

AMANDA DE ORNELLAS GONÇALVES

Efeito da lisofosfatidilcolina na modulação da proliferação, diferenciação e infectividade de *Leishmania mexicana*.



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
DEZEMBRO / 2018

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do(a) Professor(a) Angela Hampshire de Carvalho Santos Lopes e coorientação de Isabel Cristina de Faria Moreira.

De Ornellas Gonçalves, Amanda

O EFEITO DA LISOFOSFATIDILCOLINA NA MODULAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO, DIFERENCIAÇÃO E INFECTIVIDADE DE *Leishmania mexicana* / Amanda de Ornellas Gonçalves -- Rio de Janeiro: UFRJ, 2018. 48f.

Orientadora: Angela Hampshire de Carvalho Santos Lopes.

Coorientadora: Isabel Cristina de Faria Moreira.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2018.

Bibliografia: f.64-69

1. *Leishmania*. 2. *Leishmania mexicana*. 3. PAF. 4. LPC. I. Lopes, Angela Hampshire de Carvalho Santos, orient. II. Moreira, Isabel Cristina de Faria, coorient. III. Título.

**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: Amanda de Ornellas Gonçalves

DRE: 115066826

BANCA EXAMINADORA: Profa. Fernanda de Avila Abreu (Presidente)

Profa. Danielle Pereira Vieira Silveira

MSc. Felipe Soares Coelho

Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius (Suplente)

Título da Monografia: "Efeito da lisofosfatidolcolina na modulação da proliferação, diferenciação e infectividade de *Leishmania mexicana*"

Local: Sala de reunião 106 / Bloco N / CCS / UFRJ

Data e hora de início: 6 de dezembro de 2018 às 10:30h

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 pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, de de 2018.

NOTA

10,0

10,0

10,0

Banca Examinadora:

Fernanda de Avila Abreu
Profa. Fernanda de Avila Abreu

Danielle Pereira Vieira Silveira
Profa. Danielle Pereira Vieira Silveira

Felipe Soares Coelho
MSc. Felipe Soares Coelho

Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius

Aluno:

Amanda de Ornellas Gonçalves
Amanda de Ornellas Gonçalves

Orientador:

Angela Hampshire de Carvalho Santos Lopes
Profa. Angela Hampshire de Carvalho Santos Lopes

Coorientador:

Isabel Cristina de Faria Moreira
MSc. Isabel Cristina de Faria Moreira

**Coordenador
de TCC**

Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho
Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Aos meus pais, por todo amor, carinho e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por sempre me iluminar e me dar forças para não desistir mesmo quando eu achava que não conseguiria mais. Sem Ele nada disso seria possível.

Agradeço aos meus pais que, sem dúvida alguma, são as pessoas mais importantes da minha vida e batalharam muito para que eu realizasse meus sonhos e chegasse até aqui. Obrigada por todo suporte emocional, psicológico e financeiro que me dão desde sempre, tudo isso é por vocês.

Aos meus padrinhos que sempre me tiveram como filha me amando, cuidando e apoiando como tal. Eu não sei o que seria de mim sem vocês, obrigada por estarem comigo em todos os momentos da minha vida.

Angela, a pessoa que me acolheu de braços abertos, mesmo nova e sem experiência, obrigada por todas as oportunidades que você me proporcionou, por todo carinho e tudo que eu pude aprender, você é a melhor orientadora que alguém poderia ter. Isabel, eu não sei o que seria da minha vida nessa universidade sem você, que foi e é o meu anjo da guarda nesse lugar, obrigada pela paciência e por me ensinar tanto. Vocês são meus maiores exemplos de profissionais, não tenho palavras para agradecer a tudo que fizeram por mim, se hoje eu estou aqui é graças a vocês, então a minha sincera admiração e o meu agradecimento.

A toda a minha família que sempre me deu todo apoio possível, em especial a minha avó que é o maior exemplo de mulher que eu poderia ter. As minhas tias e tios que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos, a tia Maria que é minha tia-mãe, obrigada por todos os mimos e apoio.

Aos meus primos que são meus irmãos de coração: Bruninha, obrigada por ser minha parceira de vida, minha inspiração a ser melhor, meu exemplo de fé e luta, obrigada por todas as ciladas e experiências que passamos juntas, esse mundo vai ser pequeno para nós. Matheus e Fernando, sempre protagonistas das maiores idiotices e melhores risadas que já dei, sem vocês dois esses anos teriam sido menos divertidos e mais árduos. Nathália, por ser o meu bebê que se tornou minha irmã, amiga e minha parceira de vergonhas e alegrias, obrigada por me aturar nos meus piores dias e, de um jeitinho todo seu, me fazer rir mesmo

nos piores momentos. Pri, que sempre foi um pouco mãe para mim, obrigada por tudo que você fez e faz por mim e principalmente pelos 3 melhores presentes da minha vida.

Gabriel, obrigada por ter aturado todas as minhas crises de choro, surto e vontades de desistir, você sempre esteve aqui tentando melhorar a situação, o dia e a vida. Obrigada por não ter desistido mesmo quando eu fiquei insuportável, você é parte integral disso, obrigada por ser o melhor namorado, amigo e companheiro que eu poderia ter.

Essa jornada não teria sido possível sem o apoio e companherismo de todos os meus amigos do Laboratório de bioquímica de microrganismos Felipe, Juliana, Manoel, Camila, Fernanda, Inês, Adriana, Paulo, Ariane, vocês foram essenciais para esse trabalho, fazendo o LBM ser um ambiente tão agradável de se conviver, obrigada por toda a ajuda, apoio e ensinamentos. Ju, minha parceira de trabalhos, você será eternamente a minha dupla sertaneja.

Aos meus amigos que participaram comigo em toda essa jornada: Carol, Natalia, Victória, Julia e Matheus, meu muito obrigada pela parceria e amizade, eu não teria conseguido chegar até o final desses quatro anos se não fossem vocês, agradeço imensamente por tudo que já vivemos juntos, obrigada por serem os melhores amigos que alguém poderia ter, eu amo muito cada um de vocês.

Maria Julia e Thaissa, obrigada por serem tão especiais e amorosas comigo, eu não seria nada sem vocês.

Agradeço aos membros da banca por disponibilizarem seu tempo para avaliar e contribuir com meus resultados e o projeto do laboratório.

Agradeço também as agências de fomento, CNPq e FAPERJ.

RESUMO**AMANDA DE ORNELLAS GONÇALVES****EFEITO DA LISOFOSFATIDILCOLINA NA MODULAÇÃO DA
PROLIFERAÇÃO, DIFERENCIAÇÃO E INFECTIVIDADE DE *Leishmania*
*mexicana***

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.

ORIENTADOR: ANGELA HAMPSHIRE DE CARVALHO SANTOS LOPES

As leishmanioses estão entre as principais doenças parasitárias emergentes que afetam mamíferos. Essas infecções são causadas por diferentes espécies do gênero *Leishmania*. Dentre essas, *Leishmania mexicana* causa lesões cutâneas e eventualmente difusas (anérgicas) e ocorre no chamado Novo Mundo, principalmente no México e América Central. Mediadores lipídicos, incluindo a lisofosfatidilcolina (LPC) e o fator de ativação de plaquetas (PAF), apresentam papel importante na infecção por alguns protozoários. Nosso grupo mostrou que o PAF estimula a diferenciação celular e a infectividade de alguns tripanossomatídeos, além de uma cascata de transdução de sinais, ativando a proteína cinase CK2, através da proteína cinase C (PKC) em *Herpetomonas muscarum muscarum*, além de aumentar a atividade e a expressão da CK2 em *Leishmania tropica*. Recentemente, foi visto que o *Trypanosoma cruzi* sintetiza uma LPC bioativa, de 18 carbonos e uma instauração (LPC C18:1), que possui a capacidade de agregar plaquetas. Com base nesses estudos, a hipótese formulada para esse projeto é a de que a LPC tem efeito modulatório nas vias de sinalização de *Leishmania mexicana* e em processos da manutenção do seu ciclo de vida. Essa hipótese foi analisada em testes de proliferação, na qual o sistema foi crescido por 7 dias na presença e ausência de LPC, sendo observado um crescimento maior nas tratadas com LPC a partir do 3º dia de experimento. Testamos também a capacidade desse protozoário de se diferenciar, de promastigotas para amastigotas, onde os parasitos foram cultivados por 15 dias na presença e na ausência de LPC, sendo observado um aumento da porcentagem de formas diferenciadas, quando tratadas com LPC, a partir do 13º dia (40% a mais de diferenciadas). Foram feitos também testes de interação celular de *L. mexicana* com

macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, na presença e na ausência de LPC, sendo observado um aumento de cerca de 10% no índice de associação dos macrófagos tratados com LPC, após 24h e 4h de infecção. Sendo assim, nossos resultados sugerem uma modulação da infecção de macrófagos peritoneais de camundongos por *L. mexicana* pela LPC C18:1.

Palavras chave: *Leishmania*, *Leishmania mexicana*, PAF, LPC.

ABSTRACT**AMANDA DE ORNELLAS GONÇALVES****EFFECT OF LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINE ON THE MODULATION OF GROWTH, DIFFERENTIATION AND INFECTIVITY OF *Leishmania mexicana***

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.

ADVISOR: ANGELA HAMPSHIRE DE CARVALHO SANTOS LOPES

Leishmaniasis is among the major emerging parasitic diseases that affect humans. These infections are caused by different species of the genus *Leishmania*. Among these, *Leishmania mexicana* causes cutaneous and eventually diffuse (anergic) lesions, occurring especially in Mexico and Central America. Lipid mediators, including lysophosphatidylcholine (LPC) and platelet activation (PAF), play an important role in cell differentiation and infectivity of some trypanosomatids. PAF triggers a signal transduction cascade that activates protein kinase CK2, through protein kinase C (PKC), in *Herpetomonas muscarum muscarum*, and stimulates the activity and expression of CK2 in *Leishmania tropica*. Recently, our group showed that *Trypanosoma cruzi* synthesizes a bioactive LPC (C18:1LPC), which aggregates platelets and induces cell differentiation of the parasite. Based on these studies, the hypothesis formulated for this project was that C18:1 LPC would present a modulatory effect on several aspects of the physiology of *L. mexicana*. We analyzed the proliferation of promastigotes for seven days in the presence and in the absence of LPC and detected that the LPC-treated parasites have grown more than the untreated ones. We have also tested if C18:1 LPC would trigger the differentiation of the parasites from promastigotes to amastigotes. The parasites were then cultivated for up to 15 days in the presence and in the absence of LPC and we observed that the LPC-treated parasites presented 40% more amastigote forms than the untreated ones. Preliminary results from the interaction of promastigotes with BALB/c mice peritoneal macrophages showed an increase the association index of LPC-treated macrophages with *L. mexicana*, within 24 and 4 hours after the infection. Therefore, our results suggest a modulation of several important features of the life cycle of *L. mexicana* by C18:1 LPC.

Key words: *Leishmania*, *Leishmania mexicana*, PAF, LPC.

LISTA DE ABREVEATURAS

AA:Ácido araquidônico

ANOVA:Análise de variância

CO₂:Gás carbônico

COX-2:Ciclo-oxigenase-2

DAG:Diacilglicerol

DNA:Ácido desoxirribonucleico

ECBs:Endocanabióides

EDHF:Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

GPCRs:Receptores acoplados à proteína G

GPR4:Receptores acoplados à proteína G 4

ICAM-1:Moléculas de adesão

IDO:Indoleamina 2,3 dioxigenase

IFN- γ :Interferon gama

IL-1:Interleucina 1

IL-12:Interleucina 12

IL-2:Interleucina 2

IL-8:Interleucina 8

LC:Leishmaniose cutânea

LCD:Leishmaniose cutânea difusa

LMC:Leishmaniose mucocutânea

LPA:Ácido lisofosfatídico

LPC C18:1:Lisofosfatidilcolina de 18 carbonos e 1 insaturação

LPC:Lisofosfatidilcolina

LPI:Lisofosfatidilinositol

MCP-1:Proteína quimiotática de monócitos 1

NAD(P)H: Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NO:Óxido nítrico

PAF:Fator de ativação de plaquetas

PAF-AH: Fator ativador de plaquetas acetil-hidrolase

PAFR:Receptor do PAF

PBS:Tampão fosfato-salino

PC:Fosfatidilcolina

PKC:Proteína kinase C

PLA2:Fosfolipase A2

PLC:Fosfolipase C

PUFA:Precusores do ácido graxo poli-insaturados

RNA:Ácido ribonucleico

ROS:Espécie reativa de oxigênio

RPMI:Instituto Roswell Park Memorial

SIP:Esfingosina-1-fosfato

SPMs:Mediadores pró-resolução especializados

TGF- β 1:Fator transformador de crescimento β 1

Th-1: Linfócitos T *helper* 1

Th-2: Linfócitos T *helper* 2

TLR4:Receptor do tipo toll 4

TNF- α :Fatores de Necrose Tumoral alfa

WEB 2086: Antagonista do receptor de PAF

ÍNDICE

Resumo.....	VII
Abstract	X
Lista de Abreviaturas	XI
I. INTRODUÇÃO	1
1. Família Trypanosomatidae.....	1
1. <i>Leishmania</i>	1
2.1. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.....	3
2.2. Diferenciação celular	5
2.3. <i>Leishmania mexicana</i>	6
3. Tratamento	7
4. Lipídios Bioativos	8
4.1. Fator ativador de plaquetas (PAF).....	11
4.2. Lisofosfatidilcolina (LPC).....	13
II. JUSTIFICATIVA	17
III. OBJETIVOS	18
1. Objetivos Gerais.....	18
2. Objetivos Específicos.....	18
IV. METODOLOGIA	18
1. Microrganismos	18
2. Avaliação da proliferação celular	18
3. Avaliação da diferenciação celular	19
4. Interação e sobrevivência celular	19
5. Análise estatística.....	20
V. RESULTADOS.....	21
1. Efeito da LPC C18:1na proliferação celular de <i>Leishmania mexicana</i>	21
2. Efeito da LPC C18:1na diferenciação celular de <i>Leishmania mexicana</i>	21
3. Efeito da LPC C18:1 na interação e sobrevivência celular de <i>Leishmania mexicana</i> ...	23
VI. DISCUSSÃO	25
VII. CONCLUSÃO	27
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

I. INTRODUÇÃO

1. Família Trypanosomatidae

Os tripanossomatídeos formam uma família de protozoários evolutivamente bem-sucedidos, não apenas por serem encontrados em quase todo o planeta, mas também por parasitar todos os grupos de vertebrados, várias espécies de invertebrados (incluindo alguns insetos) e até plantas. Os tripanossomatídeos têm, predominantemente, seus ciclos de vida estabelecidos em um único hospedeiro (parasitos monoxênicos), entretanto, alguns destes protozoários estabelecem o ciclo de vida em mais de um hospedeiro (parasitos heteroxênicos). Os nove gêneros de tripanossomatídeos reconhecidos até hoje, os monoxênicos (*Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Herpetomonas*, *Wallaceina* e *Leptomonas*) bem como os heteroxênicos (*Trypanosoma*, *Leishmania*, *Endotrypanum* e *Phytomonas*), foram classificados, principalmente, por características morfológicas em conjunto com relações com o hospedeiro. Os morfotipos que caracterizam os gêneros são a forma da célula, as dimensões e a posição do complexo cinetoplasto-bolsa flagelar em relação ao núcleo (Hoar & Wallace, 1966; Wallace, 1966; Svobodová *et al.*, 2007; Vickerman, 2009).

Os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* são os de maior proeminência nessa família, devido à grande importância das doenças que causam em humanos e em animais domésticos. Estes gêneros são obrigatoriamente heteroxênicos e estabelecem seus ciclos de vida em vertebrados e invertebrados, tendo como vetores insetos hematófagos. Além da importância médica, os tripanossomatídeos têm importância econômica, com alguns gêneros que afetam plantas, como o gênero *Phytomonas*, que é heteroxênico e é transmitido por percevejos fitófagos (Kaufer *et al.*, 2017).

2. *Leishmania*

Leishmanioses formam um grupo de doenças causadas pelo protozoário *Leishmania*. Existem mais de 20 espécies deste parasita que causam infecções em humanos, sendo transmitidos pela picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas. Essa doença afeta principalmente pessoas pobres na América Latina, Ásia, Europa e África, estando associado com a má alimentação, deslocamento populacional, moradia precária, sistema imunológico fraco e falta de recursos (<http://www.who.int/en/>). Esse gênero de protozoários foi descoberto em 1903 por Ross, sendo suas espécies classificadas pela manifestação clínica que causam, pela distribuição geográfica e seu comportamento em

flebotomíneos e hospedeiros mamíferos (Lainson & Shaw, 1987).

Esse conjunto de doenças pode ser dividido em: cutânea (LC), que afeta a pele, causando úlceras que podem ou não cicatrizar espontaneamente, dependendo da espécie; cutânea difusa (LCD), que produz lesões cutâneas disseminadas e crônicas, sendo mais difícil de tratar do que a leishmaniose cutânea; mucocutânea (LMC), que provoca ulceração, seguida pela destruição das membranas mucosas das cavidades nasais, orais, da garganta e tecidos adjacentes, e a leishmaniose visceral (LV), que é considerada a forma mais perigosa de leishmaniose, podendo ser letal caso não tratada, é caracterizada por febre alta, perda de peso, anemia, inchaço do fígado e baço (Lainson & Shaw, 1978; Lopes *et al.*, 2010).

São reconhecidos dois estágios evolutivos distintos durante o ciclo de vida deste parasito (**Figura 1**). As formas promastigotas (**Figura 1A**), que estão presentes dentro do flebotomíneo (hospedeiro invertebrado), são alongadas e possuem flagelo longo e as formas amastigotas (**Figura 1B**), que estão presentes no hospedeiro vertebrado, são arredondadas, com flagelo quase inteiramente intracelular (Olivier, Gregory & Forget, 2005).

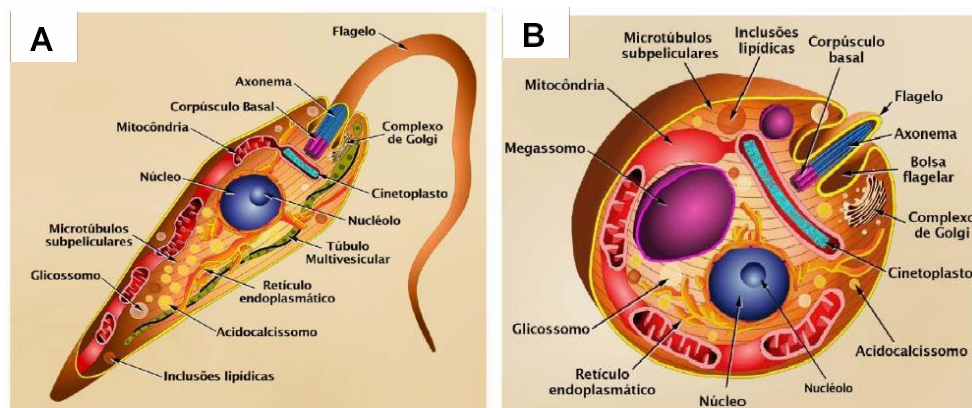


Figura 1: Formas evolutivas: **A-** Promastigota **B-** Amastigota

(Adaptação do Atlas didático: Ciclo de vida da *Leishmania*/Dirceu Esdras Teixeira *et al.*, 2013)

2.1. Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

No ciclo de vida de *Leishmania* há três formas de desenvolvimento envolvidas: promastigota metacíclico (**Figura 2A**), que não se multiplica, infecta hospedeiros mamíferos e é encontrada no intestino médio e na probóscide do flebotomíneo; a promastigota procíclico (**Figura 2B**), que é uma forma que realiza divisão binária, não infecta hospedeiros mamíferos e é encontrada no intestino médio do inseto e a forma amastigota (**Figura 2C**), que é arredondada e não possui motilidade, fica dentro do vacúolo parasitóforo das células do sistema imune dos hospedeiros vertebrados (Besteiro *et al.*, 2007).

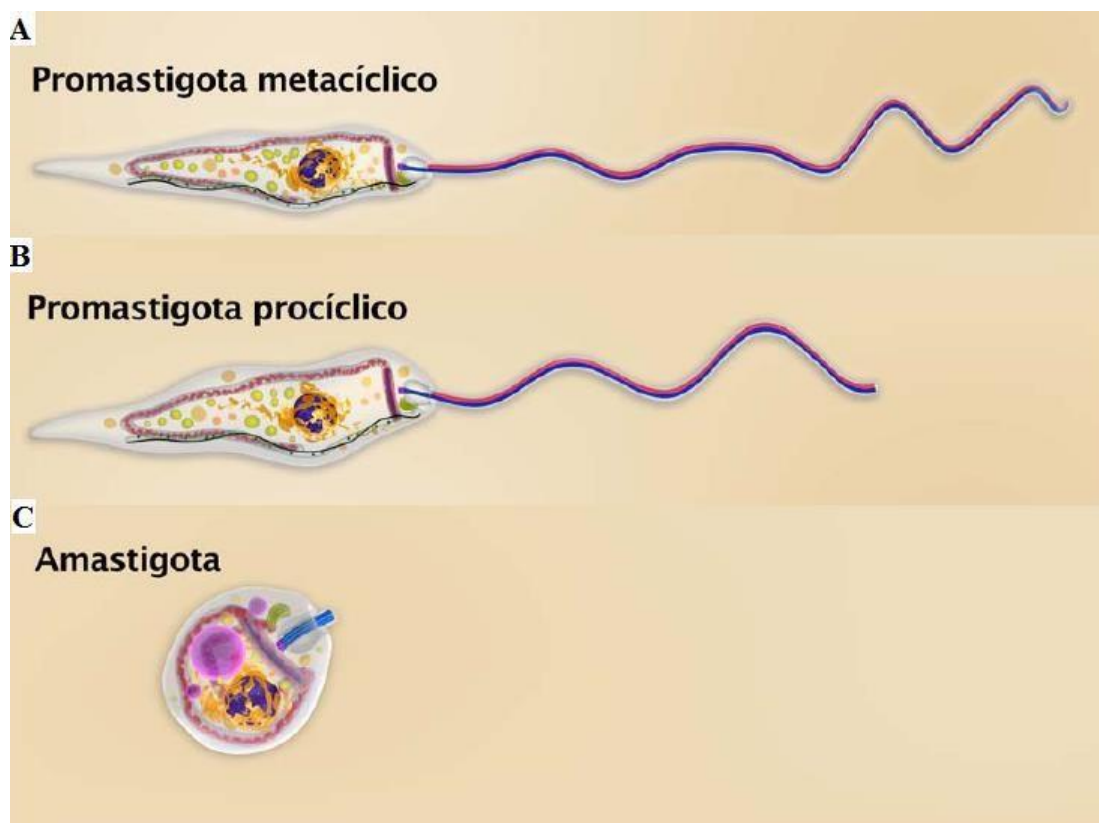
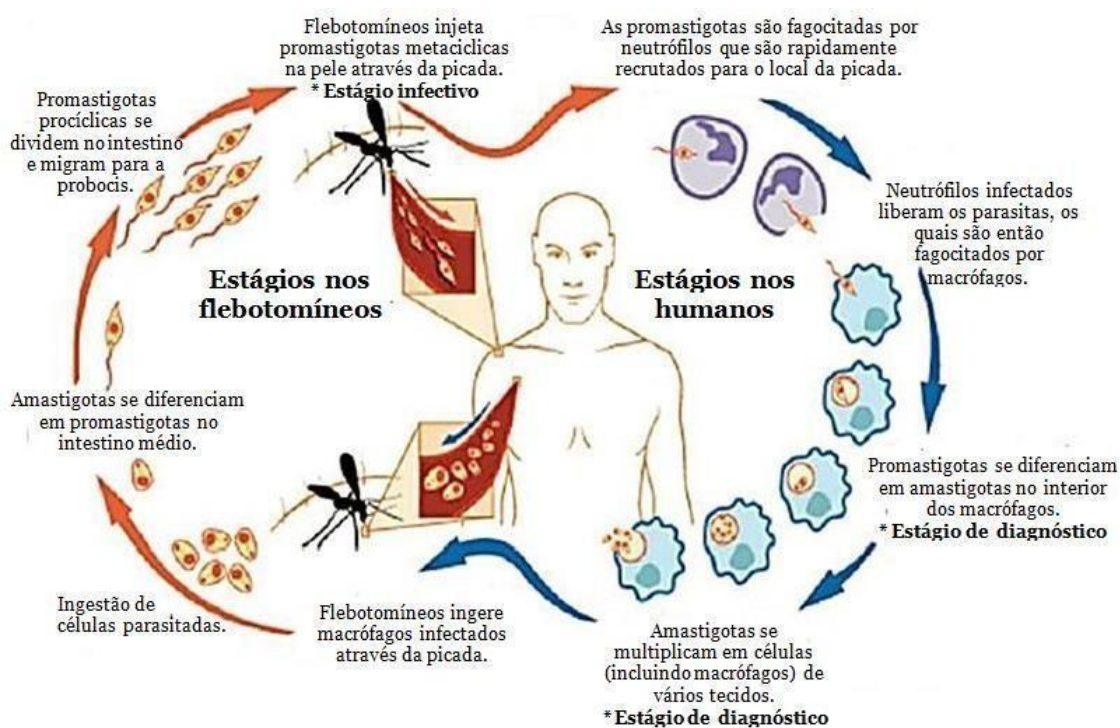


Figura 2: Formas evolutivas existentes no ciclo de vida de *Leishmania* spp: **A-** Promastigota metacíclico, **B-** Promastigota procíclica, **C-** Amastigota (Adaptação do Atlas didático: Ciclo de vida da *Leishmania*/Dirceu Esdras Teixeira *et al.*, 2013).

O vetor flebotomíneo é infectado quando se alimenta do sangue de um mamífero infectado. Quando o flebotomíneo infectado se alimenta de um hospedeiro mamífero, sua probóscide perfura a pele; a saliva do inseto, contendo anticoagulantes, é injetada na ferida para evitar a coagulação sanguínea, promastigotas metacíclicos são transferidos para o hospedeiro vertebrado juntamente com a saliva. No hospedeiro vertebrado,

apesar dos macrófagos serem considerados as principais células hospedeiras, há também outras células fagocíticas. Os neutrófilos são os primeiros fagócitos a serem recrutados ao local da inflamação e isso constitui uma via crucial para a infecção. Quando as células promastigotas metacíclicas são fagocitadas por macrófagos, elas diferenciam-se na forma amastigota intracelular, que reside dentro do vacúolo parasitóforo (vacúolo com características lisossomais), onde resiste à ação microbicida das lisozimas. Os amastigotas sobrevivem e se multiplicam dentro desses vacúolos, levando eventualmente à lise dos macrófagos, sendo então liberadas e absorvidas por macrófagos adicionais, continuando o ciclo. Assim, todos os órgãos que contêm macrófagos poderão ser infectados (Besteiro *et al.*, 2007; Guimarães-Costa *et al.*, 2009) (Figura 3).



Adaptado de McGwire and Satoskar, 2014

Figura 3: Ciclo biológico de *Leishmania* spp.

Este grupo de patógenos desenvolveu múltiplos mecanismos para subverter as funções dos macrófagos, alterando suas vias de sinalização a fim de garantir a sua sobrevivência e propagação dentro dos hospedeiros mamíferos (Olivier, Gregory & Forget, 2005; Peters *et al.*, 2008). Para garantir sua sobrevivência, *Leishmania* deve

evitar a ativação da resposta imune do hospedeiro mamífero. Nos macrófagos, os parasitos produzem um grande número de amastigotas, através da replicação. Durante a infecção, após estarem ativados, os macrófagos produzem citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 12 (IL 12), que induz a ativação de respostas Th-1, para combater parasitos intracelulares (Olivier, Gregory & Forget, 2005). Os linfócitos Th-1 induzem a ativação de macrófagos, através da secreção de INF-gama, que estimula os macrófagos a produzirem óxido nítrico (NO), o protagonista em matar parasitos intracelulares. O TLR4 tem importância no reconhecimento de formas promastigotas de *L. major*. Em camundongos nocaute para TLR4 e infectados por *L. major*, foi visto um aumento do número de parasitos, associado com um aumento total da produção, *in vitro*, de citocinas Th1 e Th2 (Vouldoukis *et al.*, 1995; Kropf *et al.*, 2004).

2.2. Diferenciação celular

Como já supracitado a forma promastigota, estrutura móvel que apresenta um longo flagelo e uma forma de célula alongada, vai diferenciar-se quando estiver dentro do macrófago para a forma amastigota que possui um flagelo curto com apenas uma pequena ponta bulbosa que se estende além do corpo celular. Esta é uma grande mudança na forma da célula e resulta em uma relação de volume / superfície celular reduzido, diminuindo assim a área sobre a qual a célula é exposta ao ambiente hostil do vacúolo parasitóforo e também uma provável reformatação do uso de flagelos (Gull, 2009).

A diferença mais importante entre as formas promastigota e amastigota é o fato de mudar de um flagelo longo para um flagelo curto não móvel (Wheeler *et al.*, 2015). Há também uma grande reestruturação da região da bolsa e do pescoço flagelar que está associada a mudanças na localização das proteínas da zona de fixação do flagelo. A bolsa flagelar é o único local de exocitose e endocitose na célula e, portanto, é uma interface importante entre o parasita e seus hospedeiros (Wheeler *et al.*, 2016).

A permanência do flagelo curto nas formas amastigotas sugere que tenha uma função significativa para o parasita dentro do macrófago (Gull, 2009). O parasita *Leishmania*, através de seu flagelo, pode avaliar as condições de seu macrófago, se ele estiver em condições apropriadas, o parasita pode se dividir, mas caso não esteja nessas condições, o parasita pode não realizar a divisão, pois o macrófago pode estar prestes a morrer e lisar, liberando o protozoário em um novo ambiente (Sunter & Gull, 2017).

O estudo do fenômeno de diferenciação celular de *Leishmania* spp. é de extrema

relevância devido a sua aparente co-evolução com distintos ciclos de vida patogênicos, levando à capacidade de persistirem em diferentes ambientes dentro do seu vetor e hospedeiro. Além disso, a diferenciação celular é fundamental para o estabelecimento da infecção no seu hospedeiro, já que sua reprodução e infectividade se dão pela forma amastigota do parasito (Maslov *et al.*, 2013 ; Wheeler *et al.*, 2013).

2.3. *Leishmania mexicana*

A *Leishmania mexicana* é uma das espécies do gênero *Leishmania* e é um dos agentes causadores da leishmaniose cutânea (também conhecida como leishmaniose tegumentar) na América Latina. Essa espécie não foi relatada até hoje como causadora de leishmaniose no Brasil, porém ela está presente no México, em países da América Central, na Colômbia e no Equador (Gontijo, Bernardo e Carvalho, 2003; Organização Pan-Americana da Saúde, 2018). As lesões cutâneas ocorrem no local da picada, possuem um aspecto pápulo-vesiculoso e podem regredir espontaneamente ou mediante tratamento, porém também é possível ocorrer a progressão da doença, levando ao surgimento de lesões cutâneas disseminadas e/ou invasão da mucosa (Furtado *et al.*, 1994).

Cerca de 95% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia central. A leishmaniose cutânea é predominantemente urbana e periurbana. A doença é geralmente caracterizada por grandes surtos em cidades densamente povoadas, especialmente em zonas de guerra e conflitos, campos de refugiados e em locais onde há migração de populações em larga escala. A epidemiologia de leishmaniose cutânea nas Américas é complexa, com variações intra e interespecíficas nos ciclos de transmissão, hospedeiros reservatórios, vetores flebotomíneos, manifestações clínicas e resposta à terapia, além de múltiplas espécies de *Leishmania* circulantes na mesma área geográfica (<http://www.who.int/en/>).

De maneira geral, as formas clínicas de leishmaniose cutânea e mucocutânea são endêmicas em 18 países do continente americano e no período entre 2001 e 2016 foram notificados cerca de 900 mil novos casos de leishmaniose cutânea, distribuídos principalmente no Brasil, Colômbia, Nicarágua e Peru, representando 75% do total de casos do Continente (**Figura 4**), com incidência de 22 casos por 100.000 habitantes (Organização Pan-Americana da Saúde; 2018. www.paho.org/leishmaniasis).

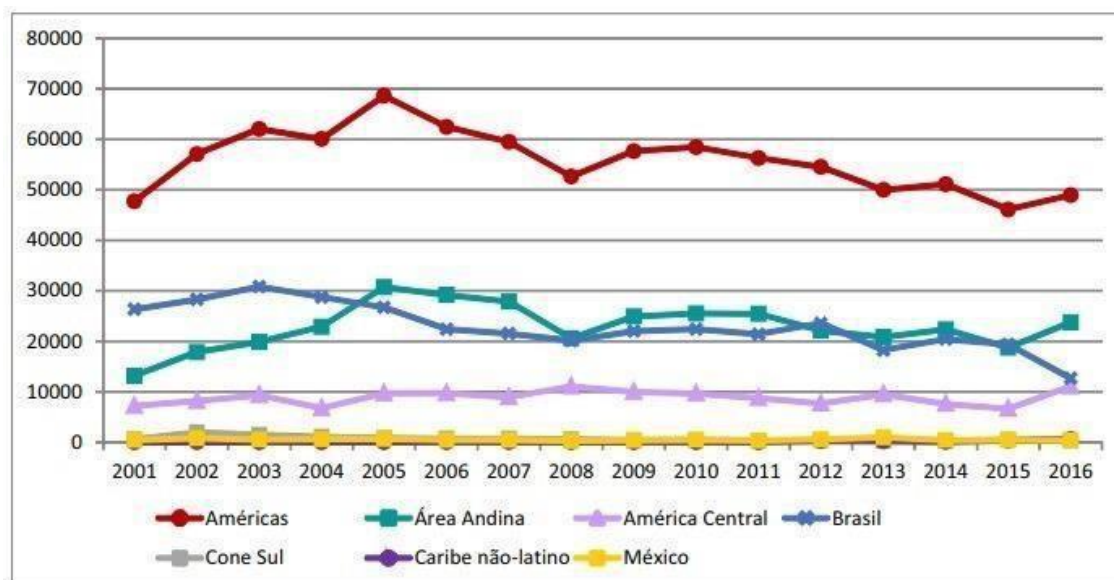


Figura 4: número de casos de leishmaniose cutânea e mucocutânea nas sub-regiões e em países selecionados nas Américas. Fonte: SisLeish-OPAS/OMS:Dados reportados pelos Programas Nacionais de Leishmanioses/Serviços de Vigilância.

3. Tratamento

Apesar de os tratamentos serem eficientes contra a leishmaniose cutânea, não há apenas um tipo de terapia considerada padrão e ideal para cada tipo clínico. A gravidade clínica da doença e a resposta ao tratamento variam de acordo com as espécies de protozoários. Existem duas abordagens básicas para o tratamento de leishmaniose cutânea, que são as terapias leishmanicidas e os métodos físicos de controle da infecção (Blum J, *et al.*, 2004; Uzun S. *et al.*, 2010; Uzun, *et al.*, 2018).

Os compostos antimoniais pentavalentes são altamente eficazes e foram a primeira linha de tratamento para a maioria das formas de leishmaniose; é considerado o padrão ouro para o desenvolvimento de novos fármacos. Seu mecanismo de ação não é totalmente elucidado, porém provavelmente age diretamente nos processos moleculares do parasito, como, por exemplo, influenciando a atividade leishmanicida dos macrófagos (Schubach *et al.*, 1998; McGwire & Satoskar, 2012). A segunda linha de tratamento contra a leishmaniose cutânea é a anfotericina B, um agente antifúngico que também apresenta resultados contra espécies de *Leishmania*; ele age se ligando ao ergosterol da membrana e desestabilizando a mesma. É comumente usada em pacientes com resistência ou contraindicação ao uso dos antimoniais pentavalentes (Korzeniewski *et al.*, 2004; Barratt & Legrand, 2005). A pentamidina é muito usada na América do Sul e em alguns casos no Velho Mundo; ela age interferindo na biosíntese de macromoléculas como RNA, DNA, fosfolípidos e proteínas

(Hellier *et al.*, 2000). A paromicina age bloqueando a síntese de proteínas, se ligando ao RNA ribossomal 16S. É usado sozinho ou em combinação com a anfotericina B (Sundar *et al.*, 2011). A miltefosina foi sintetizada, originalmente, para ser um agente anti-neoplásico; é uma alquilfosfocolina e é a única terapia oral contra leishmaniose (Jha *et al.*, 1999; Sundar *et al.*, 2006).

Mesmo com os fármacos já presentes e os esforços com combinações dos mesmos, o número crescente de pacientes infectados com cepas resistentes é uma das principais questões, por isso há ainda a procura por novos fármacos leishmanicidas (Mitropoulos *et al.*, 2010; Singh & Sundar, 2014). Algumas plantas são usadas há muito tempo como terapias contra doenças, principalmente como fontes de componentes difíceis de sintetizar, estudos recentes mostraram a importância da fitoterapia para doenças parasitárias como a leishmaniose (Carvalho e Ferreira, 2001; Derda e Hada's, 2014). Os óleos essenciais estão entre os compostos mais variáveis extraídos de plantas, dois dentre esses compostos são o linalool e o euginol, presentes em diversas plantas, esses dois óleos essenciais apresentam atividades leishmanicidas contra *L. amazonensis* (Rosa *et al.*, 2003; Ueda-Nakamura *et al.*, 2006). Estudos mostram que o esses dois compostos tem potencial leishmanicida promissor e que poderiam ser considerados compostos líderes na busca de novos fármacos leishmanicidas (Dutra *et al.*, 2016).

O tratamento físico, como a crioterapia (em nitrogênio líquido ou CO₂), é usado sozinho ou em combinação com antimoniais pentavalentes intralesionais ou sistêmicos. Essas terapias combinadas são supostamente mais eficazes do que a crioterapia sozinha (Schubach *et al.*, 1998).

Para gestantes, os tratamentos leishmanicidas sistêmicos ou intralesionais não são recomendados, já que não há informações suficientes sobre a segurança de se usar antimoniais pentavalentes ou outras drogas em mulheres grávidas ou lactantes. Métodos físicos como a crioterapia ou termoterapia, podem ser realizados se o tratamento for realmente necessário durante esse período (Lupi *et al.*, 2009).

4. Lipídios bioativos

O conceito de lipídios bioativos teve um reconhecimento tardio, mas promete ter um papel fundamental na investigação em biologia celular no século XXI. Eles não são apenas constituintes de membranas celulares, mas também são importantes mediadores de sinalização, atuando, assim, como mediadores lipídicos. Atuam na regulação imunológica,

na inflamação e na manutenção da homeostase. A rápida expansão do campo dos lipídeos bioativos nos últimos vinte anos se dá pelo entendimento de complexas vias de metabolismo e os mecanismos que regulam a produção e a ação lipídica, como por exemplo o papel desempenhado por moléculas como: os esfingolipídeos, as ceramidas, esfingosinas, esfingosina-1-fosfato (S1P), ceramida-1-fosfato e lisoesfingomiéline, na regulação do crescimento celular, morte, senescência, adesão, migração, inflamação, angiogênese e tráfico intracelular. De fato, hoje em dia tem se tornado difícil encontrar áreas de biologia celular em que os lipídeos não estejam envolvidos (Hannun & Obeid, 2008; Chiurchiù & Maccarrone, 2016).

Os lipídios bioativos estão divididos em quatro famílias de acordo com as suas funções bioquímicas: eicosanóides clássicos, mediadores pró-resolução especializados (SPMs), lisoglicerofosfolipídeos/esfingolipídeos e endocanabinóides (eCBs). Os eicosanóides são a mais ampla e distinta dessas famílias citadas eles têm o ácido araquidônico (AA) ω -6 PUFA como seu precursor biossintético liberado dos fosfolipídios da membrana por fosfolipase A2. Eles são altamente pró inflamatórios, estando envolvidos na mediação e resolução de respostas inflamatórias (Chiurchiù, Maccarrone, 2018).

Em doenças causadas por parasitos a resolução da inflamação é um processo crucial para o controle da carga parasitária e do estabelecimento da infecção crônica, nesse processo estão envolvidos diversos mediadores, incluindo derivados de eicosanóides. Em infecções por *Leishmania* spp., por exemplo, mediadores como Anexina-V, lipoxinas e Resolvina D1 estão relacionados à modulação da manifestação cutânea da doença. Já na década de 90 se sugeria o papel significativo dos eicosanóides no vasoespasmos e na agregação plaquetária característicos da doença de Chagas (Tanowitz *et al.*, 1990; López- Muñoz, Rodrigo A., *et al.*, 2018). Os principais lipídeos com a capacidade de agir como mediadores são os fosfolipídeos, os quais são o principal componente de membrana de vários tipos celulares. Existem centenas de fosfolipídeos nas células, que estão localizados em organelas e em fases laterais da bicamada da membrana (Mukherjee & Maxfield, 2004; Van Meer, 2005).

Os lisofosfolipídeos mais biologicamente ativos são lisofosfadilcolina (LPC) e lisofosfatidilinositol (LPI), derivados dos fosfolipídios da membrana pela remoção de ácidos graxos, e seu subproduto ácido lisofosfatídico (LPA), que são moléculas de sinalização envolvidas em aspectos da biologia tecidual, como formação da membrana plasmática (Shindou *et al.*, 2013), crescimento celular e morte (Makide *et al.*, 2009) e cascatas inflamatórias (Sevastou *et al.*, 2013). O LPC e LPA modulam as respostas imunes,

principalmente, controlando a distribuição, direção e ativação de células imunes (Sevastou *et al.*, 2013; Knowlden, Georas, 2014; Piñeiro, Falasca, 2012), e sua ativação sustentada tem sido sugerida como estando ligada a várias doenças inflamatórias crônicas, incluindo obesidade e diabetes (Heimerl, 2014; Moreno-Navarrete, 2012), câncer (Piñeiro, 2012), aterosclerose (Lee, 2002; Fuchs, 2005; Nikitopoulou, 2012).

Os fosfolipídeos constituem a maior proporção das membranas plasmáticas e são divididos em glicerofosfolipídeos e esfingolipídeos. Glicerofosfolipídeos, também chamados de fosfoglicerídios, são lipídeos de membrana, que possuem dois ácidos graxos ligados ao primeiro e segundo carbono do glicerol, e um grupo altamente polar ou carregado ligado ao terceiro carbono, através de ligação fosfodiéster. Os ácidos graxos podem ser de tamanhos variáveis em sua cadeia de carbonos, contendo ou não insaturações e apresentando radicais alquila ou acila na ligação ao glicerol (Nelson & Cox, 2004). Na **Figura 5** estão representados os principais lipídeos estruturais, que constituem a membrana plasmática.

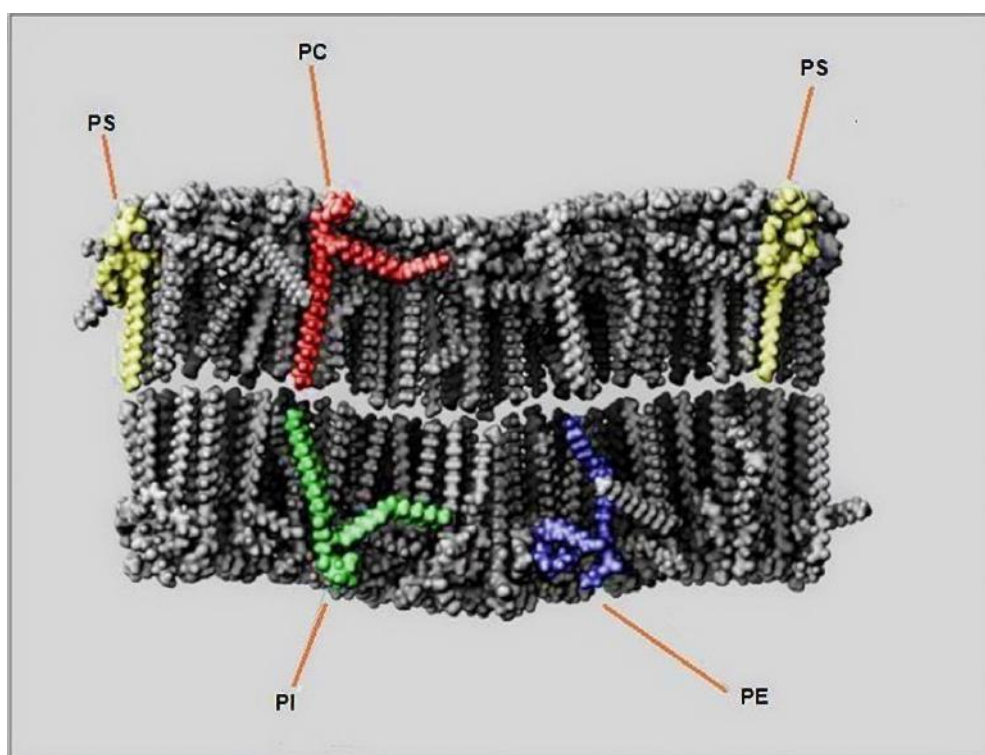


Figura 5: Representação esquemática da diversidade de espécies de lipídeos estruturais da membrana celular presentes em bicamadas lipídicas. PS: fosfatidilserina; PC: fosfatidilcolina; PI: fosfatidilinositol e PE: fosfatidietanolamina (Xu, 2013).

4.1. Fator ativador de plaquetas (PAF)

O fator ativador de plaquetas (PAF, 1-*O*-alquil-2-acetil-glicerol 3-fosfocolina) (**Figura 6**) é um fosfolípido sintetizado por uma grande variedade de células, como os neutrófilos, plaquetas, macrófagos e linfócitos. Ele exibe uma variedade de efeitos fisiológicos e fisiopatológicos, como diferenciação celular, inflamação e alergia (Honda, *et al.*, 2002; Kasperska-Zajac *et al.*, 2008).

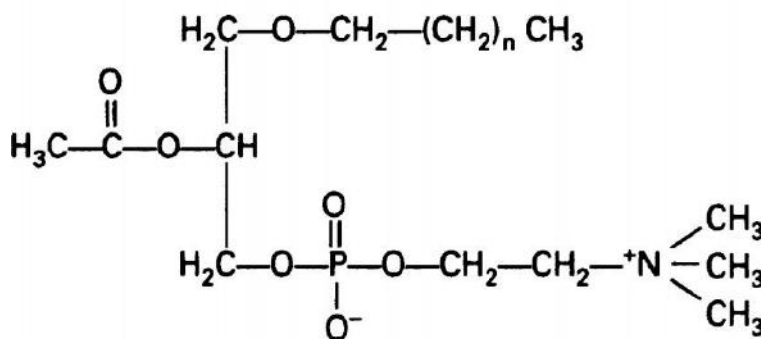
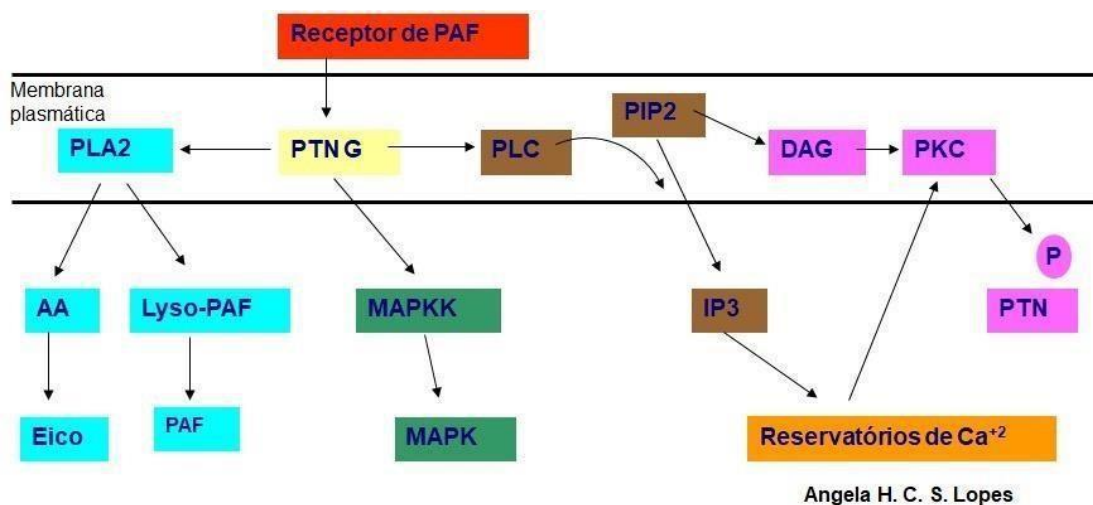


Figura 6: Estrutura do PAF (Adaptado de Chao & Olson, 1993).

O PAF exerce sua ação autócrina e parácrina através da ligação a um receptor acoplado à proteína G (GPCR), localizado na membrana plasmática de uma grande variedade de células de mamíferos (Honda *et al.*, 2002). Essa ligação do PAF ao seu receptor (PAFR) inicia uma cascata de diversas vias de sinalização intracelular (**Figura 7**), que vão traduzir a mensagem do mediador para a resposta final da célula (Zimmerman *et al.*, 1996). Através da ligação do PAF com seu receptor (PAFR), é estimulada a reciclagem de fosfatidilinositol, fluxo de cálcio, ativação de proteínas cinases importantes, como a proteína cinase C (PKC), produção de eicosanóides e fosforilação de diversas proteínas (Gouill *et al.*, 1997).

Nosso grupo de pesquisa relatou que o PAF desencadeia o processo de diferenciação celular em *Herpetomonas muscarum muscarum* (Lopes *et al.*, 1997) e em *Trypanosoma cruzi* (Rodrigues *et al.*, 1996), modulando a atividade da ectofosfatase nesses parasitos (Dutra *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 1999). Também reportamos que esse lipídeo modula a infecção de macrófagos peritoneais de camundongos por *Leishmania amazonensis*, através de um mecanismo que envolve a proteína cinase C (Rosa *et al.*, 2001). Além disso, mostramos que o *T. cruzi* sintetiza uma molécula com atividade semelhante ao PAF (Gomes *et al.*, 2006). Posteriormente, estabelecemos que esta molécula com atividade de PAF é, na verdade, uma lisofosfatidilcolina com 18 carbonos na cadeia de ácido graxo, com uma insaturação (LPC C18:1) (Gazos-Lopes *et al.*, 2014).



Transdução de sinais disparada pela ligação do PAF ao seu receptor específico. PTN G = proteína G; PLA2 = fosfolipase A2; PLC = fosfolipase C; DAG = diacilglicerol; PIP2 = fosfoinositol difosfato; PKC = proteína cinase C; IP3 = inositol trifosfato; PTN = proteína; P = fosfato; AA = ácido araquidônico; Eico = eicosanóides; Lyso-PAF = liso PAF; PAF = fator de ativação de plaquetas; MAPKK = MAP cinase cinase (MAP = cinase ativada por mitógeno); MAPK = MAP cinase.

Figura 7: Cascata de sinalização intracelular, em mamíferos, induzida pela ligação do PAF ao seu receptor.

A cascata de eventos de transdução de sinais, disparada pela ligação do PAF ao seu receptor, ativa diferentes fatores de transcrição, que controlam a expressão de genes, que estão relacionados aos diferentes processos de ativação e diferenciação celular (ChaoW, Olson MS, 1993).

Há centenas de moléculas que inibem as ações biológicas mediadas pelo PAF. A maioria delas foi testada *in vitro* em sistemas celulares e modelos animais; aquelas com as melhores propriedades, em relação à potência, biodisponibilidade e segurança, também foram testadas em ensaios clínicos (Papakonstantinou *et al.*, 2017). O WEB 2086, uma tienotriazolodiazepina (3-[4(2-clorfenil)-9-metil-6H-tieno-[3,2-f][1,2,4] triazolo-[4,3,a] [1,4] diazepina-2-g1-1-(4-morfolina-g1)-1-propanona]), é um antagonista potente e específico do fator ativador de plaquetas (PAF) *in vivo* e *in vitro*. Este composto inibe a agregação de plaquetas e neutrófilos humanos induzida por PAF *in vitro* (IC50 = 0,17 e 0,36 micromM, respectivamente) mas tem pouco ou nenhum efeito sobre a ação de outros agentes agregadores de plaquetas (Casals-Stenzel *et al.*, 1987).

Os efeitos do PAF sobre os tripanossomatídeos, vistos anteriormente, foram revertidos por WEB 2086 (antagonista do receptor de PAF), indicando uma ação através do receptor de PAF (Rodrigues *et al.*, 1996; Lopes *et al.*, 1997; Dutra *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 1999; Rosa *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2006; Dutra *et al.*, 2009).

4.2. Lisofosfatidilcolina (LPC)

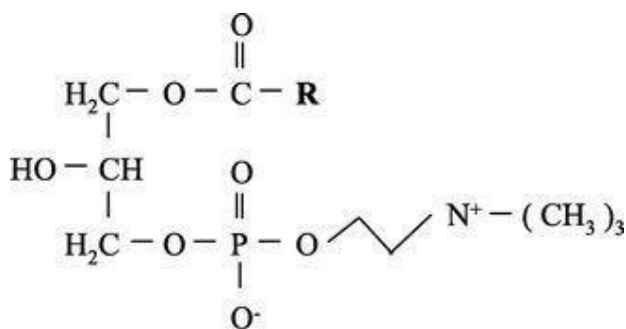
A lisofosfatidilcolina (LPC; 1-acil-*sn*-glicero-3-fosfocolina) é gerada pela hidrólise de fosfatidilcolina (PC) pela fosfolipase A2 (PLA2) na membrana plasmática (Légrad *et al.*, 2004), gerando também ácidos graxos livres. A LPC já foi descrita como moduladora de respostas celulares, atuando na proliferação e diferenciação celular, quando os mensageiros secundários diacilglicerol (DAG) e cálcio estavam presentes concomitantemente na célula.

Esta molécula apresenta-se como o principal componente de natureza fosfolipídica de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), particularmente LDL oxidada, que está envolvida em processos inflamatórios. Além disso, há uma variedade de atividades biológicas que foram atribuídas à molécula de LPC, como por exemplo, o estímulo da transcrição de moléculas de adesão e fatores de crescimento em células endoteliais, quimiotaxia em linfócitos T em ovócitos, aumento da ativação de linfócitos T na presença de DAG e relaxamento de células musculares lisas. Existe também uma especulação sobre a molécula atuar na patogênese da aterosclerose humana e a inflamação, aumentando a permeabilidade vascular de células epiteliais de artéria coronária humana, ao diminuir significativamente a expressão de moléculas de adesão nas mesmas (Yuan *et al.*, 1995; Perrin-Cocon *et al.*, 2005; Panagiotis Kougias *et al.*, 2005). Em 2008, Wilensky e colaboradores demonstraram que a redução da atividade da principal enzima responsável pela biossíntese de LPC (PLA2), em modelos experimentais, reduz a formação de placas de aterosclerose (Wilensky *et al.*, 2008). A molécula de LPC pode penetrar diretamente na membrana plasmática, sem a necessidade de um receptor específico, ou ainda se ligar a receptores de membrana acoplados à proteína G, GPR4, receptores de prostaciclina, tromboxanos e receptor para o fator de ativação de plaquetas (PAFR) (Kabarowski *et al.*, 2001; Kougias *et al.*, 2006; Gazos-Lopes *et al.*, 2014).

Existem diferentes espécies de LPC (**Figura 8**) que são caracterizadas pelo número de átomos de carbono em sua cadeia de ácidos graxos e o número de insaturações presentes nesta cadeia. As diferentes espécies de LPC são capazes de desencadear diversas atividades biológicas, que podem ser diferentes entre si (Ojala *et al.*, 2007; Rieder *et al.*, 2010). Na **Tabela 1** mostramos os diferentes efeitos do LPC em determinadas células-alvo.

Tabela 1: Efeitos de LPCs em diferentes tipos celulares de mamíferos. (Adaptado de Matsumoto, Kobayashi & Kamata, 2008.)

Célula alvo	Efeitos
Neutrófilos	<p>Geração de ROS: ativação de NAD(P)H oxidase e liberação de mieloperoxidase.</p> <p>Respostas funcionais: quimiotaxia aumentada, liberação de elastase.</p>
Monócitos/macrófagos	<p>Formação de mediadores inflamatórios: produção de citocinas (IL-1B, IL-8, VEGF, HB-EGF), fosfolipase A2 secretória e liberação de ácido araquidônico.</p> <p>Respostas funcionais: quimiotaxia aumentada.</p> <p>Citotoxicidade: aumento de permeabilidade celular e apoptose.</p>
Linfócitos T	<p>Formação de mediadores inflamatórios: produção de citocinas (IL-2, IFN-g, ROS).</p> <p>Respostas funcionais: quimiotaxia aumentada.</p> <p>Citotoxicidade: apoptose aumentada.</p>
Células endoteliais	<p>Homing de células inflamatórias: produção de moléculas de adesão (ICAM-1/VCAM-1), P-selectina e MCP-1.</p> <p>Formação de mediadores inflamatórios: ativação de fosfolipase A2 secretória, produção de COX-2 e liberação de ácido araquidônico.</p> <p>Respostas funcionais: bloqueio da proliferação/migração e redução de vasodilatação mediada por NO e EDHF.</p> <p>Citotoxicidade: apoptose aumentada.</p>
Células musculares lisas	<p>Homing de células inflamatórias: produção de MCP-1.</p> <p>Estresse oxidativo: ativação de NAD(P)H oxidase.</p> <p>Resposta funcional: produção de fatores de crescimento e aumento da proliferação/migração.</p> <p>Citotoxicidade: aumento de apoptose.</p>



LPC species	R
16:0-LPC	- C ₁₅ H ₃₁
18:0-LPC	- C ₁₇ H ₃₅
18:1-LPC	- C ₁₇ H ₃₃
18:2-LPC	- C ₁₇ H ₃₁
20:4-LPC	- C ₁₉ H ₃₁

Figura 8: Diferentes espécies de LPC, caracterizadas pela quantidade de átomos de carbono e duplas ligações entre os carbonos da cadeia de ácidos graxos (Takatera *et al.*, 2007).

Estudos recentes mostram que a LPC, além de estar presente em células de mamíferos, pode atuar como imunomoduladora da infecção de *T. cruzi* em mamíferos. LPC também é encontrada na saliva de um dos hospedeiros invertebrados de *T. cruzi*, *Rhodnius prolixus*, agindo como uma molécula anti-hemostática (Golodne *et al.*, 2003; Silva-Neto *et al.*, 2012). Mais de 50% do total de lipídeos presentes em membranas e secretados por *T. cruzi* são do tipo PC e LPC. Essas moléculas também são encontradas em *Leishmania* e *T. brucei* (Werbovetz *et al.*, 1996). Além disso, nosso grupo identificou e caracterizou bioquimicamente e funcionalmente uma molécula de LPC (LPC-C18:1) com características semelhantes ao PAF em *T. cruzi* (**Figuras 9 e 10**). No entanto, as vias e os mecanismos de síntese de LPC permanecem desconhecidos para esses microrganismos (Gazos-Lopes *et al.*, 2014).

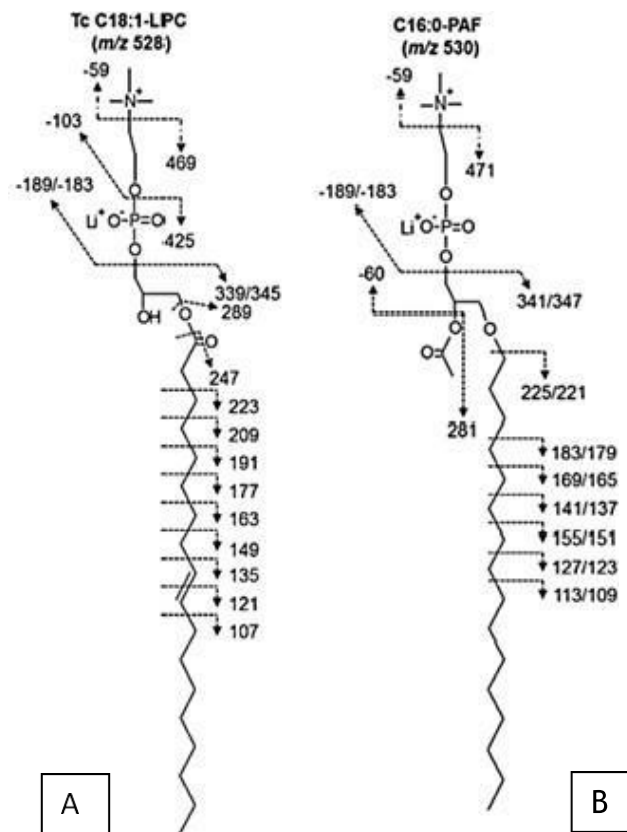


Figura 9: comparação das estruturas de LPC 18:1 (A) e PAF (B). (Gazos-Lopes *et al.*, 2014).

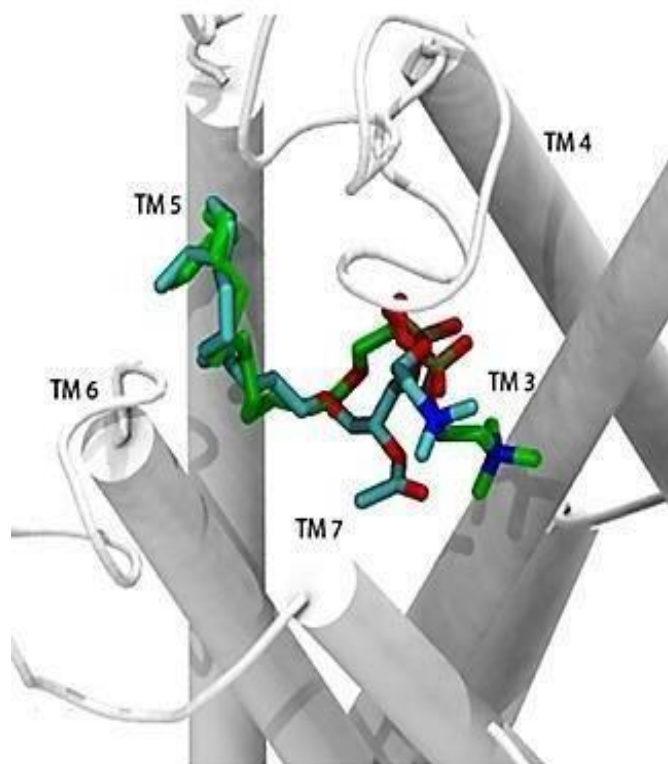


Figura 10: Docking molecular da interação da molécula de LPC 18:1 (em azul claro) e PAF (em verde) com o receptor de PAF (Gazos-Lopes *et al.*, 2014).

II. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses têm uma grande importância médica e econômica, já que afetam tanto homens quanto outros mamíferos, como foi supracitado. Foi visto também que os mediadores lipídicos, incluindo a lisofosfatidilcolina (LPC) e o fator de ativação de plaquetas (PAF), apresentam papel importante na infecção por alguns protozoários. O nosso grupo mostrou que o PAF estimula a diferenciação celular e a infectividade de alguns tripanossomatídeos, além de uma cascata de transdução de sinais, ativando a proteína cinase CK2, através da proteína cinase C (PKC) em *Herpetomonas muscarum* e aumenta a atividade e a expressão da CK2 em *Leishmania tropica*. Recentemente, foi visto que o *Trypanosoma cruzi* sintetiza um LPC bioativo, de 18 carbonos e uma insaturação, que possui a capacidade de agregar plaquetas similar ao PAF. Além disso, o nosso grupo realizou uma espectrometria de massas para avaliar se há a síntese de LPC por *Leishmania*, esse ensaio foi realizado com a espécie *Leishmania infantum* (**Figura 11**), diferentes espécies de LPC foram detectadas, inclusive a LPC C18:1 que apresenta similaridades com o PAF (Gazos-Lopes *et al.*, 2014).

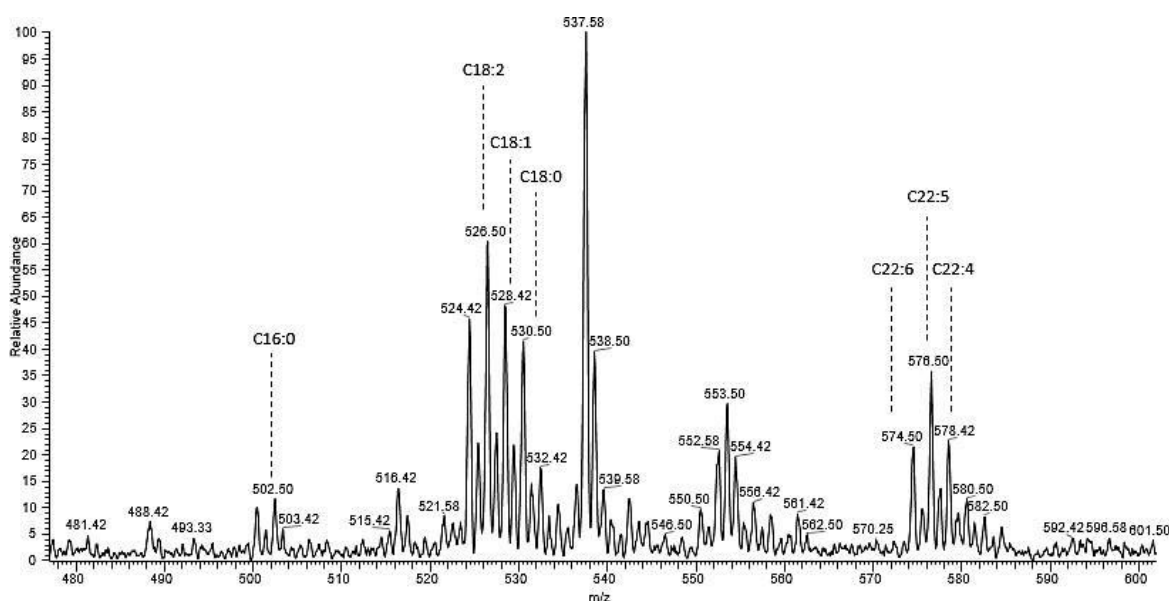


Figura 11: Espectrometria de massas dos fosfolípidos de *Leishmania infantum* (Vieira *et al.*, dado não publicado).

A partir desses estudos, a hipótese formulada para este trabalho é que a LPC C18:1 tem efeito modulatório nas vias de sinalização de *Leishmania mexicana* e em processos da manutenção do seu ciclo de vida.

III. OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Determinar o efeito da lisofosfatidilcolina C18:1 (LPC C18:1) nas vias de sinalização de *Leishmania mexicana*, modulando a sua proliferação, diferenciação e interação com macrófagos peritoneais.

2. Objetivos específicos

2.1. Verificar a influência do LPC C18:1 na proliferação de *L. mexicana*;

2.2. Verificar a influência do LPC C18:1 na diferenciação de *L. mexicana*;

2.3. Verificar a influência do LPC C18:1 na infecção de macrófagos peritoneais de camundongos por *L. mexicana*;

IV. METODOLOGIA

1. Microrganismos

Os parasitos foram obtidos no centro de referência em Leishmaniose do Instituto Oswaldo Cruz. *Leishmania (Leishmania) mexicana* (MHOM/BZ/1982/BEL 21).

As formas promastigotas do parasito foram mantidas em meio Schneider contendo 20% de soro fetal bovino a 28°C.

2. Avaliação da proliferação celular

Promastigotas de protozoários de espécie de *L. mexicana* foram crescidos por 7 dias na presença e na ausência de LPC C18:1 (10^{-5} M) e WEB 2086 (10^{-5} M) e com ambos juntos, sendo o WEB 2086 colocado 1h antes (Rodrigues *et al.*, 1996). Foram inoculados 1×10^5 parasitos em 5 ml de meio de cultura. A contagem foi realizada

diariamente em câmara de Neubauer levada ao microscópio óptico (Cambridge Instruments) (Santos & Oliveira, 1988). O número de células foi calculado da seguinte forma:

$$N = \frac{\text{Número de células} \times \text{Volume da câmara}}{\text{Volume da suspensão}} \cdot 5 \cdot 10^4$$

3. Avaliação da diferenciação celular

Os protozoários foram cultivados por 15 dias na presença e na ausência de LPC 18:1 (10^{-5}) para observarmos a diferenciação para a forma amastigota-like (que são as formas amastigotas diferenciadas *in vitro*), foram inoculados 5×10^5 promastigotas em 5 ml de um meio de diferenciação, contendo 15mM de KCl; 136mM de KH_2PO_4 ; 10mM de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 0,5mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 24 mM de NaHCO_3 ; 22 mM de glucose; 1 mM de L-glutamina, 1 x mix de vitaminas RPMI 1640, 10 μM de ácido fólico, 100 μM de adenosina, 1 x mix de aminoácidos RPMI, 5 μg / mL de hemina, 50 U / mL de penicilina e 50 μg / mL de estreptomicina, e 25 mM de MES, diluídos em água destilada e pH 5,66 (adaptado de Goyard *et al.*, 2003). Para o experimento foram adicionados 20% de soro fetal bovino (inativado por calor) e mantidas a 32°C com 5% de CO_2 . A contagem foi realizada diariamente através da retirada de 200 microlitros de cada tubo de ensaio e distribuídos por espalhamento em lâminas de vidro, após secas elas foram coradas com panótico e a contagem de 200 parasitos (entre formas promastigotas, intermediárias e amastigotas) foi feita em microscópio óptico (Bioval) (Goyard, 2003).

4. Interação e sobrevivência celular

Os camundongos BALB/c fêmeas de 8 semanas foram sacrificados em câmara de CO_2 e a cavidade peritoneal foi exposta e lavada com 6 a 8 ml de salina a 0,9 %. O volume final obtido, retirado da cavidade abdominal, foi distribuído em placas de 24 poços, recobertas com lamínulas, para aderência e manutenção dos macrófagos em meio RPMI, suplementado com 100U/ml de penicilina e 100 μg /ml de estreptomicina, a 37°C e atmosfera de 5% de CO_2 por 16 horas.

Os macrófagos peritoneais foram infectados com *Leishmania mexicana*, tratados ou não com LPC 18:1 (10^{-5} M) e WEB 2086 (10^{-5} M), que foram adicionados à cultura na proporção 10 parasitos por macrófagos. Para avaliar a interação após a

infecção, as placas foram incubadas durante 4 horas a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂. Para avaliar a sobrevivência dos parasitos após as 4 horas de infecção, foi retirado o meio contendo os parasitos e adicionado meio novo e as placas foram incubadas durante 24 horas a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂ (Rosa *et al.*, 2001).

Em seguida, as lamínulas foram lavadas em PBS, fixadas e coradas com corante panótico. Depois de secas elas foram montadas sobre lâmina de vidro (24 x 76 mm), utilizando Permount e foram contados 200 macrófagos, entre infectados e não infectados, e o número de parasitos dos infectados. A contagem foi realizada em microscópio óptico (Bioval), o índice de associação foi calculado a partir da seguinte equação:

$$IA = \% \text{ de macrófagos infectados} \cdot \frac{\text{número de amastigotas}}{N^{\circ} \text{ de macrófagos infectados}}$$

Os macrófagos peritoneais de camundongos foram obtidos de acordo com as normas para experimentação animal, aprovadas pela Comissão de Ética para Experimentação Animal do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

5. Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste de análise de variância (ANOVA), utilizando o pós teste Bonferroni, através do software GraphPad Prism 5. Valores de *P* iguais ou menores que 0,05 foram considerados significativos.

V. RESULTADOS

1. Efeito da LPC C18:1 na proliferação celular de *Leishmania mexicana*.

Foi avaliado se o LPC teria efeito na proliferação celular de *Leishmania mexicana*. A **Figura 11** mostra a curva de crescimento dos parasitos na ausência (controle) e na presença dos seguintes lipídios: WEB 2086 (10^{-5} M), LPC C18:1 (10^{-5} M) e LPC+WEB 2086 (ambos em 10^{-5} M). É possível observar que no sistema em que os protozoários foram tratados com LPC há um crescimento no número de células, em relação ao sistema controle, sistema tratado com WEB e com LPC+WEB. O sistema tratado apenas com o WEB 2086 manteve um crescimento celular similar ao do Controle, já no tratamento com WEB e LPC (LPC+WEB) é possível ver a reversão do efeito do LPC.

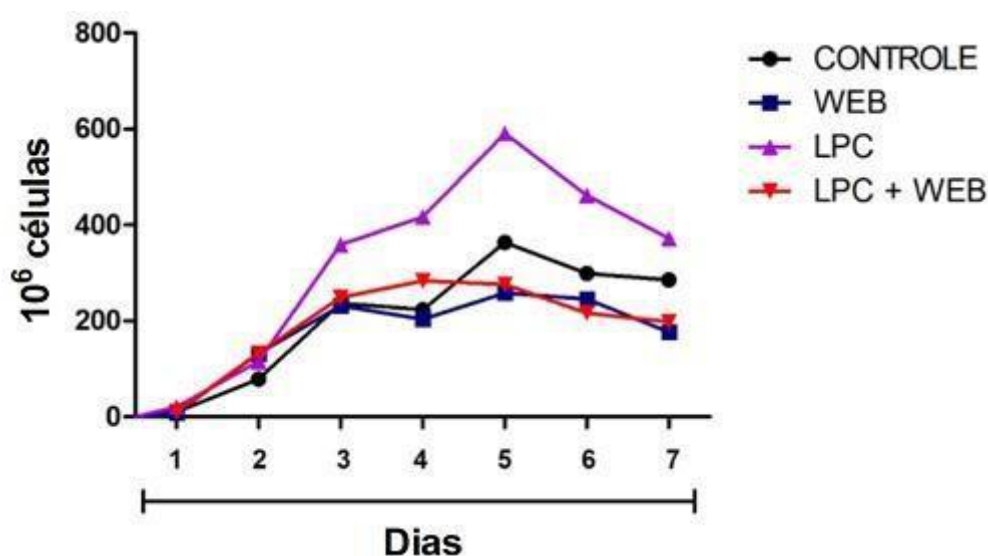


Figura 12: Proliferação *L. mexicana* na ausência (controle) e presença de LPC C18:1 (10^{-5} M) e WEB 2086 (10^{-5} M).

2. Efeito da LPC C18:1 na diferenciação celular de *Leishmania mexicana*.

Outra avaliação de efeito da LPC C 18:1 em *Leishmania mexicana* foi na

diferenciação celular. Na **Figura 13** é possível ver os gráficos do experimento de diferenciação celular, tendo assim a diminuição das formas promastigotas e aumento das formas amastigotas-like (formas amastigotas diferenciadas *in vitro*) presença do LPC C18:1 e na ausência (controle). O sistema em que os protozoários foram tratados com LPC é possível ver no 13º, 14º e 15º dias cerca de 27%, 28% e 21%, respectivamente, mais formas amastigotas-like do que no controle. As porcentagens das formas promastigotas com e sem o tratamento com LPC C18:1 estão representadas pelo gráfico A, e as porcentagens das formas amastigotas-like com e sem o tratamento com LPC C18:1 estão representadas pelo gráfico B.

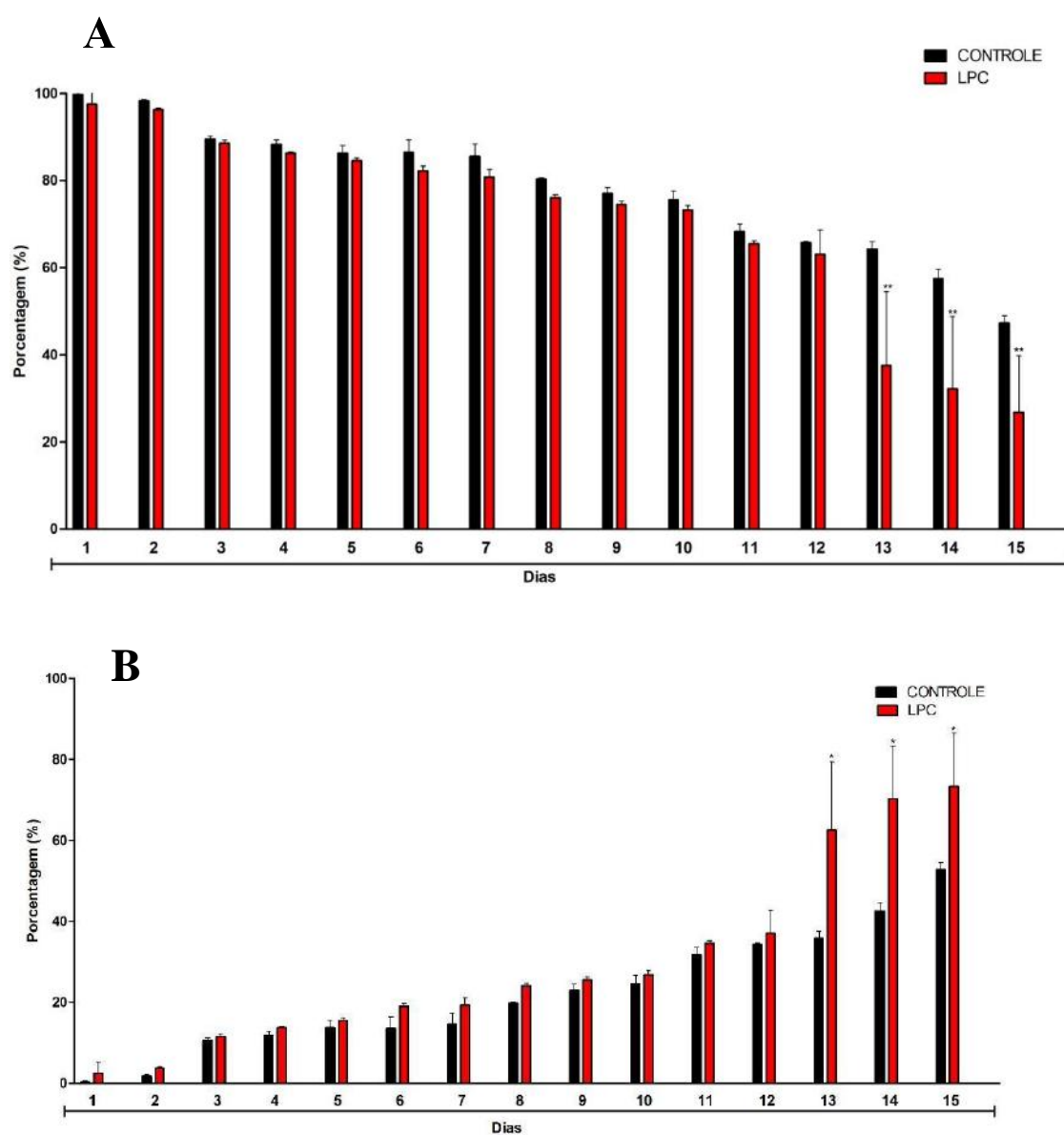


Figura 13: Porcentagem de diferenciação celular de *L. mexicana* no estado controle e na presença de LPC C18:1 (10^{-5} M) a diminuição das formas promastigotas está representada em A e o aumento das formas amastigotas-like está representado em B.

3. Efeito da LPC C18:1 na interação e sobrevivência celular de *Leishmania mexicana*.

Outra proposta foi avaliar o efeito da LPC na infectividade de *Leishmania mexicana*, para isso foi analisada a interação do parasito (por 4 horas) com os macrófagos e a sobrevivência (24 horas) dos protozoários. Os parasitos foram tratados ou não com WEB 2086 (10^{-5} M), LPC C18:1 (10^{-5} M) e LPC+WEB 2086 por 4h e 24h e depois colocados para infectar os macrófagos, foram utilizadas as duas formas evolutivas da *Leishmania*, em A temos o experimento com as promastigotas e B com as amastigotas-like. Na **Figura 14** é possível ver que a LPC modula positivamente o índice de associação dos protozoários com os macrófagos, tendo um aumento de cerca de 78% (**Gráfico A**) e 98% (**Gráfico B**) dessa associação em comparação ao controle e aos outros tratamentos na interação (4h), na sobrevivência (24h) é visto um aumento de aproximadamente 138% (**Gráfico A**) e 282% (**Gráfico B**) desse índice quando o parasito é tratado com LPC C18:1, nos experimentos feitos com ambas as formas evolutivas, assim como é vista a reversão do efeito quando tratado com WEB 2086 antes.

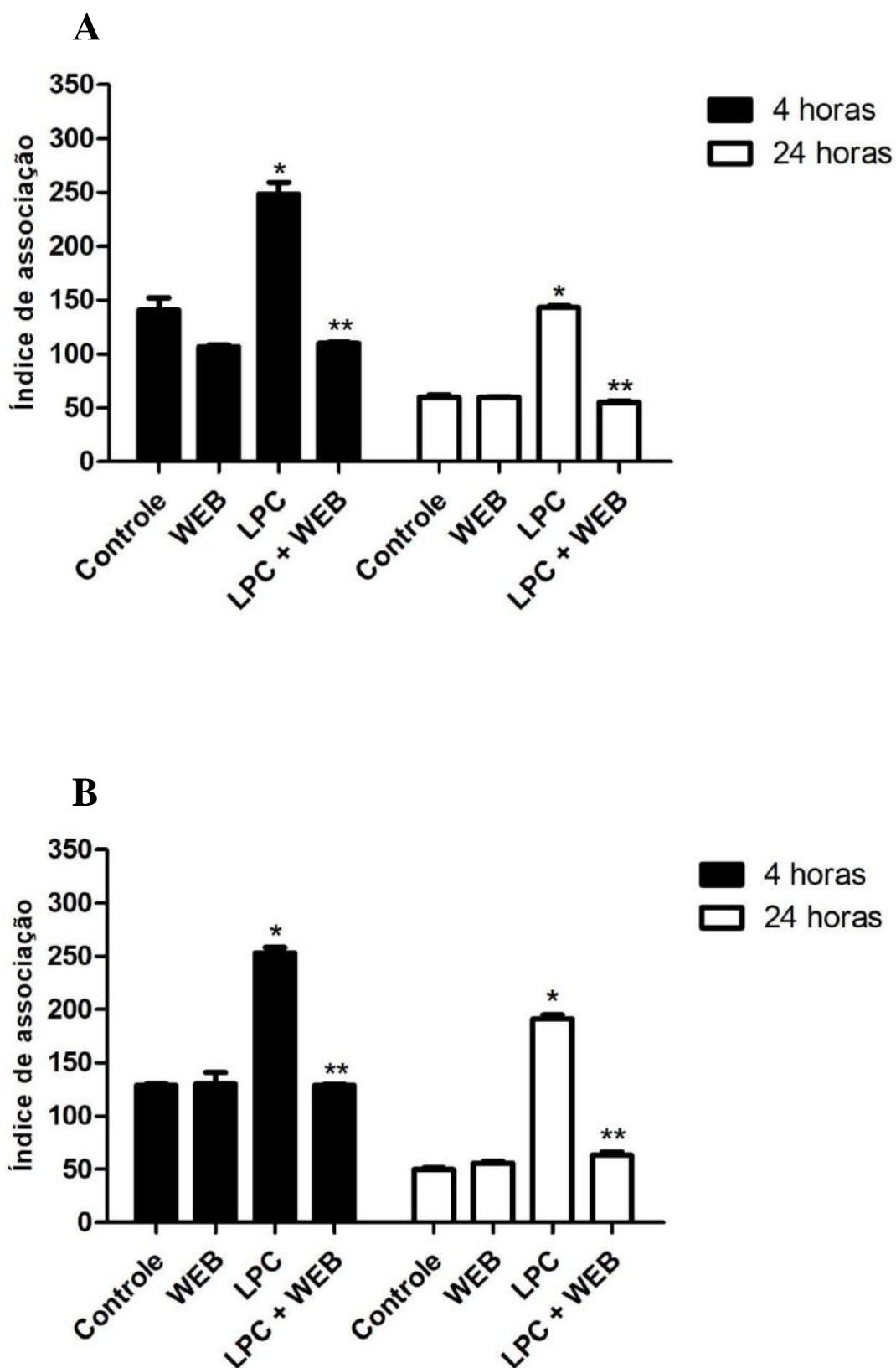


Figura 14: Interação e sobrevivência celular de *Leishmania mexicana* na presença e ausência de LPC C18:1. (A) Formas promastigotas; (B) Formas amastigotas-like.

VI. DISCUSSÃO

Os tripanossomatídeos apresentam semelhanças com eucariontes superiores em vários aspectos, incluindo o fato de suas funções celulares serem mediadas por vias de sinalização, envolvendo receptores de superfície, proteínas cinases e fosfatases, e mensageiros secundários (Parsons & Ruben, 2000). O dano causado por essa infecção se dá tanto pela replicação do protozoário (que ocorre nos macrófagos) quanto pela reposta imune do hospedeiro, já que no processo de infecção eles podem escapar e sobreviver ao sistema imune (no caso de infecções crônicas), assim a tentativa do sistema imune de eliminar esse patógeno pode contribuir para o dano. Atualmente já é visto que diversos mediadores estão envolvidos nos processos de inflamação e de evasão do sistema imune, em *T. cruzi* já foi mostrado que os lipídios bioativos derivados do parasito e do hospedeiro modulam a progressão da doença. A via de transdução de sinais destes protozoários ainda é pouco conhecida, porém o estudo de mecanismos e moléculas utilizados pelos parasitos é essencial para a compreensão dos processos realizados por eles (Seed, 1996; Machado *et al.*, 2011; López-Muñoz *et al.*, 2018).

Em Gazos-Lopes foi visto que o *T. cruzi* sintetiza diversas espécies de LPC, dentre elas a LPC C18:1 que é estrutural e funcionalmente similar à molécula de PAF, essas duas moléculas também compartilham semelhanças na interação com o receptor de PAF (PAFR) (Gazos-Lopes *et al.*, 2014), devido à essa semelhança os resultados encontrados neste estudo, avaliando o efeito da Lisofosfatidilcolina na modulação de processos fisiológicos de *Leishmania mexicana*, corroboram com outros estudos mostrando o efeito modulatório do PAF em processos de diferentes tripanossomatídeos, incluindo secreção de proteínas, diferenciação celular e infecção em macrófagos peritoneais (Rodrigues *et al.*, 1996; Lopes *et al.*, 1997; Rodrigues *et al.*, 1999; Rosa *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2006; Dutra *et al.*, 2009).

Neste estudo foi mostrado que a LPC C18:1 estimula o aumento da proliferação celular de *Leishmania mexicana* em comparação com o controle e esse efeito é revertido quando tratadas com WEB 2086 (**Figura 12**). Outros estudos já mostravam que a LPC tinha capacidade de modular o crescimento de alguns tripanossomatídeos, em 2008 Mesquita e colaboradores mostraram que tanto a injeção de saliva de *Rhodnius prolixus* (que contém LPC) quanto o LPC em si, aumentaram a parasitemia de *T. cruzi* no sangue de camundongos, esse estudo mostrou que a LPC atenua citocinas próinflamatórias e a produção de óxido nítrico desencadeada pelo *T. cruzi*, a LPC foi capaz de atenuar as

respostas imunes induzidas pelo *T. cruzi*, houve uma regulação negativa da produção de IL-12 e óxido nítrico que são dois reguladores importantes envolvidos no controle da infecção por parasitas (Vespa *et al.*, 1994; Aliberti *et al.*, 1996; Mesquita *et al.*, 2008). Em 2015, Tounsi e colaboradores sugeriram que a LPC pode aumentar a proliferação de *Leishmania major* através da neutralização da oxidação e do estresse nitrosativo, além de sustentar as atividades da indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO), enzima que consegue modular a resposta imune e criar um local de imunossupressão, e da arginase 1, enzima que ai fornecer poliaminas necessárias para o crescimento parasitário (Tounsi *et al.*, 2015).

Quanto à diferenciação celular, quando os parasitos foram tratados com LPC foi observado que a quantidade de formas diferenciadas foi superior em relação ao controle, além disso, esse aumento gradual das formas diferenciadas é visto antes nos protozoários tratados do que no controle (**Figura 13, gráficos A e B**). Esse resultado vai de encontro com estudos anteriores, Gomes e colaboradores haviam identificado uma molécula com características semelhantes ao PAF em *T. cruzi*, um PAF like, (que em Gazos-Lopes 2014 descobriu-se que esse PAF Like era uma molécula de LPC) com efeitos importantes na diferenciação celular (Gomes *et al.*, 2006), além disso estudos feitos antes desse já mostraram que o PAF estimula a diferenciação de *T. cruzi* e *Herpetomonas muscarum muscarum* (Lopes *et al.*, 1996; Lopes *et al.*, 1997).

Neste trabalho demonstramos que a LPC C18:1 estimula a interação e a sobrevivência de *Leishmania mexicana* em macrófagos peritoneais de camundongos, bem como podemos ver na **Figura 14**, na qual os protozoários tratados com LPC obtiveram um índice de associação superior ao controle e aos que receberam algum tratamento com o WEB 2086. Em 2001, Rosa e colaboradores demonstraram que quando a *Leishmania amazonensis* era tratada com PAF isso estimulava a infecção de macrófagos peritoneais por esses parasitos e quando tratados previamente com o WEB 2086 o efeito era revertido (Rosa *et al.*, 2001). Alguns outros estudos anteriores também demonstraram a relação do PAF com a infecção de macrófagos por tripanossomatídeos, quando as promastigotas de *L. tropica* foram previamente tratadas com PAF houve um estímulo na infecção de macrófagos peritoneais por esses parasitos (Dutra *et al.*, 2009). Em 2006, Gomes e colaboradores mostraram que quando as epimastigotas de *T. cruzi* eram incubadas com o lipídio similar ao PAF que ele sintetizava (PAF-like) a infecção de macrófagos peritoneais era estimulada (Gomes *et al.*, 2006). Além disso, tanto a saliva do vetor (que contém LPC) quanto o LPC comercial aumentaram a associação do

T.cruzi com macrófagos peritoneais, sendo, provavelmente, resultado do aumento da concentração de cálcio intracelular e do bloqueio da produção de óxido nítrico (Mesquita *et al.*, 2008).

O WEB 2086, antagonista do receptor do PAF, têm sido utilizado como ferramenta em estudos de ligação do PAF com seu receptor. Estudos publicados por nosso grupo mostraram que a LPC (que antes de ser descoberta como LPC era conhecida como um lipídio similar ao PAF) parece ter seus efeitos ocorrendo via receptor do PAF, já que foram revertidos na presença do WEB 2086 (Gomes *et al.*, 2006; Gazos lopes *et al.*, 2014). Além disso, outros estudos também demonstraram que o WEB 2086 reverte efeitos promovidos pelo PAF em tripanossomatídeos (Lopes *et al.*, 1997; Rodrigues *et al.*, 2001; Rosa *et al.*, 2001).

VII. CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados nesse estudo é possível sugerir que a molécula de LPC C18:1 tem efeito modulatório em importantes processos fisiológicos de *Leishmania mexicana* como proliferação, diferenciação, interação e sobrevivência em macrófagos. O papel fisiológico e as vias pelas quais a LPC age em tripanossomatídeos ainda precisam ser mais bem compreendidos, porém com esses resultados temos a hipótese de que essa molécula vá agir a partir de um receptor específico, já que seu efeito foi revertido quando colocado o WEB 2086.

Visto a gravidade das doenças que podem ser causadas por parasitos desse gênero é de extrema importância conhecer os processos que estão envolvidos no ciclo de vida desse protozoário, então apesar da LPC não ser a exclusiva responsável pelos eventos aqui apresentados é necessário conhecer as diferentes vias ou moléculas que podem alterá-los para maior entendimento da biologia celular e fisiologia deste protozoário. Em questões de aplicação prática a descoberta de uma molécula que atua na infectividade deste parasito através de um receptor pode servir como um potencial alvo para a pesquisa de novos fármacos.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aliberti, J. C., M. A. Cardoso, G. A. Martins, R. T. Gazzinelli, L. Q. Vieira, and J. S. Silva. (1996). Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect. Immun.* 64:1961–1967.
- Barcinski, M. A., Schechtman, D., Quintao, L. G., De A Costa, D., Soares, L. R., Moreira, M. E., & Charlab, R. (1992). Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Increases The Infectivity of *Leishmania Amazonensis* By Protecting Promastigotes From Heat-Induced Death. *Infection and Immunity*, V. 60, N. 9, P. 3523-3527.
- Barcinski, M. A.; Costa-Moreira, M. E. (1994) Cellular Response of Protozoan Parasites To Host- Derived Cytokines. *Parasitology Today*, V. 10, N. 9, P. 352-355.
- Barratt G, Legrand P. (2005) Comparison of the efficacy and pharmacology of formulations of amphotericin B used in treatment of leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis*;18:527–30
- Besteiro, Sébastien *et al.* (2007) Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *International journal for parasitology*, v. 37, n. 10, p. 1063-1075.
- Blum J, Desjeux P, Schwartz E, *et al.* (2004) Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. *J Antimicrob Chemother*; 53: 1581–66.
- Carvalho, P.B., Ferreira, E.I., (2001). *Leishmaniasis* phytotherapy: nature's leadership against an ancient disease. *Fitoterapia* 72, 599–618.
- Casals-Stenzel, J. O. R. G. E., Muacevic, G. O. J. K. O., & Weber, K. H. (1987). Pharmacological actions of WEB 2086, a new specific antagonist of platelet activating factor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 241(3), 974-981.
- Chao W, Olson MS (1993) Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem J* 292:617–629
- Charlab, R., Blaineau, C., Schechtman, D., Barcinski, M. A. (1990) Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Is A Growth-Factor For Promastigotes of *Leishmania Mexicana Amazonensis*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 37, (5), 352-357.
- Chiurchiu V, Maccarrone M. (2016) Bioactive lipids as modulators of immunity, inflammation and emotions. *Curr Opin Pharmacol* 29:54–62.
- Chiurchiù, V., Leuti, A., & Maccarrone, M. (2018). Bioactive lipids and chronic inflammation: managing the fire within. *Frontiers in immunology*, 9, 38.
- David CV, Craft N. (2009) Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther*; 22: 491– 502.
- Derda, M., Hada's, E., (2014). The use of phytotherapy in diseases caused by parasitic protozoa. *Acta Parasitol.* 60, 1–8.
- Dutra PML, Rodrigues CO, Jesus JB, Lopes AH, Souto-Pradrón T, Meyer-Fernandes JR (1998) A novel ectophosphatase activity of *Herpetomonas muscarum muscarum* inhibited by platelet activating factor. *Biochem Biophys Res Commun* 253:164–169.
- Dutra PML, Vieira DP, Meyer-Fernandes JR, Silva-Neto MAC, Lopes AH. (2009) Estimulação das atividades da proteína quinase da *Leishmania tropica* CK2 pelo fator ativador de plaquetas (PAF) *Acta Tropica* . 2009; 111 (3): 247-254.

- Dutra, FL, Oliveira, MM, Santos, RS, Silva, WS, Alviano, DS, Vieira, DP e Lopes, AH (2016). Efeitos do linalol e do eugenol na sobrevivência de *Leishmania (L.) infantum* chagasi em macrófagos. *Acta tropica* , 164 , 69-76.
- Dyatlovitskaya, E.V., Bezuglov, V. V. (1998) Lipids as Bioeffectors. Introduction. *Biochemistry-New York-English Translation Of Biokhimiya*.63 (1), 1-3.
- Fuchs B, Schiller J, Wagner U, Häntzschel H, Arnold K. (2005) The phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine ratio in human plasma is an indicator of the severity of rheumatoid arthritis: investigations by ³¹P NMR and MALDI-TOF MS. *Clin Biochem* 38:925–33.
- Furtado T. (1994) Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Machado Pinto J (ed), Doenças infecciosas com manifestações dermatológicas. Editora Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro, p.319- 328.
- G. A. Zimerman, M. R. Elstad, D. E. Lorant *et al.*, (1996) "Platelet-activating factor (PAF): signalling and adhesion in cell-cell interactions, in Platelet-Activating Factor and Related Lipid Media- tors 2, vol. 416 of *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 297–304, Springer.
- Gazos-Lopes, F; Oliveira, Mm; Hoelz, Lv; Vieira, Dp; Marques, Af; Nakayasu, Es; Gomes, Mt; Salloum, Ng; Pascutti, Pg; Souto-Padrón, T; Monteiro, Rq; Lopes, Ah; Almeida, Ic (2014) Structural and Functional Analysis of a Platelet-Activating Lysophosphatidylcholine of *Trypanosoma cruzi*. *Plos Negl Trop Dis*. Aug7; 8(8): E3077. Doi: 10.1371
- Golodne, D.M., Monteiro, R.Q., Graça-Souza, A.V., Silva-Neto, M.A.C., Atella, G.C. (2003) Lysophosphatidylcholine Acts As An Anti-Hemostatic Molecule In The Saliva Of The Blood-Sucking Bug *Rhodnius Prolixus*. *The Journal Of Biological Chemistry*. 278, 27766-27771.
- Gomes MT, Monteiro RQ, Grillo LA, Leite-Lopes F, Stroeder H, Ferreira-Pereira A, Alviano CS, Barreto-Bergter E, Faria-Neto HC, Silva NL Cunha e, Almeida IC, Soares RM, Lopes AH (2006) Platelet-activatingfactor-likeactivityisolatedfrom *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol*36:165–173.
- Gontijo, Bernardo, and MLR de Carvalho(2003). "Leishmaniose tegumentar americana." *Ver Soc Bras Med Trop* 36.1: 71-80.
- Goyard, S., Segawa, H., Gordon, J., Showalter, M., Duncan, R., Turco, S. J., & Beverley, S. M.(2003). An in vitro system for developmental and genetic studies of *Leishmania donovani* phosphogly- cans. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 130, n. 1, p. 31-42.
- Guimarães-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, *et al.* (2009) *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl AcadSci USA*; 106: 6748-53.
- Gull K. (2009) The parasite point of view: insights and questions on the cell biology of *Trypanosoma* and *Leishmania* parasite–phagocyte interactions. In *Phagocyte–pathogeninteractions* (eds D Russell, S Gordon), pp.453–462. Washington, DC: ASM Press
- Hannun, Y. A.(1996) Functions Of Ceramide In Coordinating Cellular Responses To Stress. *Science*. 274, (5294), 1855-1859.
- Hannun, Yusuf A.; Obeid, Lina M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphin- golipids. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 9, n. 2, p. 139.
- Heimerl S, Fischer M, Baessler A, Liebisch G, Sigrüener A, Wallner S, *et al.* (2014) Alterations of plasma lysophosphatidylcholine species in obesity and weight loss. *PLoS One* 9:e111348.

- Hellier I, Dereure O, Tournillac I, Pralong F, Guillot B, Dedet JP, et al. (2000) Treatment of Old World cutaneous leishmaniasis by pentamidine isethionate. An open study of 11 patients. *Dermatology*;200:120–3.
- Herwaldt BL (1999) Leishmaniasis. *The Lancet* 354:1191–1199
- Hoare CA, Wallace FG. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature* 1966; 212: 1385-6.
- Hokin, M. R. & Hokin, L. E. (1953) Enzyme Secretion and the incorporation Of ^{32}P Into Phospholipids Of Pancreas Slices. *J. Biol. Chem.* 203, 967–977.
- Jha TK, Sundar S, Thakur CP, Bachmann P, Karbwang J, Fischer C, *et al.* (1999) Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med*;341:1795–800.
- Kabarowski J.H.S., Zhu K., Le Q., Witte O.N., & Xu Y, (2001) “Lysophosphatidylcholine as a Ligand For The Immunoregulatory Receptor G2a,” *Science*, Vol. 293, No. 5530, Pp. 702–705.
- Kaufers, Alexa *et al.* (2017) The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites & Vectors*, v. 10, n. 1, p. 287.
- Knowlden S, Georas SN. (2014) The autotaxin-LPA axis emerges as a novel regulator of lymphocyte homing and inflammation. *J Immunol* 192:851–7.
- Korzeniewski K, Olszanski R. (2004) Leishmaniasis among soldiers of stabilization forces in Iraq. *Int Marit Health*; 55:155–163.
- Kougias, P; Hong, Chai; Peter, H; Lin, Ab; Lumsden; Qizhi, Y; Changyi, C (2006): Lysophosphatidylcholine And Secretory Phospholipase A2 In Vascular Disease: Mediators Of Endothelial Dysfunction And Atherosclerosis. *Med Sci Monit.* 12:Ra5-16.
- Kropf P, Freudenberg MA, Modolell M, et al. 2004. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun* 2004; 72: 1920-8.
- Kulikov, V.I., Muzya, G.I. The Bioregulatory Role Of Platelet-Activating Factor In Intracellular Processes And Cell-Cell Interactions. *Biochemistry (Mosc)*. 63 (1), 47-54, 1998.
- Lainson R, Shaw J. Evolution, classification and geographical distribution. In *The Leishmaniasis in Biology and Medicine, Biology and Epidemiology*. Peters W, Killick-Kendrick R. Eds. London: Academic Press 1987; 1:1-120.
- Lainson R, Shaw JJ. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature* 1978; 273: 595-600.
- Le Gouill, C., Parent, J.L., Rola-Pleszczynski & Stankova, J. Structural and functional requirements For Agonist-Induced Internalization Of The Human Platelet-Activating Factor Receptor. *J. Biol. Chem.* 272: 21289-21295, 1997.
- Lee H, Liao JJ, Graeler M, Huang MC, Goetzl EJ. Lysophospholipid regulation of mononuclear phagocytes. *Biochim Biophys Acta* (2002) 1582:175–7.
- Légrédi, A., Chitu, V., Szukacsov, V., Fajka-Boja, R., Szucs, S.K., Monostori, E. Lysophosphatidylcholine Is A Regulator Of Tyrosine Kinase Activity And Intracellular Ca^{2+} Level In Jurkat T Cell Line. *Immun. Letters* 91: 17-21. 2004.

- Leroith, D., Roberts Jr, C., Lesniak, M. A., Roth, J. Receptors For Intercellular Messenger Molecules In Microbes: Similarities To Vertebrate Receptors And Possible Implications For Diseases In Man. *Cellular And Molecular Life Sciences*. 42 (7), 782-788,1986.
- Lopes AH, Dutra PML, Rodrigues CO, Soares MJ, Angluster J, Cordeiro RSB (1997) Effect of platelet activating factor on the process of cellular differentiation of *Herpetomonas muscarum muscarum*. *JEukaryotMicrobiol*44:321–325
- Lopes, Angela H. *et al.* (2010) Trypanosomatids: odd organisms, devastating diseases. *Open Parasitol J*, v. 4, p. 30-59.
- López-Muñoz, R. A., Molina-Berrios, A., Campos-Estrada, C., Abarca-Sanhueza, P., Urrutia-Llancaqueo, L., Peña-Espinoza, M., & Maya, J. D. (2018). Inflammatory and Pro-resolving Lipids in Trypanosomatid Infections: A Key to Understanding Parasite Control. *Frontiers in microbiology*, 9.
- López-Muñoz, R. A., Molina-Berrios, A., Campos-Estrada, C., Abarca-Sanhueza, P., Urrutia-Llancaqueo, L., Peña-Espinoza, M., & Maya, J. D. (2018). Inflammatory and Pro-resolving Lipids in Trypanosomatid Infections: A Key to Understanding Parasite Control. *Frontiers in microbiology*, 9.
- Lupi O, Bartlett BL, Haugen RN, et al. Tropical dermatology: tropical diseasescausedbyproto- zoa. *J AmAcadDermatol* 2009; 60:897–925.
- Machado, F. S., Mukherjee, S., Weiss, L. M., Tanowitz, H. B., & Ashton, A. W. (2011). Bioactive Lipids in *Trypanosoma cruzi* Infection. *Chagas Disease, Part B*, 1–31. doi:10.1016/b978-0-12-385895-5.00001-3.
- Machado, F. S., Mukherjee, S., Weiss, L. M., Tanowitz, H. B., & Ashton, A. W. (2011). Bioactive lipids in *Trypanosoma cruzi* infection. In *Advances in parasitology* (Vol. 76, pp. 1-31). Academic Press.
- Makide K, Kitamura H, Sato Y, Okutani M, Aoki J. (2009) Emerging lysophospholipid mediators, lysophosphatidylserine, lysophosphatidylthreonine, lysophosphatidylethanolamine and lysophosphatidylglycerol. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 89:135–9.
- McGwire, B. S., and A. R. Satoskar. "Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment." *QJM: An International Journal of Medicine* 107.1 (2013):7-14.
- Mesquita, RD, Carneiro, AB, Bafica, A., Gazos-Lopes, F., Takiya, CM, Souto Padron, T.,& Porto, BN (2008). A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* é potencializada pela saliva do vetor através de mecanismos imunossupressores mediados pela lisofosfatidilcolina. *Infecção e imunidade* , 76 (12), 5543-5552.
- Mitropoulos, P., Konidas, P., Durkin-Konidas, M., 2010. New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment.*J. Am. Acad. Dermatol.* 63, 309–322.
- Moreno-Navarrete JM, Catalan V, Whyte L, Diaz-Arteaga A, Vazquez-Martinez R, Rotellar F, *et al.* (2012) The L- α -lysophosphatidylinositol/GPR55 system and its potential role in human obesity. *Diabetes* 61:281–91.
- Mukherjee, S., Maxfield, F.R. Membrane Domains. *Annual Review of Cell And Developmental Biology*. V. 20, P. 839-866,2004.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M. : *Lehninger Principles Of Biochemistry*. 3a. Ed., Worth Publishers, New York,2004.

- Nelson, D. L.; Cox, M. M. (2006): *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4a. Ed., Worth Publishers, New York.
- Nikitopoulou I, Oikonomou N, Karouzakis E, Sevastou I, Nikolaidou-Katsaridou N, Zhao Z, *et al.* (2012) Autotaxin expression from synovial fibroblasts is essential for the pathogenesis of modeled arthritis. *J Exp Med* 209:925–33.
- Nishizuka, Y.(1992) Intracellular signaling by Hydrolysis of Phospholipids and Activation of Protein Kinase C. *Science* 258, 607–614.
- Ojala, P.J., Hirvonen, T.E., Hermansson, M., Somerharju, P., Parkkinen, J. (2007) Acyl Chain- Dependent Effect of Lysophosphatidylcholine on human neutrophils. *Journal of leukocyte Biology*. 82, 1501-1509.
- Olivier M, Gregory DJ, Forget G (2005) Subversion Mechanisms by Which *Leishmania* Para- sites Can Escape the Host Immune Response: a Signaling Point of View. *Clin Microbiol Rev* 18:293–305.
- Organização Mundial da Saúde: Leishmaniasis; 14 March 2018 Disponível em: <http://www.who.int/en/>
- Organização Pan-Americana da Saúde: Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas: Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2018 Disponível em: www.paho.org/leishmaniasis
- Panagiotis Kougias, Hong Chai, Peter H. Lin, Alan B. Lumsden, Qizhi Yao, Changyi Chen. (2006) Lysophosphatidylcholine And Secretory Phospholipase A2 In Vascular Disease: Mediators Of Endothelial Dysfunction And Atherosclerosis. *Med Sci Monit*.12:Ra5-16.
- Papakonstantinou, Vasiliki D., *et al.* (2017) "A Review on Platelet Activating Factor Inhibitors: Could a New Class of Potent Metal-Based AntiInflammatory Drugs Induce Anticancer Properties?." *Bio- inorganic chemistry and applications* .
- Perrin-Cocon L., Agaugue S., Coutant F., Saint-Mezard P., Guinonnet-Paquet A., Nicolas J.F., AndreP., Lotteau V. (2006) Lysophosphatidylcholine Is A Natural Adjuvant That Initiates Cellular Immune Responses. *Vaccine*.;24:1254-63.
- Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, *et al.* (2008) In Vivo Imaging Re- veals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. *Science* 321: 970–974
- Piñeiro R, Falasca M. (2012) Lysophosphatidylinositol signalling: new wine from an old bottle. *Biochim Biophys Acta* 1821:694–705.
- Rieder,M.,Lechleitner,M.,Hrzenjakb,A.,Koefelerc,H.,Desoyed,G.,Heinemanne,A., Frank,S. (2010) Endothelial Lipase (El) And El-Generated Lysophosphatidylcholines Promote IL-8 Expression In Endothelial Cells. *Atherosclerosis*. 2014, 338-344.
- Rodrigues CO, Dutra PML, Barros FS, Souto-Padrón T, MeyerFernandes JR, Lopes AH (1999) Platelet-activatingfactorinductionofsecretedphosphataseactivity in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem- Biophys Res Commun*266:36–42.
- Rodrigues CO, Dutra PML, Souto-Padrón T, Cordeiro RSB, Lopes AH (1996) Effectofplatelet- activating factor on cell differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *BiochemBiophys Res Commun* 223:735–740.
- Rosa MSS, Vieira RB, Pereira AF, Dutra PML, Lopes AH (2001) Platelet-activatingfactor (PAF) modulates peritoneal mouse macrophage infection by *Leishmania amazonensis*. *Curr Microbiol* 43:33–37.

- Rosa, M.S.S., Mendonça, a-Filho, R.R., Bizzo, H.R., Rodrigues, I.A., Soares, R.M.A., Souto-Padrón, T., Alviano, C.S., Lopes, A.H.C.S., (2003). Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 1895–1901.
- Santoro, G.F., Cardoso, M.G., Guimarães, L.G., Mendonça, a, L.Z., Soares, M.J., (2007). *Trypanosoma cruzi*: activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Exp. Parasitol.* 116, 283–290.
- Santos, D. O. & Oliveira, M. M. (1988) Effect of cAMP on macromolecule synthesis in the pathogenic protozoa *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 83 (3): 287- 92.
- Schubach A, Haddad F, Oliveira-Neto MP, *et al.* (1998) Detection of leishmania DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *J Infect Dis*; 178:911–914.
- Seed, J. R. (1996). *Protozoa: pathogenesis and defenses.*
- Serhan, C. N. & Savill, J. (2005) Resolution Of Inflammation: The Beginning Programs The End. *Nature Immunol.* 6, 1191–1197 ,
- Sevastou I, Kaffe E, Mouratis M-A, Aidinis V. (2013) Lysoglycerophospholipids in chronic inflammatory disorders: the PLA2/LPC and ATX/LPA axes. *Biochim Biophys Acta* 1831:42–60.
- Shayman, J.A. Sphingo lipids: Their Role in intracellular signaling and renal Growth. *Journal Of The American Society Of Nefrology.* 7 (2), 171-182, 1996.
- Silva-Neto, M.A.C., Carneiro, A.B., Silva-Cardoso, L., Atella, G.C. Lysophosphatidylcholine: A Novel Modulator Of *Trypanosoma Cruzi* Transmission. *Journal Of Parasitology Research.* 2012.
- Silveira, F. T.; Lainson, R.; Shaw, J. J.; Shindou H, Hishikawa D, Harayama T, Eto M, Shimizu T. (2013) Generation of membrane diversity by lysophospholipid acyltransferases. *J Biochem* 154:21–8.
- Singh, O.P., Sundar, S., (2014). Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis: current status and future prospects. *Front. Immunol.* 5, 296
- Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Bhattacharya SK, Rai M. (2006). Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 100(Suppl.1):S26–33.
- Sundar S, Sinha PK, Rai M, Verma DK, Nawin K, Alam S, *et al.* (2011) Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open label, non-inferiority, randomized controlled trial. *Lancet*; 377:477–86.
- Sunter, Jack, and Keith Gull. (2017) "Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding." *Open biology* 7.9: 170165.
- Suquet CM, Leid RW. (1983) Aggregation of equine platelets by PAF (platelet-activating factor). *In: Inflammation*; 7(2):197-203.
- Svobodová M, Zídková L, Cepicka I, *et al.* (2007) *Sergeia podlipaevi* gen.nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). *Int J Syst Evol Microbiol*; 57:423-32.
- Tanowitz, H.B., Burns, E.R., Sinha, A.K., Kahn, N.N., Morris, S.A., Factor, S.M., *et al.*, (1990). Enhanced platelet adherence and aggregation in Chagas' disease: a potential pathogenic mechanism for cardiomyopathy.

- Teixeira, Dirceu E. (2013) Atlas didático: Ciclo de vida da *Leishmania*/ Dirceu Esdras Teixeira...[*etal.*].– Rio de Janeiro : Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ.64p. : il. color.1. Educação de Biologia e Parasitologia. 2. Protozoa. I. Título
- Tounsi, N., Meghari, S., Moser, M., & Djerdjouri, B. (2015). Lysophosphatidylcholine exacerbates *Leishmania* major-dendritic cell infection through interleukin-10 and a burst in arginase1 and indoleamine 2, 3-dioxygenase activities. *International immunopharmacology*, 25(1), 1-9.
- Tounsi, N., Meghari, S., Moser, M., & Djerdjouri, B. (2015). Lysophosphatidylcholine exacerbates *Leishmania* major-dendritic cell infection through interleukin-10 and a burst in arginase1 and indoleamine 2, 3-dioxygenase activities. *International immunopharmacology*, 25(1), 1-9.
- Tsoupras AB, Iatrou C, Frangia C, Demopoulos CA (2009). The implication of platelet activating factor in cancer growth and metastasis: potent beneficial role of PAF inhibitors and antioxidants. *Infect Disord Drug Targets*;9(4):390-9.
- Ueda-Nakamura, T., Mendonça, a-Filho, R.R., Morgado-Díaz, J.A., Maza, P.K., Filho, B.P.D., Cortez, D.A.G., Alviano, D.S., Rosa, M.S.S., Lopes, A.H.C.S., Alviano, C.S., Nakamura, C.V., (2006). Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. *Parasitol. Int.* 55, 99–105.
- Uzun S. (2010) Kutanozlaymanyazis. In: Tüzün Y, Serdaroglu S, Erdem C, Özpoyraz M, Önder M, Öztürkcan S, eds. *Dermatolojik Tedavi*. Istanbul: Nobel Kitabevi.
- Uzun S. (2008) Leishmaniasis. In: Tüzün Y, Gürer MA, Serdaroglu S, Oğuz O, Aksungur VL, eds. *Dermatoloji*. Istanbul: Nobel Kitabevi:659–677
- Uzun, Soner, *et al.* (2018) "Clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of cutaneous leishmaniasis in Turkey." *International journal of dermatology*.
- Van Meer, G. (2005) Cellular Lipidomics. *The Embo Journal*. 24, 3159 – 3165.
- Vespa, G. N., F. Q. Cunha, and J. S. Silva. (1994). Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect. Immun.* 62:5177–5182.
- Vickerman K. (2009) "Not a very nice subject." Changing views of parasites and parasitology in the twentieth century. *Parasitology*; 136:1395-402.
- Vouldoukis I, Riveros-Moreno V, Dugas B, *et al.* (1995) The killing of *Leishmania* major by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the Fc epsilon RII/CD23 surface antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*; 92: 7804-8.
- Wallace FG. (1966) The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. *Exp Parasitol*; 18: 124- 93.
- Werbovetz, K.A., Englund, P.T. (1996) Lipid Metabolism in *Trypanosoma Brucei*: Utilization of Myristate And Myristoyllysophosphatidylcholine For Myristoylation Of Glycosyl Phosphatidylinositols. *Biochemistry Journal*. 318, 575-581.
- Wheeler RJ, Sunter JD, Gull K. (2016) Flagellar pocket restructuring through the *Leishmania* lifecycle involves a discrete flagellum attachment zone. *J. Cell Sci.* 129, 854–867.
- Wheeler, R. J., Gluenz, E. and Gull, K. (2013b). The Limits on Trypanosomatid Morphological Diversity. *PLoS ONE* 8, e79581.

- Wheeler, R. J., Gluenz, E. and Gull, K. (2015). Basal body multipotency and axonemal remodelling are two pathways to a 9+0 flagellum. *Nat. Commun.* 6, 8964.
- Wheeler, R. J., Scheumann, N., Wickstead, B., Gull, K. and Vaughan, S. (2013a). Cytokinesis in *Trypanosoma brucei* differs between bloodstream and tsetse trypomastigote forms: implications for microtubule-based morphogenesis and mutant analysis. *Mol. Microbiol.* 90, 1339–55.
- Wilensky, Rl; Shi, Y; Mohler, Er. (2008) Inhibition of Lipoprotein Associated Phospholipase A2 Reduces Complex Coronary Atherosclerotic Plaque Development, *Nature Medicine*, Vol.14, No.10, Pp.1059–1066.
- Yuan, X., Tod, M.L., Rubin, L.J., Blaustein, M.P. (1995) Hypoxic and Metabolic Regulation of Voltage-Gated K⁺ Channels in Rat Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *Experimental Physiology.* 80, 803-813.
- Z.-I. Honda, S. Ishii, and T. Shimizu, (2002) "Platelet-activating factor receptor," *Journal of Biochemistry*, vol. 131, no. 6, pp. 773–779.