalmente os países mais pobres, recebe muito pouco financiamento para pesquisa, tratamento e prevenção, por parte dos governos. Nosso grupo de pesquisa tem estudado por anos os efeitos de duas moléculas, o fator de ativação de plaquetas (PAF) e a lisofosfatidilcolina (LPC), na biologia do *T. cruzi* e de outros parasitas da mesma família. Com nossa pesquisa, temos observado que PAF e LPC são capazes de estimular vários processos importantes nesses microrganismos, como sua capacidade de se multiplicar, de mudar de forma e de causar infecções, o que significa que estes parasitas dependem dessas moléculas para sobreviverem e causarem doenças em humanos e animais. Sabendo que essas duas moléculas interagem com *T. cruzi* através de um receptor presente na sua superfície, nós produzimos parasitas da espécie *T. cruzi*, geneticamente modificados, para não apresentarem mais esse receptor. Com isso, observamos que a remoção do receptor desencadeia sérias consequências para o parasita. Assim, este trabalho tem como objetivo estudar quais são essas consequências, que poderão servir como base para estudos de desenvolvimento de medicamentos para o combate mais eficaz à doença de Chagas.

Palavras-chave: Lipídeos bioativos; ROS; morte celular programada; tripanossomatídeos.

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
RESUMO PARA PESSOAS LEIGAS.....	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Tripanossomatídeos.....	1
1.1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> e doença de Chagas.....	3
1.2. Mitocôndria e Espécies Reativas de Oxigênio.....	6
1.3. Morte Celular Programada	9
1.3.1. Apoptose	10
1.4. Fator de Ativação de Plaquetas e Lisofosfatidilcolina	12
1.4.1. Receptor de PAF e LPC em <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVOS	19
4. METODOLOGIA.....	19
4.1. Meios e Tampões.....	19
4.2. Cultivo dos parasitos	20
4.3. Ensaio de proliferação.....	20
4.4. Viabilidade celular.....	20
4.5. Ensaio de apoptose	21
4.6. Espécies reativas de oxigênio	21
4.7. Potencial de membrana mitocondrial.....	22
4.8. Respirometria de alta resolução	22
4.9. Análise Estatística	23
5. RESULTADOS	23
5.1. Proliferação, Viabilidade Celular e Apoptose.....	23
5.2. Potencial de Membrana Mitocondrial, ROS e Consumo de Oxigênio	25
6. DISCUSSÃO	27
7. CONCLUSÃO.....	30
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tripanossomatídeos

Os tripanossomatídeos (classe Kinetoplastea, ordem Tripanossomatida, família Tripanosomatidae) são protozoários parasitas unicelulares que apresentam características morfológicas distintas, ao longo de seu ciclo de vida. Esses diferentes morfotipos, resumidos na Figura 1, dizem respeito ao tamanho e forma da célula e à posição do cinetoplasto em relação à bolsa flagelar e ao núcleo, mas também às suas características bioquímicas, nutricionais e ultraestruturais. Esses protozoários pode ter um ciclo de vida monoxênico ou dixênico (Quadro 1), isto é, necessitam de um ou dois hospedeiros diferentes para completa-lo respectivamente, parasitando uma enorme variedade de invertebrados, vertebrados e plantas (Lopes *et al.*, 2010; Maslov *et al.*, 2012; Lukes *et al.*, 2018).

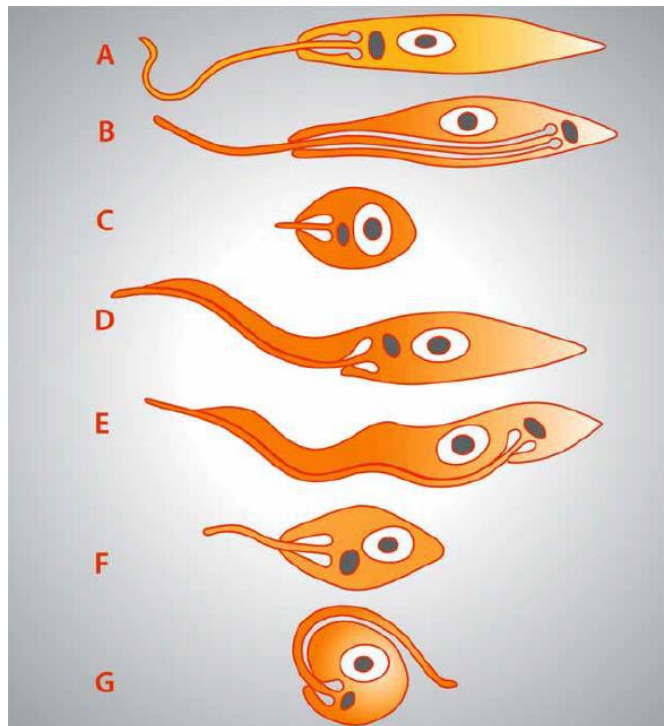
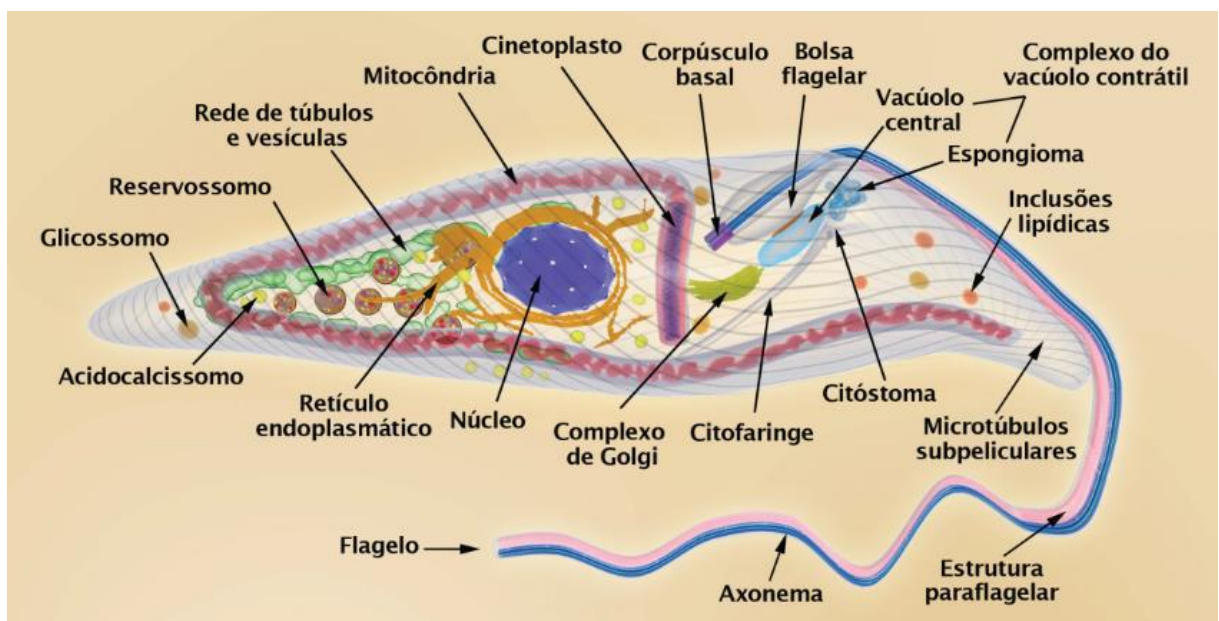


Figura 1 – Os morfotipos mais comuns apresentados pelos tripanossomatídeos. **A.** promastigota; **B.** opistomastigota; **C.** amastigota; **D.** epimastigota; **E.** tripomastigota; **F.** coanomastigota; **G.** esferomastigota. Obtido de Lopes *et al.*, 2010.

Quadro 1 – Gêneros de tripanosomatídeos já descritos. Adaptado de Kaufer *et al.*, 2017.

Monoxênicos		Dixênicos
<i>Angomonas</i>	<i>Lotmania</i>	<i>Endotrypanum</i>
<i>Blastocrithidia</i>	<i>Novymonas</i>	<i>Leishmania</i>
<i>Blechomonas</i>	<i>Paratrypanosoma</i>	<i>Phytomonas</i>
<i>Crithidia</i>	<i>Sergeia</i>	<i>Porcisia</i>
<i>Herpetomonas</i>	<i>Stringomonas</i>	<i>Trypanosoma</i>
<i>Kentomonas</i>	<i>Wallaceina</i>	
<i>Leptomonas</i>	<i>Zelonia</i>	

Esses protozoários apresentam microtúbulos subpeliculares logo abaixo da membrana plasmática distribuídos por todo o corpo celular, exceto na bolsa flagelar, região na qual emerge o flagelo único presente em todos os morfotipos (Teixeira *et al.*, 2011). Como em outros membros da classe Kinetoplastea, parte da via glicolítica é compartimentalizada nos glicossomos, organelas que tornam a glicólise mais eficiente. Os glicossomos, junto com o citoplasma e a mitocôndria, são sítios do metabolismo energético nos tripanossomatídeos. Na mitocôndria e próximo à bolsa flagelar se localiza o cinetoplasto, região que abriga o DNA mitocondrial (Lopes *et al.*, 2010). Essas e outras estruturas presentes nos tripanossomatídeos se encontram resumidas e esquematizadas na Figura 2.

**Figura 2** - Principais estruturas e organelas encontradas na forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*. Obtido de Teixeira *et al.*, 2011.

1.1.1. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas

Trypanosoma cruzi é um protozoário heteroxênico que apresenta três morfotipos (Figura 3) ao longo de seu ciclo de vida, sendo eles amastigota, tripomastigota e epimastigota. É o causador da doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, uma doença negligenciada endêmica em 21 países da América Latina. Tradicionalmente a doença se confinava à zona rural, mas a urbanização e migração interna a tornaram também periurbana e urbana. Graças à diversidade dos meios de transmissão e a globalização das rotas de imigração, estima-se que de 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo (Perez, Lymberly e Thompson, 2015; WHO, 2020).

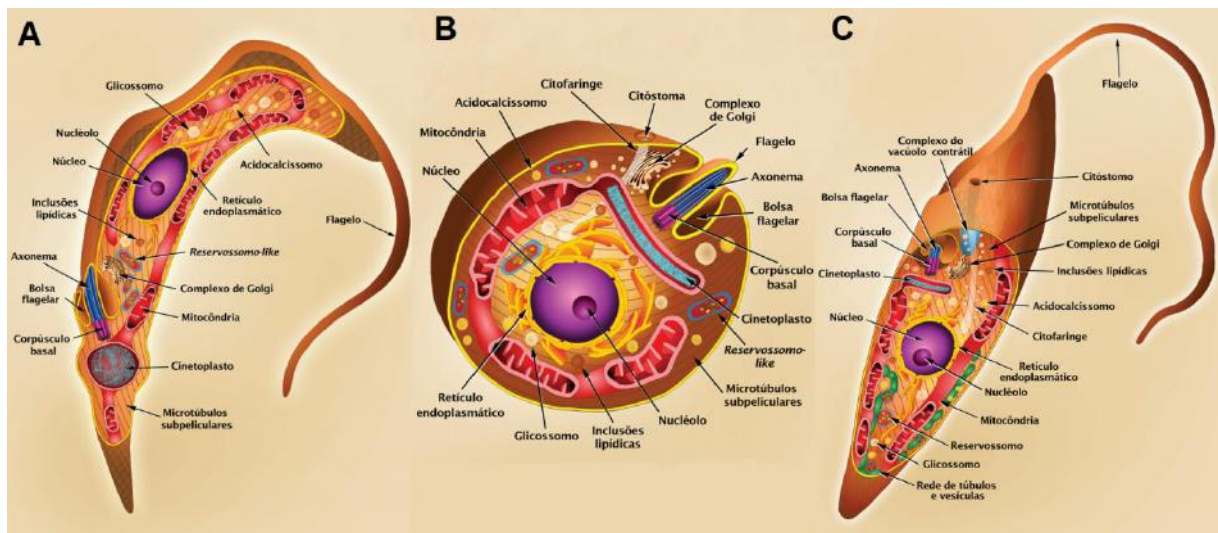


Figura 3 - Morfotipos apresentados por *Trypanosoma cruzi* durante seu ciclo de vida. **A.** tripomastigota; **B.** amastigota; **C.** epimastigota. Adaptado de Teixeira *et al.*, 2011.

O protozoário é transmitido principalmente via vetorial pelas fezes de três gêneros principais de triatomíneos, amplamente distribuídos na América Latina: *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* (Pérez-Molina e Molina, 2018). Esses insetos, que possuem hábitos hematófagos e noturnos, depositam suas fezes contaminadas com o *T. cruzi* próximas ao local da picada, permitindo a inoculação deste protozoário na corrente sanguínea. Além disso, ocasionalmente há a transmissão oral pela ingestão de sumos de frutas ou de cana de açúcar contendo fezes contaminadas de triatomíneos. Em contrapartida, outras rotas de transmissão têm maior importância em regiões não endêmicas, apesar de ocorrerem muito raramente em regiões endêmicas, como a transmissão vertical durante o parto e a transmissão via transfusão de sangue, transplante de órgãos ou acidentes de laboratório (Pérez-Molina e Molina, 2018; WHO, 2020).

O ciclo de vida do *T. cruzi* (Figura 4) é complexo. Quando a transmissão é vetorial, formas tripomastigotas metacíclicas são depositadas junto às fezes, próximo ao local da picada feita pelo vetor triatomíneo durante o repasto sanguíneo. No hospedeiro vertebrado, *T. cruzi* infecta as células no sítio de entrada, onde se diferencia para a forma amastigota, escapa do complexo vacúolo parasitóforo-lisossomo para o citoplasma, onde se replica por fissão binária, e depois torna a se diferenciar em tripomastigota. Estes tripomastigotas rompem a célula e são liberados na corrente sanguínea, sendo chamados, portanto, de tripomastigotas sanguíneos, e são capazes de infectar uma grande diversidade de células do hospedeiro. Dentro dessas células, podem voltar a se diferenciar em amastigotas e dar continuidade à replicação. O hospedeiro invertebrado (vetor) se contamina quando ingere o sangue contendo as formas tripomastigotas sanguíneas de um hospedeiro infectado. Em seu intestino médio, se diferenciam em epimastigotas, que se replicam e, já no intestino posterior, se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, que serão eliminados nas fezes (CDC, 2020).

A doença de Chagas se manifesta em duas fases. A fase aguda se inicia de 1 a 2 semanas após a exposição ao *T. cruzi* e pode ser assintomática ou apresentar sinais e sintomas leves e inespecíficos, incluindo febre, dor de cabeça, inflamação no local da picada (chagoma de inoculação), linfadenopatia, dores musculares, dificuldade de respirar, sudorese e desconforto abdominal e torácico. Também pode estar presente na fase aguda o sinal de Romaña (edema palpebral unilateral), que pode direcionar o diagnóstico da doença. Embora esses sintomas se resolvam espontaneamente em 90% dos casos, a pessoa permanece cronicamente infectada se não fizer uso de drogas tripanocidas. A maior parte dessas pessoas permanecerá com a chamada forma indeterminada da doença, caracterizada por soropositividade para *T. cruzi* e ausência de sinais clínicos, manifestações cardíacas ou digestivas. Apenas 30 a 40% delas irá evoluir para a fase crônica sintomática de 10 a 30 anos depois. Esta fase é caracterizada por cardiomiopatia ou megaesôfago e/ou megacólon, além de possíveis manifestações neurológicas (Figura 4) (Rassi, Rassi e Marin-Neto, 2010; Bombeiro *et al.*, 2010, 2012; Perez-Molina e Molina, 2018; WHO, 2020).

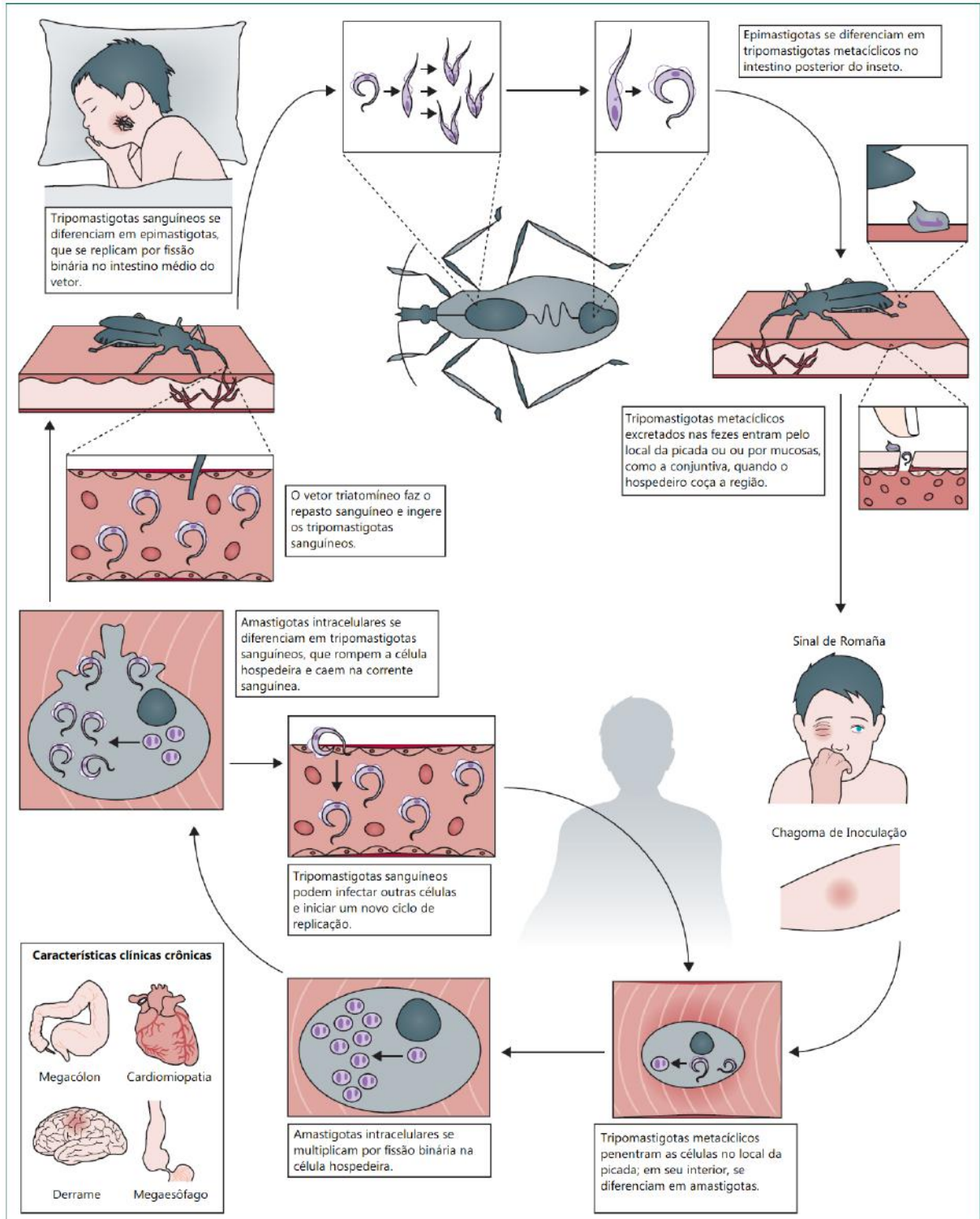


Figura 4 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* e algumas das manifestações clínicas da doença de Chagas. Adaptado de Pérez-Molina e Molina, 2018.

As únicas duas drogas utilizadas para o tratamento da doença de Chagas são o benznidazol e o nifurtimox, que possuem uma alta eficácia se administradas nos estágios mais iniciais da doença, auxiliando a retardar ou prevenir sua progressão. Entretanto, ambas apresentam efeitos colaterais e têm sua eficácia reduzida em pacientes crônicos e/ou com idade

avançada. No Brasil, apenas o benzonidazol é licenciado. O uso desses medicamentos é feito preferencialmente em pacientes em fase aguda ou indeterminada, quando a doença for congênita ou reativada pelo uso de imunossupressores e em pacientes menores de 18 anos em fase crônica. Entretanto, por falta de outros medicamentos, frequentemente os outros pacientes são tratados com essas drogas, com resultados variáveis. Para as manifestações cardíacas e gastrointestinais é feito o controle dos sintomas, já que não há um tratamento específico (Pérez-Molina e Molina, 2018; WHO, 2020).

1.2. Mitocôndria e Espécies Reativas de Oxigênio

A mitocôndria tem por função ser sítio da descarboxilação do piruvato, do ciclo do ácido cítrico e da cadeia transportadora de elétrons, sendo responsável pela produção de quase todo o ATP que será utilizado como energia pela célula. Outros processos, tais como a β -oxidação, degradação e síntese de aminoácidos, homeostase de cálcio, regulação da morte celular programada e outros, também são desempenhados pela mitocôndria (Nagajyothi e Weiss, 2019).

Os tripanossomatídeos possuem uma única mitocôndria tubular, alongada e ramificada que se estende pelo corpo celular abaixo dos microtúbulos subpeliculares (Figura 2). A mitocôndria desses protozoários também tem por característica uma matriz mais densa e diferenças no número e no formato das cristas mitocondriais. Seu volume e atividade variam não somente quanto à espécie, mas também quanto à forma evolutiva em que o tripanossomatídeo se apresenta, refletindo as condições nutricionais encontradas a cada novo hospedeiro (Lopes *et al.*, 2010; Fidalgo e Gille, 2011).

Na matriz mitocondrial se encontra o cinetoplasto, uma região geralmente em formato de disco achatado e perpendicular ao eixo do flagelo, que abriga o DNA mitocondrial (kDNA, DNA do cinetoplasto) (Lopes *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2011). O kDNA é composto por uma densa rede de círculos concatenados de dois tipos que se apresentam de forma topologicamente relaxada: os maxicírculos são maiores, menos abundantes e codificam subunidades de complexos respiratórios e proteínas ribossomais; já os minicírculos, menores e muito mais abundantes, são transcritos em RNA guias que são necessários para a edição dos transcritos gerados pelos maxicírculos. Uma parte muito pequena das proteínas mitocondriais são sintetizadas na mitocôndria e, neste caso, requerem que tRNAs sejam importados porque o genoma mitocondrial dos tripanossomatídeos não os codifica. A maior parte das proteínas mitocondriais é sintetizada no citoplasma e depois importada (Lopes *et al.*, 2010; Tomás e Castro, 2013).

Embora a mitocôndria única dos tripanossomatídeos apresente diferenças em relação aos outros eucariotos, ela também está sujeita a alterações de sua forma e função como resposta ao ambiente do hospedeiro, de forma que alterações em seu metabolismo energético afetem sua morfologia (Menna-Barreto e De Castro, 2014). Ao contrário da corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, o intestino médio do triatomíneo é um ambiente pobre em glicose e rico em aminoácidos, principalmente histidina, graças à intensa atividade de degradação de proteínas do plasma (Atwood *et al.*, 2005; Bringaud, Rivière e Coustou, 2006). As formas epimastigotas de *T. cruzi* são altamente capazes de metabolizar histidina até glutamato, e posteriormente em succinato, tornando-as muito mais dependentes da cadeia transportadora de elétrons e apresentando elevada respiração e potencial de membrana mitocondrial em comparação com os altamente glicolíticos tripomastigotas (Atwood *et al.*, 2005; Gonçalves *et al.*, 2011; Barisón *et al.*, 2016).

A funcionalidade do complexo I em tripanossomatídeos é muito debatida, já que apresenta uma atividade de NADH desidrogenase muito baixa e é incapaz de bombear prótons pela membrana mitocondrial para contribuir com o gradiente de prótons, embora apresente todas as subunidades necessárias para transferir os elétrons para a ubiquinona. Ele possui baixa sensibilidade à rotenona, um inibidor de complexo I em quase todos os organismos (Carranza *et al.*, 2009; Opperdoes e Michels, 2008; Tomás e Castro, 2013). Também já foi detectada a presença de uma NADH desidrogenase do tipo II (DHII) incapaz de realizar bombeamento de prótons, insensível à rotenona e com flavina como cofator, sendo um potencial ponto de entrada de elétrons na cadeia respiratória na forma procíclica de *Trypanosoma brucei*, com presença de sequências ortólogas no genoma de *T. cruzi* e de *Leishmania* sp. (Fang e Beattie, 2003). Também está presente em tripanossomatídeos uma glicerol-3-fosfato desidrogenase (G3PDH), que oxida glicerol-3-fosfato proveniente da glicólise, utilizando NAD como cofator e alimentando a cadeia transportadora de elétrons (Opperdoes *et al.*, 1997).

A presença de um transporte de elétrons do complexo II ao IV já foi demonstrada em tripanossomatídeos. Nesses organismos, o produto final predominante do metabolismo glicolítico é o succinato, que vai servir como o principal ponto de entrada de elétrons na cadeia respiratória a partir do complexo II (Carranza *et al.*, 2009). Os elétrons do complexo II, e potencialmente aqueles provenientes do complexo I, da DHII e da G3PDH, são transportados pela ubiquinona para o complexo III, onde serão transferidos para o citocromo c e posteriormente para o complexo IV (Tomás e Castro, 2013).

Em *T. brucei* existe uma segunda oxidase terminal, além do complexo IV, chamada de oxidase alternativa de tripanossomas (TAO), que recebe diretamente os elétrons da ubiquinona

e, por isso, é independente de citocromos. A forma sanguínea deste protozoário tem uma produção de energia principalmente via glicólise e muitas atividades mitocondriais são suprimidas, o que se reflete na falta de citocromos e consequente respiração exclusiva via TAO (Lopes *et al.*, 2010; Tomás e Castro, 2013).

Esses componentes e características da cadeia transportadora de elétrons dos tripanossomatídeos se encontram resumidas na Figura 5.

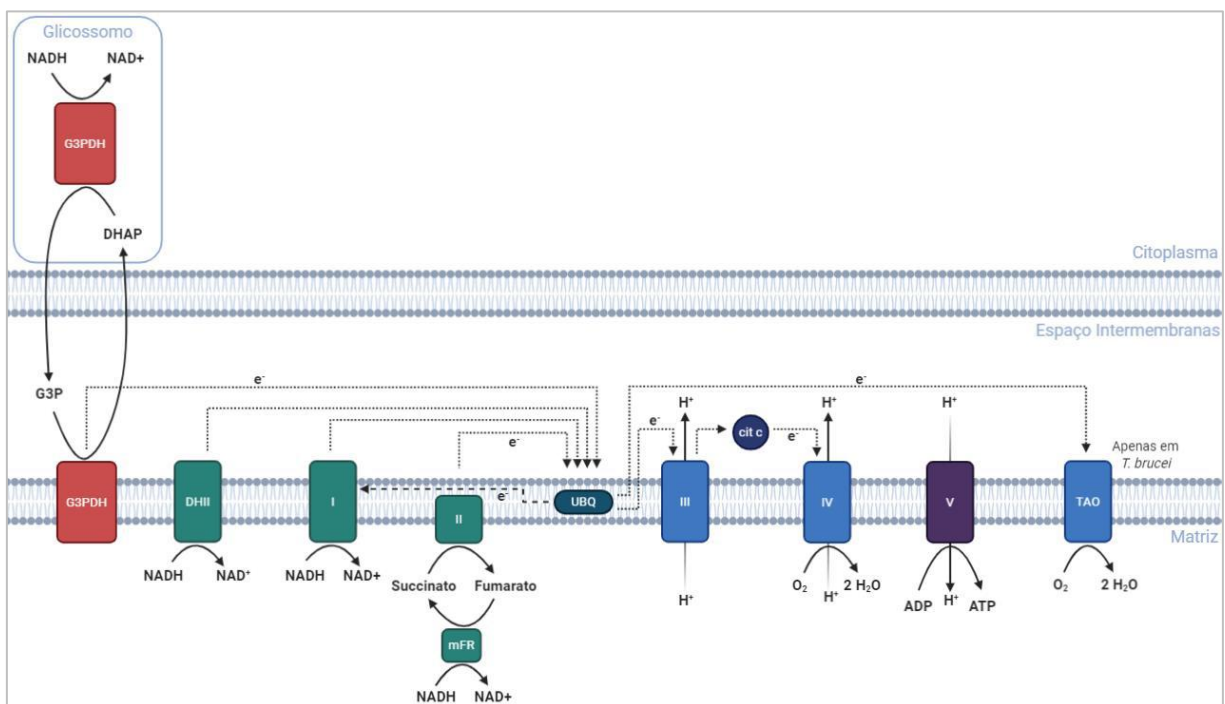


Figura 5 – Resumo do fluxo de elétrons ao longo da cadeia transportadora de elétrons (CTE) em tripanossomatídeos. G3PDH, glicerol-3-fosfato desidrogenase; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; G3P, glicerol-3-fosfato; DHII, NADH desidrogenase do tipo II; I-VI, complexos I a IV; V, ATP sintase; UBQ, ubiquinona; cit c, citocromo c; TAO, oxidase alternativa de tripanossomas; mFR, fumarato redutase mitocondrial. As setas pontilhadas esquematizam o fluxo normal de elétrons ao longo da CTE e a seta tracejada mostra o fluxo inverso. Esquema feito utilizando a plataforma online BioRender. Adaptado de Tomás e Castro, 2013.

Na maioria dos eucariotos, a respiração mitocondrial é a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (ROS) da célula. Elas são principalmente produzidas quando os elétrons transferidos pela cadeia respiratória escapam e acabam transformando o oxigênio em superóxido, que é posteriormente dismutado em H_2O_2 pela superóxido dismutase ou por redução espontânea (Boveris e Chance, 1973; Loschen *et al.*, 1974). Esse fenômeno ocorre mais facilmente de acordo com o estado redox da cadeia transportadora de elétrons já que com um alto potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) seus componentes ficam mais reduzidos, facilitando o vazamento de elétrons (Korshunov, Skulachev e Starkov, 1997). Entretanto, em

muitas outras enzimas mitocondriais já foi reportada a produção de ROS por escape de elétrons (Addabbo, Montagnani, e Goligorsky, 2009). Em tripanossomatídeos, a produção mitocondrial de ROS já foi anteriormente reportada mediante vários estímulos (Alzate *et al.*, 2007; Piacenza *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2010). Apesar das diferenças em sua cadeia transportadora de elétrons em relação aos outros eucariotos, tal qual comentado anteriormente, ela pode funcionar como fonte de ROS para esses organismos (Addabbo, Montagnani, e Goligorsky, 2009).

Embora apresentem efeitos tóxicos para a célula quando em níveis não controlados, as ROS também desempenham um papel importante em cascatas de sinalização dependentes do equilíbrio redox. Já foi descrito que o peróxido de hidrogênio e outros radicais livres atuam como sinalizadores no controle do ciclo celular, resposta ao estresse, metabolismo energético e equilíbrio redox (Dröge, 2002; Addabbo, Montagnani e Goligorsky, 2009; Brigelius-Flohé e Flohé, 2011). Em *T. cruzi*, já foi demonstrado que a produção de ROS induzida por heme potencializa a proliferação do protozoário ao ativar uma calmodulina cinase II-like e modulando sua bioenergética (Nogueira *et al.*, 2011, 2017).

Por outro lado, quando fora de controle, as ROS podem causar danos oxidativos às estruturas celulares, levando à morte da célula. A título de exemplo, as ROS podem reagir com ácidos graxos poli-insaturados, gerando lipídeos peroxidados altamente eletrofílicos e capazes de interagir com proteínas e ácidos nucleicos. A oxidação das cadeias insaturadas da cardiolipina, um fosfolípido aniônico em que uma das funções é fixar o citocromo c na membrana interna mitocondrial, leva à liberação do citocromo c. Esses eventos são capazes de ativar a cascata de apoptose, levando à morte celular (Ott, Zhivotovsky e Orrenius, 2007; Sano e Fukuda, 2008). Em tripanossomatídeos, fenótipos de morte celular programada também já foram associados à produção de ROS (Alzate *et al.*, 2007; Piacenza *et al.*, 2007; Bombaça *et al.*, 2018).

1.3. Morte Celular Programada

A morte celular é caracterizada pelo colapso dos processos metabólicos, desencadeada por algum estímulo (Menna-Barreto, 2019). Organismos multicelulares utilizam a morte celular de maneira organizada para regular o balanço entre a geração de novas células pela divisão celular e a eliminação de células que não são mais necessárias ou defeituosas. Dessa maneira, esse processo, quando programado e em homeostase, é fisiológico e promove a manutenção tecidual (D'Arcy, 2019).

A morte celular programada em tripanosomatídeos patogênicos tem sido descrita como um fator limitante à sua proliferação, virulência e patogenicidade, funcionando como um

mecanismo de controle da densidade celular, que garante o sucesso de sua transmissão ao hospedeiro seguinte (Debrabant *et al.*, 2003; Proto, Coombs e Mottram, 2012). A forma promastigota metacíclica de *Leishmania* sp. entra em estado de senescência e morte celular se não transmitida a um hospedeiro vertebrado, limitando a quantidade de parasitos que pode ser nociva ao vetor (Proto, Coombs e Mottram, 2012). Além disso, já foi demonstrado que o inóculo infeccioso de *Leishmania major* no hospedeiro vertebrado contém protozoários viáveis e mortos e que as células mortas estimulam o silenciamento de macrófagos, aumentando a sobrevivência das células viáveis (Van Zandbergen *et al.*, 2006). Embora estudos experimentais *in vivo* sejam necessários, já foi proposto que a prostaglandina D2 liberada pela forma *stumpy* de *T. brucei* induz uma apoptose-like, que impede o crescimento populacional desenfreado e consequentemente aumenta a sobrevivência do hospedeiro (Figarella *et al.*, 2006).

1.3.1. Apoptose

A apoptose é um processo fisiológico essencial para a renovação tecidual e eliminação de células não funcionais sem o desencadeamento de uma resposta inflamatória, desempenhando também um papel importante na defesa do organismo contra patógenos intracelulares e contra o desenvolvimento de câncer (Menna-Barreto, 2019).

Em organismos multicelulares, a maquinaria de apoptose é ativada por vias intrínsecas ou extrínsecas (Figura 6). A via extrínseca é ativada a partir da ligação de fatores pró-apoptóticos externos, liberados por células imunes, a seus respectivos receptores. Já a via intrínseca é ativada quando a célula detecta um dano através de seus sensores intracelulares e, neste caso, pode envolver a participação da mitocôndria ou do retículo endoplasmático. A regulação dos eventos que ocorrem após o estímulo de ativação da apoptose é complexa e envolve um balanço entre os sinais promovidos por diferentes moléculas pró- e anti-apoptóticas, principalmente os membros da família Bcl-2 (D'Arcy, 2019; Menna-Barreto, 2019).

Diferentes cascatas de eventos orquestradas pela ativação de proteases conhecidas como caspases ocorrem dependendo de qual via de apoptose foi ativada, culminando em marcadores típicos, como: condensação e fragmentação da cromatina; formação de poros na membrana externa mitocondrial, que ocasionam perda de potencial e liberação de proteínas do espaço intermembranar para o citoplasma; *flip-flop* da fosfatidilserina para face externa da membrana plasmática; destruição de proteínas nucleares e do citoesqueleto; expressão de ligantes para células fagocíticas; encolhimento celular, entre outros. Todos esses eventos levarão à fragmentação da célula em corpos apoptóticos que, revestidos de ligantes para células fagocíticas, são rapidamente fagocitados. Como não há estímulo para a indução de uma resposta

inflamatória, o risco de dano colateral às células vizinhas é minimizado (Proto, Coombs e Mottram, 2012; D’Arcy, 2019).

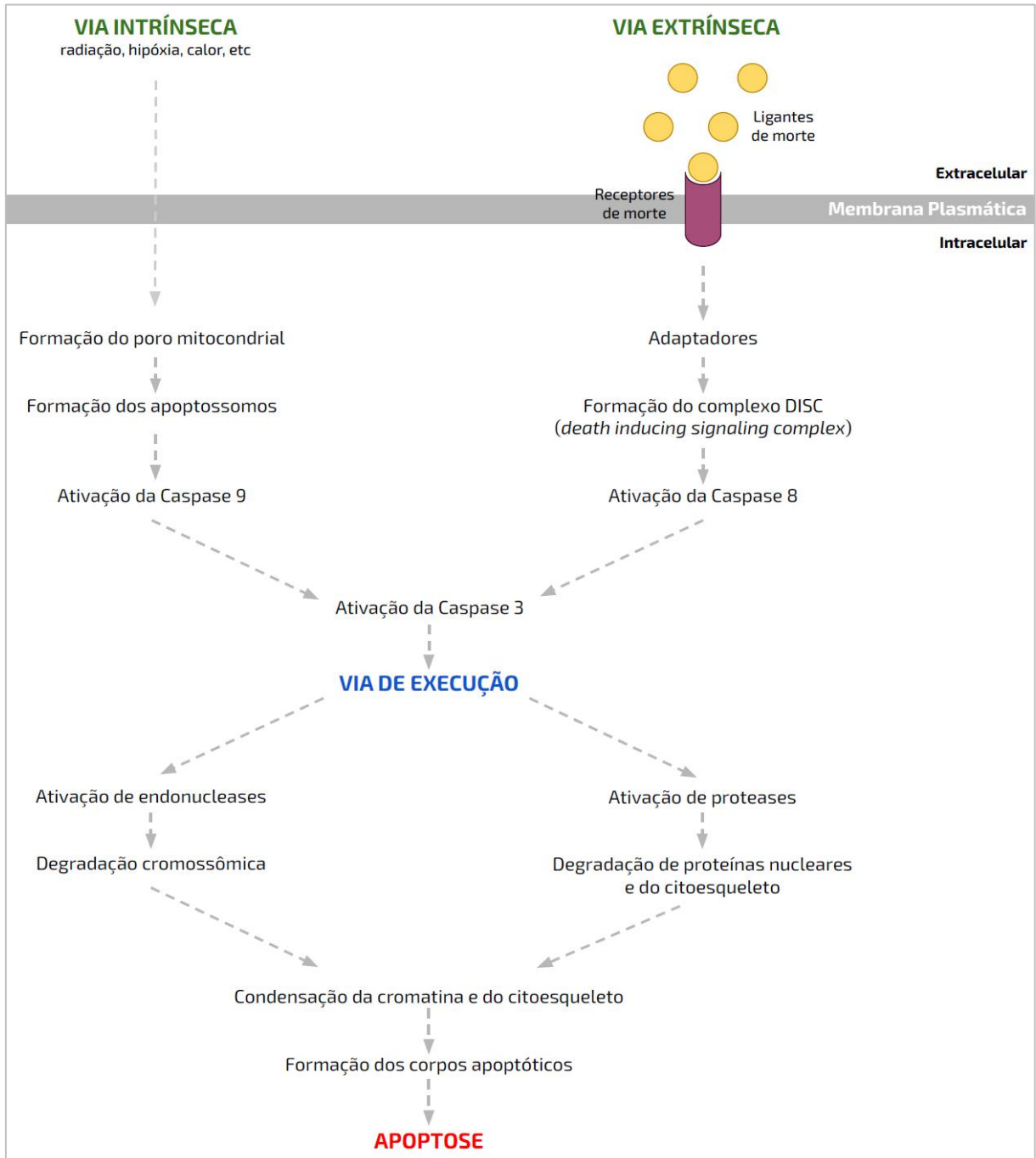


Figura 6 – Resumo da via intrínseca e extrínseca e dos principais eventos que levam à morte celular apoptótica em organismos pluricelulares. Adaptado de D’Arcy, 2019.

Vários autores já descreveram marcadores de apoptose de eucariotos superiores em tripanossomatídeos quando estes são submetidos a condições de estresse como choque térmico, ROS e drogas (Das, Mukherjee e Shaha, 2001; Debrabant *et al.*, 2003; Duszenko *et al.*, 2006;

Figarella *et al.*, 2006; Dos Anjos *et al.*, 2016). No entanto, vários reguladores importantes da apoptose ou moléculas com atividade similar ainda não foram descritos (Duszenko *et al.*, 2006; Menna-Barreto, 2019). Por causa disso, a existência ou não da apoptose em protozoários e através de quais mecanismos moleculares ela ocorreria ainda é muito debatido, por isso convém-se chamar esse processo de apoptose-like. Nesses organismos, a identificação da apoptose-like se restringe à fragmentação do DNA, *flip-flop* da fosfatidilserina, perda do $\Delta\Psi_m$ e liberação do citocromo c (Menna-Barreto, 2019).

A apoptose-like independente de caspases já foi proposta (Mukherjee *et al.*, 2002; BoseDasgupta *et al.*, 2008). Embora as caspases não estejam presentes em tripanossomatídeos, as estruturalmente similares metacaspases já foram descritas nesses protozoários, embora até então sem qualquer evidência de atividade caspase-like (Menna-Barreto, 2019). Além disso, por apresentarem diversas outras funções já reportadas, ainda não há consenso se metacaspases e caspases são correlatas e se deveriam pertencer ao mesmo clã de proteínas (Meslin *et al.*, 2011).

A superexpressão da metacaspase de *L. major* aumenta sua sensibilidade ao estresse oxidativo, conforme medido pelo aumento da exposição da fosfatidilserina e alterações no potencial da membrana mitocondrial (Zalila *et al.*, 2011), embora também já tenha sido descrita como tendo um papel importante na progressão do ciclo celular deste protozoário (Ambit *et al.*, 2007). A metacaspase de *L. major* pode substituir a metacaspase com atividade de caspase-like de *Saccharomyces cerevisiae* mantendo sua função e induzindo a apoptose dessa levedura (González *et al.*, 2007). As duas metacaspases de *T. cruzi* são translocadas do citoplasma para o núcleo quando os epimastigotas são tratados com soro humano fresco, apresentando um fenótipo de apoptose-like que se reflete na perda da morfologia e motilidade, condensação da cromatina e fragmentação do DNA (Kosec *et al.*, 2006). O triplo silenciamento das três metacaspases da forma sanguínea de *T. brucei* não impacta a morte celular desse protozoário e sim sua progressão do ciclo celular (Helms *et al.*, 2006).

1.4. Fator de Ativação de Plaquetas e Lisofosfatidilcolina

O fator de ativação de plaquetas (1-*O*-alquil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfolina; PAF) é um fosfolípido derivado da fosfatidilcolina produzido por uma grande variedade de células. Sua concentração e regulação enzimática determinam seus efeitos, que podem ser fisiológicos (agregação de plaquetas, diferenciação celular, angiogênese, manutenção do tônus vascular, apoptose, inflamação, entre outros) ou patológicos, que levam a condições ou doenças inflamatórias como alergia, asma, aterosclerose e diabetes, para citar algumas

(Papakonstantinou *et al.*, 2017). O PAF atua via um receptor de PAF (PAFR) já bem caracterizado e pertencente à família dos receptores acoplados à proteína G (GPCR), apresentando sete domínios transmembrana e estando presente na membrana plasmática de células que respondem a ele, incluindo plaquetas, macrófagos, leucócitos, células do músculo liso, células endoteliais, entre outras. Sua interação com este receptor leva à ativação de várias cascatas de sinalização dentro da célula, que culminam na ativação de fatores de transcrição associados a diversas funções celulares (Snyder, 1995; Honda, Ishii e Shimizu, 2002; Papakonstantinou *et al.*, 2017). Também foi descrita a presença do PAFR e outros GPCRs na membrana nuclear de células endoteliais (Marrache *et al.*, 2002, 2005; Zhu *et al.*, 2006; Bhosle *et al.*, 2016).

Nosso grupo já identificou o PAF como uma molécula capaz de modular diversos processos celulares em tripanossomatídeos. Ele é capaz de potencializar a diferenciação celular de *Herpetomonas muscarum muscarum* (Lopes *et al.*, 1997) e *Trypanosoma cruzi* (Rodrigues *et al.*, 1996), através da modulação da atividade de uma ectofosfatase nestes protozoários (Dutra *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 1999). O PAF também aumenta a atividade da caseína cinase 2 (CK2) em *H. m. muscarum* (Silva-Neto *et al.*, 2002) e em *Leishmania tropica* (Dutra *et al.*, 2009), além de aumentar a infecção de *Leishmania amazonensis* em macrófagos peritoneais de camundongo (Rosa *et al.*, 2001). Também foi visto que este fosfolípídeo aumenta o índice de associação de *T. cruzi* a macrófagos peritoneais de camundongo (Gomes *et al.*, 2006) e ao inseto vetor *Rhodnius prolixus* (Zimmermann *et al.*, 2010).

Em 2006, nosso grupo identificou um fosfolípídeo com atividade PAF-like, isolado de *T. cruzi*, capaz de promover agregação plaquetária e de aumentar diferenciação celular do parasito e sua infecção em macrófagos peritoneais de camundongo, a partir de uma sinalização autócrina (Gomes *et al.*, 2006). Em 2014, essa molécula foi caracterizada como uma lisofosfatidilcolina da espécie C18:1 (1-oleoil-2-hidroxi-*sn*-glicero-3-fosfolina), estruturalmente semelhante à molécula de PAF e capaz de se ligar e ativar o receptor de PAF humano (Figura 7) (Gazos-Lopes *et al.*, 2014).

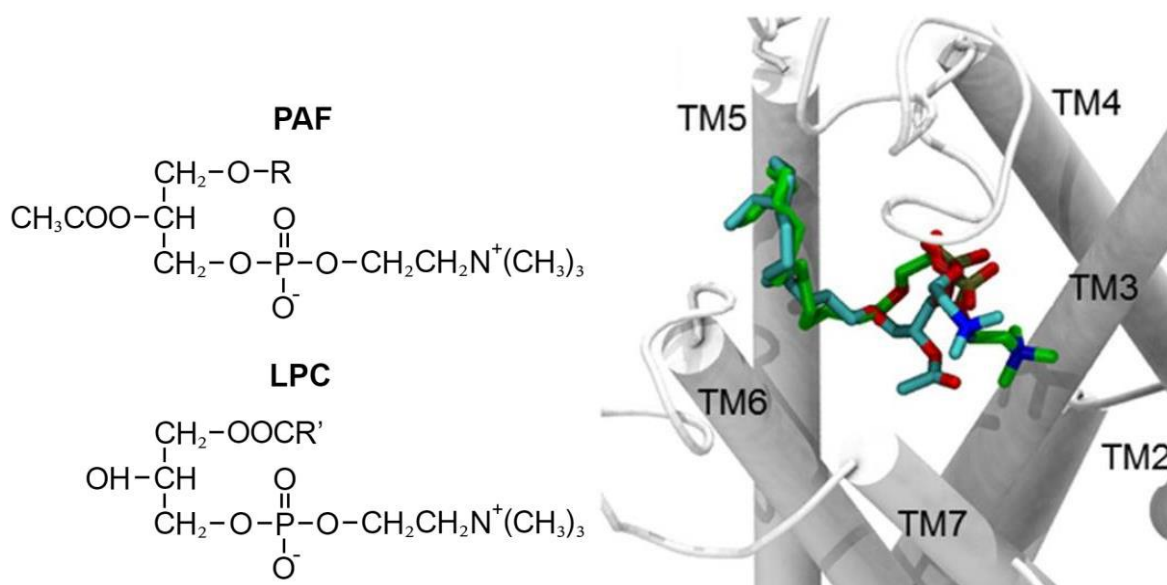


Figura 7 – Similaridades entre as moléculas de PAF e LPC C18:1. À esquerda, comparação das estruturas moleculares. À direita, PAF (ciano) e LPC (verde) se ligam de forma similar ao receptor de PAF humano (cinza). Adaptado de Gazos-Lopes *et al.*, 2014.

Lisofosfatidilcolina (LPC) é uma classe de fosfolipídeos envolvida na indução da proliferação, diferenciação, inflamação, apoptose e estresse oxidativo em mamíferos, além de estar associada a diversas doenças inflamatórias crônicas (Liu *et al.*, 2020). As LPCs podem ser produzidas a partir da clivagem da fosfatidilcolina (PC) pela fosfolipase A2 ou transferência de ácidos graxos para um colesterol livre, pela lecitina-colesterol aciltransferase, gerando LPCs saturadas. LPCs insaturadas são geradas a partir da clivagem do HDL-PC pelas lipases endotelial e hepática (Chiurchiù, Leuti e Maccarrone, 2018; Law *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020). Muitos receptores podem ser ativados por LPC, incluindo vários GPCRs, como G2A (Yang *et al.*, 2004) e GPR4 (Qiao *et al.*, 2006), receptor de prostaciclina e receptor de tromboxano A2 (Rao *et al.*, 2013) e o próprio receptor de PAF (Huang *et al.*, 1999), além de receptores do tipo Toll, como TLR2 e TLR4 (Carneiro *et al.*, 2013).

A presença da LPC já foi descrita na saliva de um dos vetores da doença de Chagas, *Rhodnius prolixus*, onde atua como molécula anti-hemostática e imunomoduladora. Neste contexto, a LPC não só atua como um quimiotático, atraindo células imunes que poderão ser infectadas pelo protozoário, mas também interfere em sua resposta imune, aumentando a concentração intracelular de cálcio e inibindo a produção de óxido nítrico por macrófagos infectados, contribuindo para o sucesso da infecção inicial do *T. cruzi* no local da picada (Golodne *et al.*, 2003; Mesquita *et al.*, 2008; Silva-Neto, Lopes e Atella, 2016). Além disso, *T. cruzi* (Gazos-Lopes *et al.*, 2014), *Leishmania* sp. (Ramos *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2010) e *T. brucei* (Werbovets e Englund, 1996) são capazes de sintetizar PC e LPC e mais de 50% do

conteúdo lipídico secretado por *T. cruzi* no meio de cultura é composto por estes lipídeos (Agusti *et al.*, 2000). Recentemente, nosso grupo evidenciou que a LPC é capaz de aumentar a diferenciação celular de *Herpetomonas samuelpessoai*, modulando a via da CK2 (Dutra *et al.*, 2019). Também já foi demonstrado que a LPC aumenta a proliferação e a diferenciação de *T. cruzi* (Chagas-Lima *et al.*, 2019).

1.4.1. Receptor de PAF e LPC em *Trypanosoma cruzi*

Mesmo sabendo que em mamíferos PAF e LPC atuam em receptores de membrana, dentre eles os GPCRs, não há relatos sobre a presença da proteína G em tripanossomatídeos (El-Sayed *et al.*, 2005). Ainda assim, nosso grupo observou, ao longo dos anos, que o uso do antagonista do receptor de PAF, WEB 2086, é capaz de promover a reversão dos efeitos desencadeados por PAF e LPC nesses protozoários, o que foi um forte indicativo da presença de um receptor de PAF nesses microrganismos. De fato, em 2006, ensaios de imunofluorescência utilizando um anticorpo comercial para o PAFR de mamífero revelou a presença deste receptor, ou de similar, na membrana plasmática e dentro da célula de epimastigotas de *T. cruzi* (Gomes *et al.*, 2006). Como já foi dito, LPC C18:1 se liga e ativa o receptor de PAF humano (Gazos-Lopes *et al.*, 2014), o que nos faz acreditar que tanto PAF quanto LPC atuam sobre *T. cruzi* via PAFR presente neste protozoário. Por causa disso, nosso grupo iniciou uma busca de um potencial candidato a receptor de PAF em *T. cruzi*.

Kawano e colaboradores já haviam sugerido a presença de 62 candidatos para o TcPAFR (Kawano *et al.*, 2011). A partir desses resultados, nosso grupo realizou uma busca por aqueles que continham sete regiões transmembrana e resíduos de ligação ao PAF, mas não interagissem com a proteína G. Também foi identificada a presença de genes ortólogos em *Leishmania* sp., gênero em que já havíamos descrito como responsivo à molécula de PAF (Rosa *et al.*, 2001; Dutra *et al.*, 2009). Alguns dos candidatos analisados se destacaram por possuírem também o domínio hemolisina-like, cujo homólogo em leveduras está envolvido no metabolismo lipídico e de fosfato. Ao final da seleção, apenas um candidato proteico satisfazia todos esses requisitos e seus genes codificantes foram nocauteados, originando dois fenótipos mutantes de TcPAFR putativo: *knockdown* (KD), que apresenta expressão reduzida deste receptor, e nocaute (KO), que não expressa o TcPAFR (Oliveira, 2014; Coelho, 2018).

Em 2018, Coelho observou que o perfil de diferenciação e de infecção em macrófagos peritoneais de camundongo entre os parasitos selvagens (*wild type*, WT) e KD era bem similar, mas somente os parasitos WT tinham sua diferenciação e infecção potencializada de maneira significativa, quando tratados com PAF ou LPC, um efeito que é revertido mediante tratamento

prévio com o WEB 2086. Para prosseguir com a caracterização do TcPAFR putativo, foi feita uma modelagem molecular deste receptor, o que indicou se tratar de um homólogo da superfamília de receptores de progesterona e adiponectina (PAQR), e que foi capaz de acomodar as moléculas de PAF, LPC e WEB 2086 (Coelho, 2018).

Em mamíferos, a superfamília dos PAQRs é composta por 11 membros, dentre os quais os PAQR1 e 2 são receptores de adiponectina, os PAQR5, 7 e 8 são receptores de progesterona e os demais apresentam funções ainda pouco conhecidas. Sua classificação é baseada na presença de sete domínios transmembrana, flanqueados por três alças com motivos de aminoácidos específicos. Apesar de possuírem sete domínios transmembrana, assim como os GPCRs, os PAQRs não interagem com a proteína G e possuem topologia invertida, com a região N-terminal voltada para o meio intracelular e a C-terminal para o extracelular (Heiker, Kosel e Beck-Stinger, 2010). É sugerido que os PAQRs estejam presentes em uma ampla variedade de organismos. Sabe-se que PAQRs procarióticos se assemelham às proteínas do tipo hemolisina III e que o homólogo dos PAQR1 e 2 em leveduras, YOL002c, está envolvido na regulação do metabolismo lipídico e de fosfato (Tang *et al.*, 2005).

Uma análise de distância *p*, feita posteriormente por Coelho, revelou que o TcPAFR é mais próximo do PAQR4. De fato, quando a estrutura do TcPAFR é sobreposta à estrutura do PAQR4 humano, é possível observar um alto índice de similaridade entre os dois receptores (Figura 8) (Coelho, 2018). O PAQR4, assim como seu homólogo PAQR3, têm sido descritos nos últimos anos como envolvidos em diversos tipos de câncer. O PAQR3 tem sido tratado como um supressor de tumor, apresentando baixa expressão em células tumorais. O PAQR3 é o regulador espacial da Raf-1, sequestrando essa proteína para o complexo de Golgi e bloqueando a cascata de sinalização Ras/Raf/MEK/ERK, que tem um importante papel de regulação da proliferação celular, apoptose, diferenciação, motilidade e metabolismo em células de diversos tumores humanos (Feng *et al.*, 2007; Fan *et al.*, 2008; Chappell *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2015). De maneira oposta, o PAQR4 é altamente expresso em tecidos e linhagens celulares de câncer. A redução da expressão de PAQR4 mediante o *knockdown* do gene promove queda significativa da proliferação, migração, apoptose e invasão celular no câncer de estômago (Feng *et al.*, 2018). Além disso, o aumento da expressão deste receptor parece estar relacionado à queda da taxa de sobrevivência ao câncer de mama (Pedersen *et al.*, 2020) e à quimiorresistência no câncer de pulmão (Xu *et al.*, 2020).

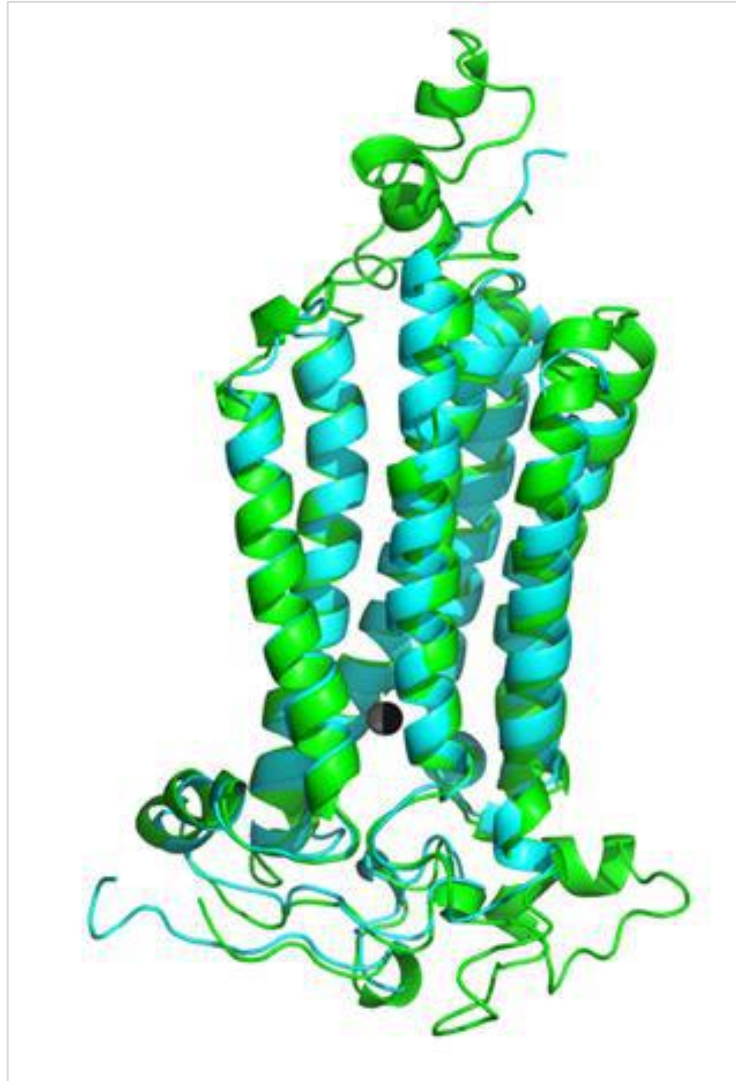


Figura 8 - Sobreposição das estruturas do TcPAFR (verde) e do PAQR4 humano (ciano). Obtido de Coelho, 2018.

2. JUSTIFICATIVA

Por anos, nosso grupo tem demonstrado como PAF e LPC potencializam diversos aspectos da biologia dos tripanossomatídeos, seja diferenciação celular (Rodrigues *et al.*, 1996; Dutra *et al.*, 2019), interação com o inseto vetor (Zimmermann *et al.*, 2010) ou infecção de células *in vitro* (Rosa *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2006). A descoberta de um receptor para estas moléculas lipídicas em *T. cruzi* nos dá mais uma peça do quebra-cabeça, ao mesmo tempo em que desdobra muitas outras perguntas a serem respondidas.

O nocaute desse receptor teve consequências interessantes para o protozoário. Nós observamos uma lentificação de seu crescimento em cultura, quando comparado com o mutante KD e a célula selvagem. Além disso, não conseguimos obter formas diferenciadas dos

protozoários KO após a infecção em cultura de células LLC-MK2 como comumente fazemos com WT e KD. De forma surpreendente, o mutante KO mas não o KD apresentou alterações em sua ultraestrutura, com uma morfologia celular alterada e uma mitocôndria que mostra indícios de fragmentação, perdendo suas características clássicas de ser alongada e tubular e percorrendo todo o corpo celular, além de apresentarem maior abundância de gotas lipídicas no citoplasma (Figura 9).

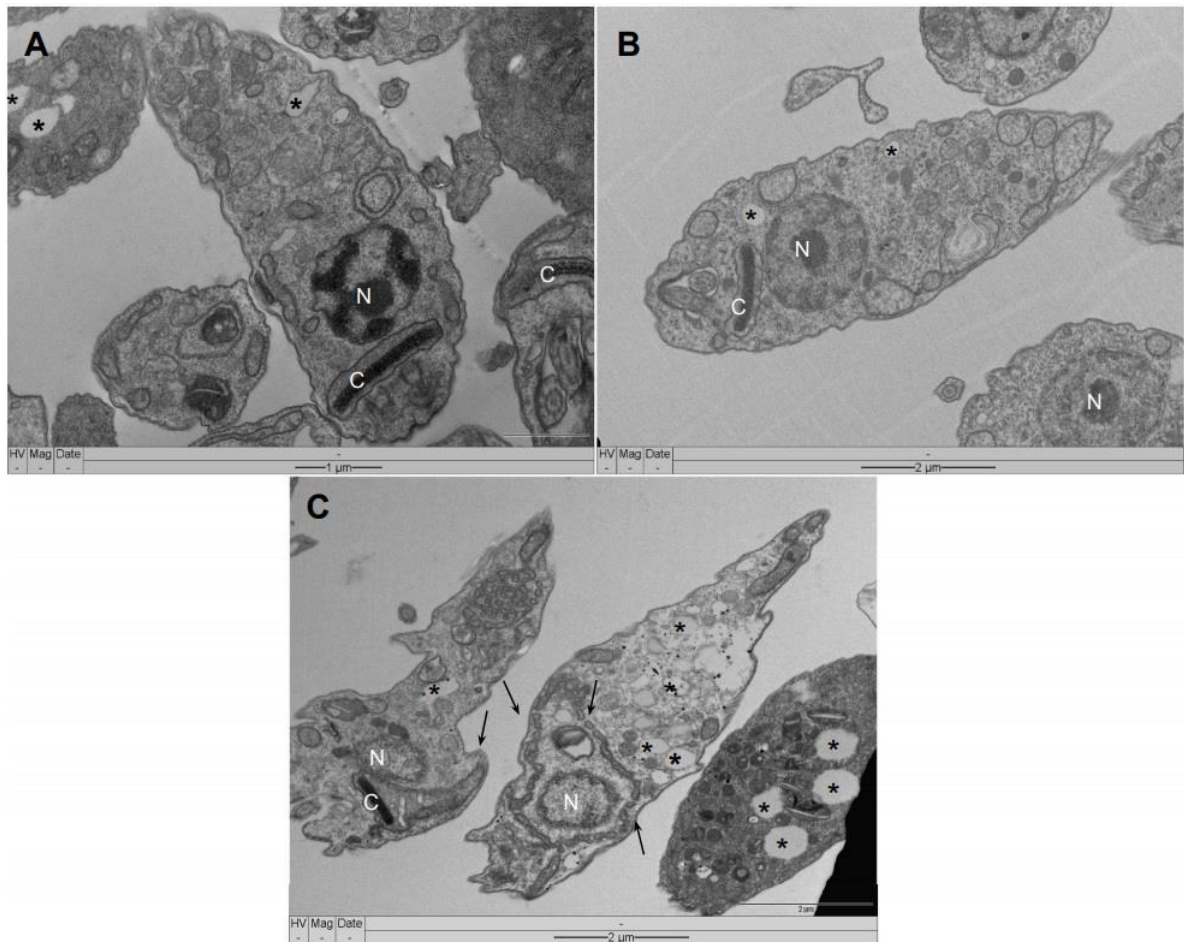


Figura 9 – Microscopia eletrônica de transmissão dos parasitos selvagens (A) e KD (B) e KO (C) para o TcPAFR. Asteriscos marcam inclusões lipídicas e setas alterações na ultraestrutura mitocondrial. N: núcleo, C: cinetoplasto.

Essas alterações intrigantes nos fizeram questionar se o receptor dessas moléculas lipídicas poderia estar envolvido em processos celulares fundamentais em *T. cruzi*, e este trabalho é o passo inicial para elucidar isso. A investigação dessas características ultraestruturais e das consequências fisiológicas da deleção do TcPAFR podem fornecer uma base para outros estudos, que possam levar a novas quimioterapias experimentais para a doença de Chagas.

3. OBJETIVOS

Tendo em vista a já anteriormente indicada influência das moléculas de PAF e LPC em *T. cruzi*, bem como as alterações mitocondriais observadas com a deleção do receptor de PAF/LPC neste protozoário, o presente trabalho busca avaliar a participação do receptor de PAF/LPC na biologia celular e na fisiologia mitocondrial da cepa Dm28c de *T. cruzi*, na forma epimastigota. Para isto, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

1. Identificar possíveis alterações na capacidade proliferativa dos parasitos nocaute para o TcPAFR de *T. cruzi*.
2. Comparar a viabilidade celular entre os parasitos selvagem e com nocaute para o TcPAFR.
3. Estudar a fisiologia mitocondrial dos parasitos nocaute para o TcPAFR de *T. cruzi*, em busca de alterações em sua capacidade respiratória, $\Delta\Psi_m$ e produção de ROS que possam estar associadas com as alterações mitocondriais, observadas em microscopia eletrônica de transmissão, após a deleção do receptor.
4. Examinar se os parasitos em questão estão entrando em morte celular programada, como apoptose, como possível consequência da deleção deste receptor.

4. METODOLOGIA

4.1. Meios e Tampões

Infusão de Fígado e Triptose

Liver Infusion Tryptose (LIT)

75.3 mM NaCl
 5.4 mM KCl
 10 mM glicose
 56.4 mM Na₂HPO₄
 0.5% bacto-triptose
 0.5% infusão de fígado
 0.0025% hemina
 pH 7.2

Solução Balanceada de Sais de Hank

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)

8.0 g/l NaCl
 0.4 g/l KCl
 0.14 g/l CaCl₂
 0.14 g/l MgSO₄ . 7 H₂O
 0.10 g/l MgCL₂ . 6 H₂O
 0.10 g/l KH₂PO₄
 1 g/l glicose
 0.10 g/l Na₂HPO₄ . 7 H₂O
 0.35 g/l NaHCO₃
 2 mL/l vermelho de fenol 1%

Tampão Fosfato Salino***Phosphate-Buffered Saline (PBS)***

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

8.0 mM Na₂HPO₄1.5 mM NaH₂PO₄2.0 mM KH₂PO₄

pH 7.4

4.2. Cultivo dos parasitos

Células selvagens e mutantes foram mantidas em meio LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e repicadas a cada 4 dias. Os mutantes também foram periodicamente repicados em LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino na presença de 400 µg/ml de G418 (para KD) e 400 µg/ml de G418 + 250 µg/ml de Higromicina B (para KO) para que ocorresse a seleção dos parasitos mutantes.

4.3. Ensaio de proliferação

Epimastigotas WT, KD e KO foram lavados com PBS e ressuspensos, em duplicata, em tubos de ensaio contendo meio LIT suplementado com 10% de SFB a uma concentração de 5.10⁵ células/ml. Os parasitos foram incubados durante 7 dias a 28°C e a cada 24 horas foram coletadas alíquotas de cada duplicata e posteriormente fixadas com formaldeído 2% e contadas em câmara de Neubauer para a confecção de curvas de crescimento.

4.4. Viabilidade celular

Para a determinação da viabilidade celular, aproximadamente 10⁷ epimastigotas/ml de WT, KD e KO em fase log foram incubados com iodeto de propídio (IP) (Sigma) na concentração de 15 µg/ml durante 15 minutos, a 28°C, em ausência de luz e em tubos de citometria. O IP é um intercalante de DNA, fluorescente, que é incapaz de atravessar a membrana plasmática, exceto quando as células estão lisadas (Riccardi *et al.*, 2006). Para o controle positivo do WT, KD e KO, as células foram tratadas previamente por 30 minutos com uma solução de permeabilização (5% SFB, 0.1% saponina, 1% BSA, PBS) e depois com PI nas mesmas condições anteriormente citadas. Com o término da incubação, as células foram analisadas imediatamente em citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA), equipado com o software Cell Quest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, San Diego, CA, EUA). Foram coletados 10.000 eventos em região previamente estabelecida correspondente às populações parasitárias. A fluorescência do IP foi captada em

escala logarítmica pelo canal FL-2. A análise dos dados obtidos foi feita utilizando o programa Windows Multiple Document Interface Flow Citometry Application (WinMDI).

4.5. Ensaio de apoptose

Cerca de 5×10^7 epimastigotas/ml de WT, KD e KO em fase log foram lavados duas vezes com PBS e posteriormente fixados com paraformaldeído a 4% por 15 minutos no gelo. O ensaio de apoptose foi feito utilizando o kit de ensaio APO-BrdU™ TUNEL (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. O ensaio se baseia na detecção de fragmentação do DNA rica em terminais 3'-hidroxila. Esses terminais servem como base para a adição, por parte da enzima deoxinucleotidil transferase terminal (TdT) presente no kit, dos análogos de deoxitimidinas 5-bromo-2'-deoxiuridina 5'-trifosfato (BrdUTP), que serão posteriormente detectados pelo anticorpo anti-BrdU do kit. Como controle positivo, os protozoários foram previamente tratados com DNase a 1 µg/ml por 30 minutos (De Souza *et al.*, 2010). Com o término da incubação, as células foram analisadas imediatamente em citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA), equipado com o software Cell Quest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, San Diego, CA, EUA). Foram coletados 10.000 eventos em região previamente estabelecida correspondente às populações parasitárias. A fluorescência foi captada em escala logarítmica pelo canal FL-3 acima de 670 nm. A análise dos dados obtidos será feita utilizando o programa Windows Multiple Document Interface Flow Citometry Application (WinMDI).

4.6. Espécies reativas de oxigênio

Cerca de 10^7 epimastigotas/ml de WT, KD e KO em fase exponencial e em meio LIT suplementado com 10% de SFB foram lavados e ressuspensos em PBS, com posterior incubação, durante 20 minutos e ao abrigo da luz, com 5 µM de MitoSOX Red (Molecular Probes) em uma placa preta de 96 poços com fundo chato (100 µl de volume final). MitoSOX Red é um corante fluorescente específico para a mitocôndria de células vivas que, quando oxidado, emite fluorescência vermelha. Poços adicionais foram confeccionados contendo apenas PBS e PBS + 5 µM de MitoSOX Red, para controle de reação. A placa foi lida imediatamente após o tempo de incubação no espectrofluorômetro SpectraMax M2/M2e (molecular Devices) a 510/580 nm de excitação/emissão.

4.7. Potencial de membrana mitocondrial

Um total de 10^7 epimastigotas/ml de WT, KD e KO em fase log e em meio LIT suplementado com 10% de SFB foram transferidos para tubos de citometria e incubados com $12 \mu\text{g/ml}$ de Rodamina 123 (Rh 123)(Sigma) por 15 minutos. A Rh 123 é uma sonda fluorescente específica para mitocôndrias que perde fluorescência conforme o potencial de membrana mitocondrial aumenta. Com o término da incubação, as células foram analisadas imediatamente em citômetro de fluxo FACScalibur (Bencton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA), equipado com o software Cell Quest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, San Diego, CA, EUA). Foram coletados 10.000 eventos em região previamente estabelecida correspondente às populações parasitárias. A fluorescência da Rh 123 foi captada em escala logarítmica pelo canal FL-1. A análise dos dados obtidos foi feita utilizando o programa Windows Multiple Document Interface Flow Citometry Application (WinMDI).

4.8. Respirometria de alta resolução

Culturas em fase exponencial de epimastigotas selvagens e mutantes foram centrifugadas a 3500 rpm, por 7 minutos, a 4°C , e 10^7 células foram ressuspensas em 2 ml de solução de Hanks (HBSS) e aplicadas nas câmaras do respirômetro de alta resolução (Oxygraph-2k; OROBOROS Instruments, Innsbruck, Áustria). Primeiro, foi medida a respiração basal, isto é, a taxa de consumo de oxigênio da célula sem adição de qualquer modulador da respiração. Em seguida, foram medidos diferentes parâmetros respiratórios através de moduladores específicos. Cada modulador é adicionado consecutivamente após a estabilização do consumo de oxigênio referente à adição do modulador anterior a ele, como ilustrado na Figura 10. Os cálculos de consumo de oxigênio referentes a cada parâmetro são realizados após o término do experimento. As concentrações de oxigênio foram registradas usando o programa DatLab (Oxygraph-2K; OROBOROS Instruments, Innsbruck, Austria).

O consumo de oxigênio ligado à produção de ATP e o ligado ao vazamento de prótons foram obtidos por meio de titulações crescentes ($2,5 - 10 \mu\text{l}$) de oligomicina, um conhecido inibidor da ATP sintase, que bloqueia a passagem de prótons de volta à matriz mitocondrial e, com isso, a síntese de ATP. A diferença entre a respiração basal da célula e após a adição da oligomicina é o consumo de oxigênio ligado à produção de ATP (*ATP-linked*). Além da ATP sintase, os prótons podem retornar à matriz, passando diretamente pela membrana mitocondrial interna e gerando calor, num processo conhecido como vazamento de prótons (*leak*). O consumo de oxigênio durante esse processo foi calculado pela diferença entre o consumo de

oxigênio ligado à produção de ATP, obtido após a adição da oligomicina, e o após a adição da antimicina A, feito no decorrer do experimento.

Após a adição da oligomicina, foram feitas titulações (0,1 – 0,5 μ l) de BAM15, um protonóforo desacoplador que medeia o retorno de prótons de volta à matriz mitocondrial rapidamente, desfazendo o gradiente de prótons e, com isso, acelerando ao máximo a transferência de elétrons através da cadeia transportadora elétrons. Por causa disso, o consumo de oxigênio pela célula atinge seu potencial máximo, e ele foi calculado pela diferença entre o consumo de oxigênio após a adição do BAM15 e o após a adição da antimicina A.

Finalmente, o experimento terminou com a adição de 2,5 μ l de antimicina A, um inibidor do complexo III que interrompe o fluxo de elétrons pela cadeia transportadora de elétrons e, assim, cessa o consumo de oxigênio pela cadeia respiratória.

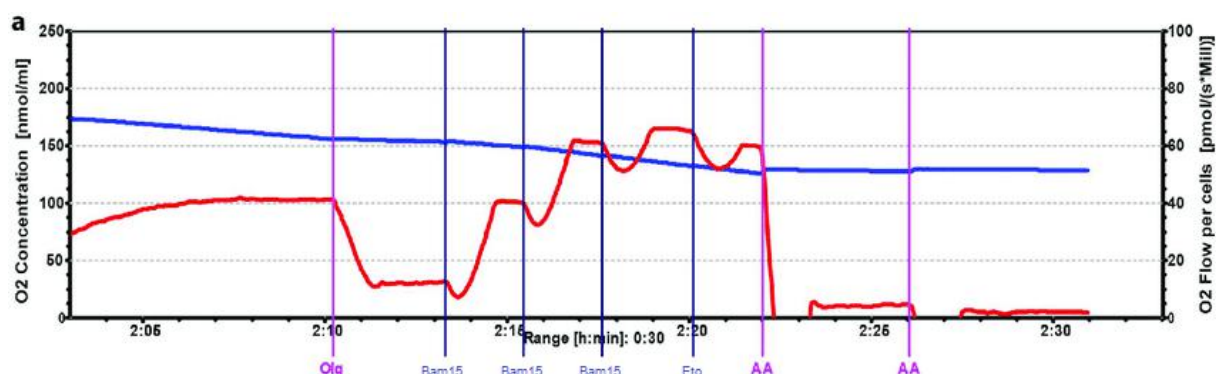


Figura 10 – Esquema ilustrativo do consumo de oxigênio frente aos moduladores respiratórios no decorrer do experimento. Olg, oligomicina; AA, antimicina A. A linha vermelha (eixo y, direita) representa o consumo de oxigênio pelas células enquanto que a linha azul (eixo y, esquerda) representa a concentração de oxigênio disponível no meio. Cada valor de consumo de oxigênio referente a cada modulador é obtido após a estabilização da linha vermelha e o modulador seguinte só é adicionado após essa estabilização.

4.9. Análise Estatística

A análise estatística referente aos experimentos deste trabalho foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 8, sendo feitos os testes *one-way* ou *two-way* ANOVA.

5. RESULTADOS

5.1. Proliferação, Viabilidade Celular e Apoptose

Tendo em vista as alterações observadas na morfologia celular dos protozoários KO, primeiro foi analisado de forma comparativa a capacidade proliferativa das células selvagens e mutantes. A curva de crescimento construída a partir de contagem direta revelou que o mutante

KO possui sua proliferação impactada de forma significativa a partir do 5º dia de crescimento após a deleção do receptor de PAF e LPC em *T. cruzi*. O mesmo não ocorreu para o mutante KD, que teve sua proliferação similar ao protozoário selvagem (figura 11).

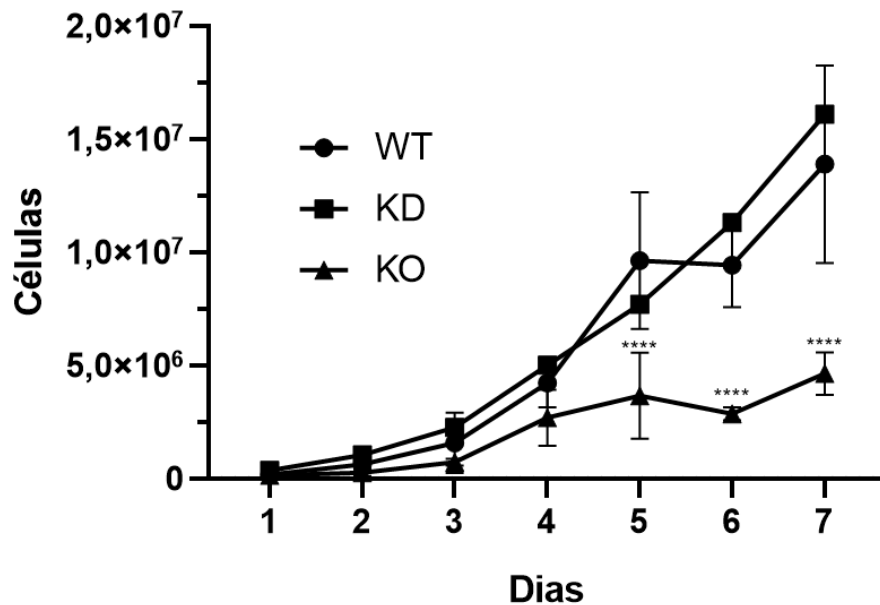


Figura 11 – Curva de crescimento dos protozoários mutantes (KO e KD) e selvagem (WT) durante 7 dias. (****) P valor <0.0001 (n=4) de acordo com o teste *two-way* ANOVA.

Para melhor investigar essa queda na proliferação do mutante KO, foi avaliada nessas células sua viabilidade bem como a fragmentação do DNA, que já foi descrita como um marcador de *apoptose-like* em tripanossomatídeos (Menna-Barreto, 2019). Apesar das alterações observadas na microscopia e na queda da proliferação para esse mutante, não houve perda significativa da viabilidade celular de acordo com a técnica utilizada, mostrando que a membrana plasmática se mantém íntegra nesses protozoários (Figura 12A). Em resultado preliminar, o mutante KO apresentou quase o dobro (9.61%) de células positivas para fragmentação do DNA quando comparado com o mutante KD (4.05%) e o WT (4.9%), indicando um fenótipo de *apoptose-like* como decorrência da remoção total deste receptor (Figura 12B).

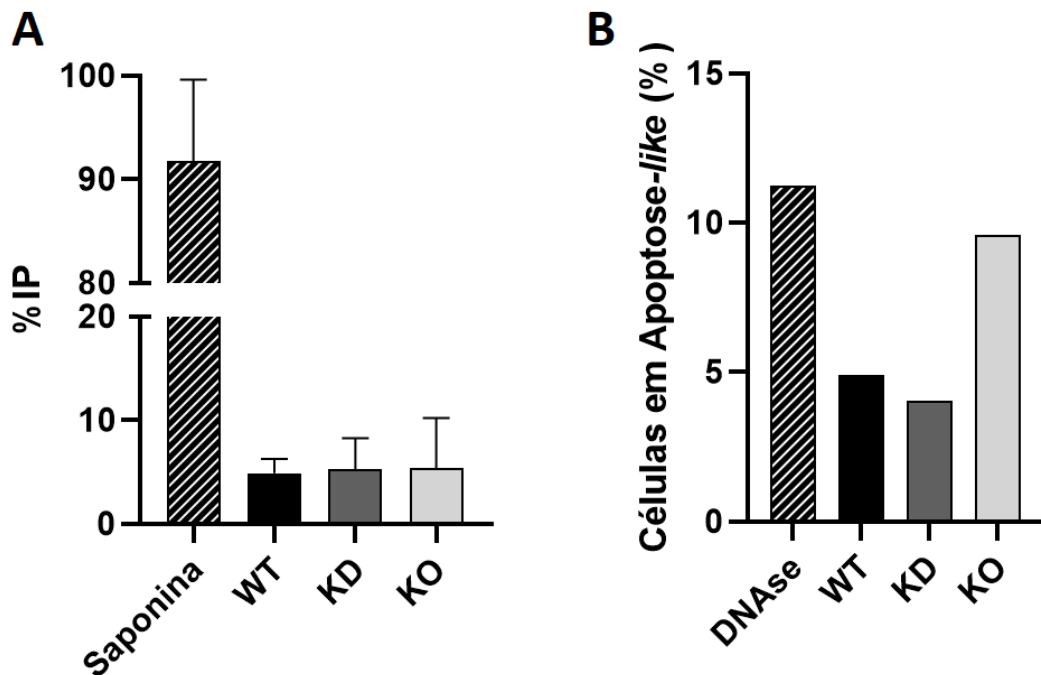


Figura 12 – Viabilidade celular e Apoptose. (A) Viabilidade celular inferida através da integridade da membrana plasmática utilizando IP (n=4). Significância de acordo com o teste *one-way* ANOVA. (B) Ensaio de TUNEL para inferir a fragmentação do DNA, um dos marcadores de apoptose (n=1). Saponina e DNase representam os controles positivos de cada experimento.

5.2. Potencial de Membrana Mitocondrial, ROS e Consumo de Oxigênio

Com o objetivo de avaliar mais a fundo os efeitos da deleção do TcPAFR no parasito selvagem e nos mutantes em decorrência das alterações na ultraestrutura mitocondrial, a fisiologia mitocondrial foi analisada quanto ao potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), teor de ROS e consumo de oxigênio.

O mutante KO apresentou um elevado teor de ROS mitocondrial (Figura 13A) quando em comparação com o mutante KD e o WT. Além disso, este mutante também mostrou uma despolarização no $\Delta\Psi_m$ (Figura 13B) que não foi observada nas outras células. Com esses resultados se esperava uma alteração em sua atividade respiratória. No entanto, curiosamente todas as células apresentaram taxas de consumo de oxigênio semelhantes entre si em todos os parâmetros analisados (consumo de oxigênio basal, ligado à produção de ATP e ao vazamento de prótons, e o consumo de oxigênio máximo alcançado pela célula) (Figura 14).

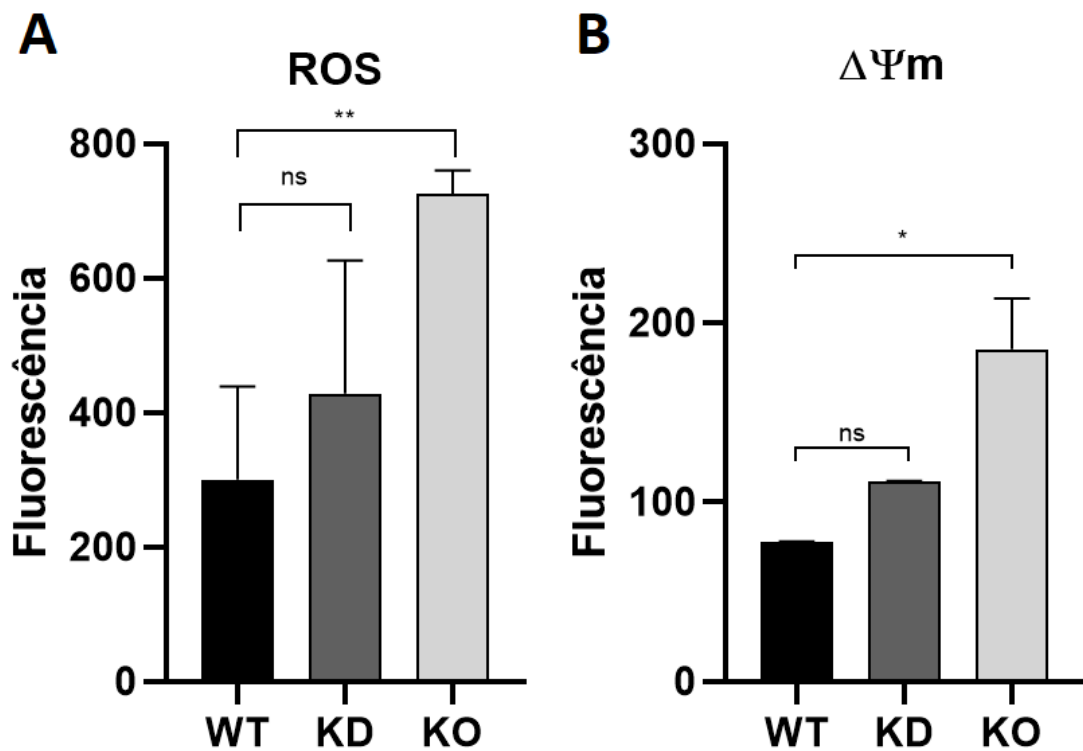


Figura 13 – Teor de ROS mitocondrial (A) e potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) (B) entre as células WT, KD e KO. (*) P valor <0.0117 (n=2), (**) P valor <0.0181 (n=2), (ns) não significativo, de acordo com o teste *one-way* ANOVA.

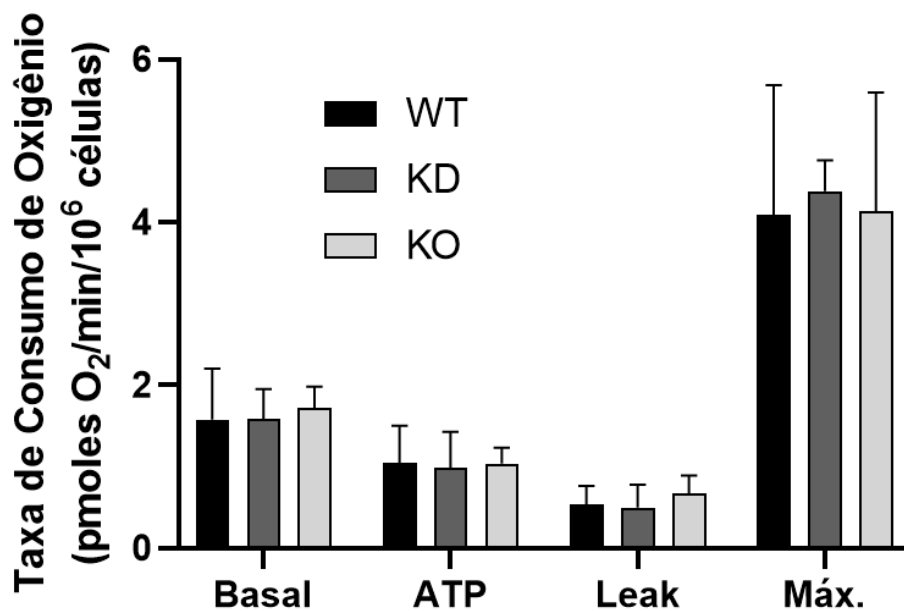


Figura 14 – Consumo de oxigênio basal, ligado à produção de ATP (ATP) e ao vazamento de prótons (*Leak*) e consumo de oxigênio máximo (Máx.). (n=3). Significância de acordo com o teste *one-way* ANOVA.

6. DISCUSSÃO

PAF e LPC são ambos fosfolipídeos bioativos que atuam em suas células-alvo mediante receptores transmembranares, desencadeando uma grande variedade de transdução de sinais que culminam em diferentes respostas celulares, sejam estas fisiológicas ou patológicas. Nosso grupo e outros demonstraram que em tripanossomatídeos essas moléculas também influenciam fortemente seu ciclo de vida, atuando em processos de proliferação, diferenciação, infecção e modulação de vias de sinalização.

O presente trabalho evidencia que o nocaute do receptor de PAF e LPC em *T. cruzi* impacta a proliferação das epimastigotas a partir do 5º dia (figura 11). Já foi reportado que a LPC C18:1 é capaz de modular de forma positiva a proliferação deste protozoário no mesmo morfotipo do 5º ao 7º dia de crescimento (Chagas-Lima *et al.*, 2019), o que coincide com os dados apresentados aqui.

Já foi visto que a LPC pode ser sintetizada por *T. cruzi* (Gazos-Lopes *et al.*, 2014) e que 50% do conteúdo lipídico secretado por este protozoário no meio de cultura é constituído de PC e LPC (Agusti *et al.*, 2000). Coelho também identificou em análise *in silico* que duas das diversas vias de síntese de LPC estão presentes em *T. cruzi*, e foi ainda capaz de amplificar 8 das 10 enzimas envolvidas nessas vias neste protozoário (Coelho, 2014). Além disso, PAF e LPC oriundos do hospedeiro vertebrado estariam biodisponíveis no intestino do inseto vetor após o repasto sanguíneo. Isso porque estas duas moléculas estão envolvidas na resposta inflamatória do hospedeiro (Papakonstantinou *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2020) e a LPC também está presente na saliva do inseto vetor, onde atua como molécula antihemostática e imunomoduladora (Golodne *et al.*, 2003; Mesquita *et al.*, 2008). Qualquer que seja a origem dessas moléculas, endógena ou exógena, elas seriam importantes para a manutenção da replicação dos epimastigotas no intestino médio do vetor através da interação com o TcPAFR, o que explicaria porque a remoção deste receptor diminuiu sua proliferação. No intestino posterior, onde sua disponibilidade é reduzida após a digestão, seria possível que *T. cruzi* sintetizaria LPC e a secretaria para que, por sinalização autócrina, isso estimulasse sua metaciclogênese.

Coelho evidenciou que o TcPAFR é homólogo à família dos PAQRs, com maior similaridade ao PAQR4 (figura 8) (Coelho, 2018), que vem sendo descrito nos últimos anos como envolvido em diversos tipos de tumores (Feng *et al.*, 2018; Pedersen *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2020). Já foi demonstrado que, em células de câncer de estômago, o PAQR4 é altamente expresso e que o *knockdown* de seu gene reduz a taxa de proliferação, migração, apoptose e

invasão do tumor (Feng *et al.*, 2018). No presente trabalho, embora o mutante KO tenha apresentado uma redução significativa em sua proliferação, o mutante KD teve sua proliferação inalterada (figura 11). Embora não se possa desconsiderar o fato de serem modelos celulares bem distintos e apresentarem mecanismos de silenciamento diferentes, o que poderia explicar essa diferença, isto também poderia indicar que mesmo com a redução da expressão desse receptor ele ainda é capaz de desempenhar suas funções neste protozoário. Coelho observou que o mesmo perfil ocorre para a metaciclologênese destes mutantes (Coelho, 2018). Como *T. cruzi* apresenta ao longo do seu ciclo outros estágios de diferenciação, incluindo diferenciações que acontecem dentro da célula hospedeira, são necessários mais estudos para aprofundar a função que o receptor apresenta nestes outras etapas. Esse perfil também corrobora com o fato de que a ultraestrutura do mutante KD permanece inalterada em relação ao WT e que apenas o KO apresente alterações (Figura 9). Nesse sentido, é possível que uma melhor caracterização das funções do PAQR4 e as vias de sinalização as quais ele está envolvido possam nos dar mais pistas sobre o homólogo presente em *T. cruzi*.

Com base nas alterações observadas na ultraestrutura mitocondrial por parte dos parasitos KO para o TcPAFR, esperava-se que a fisiologia mitocondrial desses parasitos estivesse comprometida e, de fato, foi evidenciada uma redução da magnitude do $\Delta\Psi_m$ e um aumento no teor de ROS mitocondrial para o mutante KO (Figura 13). No entanto, com a queda no $\Delta\Psi_m$, esperava-se que o KO estivesse apresentando uma respiração inferior ao WT, mas a taxa de consumo de oxigênio para essas células se mantiveram inalteradas (Figura 14).

É sabido que os tripanossomatídeos são capazes de adaptar seu metabolismo de acordo com a disponibilidade de diferentes nutrientes no ambiente, no entanto ainda é desconhecido como os tripanossomas regulam a fosforilação oxidativa (Bringaud, Rivière e Coustou, 2006). As formas epimastigotas de *T. cruzi* são mais dependentes da fosforilação oxidativa tendo em vista que o ambiente em que se encontram – o intestino do vetor – é pobre em glicose e rico em aminoácidos, sobretudo histidina (Gonçalves *et al.*, 2011). *T. cruzi* possui anotado genes putativos para a via de degradação histidina-glutamato (Atwood *et al.*, 2005), sendo capaz de oxidá-la completamente até CO_2 (Barisón *et al.*, 2016). Já foi demonstrado que este protozoário é capaz de incorporar histidina no meio, utilizando este aminoácido como substrato para fornecer elétrons para a cadeia transportadora mantendo o $\Delta\Psi_m$, o consumo de oxigênio e a produção de ATP, sendo capaz de restaurar sua viabilidade após um longo período de estresse nutricional (Barisón *et al.*, 2016). Além disso, sabe-se que as formas epimastigotas dependem da respiração para sua proliferação (Stoppani *et al.*, 1980).

Por causa disso, é possível que esteja ocorrendo um mecanismo compensatório que ainda precisa ser investigado com adaptações para contornar as alterações morfológicas e funcionais que a ausência do TcPAFR desencadeia. Isso poderia indicar que este receptor tem grande importância para a manutenção de seu ciclo de vida a ponto de sua remoção debilitar a célula, embora ela ainda consiga sobreviver.

Essas adaptações poderiam ser, por exemplo, a modulação da atividade dos complexos respiratórios para acelerar a respiração. A principal fonte de elétrons para a cadeia transportadora nesse protozoário é o succinato via complexo II (Fidalgo e Gille, 2011), que é incapaz de bombear prótons para o espaço intermembranas e consequentemente contribuir com o $\Delta\Psi_m$ (Tomás e Castro, 2013). Além disso, sabe-se que alterações na atividade do complexo IV desencadeiam um aumento no estado reduzido dos complexos anteriores a ele na cadeia transportadora, impactando a taxa respiratória e a fosforilação oxidativa (Zuckerbraun et al., 2007). O aumento na atividade desses dois complexos poderia estar relacionado com o aumento do consumo de oxigênio para sustentar a respiração e, dessa forma, atenuar as consequências que a deleção do TcPAFR causa na célula. A atividade dos complexos respiratórios bem como uma análise mais cuidadosa da bioenergética desses protozoários pode nos ajudar a elucidar de que forma esse mecanismo compensatório esteja ocorrendo. Essas e outras análises serão realizadas e melhor investigadas no futuro.

As ROS podem causar uma série de danos às estruturas celulares, incluindo proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Se esse estresse oxidativo supera as defesas antioxidantes da célula, ela pode ter como consequência a morte celular. É sabido que a principal fonte de ROS nos eucariotos é a mitocôndria, através do vazamento de elétrons que ocorre quando a disponibilidade de elétrons é grande e a energia potencial para sua transferência é baixa. Enzimas mitocondriais conhecidas por gerarem ROS desta forma são os complexos respiratórios I, II e III; as enzimas do ciclo de Krebs aconitase 2 e α -cetoglutarato desidrogenase; piruvato desidrogenase e glicerol-3-fosfato desidrogenase; entre outras (Addabbo, Montagnani, e Goligorsky, 2009). Apesar de existirem muitas evidências de produção de ROS pela mitocôndria de tripanossomatídeos, o sítio exato para sua produção não é tão bem investigado quanto em outros sistemas (Tomás e Castro, 2013).

No presente trabalho, fica evidenciado que a deleção do receptor de PAF e LPC aumenta a produção mitocondrial de ROS (Figura 13A). O dano oxidativo provocado por essas moléculas já foi descrito, inclusive em tripanossomatídeos, como indutores de morte celular programada (Menna-Barreto, 2019). Dois indicativos do fenótipo de apoptose-like em tripanossomatídeos foram reportados aqui como consequência da deleção do TcPAFR:

fragmentação do DNA e perda do $\Delta\Psi_m$. Ainda se discute se a perda do $\Delta\Psi_m$ é uma condição que induza a apoptose ou se é uma consequência deste processo (Ly, Grubb e Lawen, 2003). No entanto, sabe-se que a fragmentação do DNA é capaz de ativar a cascata de apoptose em eucariotos superiores (D'Arcy, 2019).

A fragmentação do DNA é um dos marcadores de apoptose-*like* em tripanossomatídeos (Menna-Barreto, 2019). Uma pequena porcentagem (9.61%) das células KO apresentaram indicativo de fragmentação do DNA em comparação a WT (4.9%) e KD (4.05%) (Figura 12B), embora não se tenha observado perda na viabilidade celular conforme observado pela marcação com IP (Figura 12A). O iodeto de propídio é um intercalante de DNA que é incapaz de atravessar membranas e, portanto, um resultado negativo indica que a membrana plasmática da célula esteja íntegra. É sabido que durante a apoptose, embora ocorra a formação de *blebbing* e posteriormente a célula se desfaça em corpos apoptóticos, a membrana plasmática se mantém íntegra para evitar a liberação do conteúdo celular e consequente formação de uma resposta inflamatória (Zhang *et al.*, 2017; D'arcy, 2019). Portanto é necessário investigar a viabilidade celular por outros mecanismos além do IP.

A fragmentação no DNA corrobora com o elevado teor de ROS observado nos mutantes KO. As bases de DNA costumam ser bem suscetíveis a ROS, principalmente a guanina, que possui um baixo potencial redox. O principal produto da oxidação da guanina é a 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoG) (David, O'Shea e Kundu, 2007). A 8-oxoG mimetiza uma timidina e é capaz de parear com adenina durante da replicação, causando quebras das fitas duplas e consequente fragmentação do DNA, levando a mutações (Neeley e Essigmann, 2006; Nakabeppu *et al.*, 2004). Já foi demonstrado que quando a 8-oxoguanina DNA glicosilase humana, responsável por remover a 8-oxoG do DNA, é superexpressa em fibroblastos humanos e células de carcinoma de pulmão, a apoptose induzida por H_2O_2 é inibida (Youn *et al.*, 2007). Aguiar e colaboradores também demonstraram que a inserção de enzimas bacterianas envolvidas na eliminação e reparo do pareamento incorreto da 8-oxoG com adenina em *T. cruzi* aumenta sua viabilidade e resistência ao H_2O_2 e diminui os danos ao DNA (Aguiar *et al.*, 2013).

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho apresenta evidências de que o TcPAFR é importante para o ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. A deleção do TcPAFR apresenta consequências apenas quando ele é totalmente removido da célula, já que o mutante KD apresenta uma fisiologia muito parecida com o WT. Assim, a deleção desse receptor compromete a ultraestrutura celular e da

mitocôndria, reduzindo o potencial de membrana mitocondrial e aumentando a produção de ROS. Esse aumento no teor de ROS estaria associado à fragmentação do DNA que, junto com a diminuição da magnitude do potencial de membrana, levariam ao fenótipo de *apoptose-like* apresentado por este mutante, reduzindo sua proliferação a partir do 5º dia. Possivelmente, esse mutante também sofreu alguma alteração em seu metabolismo respiratório para sustentar um nível normal de consumo de oxigênio como um mecanismo ainda a ser melhor estudado para contornar as consequências da deleção do TcPAFR e se manter vivo. Estes eventos se encontram esquematizados na Figura 15.

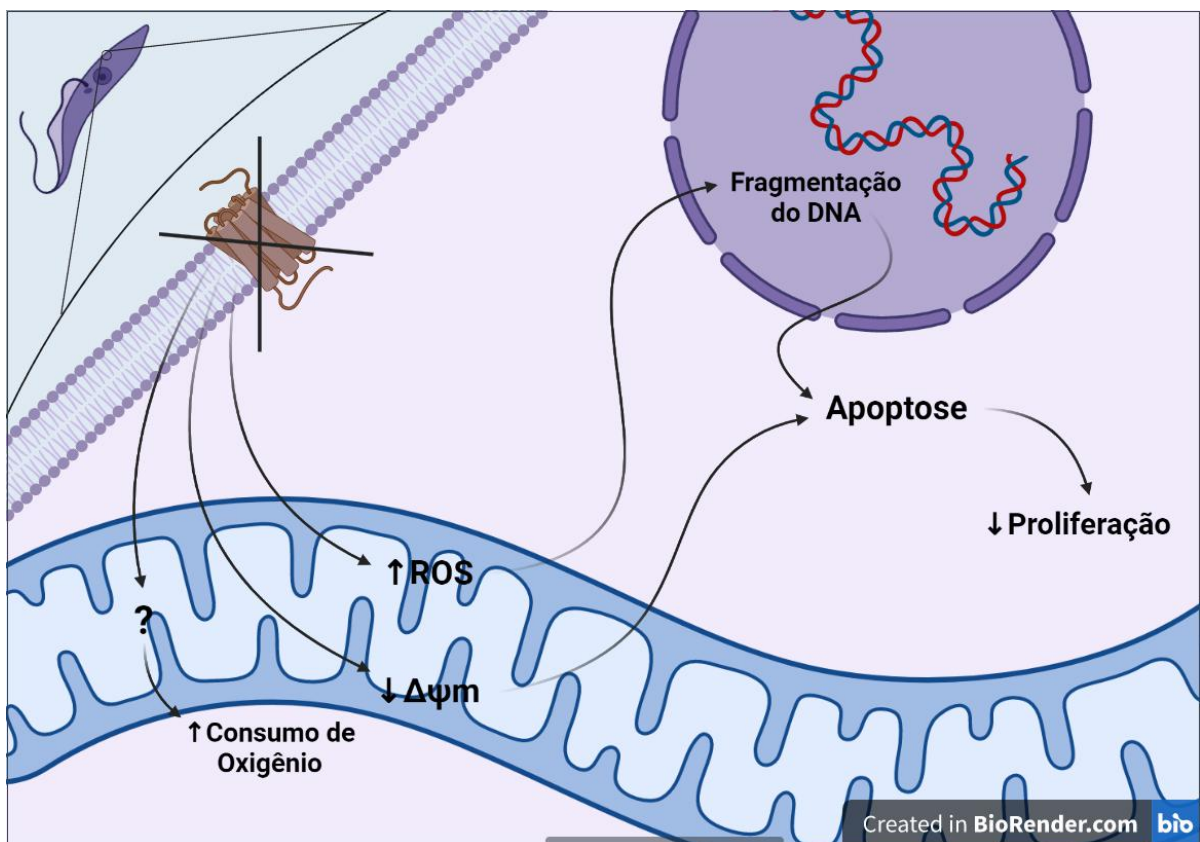


Figura 15 – Resumo dos eventos observados após a deleção do TcPAFR. O nocaute do receptor desencadeia um aumento no teor de ROS mitocondrial e isso se relaciona à fragmentação no DNA que, junto com a redução do potencial de membrana mitocondrial, indica que os protozoários estão entrando mais em *apoptose-like*, reduzindo sua proliferação. A deleção do receptor também culmina em alterações na fisiologia respiratória aumentando o consumo de oxigênio e o equiparando ao das células selvagens.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adade, C.M., Chagas, G.S. e Souto-Padron, T. (2012). *Apis mellifera* venom induces different cell death pathways in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, 139, 1444-1461.
- Addabbo, F., Montagnani, M. e Goligorsky, M.S. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. *Hypertension*, 53, 885-892.
- Aguiar, P.H.N., Furtado, C., Repolês, B.M., Ribeiro, G.A., Mendes, I.C., Peloso, E.F., Gadelha, F.R., Macedo, A.M., Franco, G.R., Pena, S.D.J., Teixeira, S.M.R., Vieira, L.Q., Guarneri, A.A., Andrade, L.O., Machado, C.R. (2013). Oxidative Stress and DNA Lesions: The Role of 8-Oxoguanine Lesions in *Trypanosoma cruzi* Cell Viability. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7, e2279.
- Agusti, R., Couto, A.S., Alves, M.J.M., Colli, W. e Lederkremer, R.M. (2000). Lipids shed into the culture medium by trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, 97-102.
- Alzate, J.F., Arias, A.A., Moreno-Mateos, D., Álvarez-Barrientos, A. e Jiménez-Ruiz, A. (2007). Mitochondrial superoxide mediates heat-induced apoptotic-like death in *Leishmania infantum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 152, 192-202.
- Ambit, A., Fasel, N., Coombs, G.H. e Mottram, J.C. (2007). An essential role for the *Leishmania major* metacaspase in cell cycle progression. *Cell Death & Differentiation*, 15, 113-122.
- Atwood, J. A., Weatherly, D. B., Minning, T. A., Bundy, B., Cavola, C., Opperdoes, F. R., Orlando, R. e Tarleton, R. L. (2005). The *Trypanosoma cruzi* Proteome. *Science*, 309, 473-476.
- Barisón, M. J., Damasceno, F. S., Mantilla, B. S. e Silber, A. M. (2016). The active transport of histidine and its role in ATP production in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 48, 437-449.
- Bhosle, K.V., Rivera, J.C., Zhou, T.E., Omri, S., Sanchez, M., Hamel, D., Zhu, T., Rouget, R., Rabea, A.A., Hou, X., Lahaie, I., Ribeiro-da-Silva, A. e Chemtob, S. (2016) Nuclear localization of platelet-activating factor receptor controls retinal neovascularization. *Cell Discovery*, 2, 16017.
- Bombaça, A.C.S., Dossow, D.V., Barbosa, J.M.C., Paz, C., Burgos, V. e Menna-Barreto, R.F.S. (2018). Trypanocidal Activity of Natural Sesquiterpenoids Involves Mitochondrial Dysfunction, ROS Production and Autophagic Phenotype in *Trypanosoma cruzi*. *Molecules*, 23, 2800.
- Bombeiro, A.L., D'Império Lima, M.R., Chadi, G. e Álvarez, J.M. (2010). Neurodegeneration and Increased Production of Nitrotyrosine, Nitric Oxide Synthase, IFN- γ and S100 β Protein in the Spinal Cord of IL-12p40-Deficient Mice Infected with *Trypanosoma cruzi*. *Neuroimmunomodulation*, 17, 67-78.
- Bombeiro, A.L., Gonçalves, L.A., Penha-Gonçalves, C., Marinho, C.R.F., D'Império Lima, M.R., Chadi, G. e Álvarez, J.M. (2012). IL-12p40 Deficiency Leads to Uncontrolled *Trypanosoma cruzi* Dissemination in the Spinal Cord Resulting in Neuronal Death and Motor Dysfunction. *PLoS ONE*, 7, e49022.
- BoseDasgupta, S., Das, B.B., Sengupta, S., Ganguly, A., Roy, A., Dey, S., Tripathi, G., Dinda, B. e Majumder, H.K. (2008). The caspase-independent algorithm of programmed cell death in *Leishmania* induced by baicalin: the role of LdEndoG, LdFEN-1 and LdTatD as a DNA “degradesome.” *Cell Death & Differentiation*, 15, 1629-1640.
- Boveris, A. e Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal*, 134, 707-716.
- Bringaud, F., Rivièrè, L., e Coustou, V. (2006). Energy metabolism of trypanosomatids: Adaptation to available carbon sources. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 149, 1-9.
- Brigelius-Flohé, R. e Flohé, L. (2011). Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxidants & redox signaling*, 15, 2335-2381.
- Carneiro, A.B., Iaciura, B.M.F., Nohara, L.L., Lopes, C.D., Veas, E.M.C., Mariano, V.S., Bozza, P.T., Lopes, U.G., Atella, G.C., Almeida, I.C. e Silva-Neto, M.A.C. (2013). Lysophosphatidylcholine triggers TLR2- and TLR4-mediated signaling pathways but counteracts LPS-induced NO synthesis in peritoneal macrophages by inhibiting NF- κ B translocation and MAPK/ERK phosphorylation. *PloS one*, 8, e76233.
- Carvalho, L., Luque-Ortega, J. R., Manzano, J. I., Castanys, S., Rivas, L. e Gamarro, F. (2010). Tafenoquine, an Antiplasmodial 8-Aminoquinoline, Targets *Leishmania* Respiratory Complex III and Induces Apoptosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 5344-5351.

- CDC (2020). Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>. Acesso em 17/06/2020.
- César Carranza, J., Kowaltowski, A.J., Mendonça, M.A.G., de Oliveira, T.C., Gadelha, F.R. e Zingales, B. (2009). Mitochondrial bioenergetics and redox state are unaltered in *Trypanosoma cruzi* isolates with compromised mitochondrial complex I subunit genes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 41, 299–308.
- Chagas-Lima, A.C., Pereira, M.G., Fampa, P., Lima, M.S., Kluck, G.E.G. e Atella, G.C. (2019). Bioactive lipids regulate *Trypanosoma cruzi* development. *Parasitology Research*, 118(9):2609-2619.
- Chiurchiù, V., Leuti, A. e Maccarrone, M. (2018). Bioactive Lipids and Chronic Inflammation: Managing the Fire Within. *Frontiers in Immunology*, 9, 38.
- Coelho, F.S. (2014). Identificação de genes codificantes envolvidos na biossíntese de lipídeos bioativos no protozoário *Trypanosoma cruzi*. Dissertação (Mestrado em Ciências – Microbiologia), Instituto de Microbiologia Paulo de Goés, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Coelho, F.S. (2018). Caracterização estrutural e funcional de um receptor putativo para o fator de ativação de plaquetas (PAF) e para lisofosfatidilcolina (LPC) e de uma PAF-acetilhidrolase em *Trypanosoma cruzi*. Tese (Doutorado em Ciências - Microbiologia), Instituto de Microbiologia Paulo de Goés, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- D’Arcy, M.S. (2019). Cell Death. A review of the major forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy. *Cell Biology International*, 43, 582-592.
- Das, M., Mukherjee, S.B. e Shaha, C. (2001). Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Journal of Cell Science*, 114, 2461–2469.
- David, S.S., O’Shea, V.L. e Kundu, S. (2007). Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*, 447, 941–950.
- De Souza, E.M., Nefertiti, A.S.G., Bailly, C., Lansiaux, A. e Soeiro, M.N.C. (2010). Differential apoptosis-like cell death in amastigote and trypomastigote forms from *Trypanosoma cruzi*-infected heart cells in vitro. *Cell and tissue research*, 341, 173-180.
- Debrabant, A., Lee, N., Bertholet, S., Duncan, R. e Nakhasi, H.L. (2003). Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. *International Journal for Parasitology*, 33, 257–267.
- Dos Anjos, D.O., Alves, E.S.S., Gonçalves, V.T., Fontes, S.S., Nogueira, M.L., Suarez-Fontes, A.M., Da Costa, J.B.N., Rios-Santos, F. e Vannier-Santos, M.A. (2016). Effects of a novel β -lapachone derivative on *Trypanosoma cruzi*: Parasite death involving apoptosis, autophagy and necrosis. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 6, 207–219.
- Dröge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Reviews*, 82, 47-95.
- Duszenko, M., Figarella, K., Macleod, E.T. e Welburn, S.C. (2006). Death of a trypanosome: a selfish altruism. *Trends in Parasitology*, 22, 536–542.
- Dutra, P.M.L., Rodrigues, C.O., Jesus, J.B., Lopes, A.H.C.S., Souto-Pradrón, T. e Meyer-Fernandes, J.R. (1998). A Novel Ecto-Phosphatase Activity of *Herpetomonas muscarum muscarum* Inhibited by Platelet-Activating Factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 253, 164–169.
- Dutra, P.M.L., Vieira, D.P., Meyer-Fernandes, J.R., Silva-Neto, M.A.C. e Lopes, A.H.C.S. (2009). Stimulation of *Leishmania tropica* protein kinase CK2 activities by platelet-activating factor (PAF). *Acta Tropica*, 111, 247–254.
- Dutra, F.L., Vieira, D.P., Coelho, F.S., Adade, C.M., Atella, G.C., Silva-Neto, M.A.C. e Lopes, A.H.C.S. (2019). Lysophosphatidylcholine triggers cell differentiation in the protozoan parasite *Herpetomonas samuelpessoai* through the CK2 pathway. *Acta Parasitologica*, 65, 108–117.
- El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.-N., Ghedin, E., Worthey, E.A., Delcher, A.L., Blandin, G., Westenberger, S.J., Caler, E., Cerqueira, G.C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Aslund, L., Attipoe, P., Bontempi, E., Bringaud, F., Burton, P., Cadag, E., Campbell, D.A., Crabtree, C.M., Hamid Darban, H., Silveira, J. F., Jong, P., Edwards, K., Englund, P.T., Fazalina, G., Feldblyum, T., Ferella, M., Frasch, A.C., Gull, K., Horn, D., Hou, L., Huang, Y., Kindlund, E., Klingbeil, M., Kluge, S., Koo, H., Lacerda, D., Levin, M.J., Lorenzi, H., Louie, T., Machado, C.R., McCulloch, R., McKenna, A., Mizuno, Y., Mottram, J.C., Nelson, S., Ochaya, S., Osoegawa, K. Pai, G., Parsons, M., Pentony, M., Pettersson, U., Pop, M., Ramirez, J.R., Rinta, J., Robertson, L., Salzberg, S.L., Sanchez, D.O., Seyler, A., Sharma, R., Shetty, J., Simpson, A.J., Sisk, E., Tammi, M.T., Tarleton, R., Teixeira, S., Aken, S.V., Vogt, C.,

- Ward, P.N., Wickstead, B., Wortman, J., White, O., Fraser, C.M., Stuart, K.D. e Andersson, B. (2005). The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. *Science*, 309, 409–415.
- Fan, F., Feng, L., He, J., Wang, X., Jiang, X., Zhang, Y., Wang, Z. e Chen., Y. (2008). RKTG sequesters B-Raf to the Golgi apparatus and inhibits the proliferation and tumorigenicity of human malignant melanoma cells. *Carcinogenesis*, 29, 1157-1163.
- Fang, J. e Beattie, D. S. (2003). Identification of a gene encoding a 54 kDa alternative NADH dehydrogenase in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 127, 73–77.
- Feng, Y., Sun, T., Yu, Y., Gao, Y., Wang, X. e Chen, Z. (2018). MicroRNA-370 inhibits the proliferation, invasion and EMT of gastric cancer cells by directly targeting PAQR4. *Journal of Pharmacological Sciences*, 1-11.
- Feng, L., Xie, X., Ding, Q., Luo, X., He, J., Fan, F., Liu, W., Wang, Z., Chen, Y. (2007) Spatial regulation of Raf kinase signaling by RKTG. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 14348-14353.
- Fidalgo, L.M. e Gille, L. (2011). Mitochondria and Trypanosomatids: Targets and Drugs. *Pharmaceutical Research*, 28, 2758–2770.
- Figarella, K., Rawer, M., Uzcategui, N.L., Kubata, B.K., Lauber, K., Madeo, F., Wesselborg, S. e Duszenko, M. (2006). Prostaglandin D2 induces programmed cell death in *Trypanosoma brucei* bloodstream form. *Cell Death and Differentiation*, 12, 335–346.
- Figueira, T.R., Barros, M.H., Camargo, A.A., Castilho, R.F., Ferreira, J.C.B., Kowaltowski, A.J., Sluse, F.E., Souza-Pinto, N.C. e Vercesi, A.E. (2013). Mitochondria as a Source of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: From Molecular Mechanisms to Human Health. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18, 2029–2074.
- Gazos-Lopes, F., Oliveira, M.M., Hoelz, L.V.B., Vieira, D.P., Marques, A.F., Nakayasu, E.S., Gomes, M.T., Salloum, N.G., Pascutti, P.G., Souto-Pradrón, T., Monteiro, R.Q., Lopes, A.H.C.S. e Almeida, I.C. (2014). Structural and Functional Analysis of a Platelet-Activating Lysophosphatidylcholine of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8, e3077.
- Golodne, D.M., Monteiro, R.Q., Graça-Souza, A.V., Silva-Neto, M.A.C. e Atella, G.C. (2003). Lysophosphatidylcholine Acts as an Anti-hemostatic Molecule in the Saliva of the Blood-sucking Bug *Rhodnius prolixus*. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 27766–27771.
- Gomes, M.T., Monteiro, R.Q., Grillo, L.A., Leite-Lopes, F., Stroeder, H., Ferreira-Pereira, A., Alviano, C.S., Barreto-Bergter, E., Neto, H.C.F., Silva, N.L.C., Almeida, I.C., Soares, R.M.A. e Lopes, A.H.C.S. (2006). Platelet-activating factor-like activity isolated from *Trypanosoma cruzi*. *International Journal for Parasitology*, 36, 165–173.
- Gonçalves, R. L. S., Barreto, R. F. S. M., Polycarpo, C. R., Gadelha, F. R., Castro, S. L. e Oliveira, M. F. (2011). A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 43, 651–661.
- González, I.J., Desponds, C., Schaff, C., Mottram, J.C. e Fasel, N. (2007). *Leishmania major* metacaspase can replace yeast metacaspase in programmed cell death and has arginine-specific cysteine peptidase activity. *International Journal for Parasitology*, 37, 161–172.
- Helms, M.J., Ambit, A., Appleton, P., Tetley, L., Coombs, G.H. e Mottram, J.C. (2006). Bloodstream form *Trypanosoma brucei* depend upon multiple metacaspases associated with RAB11-positive endosomes. *Journal of Cell Science*, 119, 1105–1117.
- Honda, Z., Ishii, S. e Shimizu, T. (2002). Platelet-Activating Factor Receptor. *Journal of Biochemistry*, 131, 773–779.
- Huang, Y.H., Schäfer-Elinder, L., Wu, R., Claesson, H.E. e Frostegård, J. (1999). Lysophosphatidylcholine (LPC) induces proinflammatory cytokines by a platelet-activating factor (PAF) receptor-dependent mechanism. *Clinical and Experimental Immunology*, 116, 326–331.
- Kadowaki, T. e Yamauchi, T. (2005). Adiponectin and Adiponectin Receptors. *Endocrine Reviews*, 26, 439–451.
- Kawano, D.F., Silva, V.B., Jorge, D.M.M., Silva, C.H.T.P. e Carvalho, I. (2011). Search for a platelet-activating factor receptor in the *Trypanosoma cruzi* proteome: a potential target for Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106, 957-967.

- Korshunov, S. S., Skulachev, V. P. e Starkov, A. A. (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Letters*, 416, 15–18.
- Kosec, G., Alvarez, V.E., Agüero, F., Sánchez, D., Dolinar, M., Turk, B., Turk., V. e Cazzulo, J.J. (2006). Metacaspases of *Trypanosoma cruzi*: Possible candidates for programmed cell death mediators. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 145, 18–28.
- Kaufers, A., Ellis, J., Stark, D. e Barratt, J. The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites & Vectors*, 10, 287.
- Law, S.H., Chan, M.L., Marathe, G.K., Parveen, F., Chen, C.H. e Ke, L.Y. (2019). An Updated Review of Lysophosphatidylcholine Metabolism in Human Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 1149.
- Liu, P., Zhu, W., Chen, C., Yan, B., Zhu, L., Chen, X. e Peng, C. The mechanisms of lysophosphatidylcholine in the development of diseases. *Life Sciences*, 247, 117443.
- Lopes A.H.C.S., Dutra, P.M.L., Rodrigues, C.O., Soares, M.J., Angluster, J. e Cordeiro, R.S.B. (1997). Effect of Platelet-Activating Factor on the Process of Cellular Differentiation of *Herpetomonas muscarum muscarum*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 44, 321–325.
- Lopes, A.H.C.S., Souto-Pradón, T., Dias, F.A., Gomes, M.T., Rodrigues, G.C., Zimmermann, L.T., Silva T.L.A., Vermelho, A.B. (2010). Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases. *The Open Parasitology Journal*. 4, 30-59.
- Loschen, G., Azzi, A., Richter, C. e Flohé, L. (1974). Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Letters*, 42, 68–72.
- Lukes, J., Butenko, A., Hashimi, H., Maslov, D.A., Votýpka, J. e Yurchenko, V. (2018). Trypanosomatids Are Much More than Just Trypanosomes: Clues from the Expanded Family Tree. *Trends in Parasitology*, 34, 466-480.
- Ly, J.D., Grubb, D.R. e Lawen, A. (2003). The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in apoptosis; an update. *Apoptosis*, 8, 115–128.
- Marrache, A.M., Gobeil, F., Bernier, S.G., Stankova, J., Rola-Pleszczynski, M., Choufani, S., Bkaily, G., Bourdeau, A., Sirois, M.G., Vazquez-Tello, A., Fan, L., Joyal, J.S., Filep, J.G., Varma, D.R., Ribeiro-da-Silva, A. e Chemtob, S. (2002). Proinflammatory Gene Induction by Platelet-Activating Factor Mediated Via Its Cognate Nuclear Receptor. *The Journal of Immunology*, 169, 6474–6481.
- Marrache, A.M., Gobeil, F., Zhu, T. e Chemtob, S. (2005). Intracellular Signaling of Lipid Mediators via Cognate Nuclear G Protein–Coupled Receptors. *Endothelium*, 12, 63–72.
- Maslov, D.A., Votýpka, J., Yurchenko, V., Lukes, J. (2012). Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. *Trends in Parasitology*. 29, 43-52.
- Meslin, B., Zalila, H., Fasel, N., Picot, S. e Bienvenu, A.L. (2011). Are protozoan metacaspases potential parasite killers?. *Parasites & Vectors*, 4, 26.
- Menna-Barreto, R.F.S., Corrêa, J.R., Cascabulho, C.M., Fernandes, M.C., Pinto, A.V., Soares, M.J. e De Castro, S.L. (2009). Naphthoimidazoles promote different death phenotypes in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, 136, 499.
- Menna-Barreto, R.F.S., Salomão, K., Dantas, A.P., Santa-Rita, R.M., Soares, M.J., Barbosa, H.S. e De Castro, S.L. (2009). Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: An ultrastructural study. *Micron*, 40, 157–168.
- Menna-Barreto, R. F. S. e de Castro, S. L. (2014). The Double-Edged Sword in Pathogenic Trypanosomatids: The Pivotal Role of Mitochondria in Oxidative Stress and Bioenergetics. *BioMed Research International*, 1–14.
- Menna-Barreto, R.F.S. (2019). Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over)kill. *Cell Death & Disease*, 10, 93.
- Mesquita, R.D., Carneiro, A.B., Báfica, A., Gazos-Lopes, F., Takiya, C.M., Souto-Pradon, T., Viera, D.P., Ferreira-Pereira, A., Almeida, I.C., Figueiredo, R.T., Porto, B.N., Bozza, M.T., Graça-Souza, A.V., Lopes, A.H.C.S., Atella, G.C. e Silva-Neto, M.A.C. (2008). *Trypanosoma cruzi* Infection Is Enhanced by Vector Saliva through Immunosuppressant Mechanisms Mediated by Lysophosphatidylcholine. *Infection and Immunity*, 76, 5543–5552.

- Mukherjee, S.B., Das, M., Sudhandiran, G. e Shaha, C. (2002). Increase in Cytosolic Ca²⁺ Levels through the Activation of Non-selective Cation Channels Induced by Oxidative Stress Causes Mitochondrial Depolarization Leading to Apoptosis-like Death in *Leishmania donovani* Promastigotes. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 24717–24727.
- Nagajyothi, J.F. e Weiss, L.M. (2019). Advances in understanding the role of adipose tissue and mitochondrial oxidative stress in *Trypanosoma cruzi* infection. *F1000Research*, 8, F1000 Faculty Rev-1152.
- Nakabeppu, Y., Tsuchimoto, D., Furuichi, M. e Sakumi, K. (2004). The Defense Mechanisms in Mammalian Cells against Oxidative Damage in Nucleic Acids and their Involvement in the Suppression of Mutagenesis and Cell Death. *Free Radical Research*, 38, 423–429.
- Neeley, W.L. e Essigmann, J.M. (2006). Mechanisms of Formation, Genotoxicity, and Mutation of Guanine Oxidation Products. *Chemical Research in Toxicology*, 19, 491–505.
- Nogueira, N.P., De Souza, C.F., Saraiva, F.M.S., Sultano, P.E., Dalmau, S.R., Bruno, R.E., Gonçalves, R.L.S., Laranja, G.A.T., Leal, L.H.M., Coelho, M.G.P., Masuda, C.A., Oliveira, M.F. e Paes, M.C. (2011). Heme-induced ROS in *Trypanosoma cruzi* activates CaMKII-like that triggers epimastigote proliferation. One helpful effect of ROS. *PLoS One*, 6, e25935.
- Nogueira, N.P., Saraiva, F.M.S., Oliveira, M.P., Mendonça, A.P.M., Inacio, J.D.F., Almeida-Amaral, E.E., Menna-Barreto, R.F., Laranja, G.A.T., Torres, E.J.L., Oliveira, M.F. e Paes, M.C. (2017). Heme modulates *Trypanosoma cruzi* bioenergetics inducing mitochondrial ROS production. *Free Radical Biology and Medicine*, 108, 183–191.
- Oliveira, M.M. (2014). Identificação de potenciais ligantes de receptor do fator de ativação de plaquetas (PAFR) e nocaute de possível PAFR de *Trypanosoma cruzi*. Dissertação (Mestrado em Ciências - Microbiologia), Instituto de Microbiologia Paulo de Goés, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Opperdoes, F.R., Borst, P., Bakker, S. e Leene, W. (1997). Localization of glycerol-3-phosphate oxidase in the mitochondrion and particulate NAD⁺-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenase in the microbodies of the bloodstream form to *Trypanosoma brucei*. *European Journal of Biochemistry*, 76, 29–39.
- Opperdoes, F.R. e Michels, P.A.M. (2008). Complex I of Trypanosomatidae: does it exist? *Trends in Parasitology*, 24, 310–317.
- Ott, M., Zhivotovsky, B. e Orrenius, S. (2007). Role of cardiolipin in cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death & Differentiation*, 14, 1243–1247.
- Papakonstantinou, V.D., Lagopati, N., Tsilibary, E.C., Demopoulos, C.A. e Philippopoulos, A.I. (2017). A Review on Platelet Activating Factor Inhibitors: Could a New Class of Potent Metal-Based Anti-Inflammatory Drugs Induce Anticancer Properties? *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2017, 1–19.
- Pedersen, L., Panahandeh, P., Siraji, M. I., Knappskog, S., Lønning, P. E., Gordillo, R., Scherer, P. E., Molven, A., Teigen, K. e Halberg, N. (2020). Golgi-localized PAQR4 mediates Anti-apoptotic Ceramidase Activity in Breast Cancer. *Cancer Research*, canres.3177.2019.
- Perez, C.J., Lymbery, A.J. e Thompson, R.C.A. (2015). Reactivation of Chagas Disease: Implications for Global Health. *Trends in Parasitology*, 31, 595–603.
- Pérez-Molina, J.A. e Molina, I. (2018). Chagas disease. *The Lancet*, 391, 82–94.
- Piacenza, L., Irigoín, F., Alvarez, M.N., Peluffo, G., Taylor, M.C., Kelly, J.M., Wilkinson, S.R. e Radi, R. (2007). Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. *The Biochemical Journal*, 403, 323–334.
- Proto, W.R., Coombs, G.H. e Mottram, J.C. (2012). , *Nature Reviews Microbiology*, 11, 58–66.
- Qiao, J., Huang, F., Naikawadi, R.P., Kim, K.S., Said, T. e Lum, H. (2006). Lysophosphatidylcholine impairs endothelial barrier function through the G protein-coupled receptor GPR4. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 291, L91–L101.
- Ramos, R.G., Libong, D., Rakotomanga, M., Gaudin, K., Loiseau, P.M. e Chaminade, P. (2008). Comparison between charged aerosol detection and light scattering detection for the analysis of *Leishmania* membrane phospholipids. *Journal of Chromatography A*, 1209, 88–94.
- Rao, S.P., Riederer, M., Lechleitner, M., Hermansson, M., Desoye, G., Hallström, S., Graier, W.F. e Frank, S. (2013). Acyl chain-dependent effect of lysophosphatidylcholine on endothelium-dependent vasorelaxation. *PLoS one*, 8, e65155.

- Rassi, A., Rassi, A. e Marin-Neto, J.A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375, 1388–1402.
- Riccardi, C. e Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols*, 1, 1458.
- Rodrigues, C.O., Dutra, P.M.L., Barros, F.S., Souto-Pradón, T., Meyer-Fernandes, J.R. e Lopes, A.H.C.S. (1999). Platelet-Activating Factor Induction of Secreted Phosphatase Activity in *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 266(1), 36–42. doi:10.1006/bbrc.1999.1759
- Rodrigues, C.O., Dutra, P.M.L., Souto-Pradón, T., Cordeiro, R.S.B. e Lopes, A.H.C.S. (1996). Effect of Platelet-Activating Factor on Cell Differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 223, 735–740.
- Rosa, M.S.S., Vieira, R.B., Pereira, A.F., Dutra, P.M.L. e Lopes, A.H.C.S. (2001). Platelet-Activating Factor (PAF) Modulates Peritoneal Mouse Macrophage Infection by *Leishmania amazonensis*. *Current Microbiology*, 43, 33–37.
- Sano, M. e Fukuda, K. (2008). Activation of Mitochondrial Biogenesis by Hormesis. *Circulation Research*, 103, 1191–1193.
- Silva-Neto, M.A.C., Carneiro, A.B., Vieira, D.P., Mesquita, R.D. e Lopes, A.H.C.S. (2002). Platelet-activating factor (PAF) activates casein kinase 2 in the protozoan parasite *Herpetomonas muscarum muscarum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293, 1358–1363.
- Silva-Neto, M.A.C., Lopes, A.H.C.S. e Atella, G.C. (2016). Here, There, and Everywhere: The Ubiquitous Distribution of the Immunosignaling Molecule Lysophosphatidylcholine and Its Role on Chagas Disease. *Frontiers in Immunology*, 7.
- Snyder, F. (1995). Platelet-activating factor and its analogs: metabolic pathways and related intracellular processes. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*, 1254, 231–249.
- Teixeira, D.E., Benchimol, M., Crepaldi, P.H., De Souza, W. (2011). Atlas Didático Ciclo de Vida do *Trypanosoma cruzi*. 1ª Ed (Rio de Janeiro, Cecierj), pp. 6 - 22.
- Tomás, A.M. e Castro, H. (2013). Redox metabolism in mitochondria of trypanosomatids. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19, 696–707.
- Van Zandbergen, G., Bollinger, A., Wenzel, A., Kamhawi, S., Voll, R., Klinger, M., Müller, A., Hölscher, C., Herrmann, M., Sacks, D., Solbach, W. e Laskay, T. (2006). *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 13837–13842.
- Vazquez, C.L. e Colombo, M.I. (2009). Assays to assess autophagy induction and fusion of autophagic vacuoles with a degradative compartment, using monodansylcadaverine (MDC) and DQ-BSA. *Methods in Enzymology*, 452, 85-95.
- Villas-Boas, M.H., Wait, R., Silva, R.B., Rodrigues, M.L. e Barreto-Bergter, E. (2005). Ceramide glycosylation and fatty acid hydroxylation influence serological reactivity in *Trypanosoma cruzi* glycosphingolipids. *FEMS Microbiology Letters*, 244, 47-52.
- Werbovetz, K.A. e Englund, P.T. (1996). Lipid metabolism in *Trypanosoma brucei*: utilization of myristate and myristoyllysophosphatidylcholine for myristoylation of glycosylphosphatidylinositol. *Biochemical Journal*, 318, 575–581.
- WHO (2020) World Health Organization. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/chagas-disease>. Acesso em 16/06/2020.
- Xu, P., Jiang, L., Yang, Y., Wu, M., Liu, B., Shi, Y., Shen, Q., Jiang, X., He, Y., Cheng, D., Xiong, Q., Yang, Z., Duan, L., Lin, J., Zhao, S., Shi, P., Yang, C., e Chen, Y. (2020). PAQR4 promotes chemoresistance in non-small cell lung cancer through inhibiting Nrf2 protein degradation. *Theranostics*, 10, 3767–3778.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., Eto, K., Akanuma, Y., Froguel, P., Foufelle, F., Ferre, P., Carling, D., Kimura, S., Nagai, R., Kahn, B.B. e Kadowaki, T. (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine*, 8, 1288–1295.
- Yang, L.V., Radu, C.G., Wang, L., Riedinger, M. e Witte, O.N. (2004). Gi-independent macrophage chemotaxis to lysophosphatidylcholine via the immunoregulatory GPCR G2A. *Blood*, 105, 1127–1134.

- Youn, C.-K., Song, P.I., Kim, M.-H., Kim, J.S., Hyun, J.-W., Choi, S.-J., Yoon, S.P., Chung, M.H., Chang, I.-Y. e You, H.J. (2007). Human 8-Oxoguanine DNA Glycosylase Suppresses the Oxidative Stress Induced Apoptosis through a p53-Mediated Signaling Pathway in Human Fibroblasts. *Molecular Cancer Research*, 5, 1083–1098.
- Yu, X., Li, Z., Chan, M. T., e Wu, W. K. (2015). PAQR3: a novel tumor suppressor gene. *American journal of cancer research*, 5, 2562–2568.
- Zalila, H., González, I.J., El-Fadili, A.K., Delgado, M.B., Desponds, C., Schaff, C. e Fasel, N. (2011). Processing of metacaspase into a cytoplasmic catalytic domain mediating cell death in *Leishmania major*. *Molecular microbiology*, 79, 222–239.
- Zhang, Y., Chen, X., Gueydan, C. e Han, J. (2017). Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Research*, 28, 9–21.
- Zheng, L., T'Kind, R., Decuypere, S., von Freyend, S.J., Coombs, G.H. e Watson, D.G. (2010). Profiling of lipids in *Leishmania donovani* using hydrophilic interaction chromatography in combination with Fourier transform mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24, 2074–2082.
- Zhu, T., Gobeil, F., Vazquez-Tello, A., Leduc, M., Rihakova, L., Bossolasco, M., Bkaily, G., Peri, K., Varma, D.R., Orvoine, R. e Chemtob, S. (2006). Intracrine signaling through lipid mediators and their cognate nuclear G-protein-coupled receptors: a paradigm based on PGE2, PAF, and LPA1 receptors. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 84, 377–391.
- Zimmermann, L.T., Folly, E., Gomes, M.T., Alviano, D.S., Alviano, C.S., Silva-Filho, F.C., Atella, G.C. e Lopes, A.H.C.S. (2010). Effects of platelet-activating factor on the interaction of *Trypanosoma cruzi* with *Rhodnius prolixus*. *Parasitology Research*, 108, 1473–1478.
- Zuckerbraun, B.S., Chin, B.Y., Bilban, M., de Costa d'Avila, J., Rao, J., Billiar, T.R. e Otterbein, L. E. (2007). Carbon monoxide signals via inhibition of cytochrome c oxidase and generation of mitochondrial reactive oxygen species. *The FASEB Journal*, 21, 1099–1106.