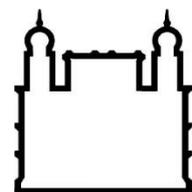




**UFBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



**FIOCRUZ**

**Programa de Pós-graduação em Patologia Humana**

**TESE DE DOUTORADO**

**INVESTIGAÇÃO DA SÍNTESE DE EICOSANÓIDES DURANTE A LEISHMANIOSE: UMA  
ANÁLISE DO PARASITO AO HOSPEDEIRO**

**YASMIN MONARA FERREIRA DE SOUSA ANDRADE**

**Salvador - Bahia**

**2022**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Programa de Pós-graduação em Patologia Humana**

**INVESTIGAÇÃO DA SÍNTESE DE EICOSANOIDES DURANTE A  
LEISHMANIOSE: UMA ANÁLISE DO PARASITO AO HOSPEDEIRO**

**YASMIN MONARA FERREIRA DE SOUSA ANDRADE**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana para a obtenção do grau de Doutora.

Orientadora: Profa. Dra. Valéria de Matos Borges

Coorientador: Prof. Dr. Théo de Araújo Santos

**Salvador - Bahia**

**2022**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Instituto Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ – Bahia - Salvador

**A554i** Andrade, Yasmin Monara Ferreira de Sousa

Investigação da síntese de eicosanoides durante a leishmaniose:  
uma análise do parasito ao hospedeiro. / Yasmin Monara Ferreira de  
Sousa Andrade. \_ Salvador, 2022.

89 f.: il.: 30 cm

Orientadora: Profa. Dra. Valéria de Matos Borges  
Coorientador: Prof. Dr. Théo de Araújo Santos

Tese (Doutorado em Patologia Humana) – Universidade Federal  
da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação  
Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

1. Corpúsculos lipídicos. 2. Eicosanoides. 3. Leishmania. 4.  
Mediadores lipídicos. 5. Leishmanioses. I. Título.

CDU 616.993.161

"INVESTIGAÇÃO DA SÍNTESE DE EICOSANOIDES DURANTE A LEISHMANIOSE: UMA ANÁLISE DO PARASITO AO HOSPEDEIRO"

**Yasmin Monara Ferreira de Sousa Andrade**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Salvador, 16 de novembro de 2022.

COMISSÃO EXAMINADORA



Documento assinado digitalmente  
Patricia Flavia Quaresma  
Data: 17/11/2022 11:24:03-0300  
CPF: \*\*\*.504.436-\*\*  
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

---

Dra. Patrícia Flávia Quaresma  
Professora  
UFSC

---

Dra. Cláudia Ida Brodskyn  
Pesquisadora  
FIOCRUZ/BA

---

Dr. Robson Amaro Augusto da Silva  
Professor  
UFBA

---

Dr. Jaime Ribeiro Filho  
Pesquisador  
FIOCRUZ/CE

---

Dra. Valéria de Matos Borges  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

À CAPES pelo fomento, apoio financeiro e consolidação do programa de pós-graduação em Patologia Humana.

À Universidade Federal da Bahia.

Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina- UFBA.

Dedico este trabalho:

Ao meu pai Aécio, meu amor eterno e maior incentivador. De onde estiver, saiba que conseguimos.

A Alcinda, Sinho, Huann e Dedezinho, vocês são meu acalento e paz.

A Ícaro, meu presente. Esta é mais uma das muitas conquistas ao seu lado.

Aos familiares e amigos, saibam que o carinho e apoio de vocês fazem diferença.

E a Deus, meu guia, minha força...sem Teu amor e sustento eu nada seria!

## AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos orientadores Valéria e Theo. Vocês me acolheram de braços abertos e nortearam esta etapa da minha formação científica com excelência, carinho, respeito e se tornaram pessoas especiais na minha vida. Agradeço a Deus por vocês!

Ao laboratório LIB e aos Valerianos pelo companheirismo, apoio, discussões, sugestões e principalmente, pelo auxílio nos fatídicos dias de ensaios *in vivo*.

A Dr. Washington e seu grupo de pesquisa, especialmente, Jonathan e Bianca. Grata por todas as sugestões, análises e contribuições realizadas na bancada e fora desta.

À equipe de Dra. Nicole do Hospital Veterinário da UFBA e do Dr. Carlos Sorgi da USP (Ribeirão Preto) pelas contribuições no estudo.

Às pesquisadoras Deborah Fraga e Bruna Leite pelo auxílio e análises realizadas.

Aos técnicos do LIB, Deyse e Matheus, por toda carinhosa ajuda. Bom ter pessoas como vocês por perto.

À equipe do biotério pelo suporte com os animais.

A FABESB pelo apoio financeiro.

À CAPES pelo fomento, apoio financeiro e consolidação do programa de pós-graduação em Patologia Humana (PGPAT).

Ao Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina-UFBA, à FIOCRUZ e PGPAT por potencializarem a formação de novos pesquisadores.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

**Muito Obrigada!**

ANDRADE, Yasmin Monara Ferreira de Sousa. **Investigação da síntese de eicosanoides durante a leishmaniose: uma análise do parasito ao hospedeiro**. 2022. 89 f. il. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2022.

## RESUMO

Corpúsculos lipídicos (CLs) são organelas citoplasmáticas responsáveis pelo armazenamento de lipídios neutros e pelo metabolismo de mediadores em muitos tipos de células. Dados recentes mostram formação de CLs e produção de eicosanoides em *Leishmania*. Contudo, estudos da formação e modulação de CLs, bem como, da síntese de lipídios bioativos em diferentes espécies de *Leishmania* ainda não foram conduzidos. Assim, primeiramente foram avaliadas por microscopia ótica a formação de CLs em *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, bem como, a modulação destas organelas estimuladas com os ácidos eicosapentaenóico (EPA), docosahexaenóico (DHA) e araquidônico (AA). Os mediadores produzidos por estas espécies foram quantificados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS) e a expressão das proteínas GP63 e PGFS foram avaliadas por imunoblotting e ELISA. Por fim, as sequências genômicas e os resíduos do sítio ativo dessas proteínas foram analisadas em espécies de *Leishmania* do Velho e Novo Mundo. Observamos maior número de CLs durante metaciclo-gênese e após estimulação com EPA, DHA e AA, em *L. infantum* e *L. braziliensis*. Além disso, identificamos 12 lipídios bioativos, estimulados principalmente por AA. A partir das análises *in silico*, notamos que as sequências de GP63 e PGFS são mais similares entre as espécies de mesmo tropismo e que os resíduos do sítio ativo de GP63 foram mais alterados, ao contrário dos resíduos de PGFS. Também observamos que GP63 foi mais produzida na fase logarítmica dos parasitos, ao contrário de PGFS que foi mais expressa na fase estacionária. No contexto da interação parasito-hospedeiro, ainda não foi investigado a síntese de eicosanoides *in situ* durante a fase crônica da leishmaniose visceral (LV). Desse modo, utilizamos Hamsters Golden Syrian (*Mesocricetus auratus*) machos, com 6 a 8 semanas de idade, que foram infectados intraperitonealmente com  $10^7$  *L. infantum*/mL. Após 150 dias de infecção, avaliamos as alterações clínicas e histológicas no baço e fígado. Através da HPLC-MS/MS demonstramos pela primeira vez a produção de eicosanoides no plasma, baço e fígado dos animais. Notamos que o aumento da produção dos mediadores HETEs está correlacionado com a gravidade da LV. Portanto, este estudo abre perspectivas para compreensão da biologia de *Leishmania* e sua interação com o hospedeiro, bem como amplia o conhecimento para elaboração de novas estratégias antiparasitárias.

**Palavras-chave:** Corpúsculos lipídicos. Eicosanoides. *Leishmania*. Mediadores lipídicos. Leishmanioses.

ANDRADE, Yasmin Monara Ferreira de Sousa. **Investigation of eicosanoid synthesis during leishmaniasis: a parasite-to-host analysis**. 2022. 89 f. il. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2022.

## ABSTRACT

Lipid droplets (LDs) are cytoplasmic organelles responsible for the storage of neutral lipids and the mediator's metabolism in many types of cells. Recent data show LDs formation and eicosanoid production in *Leishmania*. However, studies on the formation and modulation of LDs, as well as the bioactive lipids synthesis in different *Leishmania* species have not yet been conducted. Thus, the formation of LDs in *L. infantum*, *L. amazonensis* and *L. braziliensis*, as well as the stimulation of these organelles with eicosapentaenoic (EPA), docosahexaenoic (DHA) and arachidonic (AA) acids were first evaluated by optical microscopy. The mediators produced by these species were quantified by High-Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (HPLC-MS) and the expression of GP63 and PGFS proteins were evaluated by immunoblotting and ELISA. Finally, the genomic sequences and active site residues of these proteins were analyzed in Old and New World *Leishmania* species. We observed a greater number of LDs during metacyclogenesis and after stimulation with EPA, DHA and AA, in *L. infantum* and *L. braziliensis*. In addition, we identified 12 bioactive lipids, mainly stimulated by AA. From the in-silico analyses, we noticed that GP63 and PGFS sequences are more similar between species with the same tropism and that GP63 active site residues were more altered, unlike the PGFS residues. We also observed that GP63 was more produced in the log phase of the parasites, unlike PGFS which was more expressed in the stationary phase. In the context of the parasite-host interaction, the eicosanoids synthesis *in situ* during the chronic phase of visceral leishmaniasis (VL) has not yet been investigated. Therefore, we used male Golden Syrian Hamsters (*Mesocricetus auratus*), aged 6 to 8 weeks, which were infected intraperitoneally with  $10^7$  *L. infantum*/mL. After 150 days of infection, we evaluated the clinical and histological changes in the spleen and liver. Through HPLC-MS, we demonstrated for the first time the eicosanoids production in the plasma, spleen and liver of animals. We noticed that the increase in the production of HETEs mediators is correlated with the severity of VL. Therefore, this study opens perspectives for understanding the biology of *Leishmania* and its interaction with the host, as well as expanding the knowledge for the development of new antiparasitic strategies.

**Keywords:** Lipid droplets. Eicosanoids. *Leishmania*. Lipid mediators. Leishmaniasis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Classificação clínica das leishmanioses	16
<b>Figura 2</b>	Distribuição endêmica da leishmaniose cutânea 2020	17
<b>Figura 3</b>	Distribuição endêmica da leishmaniose visceral em 2020	18
<b>Figura 4</b>	Características ultra estruturais de formas promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania</i> spp	20
<b>Figura 5</b>	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp	21
<b>Figura 6</b>	Representação esquemática dos glicoconjugados em <i>Leishmania</i> spp	22
<b>Figura 7</b>	Estrutura do lipofosfoglicano em <i>Leishmania dovonani</i>	24
<b>Figura 8</b>	Biogênese e estrutura de corpos lipídicos	26
<b>Figura 9</b>	Esquema dos mediadores lipídicos derivados do AA	27

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Funções e composição presumível de gotículas lipídicas nos protozoários	29
<b>Tabela 2</b>	Mediadores lipídicos, precursores e suas enzimas de metabolismo identificadas em patógenos protozoários	30

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>11-HETE</b>	Ácido 11-hidroxieicosatetraenóico
<b>12-HETE</b>	Ácido 12-hidroxieicosatetraenóico
<b>15-HETE</b>	Ácido 5-hidroxieicosatetraenóico
<b>15-keto-PGE2</b>	15-keto-Prostaglandina E2
<b>5-HETE</b>	Ácido 5-hidroxieicosatetraenóico
<b>5-LO</b>	5-lipoxigenase
<b>8-HETE</b>	Ácido 8-hidroxieicosatetraenóico
<b>AA</b>	Ácido araquidônico
<b>ADRP</b>	Proteína relacionada à diferenciação adiposa
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>BCA</b>	Ácido bicinconcônico
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>CCT</b>	Fosfocolina citidililtransferase
<b>CDS</b>	Sequencias codificantes
<b>CEQIL</b>	Center of Excellence in Lipid Quantification and Identification
<b>CLs</b>	Corpos/Corpúsculos lipídicos
<b>COX</b>	Ciclooxigenases
<b>cPLA2</b>	Fosfolipases citosólicas
<b>CYP450</b>	Proteína semelhante ao citocromo P450
<b>DHA</b>	Ácido docosa-hexaenóico
<b>DGAT</b>	Acil CoA:diacilglicerol aciltransferases
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>EPA</b>	Ácido eicosapentaenóico
<b>FLAP</b>	Proteína ativadora da 5-LO
<b>GIPLs</b>	Glicosilinositolfosfolipídeos
<b>GP63</b>	Glicoproteína 63
<b>GPI</b>	Glicofosfatidilinositol
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidade
<b>HE</b>	Hematoxilina/Eosina

<b>HETE</b>	Ácido hidroxiieicosatetraenóico
<b>HGB</b>	Hemoglobina
<b>HPLC-MS</b>	espectrometria de massa por cromatografia em fase líquida
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintases
<b>I-TASSER</b>	Interactive Threading Assembly Refinement
<b>KC</b>	Kupffer cells
<b>kDNA</b>	DNA do cinetoplasto
<b>LAMP-1</b>	Proteína 1 de membrana associada a lisossomos
<b>LAP</b>	Fagocitose associada a LC3
<b>LC</b>	Leishmaniose Cutânea
<b>LCD</b>	Leishmaniose cutânea difusa
<b>LCL</b>	Leishmaniose cutânea localizada
<b>LD</b>	Leishmaniose disseminada
<b>LD</b>	Lipid bodies
<b>LM</b>	Leishmaniose Mucocutânea
<b>LOX</b>	Lipoxigenases
<b>LPG</b>	Lipofosfoglicano
<b>LT</b>	Leishmaniose Tegumentar
<b>LTs</b>	Leucotrienos
<b>LV</b>	Leishmaniose Visceral
<b>LXA4</b>	Lipoxina A4
<b>MEGA X</b>	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
<b>MMP-8</b>	Metaloproteinase-8
<b>msp</b>	Major surface protease
<b>NF- κB</b>	Fator nuclear kappa B
<b>PAHO</b>	Pan American Health Organization
<b>PAMPs</b>	Padrões moleculares associados a patógenos
<b>PDB</b>	Protein Data Bank
<b>PGD2</b>	Prostaglandina D2
<b>PGE2</b>	Prostaglandina E2
<b>PGF2S</b>	Prostaglandina F2α sintase
<b>PGH2</b>	Prostaglandina H2
<b>PGs</b>	Polímeros Livres de Fosfoglicanos

<b>PGs</b>	Prostaglandinas
<b>PLIN-1</b>	Perilipina
<b>PLT</b>	Plaquetas
<b>PPGs</b>	Proteoglicanos
<b>PUFA</b>	Polyunsaturated fatty acids
<b>qPCR</b>	PCR em Tempo Real
<b>RAB18</b>	Guanosina trifosfatase Rab
<b>RBC</b>	Eritrócitos
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>ROC</b>	Receiver Operating Characteristic
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>RvD1</b>	Resolvina D1
<b>sAP</b>	Fosfatases Ácidas Secretadas
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sódio
<b>TBS</b>	Tris saline buffer
<b>TIP 47</b>	Proteína que interage com cauda de 47 kDa
<b>TMB</b>	Tetramethylbenzidine
<b>TXA2</b>	Tromboxano A2
<b>UPGMA</b>	Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean
<b>VAMP8</b>	Proteína 8 de membrana associada à vesícula
<b>VP</b>	Vacúolo parasitóforo
<b>WHO</b>	World Health Organization
<b>XTT</b>	Tetrazole salt

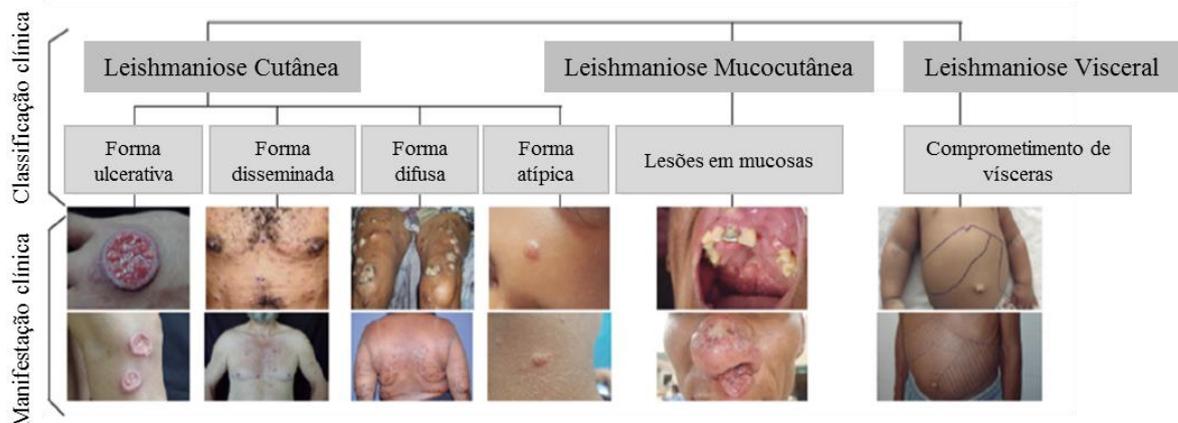
## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	16
1.1	LEISHMANIOSES	16
1.1.1	<b>Leishmaniose Cutânea (LC)</b>	16
1.1.2	<b>Leishmaniose Muco-cutânea (LM)</b>	17
1.1.3	<b>Leishmaniose Visceral (LV)</b>	18
1.2	MORFOLOGIA E CICLO BIOLÓGICO DOS PROTOZOÁRIOS <i>LEISHMANIA</i> spp.	19
1.3	MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE COMO FATORES DE VIRULÊNCIA EM <i>LEISHMANIA</i>	21
1.3.1	<b>Glicoproteína 63 (GP63)</b>	22
1.3.2	<b>Lipofosfoglicano (LPG)</b>	23
1.4	CORPÚSCULOS E MEDIADORES LIPÍDICOS NA INFECÇÃO POR <i>LEISHMANIA</i>	26
1.5	CORPÚSCULOS LIPÍDICOS E SÍNTESE DE EICOSANOIDES EM <i>LEISHMANIA</i>	28
2	<b>JUSTIFICATIVA</b>	32
3	<b>PARTE I</b>	33
3.1	HIPÓTESE	33
3.2	OBJETIVOS	33
3.2.1	<b>Objetivo geral</b>	33
3.2.2	<b>Objetivos específicos</b>	33
3.3	MANUSCRITO I	34
4	<b>PARTE II</b>	57
4.1	HIPÓTESE	57
4.2	OBJETIVOS	57
4.2.1	<b>Objetivo geral</b>	57
4.2.2	<b>Objetivos específicos</b>	57
4.3	MANUSCRITO II	57
5	<b>DISCUSSÃO</b>	75
6	<b>CONCLUSÕES</b>	78
7	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	80
	<b>REFERÊNCIAS</b>	81

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 LEISHMANIOSES

Leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas e ainda consideradas como um grave problema ecoepidemiológico, já que, atingem populações pobres em muitas regiões ao redor do mundo, principalmente a Ásia, Oriente Médio, África e Américas (RUIZ-POSTIGO et al., 2021), sendo assim classificadas como do Velho (Oriente) ou Novo Mundo (Ocidente) (WHO, 2010). A doença apresenta duas formas clínicas principais: Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV), que são causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (WHO, 2010). No Novo Mundo, a LT ainda é subdividida em: leishmaniose cutânea (LC) e mucocutânea (LM) (Fig. 1) (MANN et al., 2021; PAHO, 2021; RUIZ-POSTIGO et al., 2021; WHO, 2018).



**Figura 1** - Classificação clínica das leishmanioses

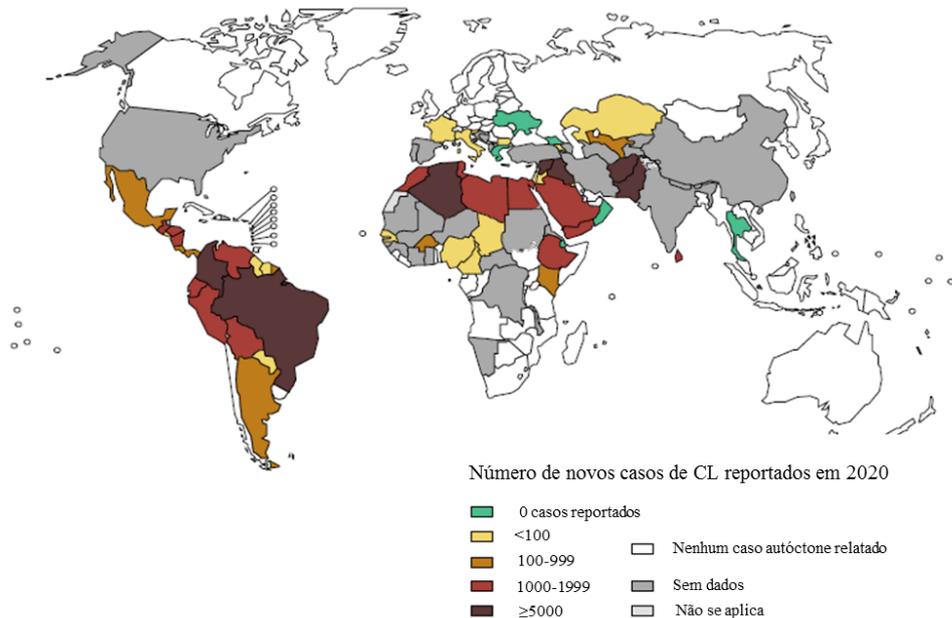
**Fonte:** adaptado de (MANN et al., 2021)

### 1.1.1 Leishmaniose Cutânea (LC)

Dentre as leishmanioses, a LC é a forma mais comum e causa lesões de pele caracterizadas pelo surgimento inicial de granuloma dérmico que evolui até a formação de úlceras, além de inchaço local, pápula eritematosa e adenopatia regional (REITHINGER et al., 2007; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017; WHO, 2018). A LC ainda apresenta classificações clínicas, podendo ser: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose disseminada (LD) (Fig. 1) (MANN et al., 2021). No Brasil, os principais agentes etiológicos da LC são *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*, no entanto, outras espécies também podem causar LC (KAYE; SCOTT, 2011).

Em 2020, o país reportou o maior número de novos casos (291) de LC dentre os países da Américas do Sul (RUIZ-POSTIGO et al., 2021) (Fig. 2) e estima-se que entre 600.000 a 1 milhão de novos casos ocorram anualmente em todo o mundo (PAHO, 2019; WHO, 2018).

Mapa: Status endêmico da leishmaniose cutânea (LC) no mundo, 2020



**Figura 2** - Distribuição endêmica da leishmaniose cutânea em 2020

**Fonte:** adaptado de (RUIZ-POSTIGO et al., 2021)

### 1.1.2 Leishmaniose Mucocutânea (LM)

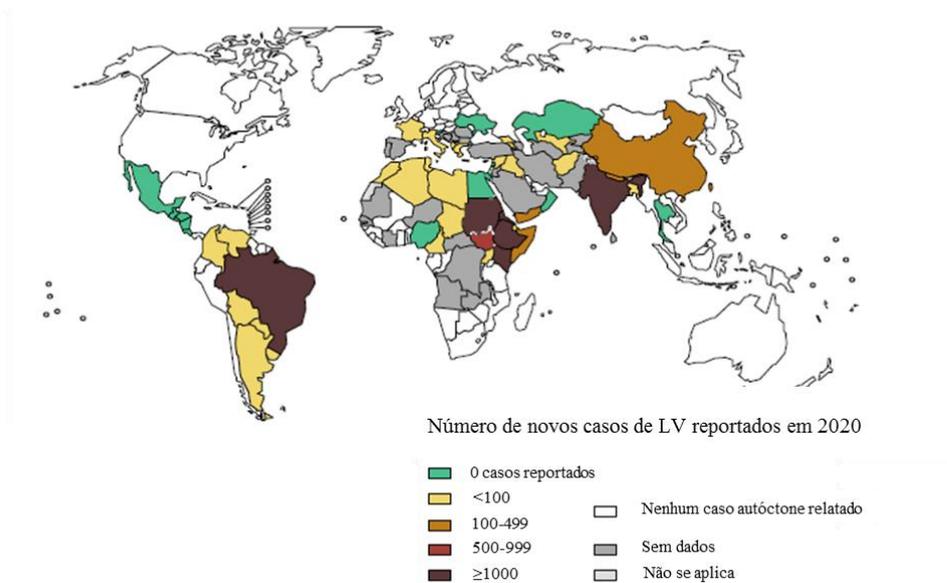
Considerada uma das formas mais graves, a LM causa destruição parcial ou total das mucosas do nariz, boca e garganta (PAHO, 2019; WHO, 2010). Além disso, a LM ocorre principalmente nas Américas, com grande incidência na Bolívia, Peru e Brasil (PAHO, 2019). Em 2020, 4,2% dos novos casos de LT reportados no Brasil corresponderam a LM (PAHO, 2021), tendo como principal agente etiológico *L. braziliensis* (KAYE; SCOTT, 2011).

As respostas imunológicas contra as formas mais severas de LT (LM e LCD) são opostas e variam quanto à imunidade celular, produção de anticorpos e carga parasitária (SCOTT; NOVAIS, 2016). Isso demonstra que, além de depender das espécies infectantes de *Leishmania*, a forma e progressão da doença estão associados a fatores do hospedeiro e também podem direcionar estratégias terapêuticas mais eficientes (MANN et al., 2021; SCOTT; NOVAIS, 2016).

### 1.1.3 Leishmaniose Visceral (LV)

A LV, também conhecida como calazar, é causada pela espécie *L. infantum* (KAYE; SCOTT, 2011) e tem como principais reservatórios alguns mamíferos como cães, gatos, coelhos, morcegos, entre outros (PENNISI et al., 2015). O quadro clínico da LV varia de casos assintomáticos a manifestações leves, moderadas ou graves, no entanto, a LV continua a ser uma das principais doenças parasitárias com potencial de surto e mortalidade quando não tratada adequadamente (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; PAHO, 2019; WHO, 2010). Febre irregular persistente e esplenomegalia caracterizam a LV, além da pancitopenia, hepatomegalia, hipergamaglobulinemia e perda de peso, particularmente em pacientes que se apresentam na fase crônica da doença (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). A desnutrição aguda ou o emagrecimento estão associados a uma alta carga parasitária, particularmente em crianças pequenas, embora não esteja claro se esse efeito é causa ou consequência de um estado nutricional ruim (HARHAY et al., 2011; MALAFAIA, 2009; ZACARIAS et al., 2017). Em 2020, o Brasil juntamente com Etiópia, Eritreia, Quênia, Índia e Sudão representam 79% dos casos globais de LV (Fig. 3) (RUIZ-POSTIGO et al., 2021).

Mapa: Status endêmico da leishmaniose visceral (LV) no mundo, 2020



**Figura 3** - Distribuição endêmica da leishmaniose visceral em 2020

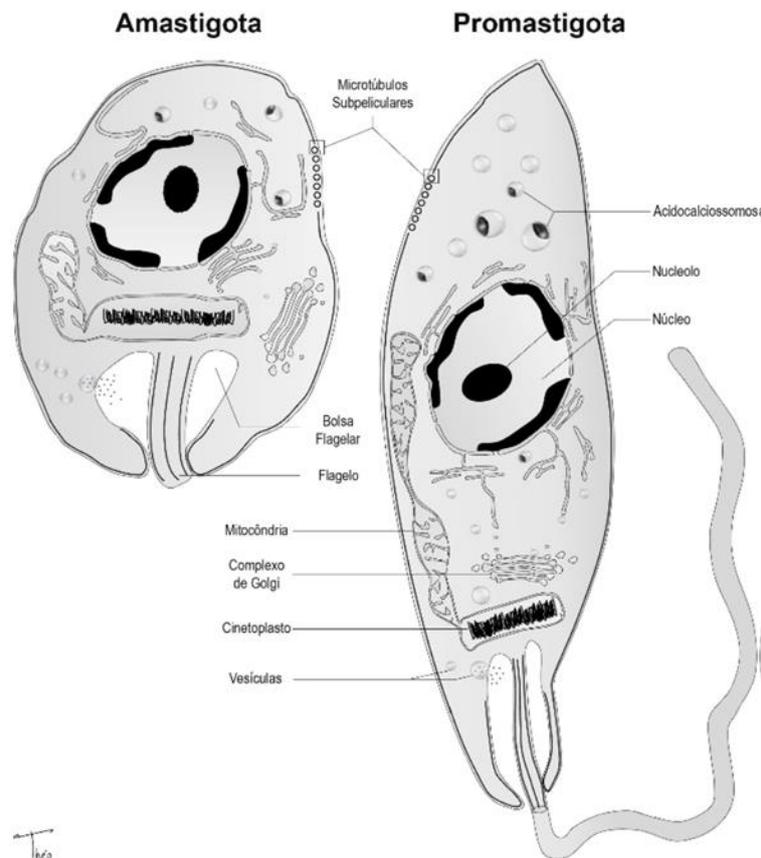
**Fonte:** adaptado de (RUIZ-POSTIGO et al., 2021)

Diante da gravidade da LV, diferentes modelos experimentais *in vivo* têm sido utilizados para uma melhor compreensão da doença e desenvolvimento de novas terapias (DORES

MOREIRA et al., 2016; LOEUILLET; BAÑULS; HIDE, 2016; ROUAULT et al., 2017). Os camundongos são geneticamente resistentes ou suscetíveis à infecção, mas os camundongos suscetíveis podem ainda conter a infecção e dificultar o desenvolvimento da doença (LOEUILLET; BAÑULS; HIDE, 2016; MARQUIS; GROS, 2007; MELBY et al., 2001; NIETO et al., 2011; WEGNER et al., 2004). Já o hamster (*Mesocricetus auratus*) representa o melhor modelo para LV, pois possui uma suscetibilidade a uma variedade de patógenos intracelulares, além de desenvolver a maioria das alterações imunopatológicas características da LV humana com crescimento de parasitas na medula óssea, baço e fígado, sintomas clínicos e hematológicos como hepatoesplenomegalia, anemia, pancitopenia (ALMEIDA et al., 2021; DORES MOREIRA et al., 2016; LIMA et al., 2014; NIETO et al., 2011; SAINI; RAI, 2020). Fatores do hospedeiro, como idade e sexo, também determinam a suscetibilidade a infecções, desse modo, hamsters do sexo masculino e em estágio juvenil mostraram lesões maiores e mais graves e maior carga parasitária nos linfonodos em comparação com as fêmeas (SINGH et al., 2007; TRAVI et al., 2002).

## 1.2 MORFOLOGIA E CICLO BIOLÓGICO DOS PROTOZOÁRIOS *LEISHMANIA* spp.

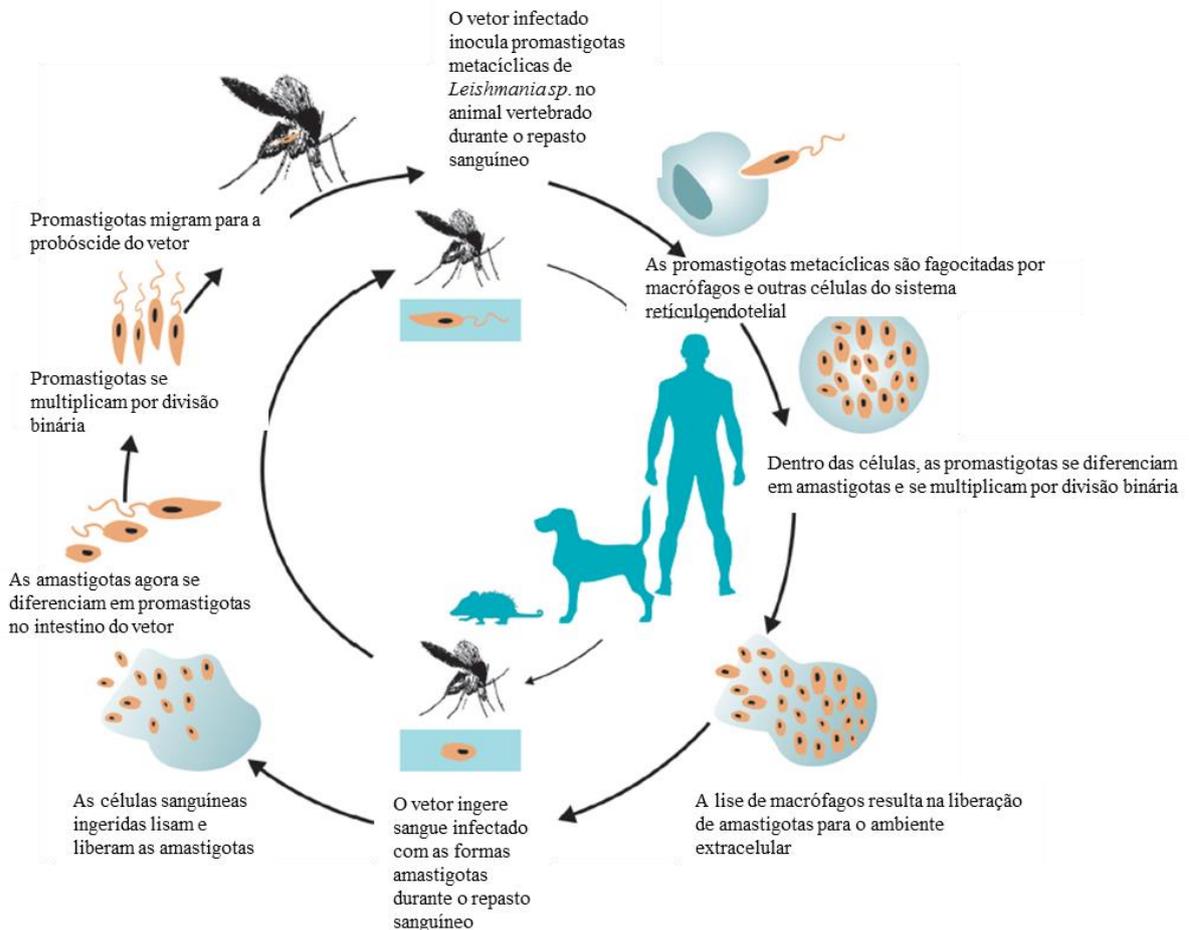
Protozoários do gênero *Leishmania* têm ciclo de vida dixeno, ou seja, infectam hospedeiros vertebrados e invertebrados. Além disso, são parasitos digenéticos, pois compreendem dois estágios de desenvolvimento: um estágio extracelular e flagelado denominado promastigota que prolifera no intestino médio do vetor e um estágio intracelular obrigatório sem flagelo denominado amastigota que se multiplica nas células de hospedeiros vertebrados (Fig. 4) (FORESTIER, 2013; SUNTER; GULL, 2017). No entanto, a divisão por fissão binária e a arquitetura celular básica é conservada entre promastigotas e amastigotas, que têm: núcleo, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, mitocôndria e cinetoplasto genoma mitocondrial (kDNA) que está diretamente ligado ao corpo basal a partir do qual se estende o flagelo (OGBADOYI, EMMANUEL O., 2003). Na base do flagelo há uma invaginação da membrana celular formando uma bolsa flagelar, que é importante nesses parasitas por ser o único local de endocitose e exocitose e, portanto, é uma interface crítica entre o parasita e hospedeiro (LACOMBLE et al., 2009).



**Figura 4** - Características ultra estruturais de formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* spp. (Desenho esquemático produzido por Théo Araújo-Santos)  
**Fonte:** (BARRAL, 2011).

A infecção do hospedeiro vertebrado pela *Leishmania* ocorre durante o repasto sanguíneo realizado pelo flebotômíneo, o qual regurgita formas promastigotas metacíclicas na derme do hospedeiro, dessa forma, os parasitos liberados são fagocitados pelas células hospedeiras locais e iniciam sua diferenciação para a forma amastigota, dentro do vacúolo parasitóforo (VP) (PAHO, 2019). As amastigotas se multiplicam até o momento em que ocorre o rompimento da célula hospedeira, o que possibilita a infecção de novas células e leva às formas assintomáticas ou sintomáticas da doença a depender de fatores relacionados ao hospedeiro e à espécie de *Leishmania* (MANN et al., 2021; PAHO, 2019). Já a infecção do hospedeiro invertebrado, se dá pelo repasto sanguíneo de animais infectados, uma vez que os flebotomos ingerem os parasitos na forma amastigota, que passam por processos de diferenciação no trato digestivo do vetor até alcançarem novamente a forma promastigota

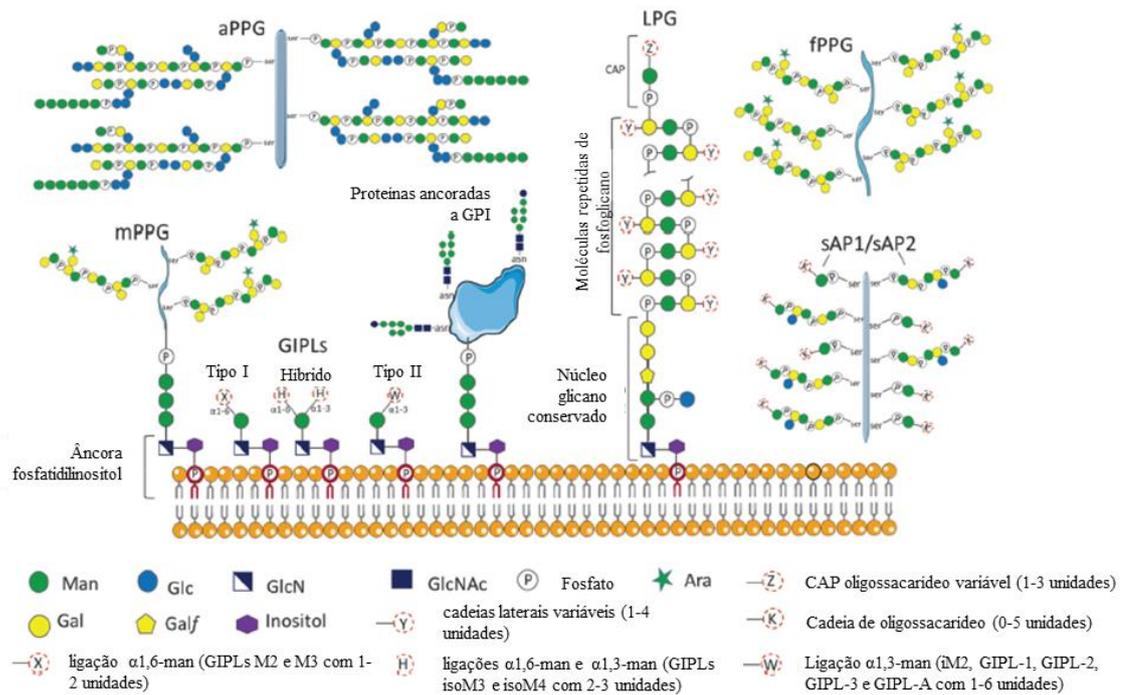
metacíclica, e assim, dar continuidade ao ciclo de infecção (Fig. 5) (CECÍLIO; CORDEIRO-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2022; PAHO, 2019; SUNTER; GULL, 2017)



**Figura 5** - Ciclo biológico de *Leishmania* spp.  
**Fonte:** adaptado de (PAHO, 2019)

### 1.3 MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE COMO FATORES DE VIRULÊNCIA EM *LEISHMANIA*

Durante o ciclo de vida dos protozoários *Leishmania* spp., moléculas de superfície celular denominadas glicoconjugados desempenham papel fundamental na sobrevivência, infectividade e virulência dos parasitos, sendo esses: o Lipofosfoglicano (LPG), os Proteofosfoglicanos (PPGs), Polímeros Livres de Fosfoglicanos (PGs), Fosfatases Ácidas Secretadas (sAP), Glicosilinositolfosfolipídeos (GIPLs), e a Glicoproteína 63 (GP63) (Fig. 6) (MULE et al., 2020; TURCO; DESCOTEAUX, 1992). GP63 e LPG são as moléculas mais abundantes, têm sido frequentemente reportadas em estudos da interação-hospedeiro e, por isso, serão descritas abaixo.



**Figura 6** - Representação esquemática dos glicoconjugados em *Leishmania* spp  
**Fonte:** adaptado de (MULE et al., 2020)

### 1.3.1 Glicoproteína 63 (GP63)

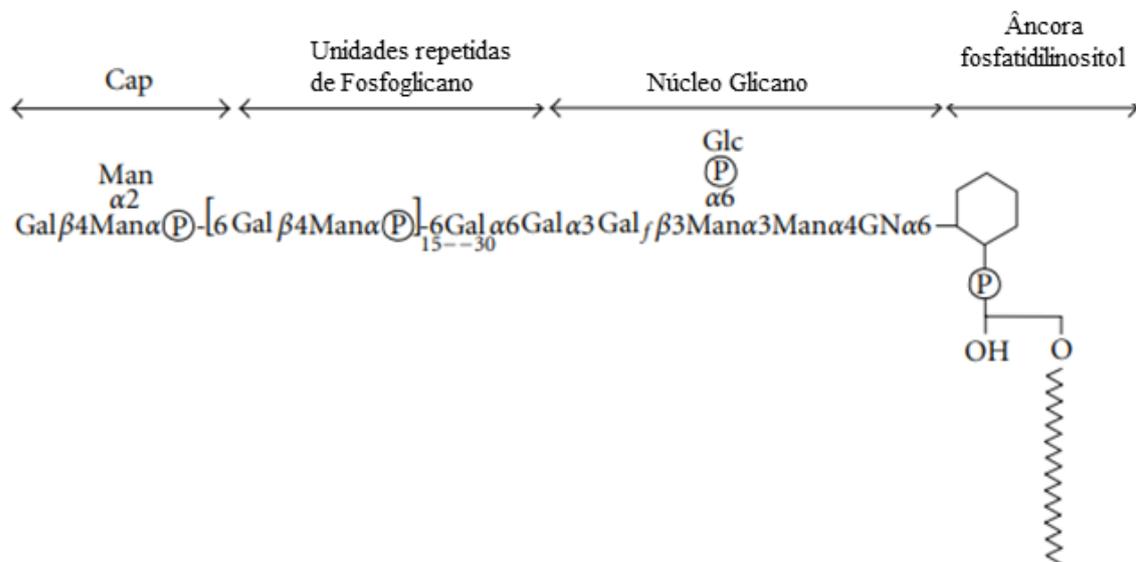
Também chamada de leishmanolisina, a GP63 é a glicoproteína mais abundante da superfície de *Leishmania* (FONG; CHANG, 1982), atua como metaloprotease dependente de zinco e está presente em promastigotas e amastigotas (FROMMEL et al., 1990). Seus genes codificadores, *msp*, são altamente conservados e organizados *in tandem* entre a maioria das espécies de *Leishmania* (ATAYDE et al., 2016; IVENS et al., 2006; PEACOCK et al., 2007). Esta proteína pode estar ancorada na membrana via glicofosfatidilinositol (GPI) ou pode ser diretamente secretada para o meio extracelular na forma glicosilada e, por isso, seu peso molecular varia entre 60-66 kDa (MATLASHEWSKI, 2001; MCGWIRE et al., 2002).

Quanto à virulência de GP63, sabe-se que esta proteína é essencial no desenvolvimento da patogênese *in vivo* e *in vitro* por *Leishmania* spp. (JOSHI et al., 2002). A GP63 é capaz de evadir da lise mediada pelo complemento por inativar a proteína C3b (BRITTINGHAM; MORRISON, 1995); degrada componentes da matriz extracelular, facilitando a migração de promastigotas no hospedeiro (MCGWIRE; CHANG; ENGMAN, 2003); modula a sinalização e funções microbicidas dos macrófagos ao clivar importantes proteínas regulatórias a favor da sobrevivência dos parasitos (OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005); neutraliza a proteína 8

de membrana associada à vesícula (VAMP8), evadindo da fagocitose associada a LC3 (LAP) (MATTE et al., 2016); reduz a acidificação fagossômica e tem sua atividade como metaloprotease alterada de acordo com a variabilidade intraespecífica de *L. braziliensis* (DA SILVA VIEIRA et al., 2019); e favorece o desenvolvimento da leishmaniose cutânea após coinoculação de *L. amazonensis* e seus exossomos contendo GP63 (DA SILVA LIRA FILHO et al., 2022). Desse modo, GP63 mostra-se como um grande fator que impulsiona a doença desencadeada por *Leishmania* spp e os mecanismos pelos quais o parasito interage e tolera o hospedeiro por meio dessa proteína continua sendo investigado.

### 1.3.2 Lipofosfoglicano (LPG)

A expressão de determinantes de virulência também inclui a família dos fosfoglicanos (PG), que têm em comum a repetição de unidades de fosfodissacarídeo ( $\text{Gal}\beta 1,4\text{Man-PO}_4$ ) (DESCOTEAUX; TURCO, 1999). Dentre os fosfoglicanos, o lipofosfoglicano (LPG) é o principal glicoconjugado de superfície de promastigotas metacíclicas, reduzindo sua expressão na forma amastigota (TURCO; DESCOTEAUX, 1992). O LPG é uma macromolécula composta basicamente por quatro domínios distintos: uma âncora GPI, um núcleo de glicano, uma cadeia linear de PGs e uma “cap” de oligossacarídeo na porção mais externa. A âncora de GPI consiste em 1-*O*-alquil-2-liso-fosfatidilinositol contendo uma cadeia alifática saturada única. O núcleo glicano (“core”) é um heptassacarídeo composto por dois galactopiranosídeos, um galactofuranosídeo, dois manosídeos e um resíduo de glucosamina ligado ao inositol. Este núcleo glicano está ligado a um PG linear que contém de 15-40 unidades repetidas de fosfodissacarídeos e, mais externamente, a estrutura do LPG contém di-, tri- ou tetrassacarídeos formados por galactose e manose montados da seguinte forma:  $\text{Man}\alpha 1, 2\text{Man}\alpha 1$  ou  $\text{Gal}\beta 1, 4$  (Fig. 7) (FORESTIER; GAO; BOONS, 2014; TURCO; DESCOTEAUX, 1992).



**Figura 7** - Estrutura do lipofosfoglicano em *Leishmania dovonani*

**Fonte:** ( adaptado de FRANCO; BEVERLEY; ZAMBONI, 2012)

Sobre o papel do LPG no hospedeiro invertebrado, estudo mostra que esta molécula protege as promastigotas das enzimas digestivas do flebotomíneo e permite a adesão dos parasitos na parede do intestino médio, evitando sua excreção (SACKS et al., 2000). Além disso, o LPG sofre alteração durante a metaciclogênese impedindo a aderência do parasito no intestino e preparando-os para a inoculação no mamífero (SACKS, 2001). Já no hospedeiro vertebrado, o LPG desempenha papéis importantes logo no início da interação parasito-hospedeiro, já que, protege as promastigotas contra lise pelo sistema complemento, promove fixação com a célula hospedeira, inibe a maturação do fagossomo, protege contra enzimas lisossomais, inibe iNOS, protege contra a ação de ROS e inibe a síntese de citocinas (FRANCO; BEVERLEY; ZAMBONI, 2012). Mais recentemente, mostrou-se que o LPG de diferentes cepas de *L. braziliensis* reduziu o recrutamento fagossômico via proteína 1 de membrana associada a lisossomos (LAMP-1) (DA SILVA VIEIRA et al., 2019); inibiu a acidificação do vacúolo parasitóforo (PV) de monócitos inflamatórios infectados por *L. donovani* (MATTE et al., 2021); e que o LPG purificado modulou resposta inflamatória ao induzir a sinalização PPAR- $\gamma$  via TLR1/2 (LIMA et al., 2017).

Outra abordagem que levou a uma melhor compreensão das funções do LPG na interação parasito-hospedeiro foi a geração de parasitos nocaute para os genes específicos que codificam enzimas envolvidas na síntese deste glicoconjugado (JESUS-SANTOS et al., 2020; LÁZARO-SOUZA et al., 2018). Assim, estudos que utilizaram parasitos nocaute mostraram que o LPG não é um fator determinante na retenção de *L. infantum* no intestino médio do flebotomíneo, portanto, não define a competência vetorial em *Lutzomyia longipalpis* (COUTINHO-ABREU

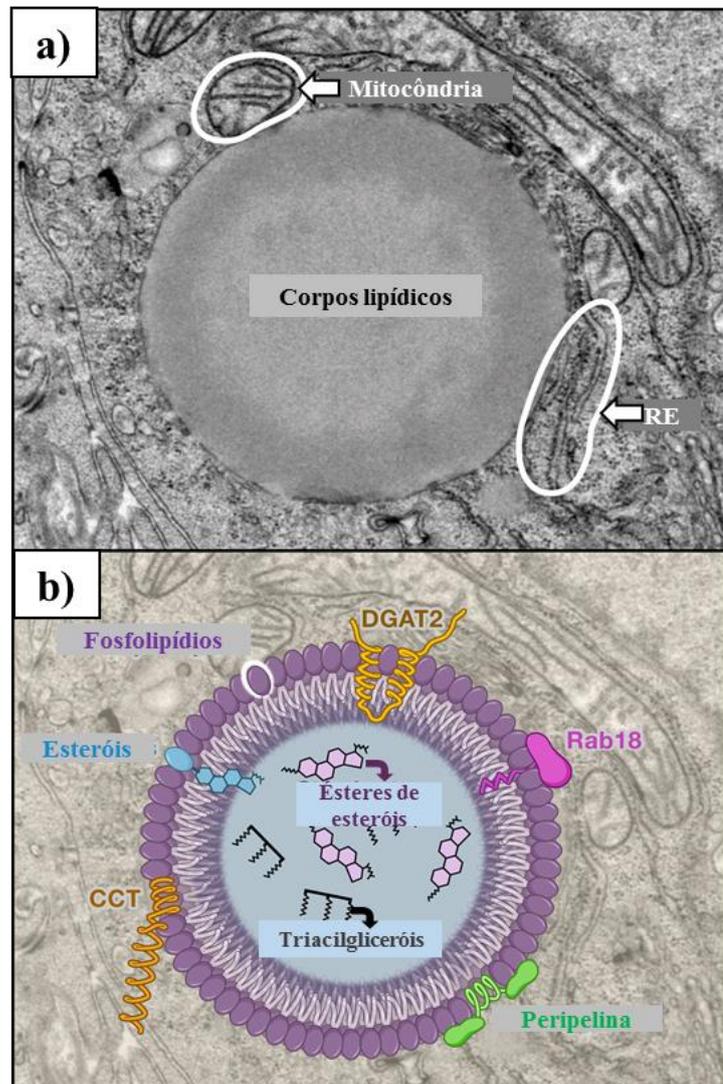
IV, ORISTIAN J et al., 2020). Além disso, a deficiência de LPG em *L. infantum* afetou a sobrevivência do patógeno em macrófagos, ao passo que induziu fortemente a expressão de iNOS e NF- $\kappa$ B (Lázaro-Souza et al., 2018). Como esperado, a mutação também aumentou os processos de fusão lisossomal, secreção de metaloproteinase-8 (MMP-8), degradação da matriz de colágeno tipo I e espécies reativas de oxigênio (ROS), com consequente redução da viabilidade de *L. infantum* mutante em neutrófilos humanos (QUINTELA-CARVALHO et al., 2022). Esses estudos reforçam a importância do LPG como um determinante de virulência nas interações patógeno-hospedeiro. Contudo, outras biomoléculas também estão associadas à virulência do patógeno, como por exemplo, os mediadores lipídicos que são produzidos por corpúsculos lipídicos (TAVARES et al., 2021). Essas organelas especializadas no metabolismo de lipídios, têm sido descritas em *Leishmania* e vem direcionando investigações no contexto da relação patógeno-hospedeiro (TAVARES et al., 2021).

#### 1.4 CORPÚSCULOS E MEDIADORES LIPÍDICOS NA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA*

Os lipídios representam uma classe importante e altamente diversificada de biomoléculas insolúveis, que atuam tanto na fisiologia quanto na fisiopatologia dos sistemas vivos (VAN MEER; VOELKER; FEIGENSON, 2008). Essas biomoléculas funcionam como componentes estruturais de membranas (fosfolipídios e colesterol), moléculas armazenadoras de energia (ácidos graxos) e moléculas sinalizadoras (eicosanoides, resolvinas) durante processos infecciosos e inflamatórios (BOSCH et al., 2021; BOZZA et al., 2011; VAN MEER; VOELKER; FEIGENSON, 2008). Na célula, os principais locais de armazenamento de lipídios são os corpúsculos lipídicos ou corpos lipídicos (CLs) (do inglês *lipid droplet*), organelas que podem ser encontradas em praticamente todos os tipos de células, de procariontes a eucariotos multicelulares (BOZZA; MAGALHÃES; WELLER, 2009).

Para além do armazenamento lipídico, os CLs são organelas complexas e dinâmicas envolvidas na homeostase energética e lipídica, biossíntese de membrana, sinalização celular e manipulação de vitaminas hidrofóbicas e proteção celular à lipotoxicidade (OLZMANN; CARVALHO, 2019; PEREIRA-DUTRA et al., 2019). Estruturalmente, os CLs são derivados do retículo endoplasmático (RE), armazenam lipídios neutros (triacilglicerol, diacilglicerol e éster de colesterol) que são protegidos por uma monocamada de fosfolipídios associados a proteínas específicas (Fig. 8) (BOZZA; MAGALHÃES; WELLER, 2009; FARESE; WALTHER, 2009; WILFLING et al., 2013). As principais proteínas estruturais presentes na superfície dos CLs são as proteínas perilipina (PLIN-1), acil CoA:diacilglicerol aciltransferases

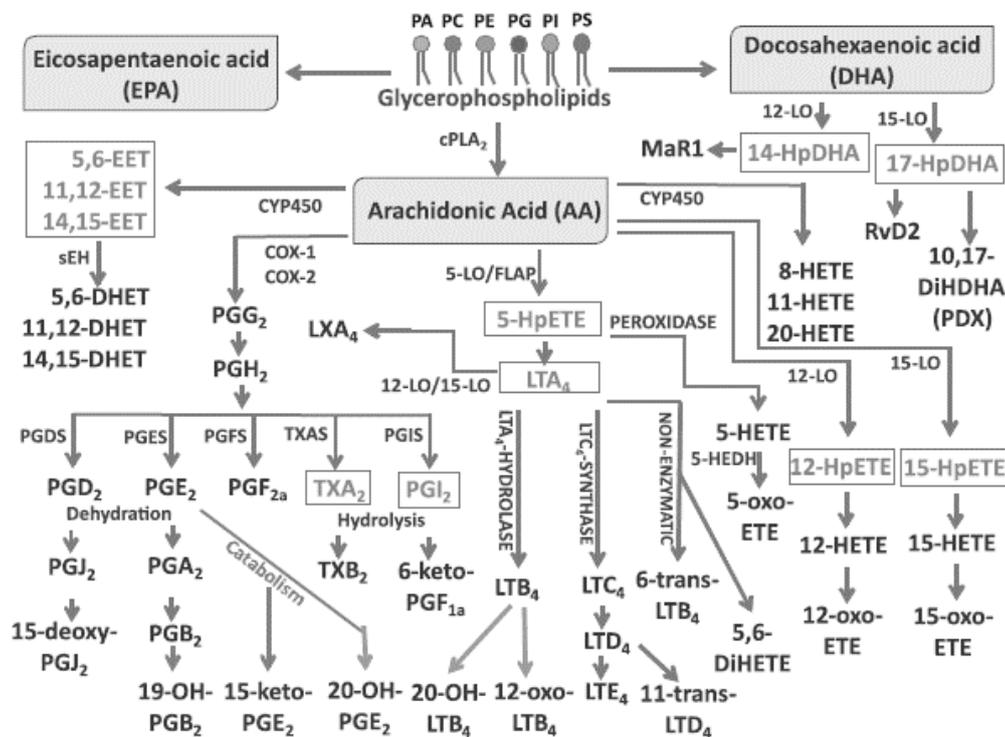
(DGAT), guanosina trifosfatase Rab (Rab18), a enzima limitante da taxa de síntese de fosfatidilcolina CTP:fosfocolina citidililtransferase (CCT), dentre outras proteínas como a proteína relacionada à diferenciação adiposa (ADRP) e a proteína que interage com cauda de 47 kDa (TIP 47). Tais proteínas desempenham papel na montagem e biogênese do CL (BOZZA; MAGALHÃES; WELLER, 2009; MIURA et al., 2002).



**Figura 8** - Estrutura de corpos lipídicos. a) Micrografia eletrônica de um corpo lipídico em uma célula de hepatoma cultivada. A monocamada da membrana que o envolve é visível, assim como associações próximas com mitocôndrias e membranas do RE. São mostrados os lipídios de superfície da monocamada (por exemplo, fosfolipídios e esteróis), os lipídios do núcleo (por exemplo, ésteres de esteróis e triacilgliceróis), e uma variedade de proteínas na superfície do corpúsculo. Essas proteínas incluem DGAT2, Rab18, perilipina e CCT (CTP:fosfocolina citidililtransferase; a enzima limitante da velocidade na síntese de fosfatidilcolina). Vários mecanismos hipotéticos de como as proteínas interagem com o corpo lipídico são mostrados, incluindo hélices  $\alpha$  anfipáticas, incorporação de regiões hidrofóbicas diretamente na gota e âncoras lipídicas.

**Fonte:** adaptado de (FARESE; WALTHER, 2009).

Os CLs compartimentam o substrato e toda a maquinaria enzimática para a síntese de mediadores lipídicos, como os eicosanoides. Estes são biomoléculas derivadas da oxidação do ácido araquidônico (AA) e controlam vários processos celulares como homeostase tecidual, defesa do hospedeiro, inflamação, câncer (BOZZA et al., 2011; MELO et al., 2016). A síntese de eicosanoides, tais como prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (LTs), é iniciada pela ação da superfamília de enzimas conhecidas como enzima fosfolipase (PL)A<sub>2</sub>, que libera ácidos graxos a partir da hidrólise de fosfolipídios (GUIJAS et al., 2014). Especificamente, as fosfolipases citosólicas (cPLA<sub>2</sub>) tem papel central na mobilização de AA. As moléculas de AA são acumulados em um corpúsculo lipídico por proteínas de membrana presente nessas organelas, como as perilipinas (PLIN-1), as quais medeiam a formação de CLs (BOZZA et al., 2011). Em seguida, a oxidação de AA livre pode ocorrer devido ação de ciclooxigenase (COX) para formar PGH<sub>2</sub> que pode ser metabolizada por endoperoxidases em diferentes prostaglandinas, ou ainda, pelas enzimas lipoxigenases (LOX), sendo a 5-lipoxigenase (5-LO) em associação com a proteína ativadora da 5-LO (FLAP) responsáveis pela produção de LTA<sub>4</sub>, o qual é metabolizado pela ação da LTA<sub>4</sub> hidrolase em LTB<sub>4</sub> ou pela ação da LTC<sub>4</sub> sintase em LTC<sub>4</sub> (Fig. 9) (BOZZA; MAGALHÃES; WELLER, 2009; PEREIRA-DUTRA et al., 2019).



**Figura 9** - Esquema dos mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico (AA) via lipoxigenases (LOX), ciclooxigenases (COX) e proteína semelhante ao citocromo P450 (CYP450).

Fonte: adaptado de (SORGI et al., 2018).

A participação de CLs na patogênese de doenças infecciosas têm sido descrita em diferentes classes de patógenos: bactérias (ALLEN; MARTINEZ, 2020), vírus (DA SILVA GOMES DIAS et al., 2020), fungos (NOLAN et al., 2017) e protozoários (TAVARES et al., 2021). Assim, a formação de CLs, com conseqüente produção de eicosanoides, integra os mecanismos de defesa de um hospedeiro, já que, (I) ocorre acúmulo de CLs minutos após estimulação inflamatória ou infecciosa (BOZZA et al., 2011; MONSON et al., 2020); (II) o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) levam a formação de CLs (BARLETTA et al., 2016); (III) CLs recrutam muitas proteínas antimicrobianas na ativação celular (BOSCH et al., 2020), etc. Além disso, os CLs podem fazer parte dos processos de adaptação de patógenos para escapar da imunidade do hospedeiro e servir como fontes de energia para patógenos intracelulares (PEREIRA-DUTRA et al., 2019). Estas observações demonstram a participação de CLs /mediadores lipídicos na imunidade inata e adaptativa do hospedeiro, modulando a resposta à diferentes infecções.

No contexto da infecção por *Leishmania*, os mediadores podem exercer papéis antagonicos. Um estudo, demonstrou que aumento de PGE<sub>2</sub> induzida pela saliva do inseto vetor é importante para o estabelecimento da infecção (ARAÚJO-SANTOS et al., 2014a). Além disso, a morte intracelular de *L. amazonensis* foi induzida pelo aumento de produção de LTB<sub>4</sub> em macrófagos e neutrófilos infectados (SEREZANI et al., 2006; TAVARES et al., 2014), assim como a superexpressão de PGF<sub>2α</sub> sintase (PGF2S) em *L. braziliensis* leva ao aumento da infectividade *in vitro* (ALVES-FERREIRA et al., 2020) e piora a evolução da leishmaniose tegumentar em pacientes com diabetes pela produção desequilibrada de LTB<sub>4</sub>/PGE<sub>2</sub> (BONYEK-SILVA et al., 2020). Outros mediadores lipídicos, como as resolvinas, são responsáveis pela resolução da inflamação e homeostase tecidual (SERHAN; LEVY, 2018). Neste sentido, pacientes com LCD apresentam maiores níveis plasmáticos de resolvina D1 (RvD1) quando comparados com pacientes acometidos pela LCL (MALTA-SANTOS et al., 2017) e uma bioassinatura de mediadores lipídicos derivados do plasma previram com precisão a falha do tratamento leishmanicida em pacientes com LC (MALTA-SANTOS et al., 2020a).

## 1.5 CORPÚSCULOS LIPÍDICOS E SÍNTESE DE EICOSANOIDES EM *LEISHMANIA*

CLs são comumente observadas em protozoários, incluindo os gêneros *Plasmodium*, *Trypanosoma* e *Leishmania* (Tabela 1) (TAVARES et al., 2021) e, por isso, uma variedade de mediadores lipídicos e seus precursores têm sido descritos na literatura como sendo produzidos por estes parasitos (Tabela 2) (TAVARES et al., 2021).

**Tabela 1** - Funções e composição presumível de gotículas lipídicas nos protozoários

Species	Roles of LD	Components	References
<i>Leishmania infantum</i>	Virulence Eicosanoid metabolism Lipid traffic and organelle membrane interactions	Prostaglandin F <sub>2</sub> $\alpha$ synthase, and Arachidonic Acid*	Araújo-Santos et al. <sup>(27)</sup>
<i>Leishmania amazonensis</i>	Increase during cell death induced by oxidative stress	Undetermined	da Silva Rodrigues et al. <sup>(19)</sup>
<i>Toxoplasma gondii</i>	Cholesterol, DAG, and TAG metabolism Storage of neutral lipids	Cholesterol, TAG, and DAG molecules TgACAT1, TgACAT2, TgDGAT, and Tglipin enzymes <sup>#</sup>	Quittnat et al. <sup>(10)</sup> Nishikaea et al. <sup>(11)</sup> Lige et al. <sup>(12)</sup>
<i>Trypanosoma brucei</i>	Growth and differentiation TAG and phospholipids metabolism	TAG; Phospholipids; LDK; TbLpn enzyme <sup>#</sup>	Flaslohper et al. <sup>(6)</sup> Dawoody et al. <sup>(17)</sup>
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Lipid traffic, storage, and metabolism Organelle communications Eicosanoid production	Neutral lipids, sterols, cholesterol, cholesteryl esters, acylglycerols, phospholipids, fatty acids, arachidonic acid, and PGE <sub>2</sub>	Toledo et al. <sup>(24)</sup> Pereira et al. <sup>(15)</sup>
<i>Plasmodium falciparum</i>	Replication and membrane generation of the parasites Heme detoxification effects Induces $\beta$ -hematin formation in the digestive vesicles.	Neutral lipids and PfdGAT enzyme <sup>#</sup>	Vielemeyer et al. <sup>(9)</sup> Jackson et al. <sup>(30)</sup> Ambele et al. <sup>(32)</sup>

\*: localisation in lipid droplets was not demonstrated; #: localisation in endoplasmic reticulum. Enzymes involved in the biogenesis of lipid droplets; TAG: triacylglycerol; Tg: *Toxoplasma gondii*; Pf: *Plasmodium falciparum*; ACAT: Acyl-CoA cholesterol acyltransferase; DGAT: Diacyl-CoA:cholesterol acyltransferase; LDK: lipid droplet kinase; COX: cyclooxygenase; PGFS: prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  synthase; PGE<sub>2</sub>: prostaglandin E<sub>2</sub>; TbLpn: *Trypanosoma brucei* Lipin.

**Fonte:** (TAVARES, et al., 2021, p. 4)

**Tabela 2** - Mediadores lipídicos, precursores e suas enzimas de metabolismo identificadas em patógenos protozoários

Species	Lipid mediators and precursors	Proteins	References
<i>Leishmania</i> sp.	<b>Linoneic acid-derived metabolites</b> (9,10-DiHOME, 9,10-DiHODE, 15,16-DiHODE, 9-HODE, 10-HODE, 12-HODE, 13-HODE, 15-HODE, 5(S)-HETrE, 8(S)-HETrE, 12(S)-HETrE, 15(S)-HETrE)		
	<b>Arachidonic acid-derived metabolites</b> (5-HETE, 8-HETE, 11-HETE, 12-HETE, 15-HETE, 18-HETE, 8(9)-EpETrE, PGE <sub>2</sub> , PGD <sub>2</sub> , PGF <sub>2α</sub> )	PLA <sub>2</sub> /PAF-AH, PGFS, COX-like enzyme, CYP1, CYP2, CYP3	Araújo-Santos et al. <sup>(27)</sup> Azevedo et al. <sup>(33)</sup> Alves-Ferreira et al. <sup>(57)</sup> Pawlowic et al. <sup>(58)</sup> Estrada-Figueroa et al. <sup>(47)</sup> Kabutu et al. <sup>(49)</sup> Paloque et al. <sup>(51)</sup>
	<b>Docosahexaenoic acid-derived metabolites</b> (4-HDoHE, 7-HDoHE, 8-HDoHE, 10-HDoHE, 11-HDoHE, 13-HDoHE, 14-HDoHE, 16-HDoHE, 17-HDoHE, 20-HDoHE)		
	<b>Eicosapentaenoic acid-derived metabolites</b> (7(8)-EpDPE, 10(11)-EpDPE, 13(14)-EpDPE, 16(17)-EpDPE, 19(20)-EpDPE, 10,11-DiHDPE, 13,14-DiHDPE, 16,17-DiHDPE)		
<b>Arachidonic acid-derived metabolites</b> (PGE <sub>2</sub> , PGD <sub>2</sub> , PGF <sub>2α</sub> )	PLA <sub>2</sub> , PGFS		Kubata et al. <sup>(54,55)</sup>
<i>Trypanosoma brucei</i>	<b>Hydroxydocosahexaenoic acid precursors</b> 17-HDHA, 14-HDHA, 7-HDHA, 4-HDHA		
<i>Trypanosoma cruzi</i>	<b>Arachidonic acid-derived metabolites</b> (PGE <sub>2</sub> , PGD <sub>2</sub> , PGF <sub>2α</sub> , TXA <sub>2</sub> , 5-HETE, 12-HETE, 15-HETE, 5S,15S-DiHETE, 5-HEPE, 12-HEPE, 15-HEPE, 18-HEPE, 5S,15S-DiHEPE, TXA <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub> , PGD <sub>2</sub> , PGF <sub>2α</sub> )	PGFS, PGES, TcTP, PLA <sub>2</sub> , TXA <sub>2</sub> S	Toledo et al. <sup>(24)</sup> Colas et al. <sup>(48)</sup> Okamoto et al. <sup>(50)</sup> Murkherjee et al. <sup>(53)</sup> Kubata et al. <sup>(55,56)</sup>
	<b>Docosahexaenoic acid-derived metabolites</b> (RvD1, RvD5)		
	<b>Eicosapentaenoic acid-derived metabolites</b> (RvE2)		
<i>Toxoplasma gondii</i> <i>Plasmodium falciparum</i> <i>Trypanosoma congolense</i>	Not determined	PLA <sub>2</sub>	Kubata et al. <sup>(55)</sup>

DiHOME: dihydroxyoctadecaenoic acid; DiHODE: dihydroxyoctadecadienoic acid; HODE: hydroxyoctadecadienoic acid; HETrE: hydroxyeicosatrienoic acid; HETE: hydroxyeicosatetraenoic acid; DiHETE: hydroxyeicosatetraenoic acid; EpETrE: epoxyeicosatrienoic acid; HDoHE: hydroxydocosahexaenoic acid; EpDPE: epoxydocosapentaenoic acid; DiHDPE: dihydroxydocosapentaenoic acid; PG: prostaglandin; TX: thromboxane; HDHA: hydroxydocosahexaenoic acid; HEPE: hydroxyeicosapentaenoic acid; DiHEPE: dihydroxyeicosapentaenoic acid; Rv: resolvin; TcTP: *T. cruzi* thromboxane receptor; PLA<sub>2</sub>: phospholipase A<sub>2</sub>; PAF-AH: platelet-activating factor-acetylhydrolase; PGFS: prostaglandin F synthase; PGES: prostaglandin E synthase; TXA<sub>2</sub>S: thromboxane A<sub>2</sub> synthase; CYP: cytochrome P450 enzymes.

**Fonte:** (TAVARES, et al., 2021, p. 5)

Neste contexto, fica evidente que os parasitos possuem uma maquinaria necessária para síntese de mediadores lipídicos, como por exemplo, PG sintases em *L. infantum* (ARAÚJO-SANTOS et al., 2014b). Além disso, foi observado que a proteína GP63 de *L. mexicana* tem atividade de COX, enfatizando a capacidade de produção de eicosanoides pelo parasito (DÍAZ-GANDARILLA et al., 2018).

Ainda é pouco explorado a participação desses lipídios bioativos produzidos pelo parasita durante uma infecção, no entanto, foi demonstrado que  $\text{PGF}_{2\alpha}$  aumentou a viabilidade parasitária nos momentos iniciais de infecção (ARAÚJO-SANTOS et al., 2014b), ao passo que resolvina D1 (RvD1), sintetizados por *T. cruzi*, contribuiu para resolução do processo inflamatório (COLAS, 2018) e tromboxano  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ), também derivado de *T. cruzi*, controlou a proliferação e parasitemia *in vivo* (ASHTON et al., 2007). Além disso, foi demonstrado que *T. cruzi* expressa receptor para  $\text{TXA}_2$  localizado principalmente na membrana flagelar dos parasitos, com padrão de glicosilação similar aos receptores de plaquetas humanas (MUKHERJEE et al., 2013). Proteína semelhante ao citocromo P450 (CYP450) é uma outra via de produção de mediadores lipídicos e foi recentemente descrita no genoma de *L. infantum* como CYP1, CYP2 e CYP3 (PALOQUE et al., 2019). Esta via produz metabólitos que promovem a polarização de macrófagos M2 pró-resolutivos, contribuindo para a sobrevivência de *L. infantum* na célula hospedeira. Embora o conhecimento sobre o metabolismo de lipídios bioativos, assim como os mecanismos envolvendo CLs seja crescente, um estudo envolvendo diferentes espécies de *Leishmania* não foi conduzido.

## 2 JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por protozoários de gênero *Leishmania*, transmitidas por insetos flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*. De modo geral, essas infecções têm diferentes manifestações clínicas: a forma tegumentar, que atinge pele e mucosas e a forma visceral que acomete órgãos internos. Além disso, as diferentes formas clínicas da doença apresentam agentes etiológicos específicos. Entretanto, ainda é pouco explorado quais diferenças nesses agentes são responsáveis pelas variações clínicas observadas. Diante disso, a busca pelo conhecimento dos aspectos biológicos, inerentes ao parasito e ao hospedeiro, é crucial para compreensão desta complexa relação. Neste contexto, os corpúsculos lipídicos são organelas centrais na síntese de mediadores lipídicos, tais como os eicosanoides, que desempenham papel importante na resposta imune do hospedeiro mamífero (BOZZA et al., 2011) e estão possivelmente associados à virulência parasitária (ARAÚJO-SANTOS et al., 2014b).

Desse modo, este projeto buscou investigar possíveis aspectos relacionados aos agentes etiológicos das diferentes formas clínicas da leishmaniose, identificando os potenciais mediadores lipídicos sintetizados pelo parasito ainda não descritos em estudos, assim como, avaliou o perfil de eicosanoides produzidos durante a fase crônica da leishmaniose visceral em modelo experimental *in vivo* utilizando hamsters, que são roedores altamente suscetíveis à infecção por espécies visceralizantes. Assim, a caracterização do perfil de mediadores lipídicos produzidos tanto no parasito quanto no hospedeiro permitirá a identificação de biomarcadores e concepção de novas abordagens terapêuticas.

## 3 PARTE I

### 3.1 HIPÓTESE

A biogênese de corpúsculos lipídicos e síntese de mediadores lipídicos ocorrem diferentemente entre espécies de *Leishmania* do Novo Mundo e está relacionado com a manifestação clínica da doença.

### 3.2 OBJETIVOS

#### 3.2.1 Objetivo geral

Avaliar metabolismo e a formação de mediadores lipídicos em espécies de *Leishmania* associadas às diferentes apresentações clínicas da leishmaniose.

#### 3.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a biogênese de corpúsculos lipídicos em promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*;
- Avaliar a modulação da formação de corpúsculos lipídicos em *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*;
- Avaliar enzimas do metabolismo de eicosanoides entre diferentes espécies de *Leishmania* do Velho e Novo Mundo;
- Avaliar a expressão de enzimas do metabolismo de eicosanoides em promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*;
- Verificar a presença de precursores de mediadores lipídicos e eicosanoides em *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*.

## 3.3 MANUSCRITO I

**Polyunsaturated fatty acids alter the formation of lipid droplets and eicosanoid production in *Leishmania*.**

Yasmin Monara Ferreira de Sousa Andrade<sup>1,3</sup>, Monara Viera de Castro<sup>2</sup>, Victor de Souza Tavares<sup>2</sup>, Rayane da Silva Oliveira Souza<sup>2</sup>, Lúcia Helena Faccioli<sup>4</sup>, Jonilson Berlink Lima<sup>1,2,3</sup>, Carlos Arterio Sorgi<sup>5</sup>, Valéria de Matos Borges<sup>1,3</sup>, Théo Araújo-Santos<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brasil

<sup>2</sup> Núcleo de Estudos de Agentes Infecciosos e Vetores, Centro das Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Oeste da Bahia, Barreiras, Bahia, Brasil

<sup>3</sup> Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Bahia, Brasil

<sup>4</sup> Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

<sup>5</sup> Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

\*Corresponding author:

Théo Araújo-Santos, Ph.D.

Address: Laboratório de Agentes Infecciosos e Vetores, Centro das Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Oeste da Bahia - Campus Reitor Edgard Santos, Rua da Prainha, 1326, Morada Nobre, Barreiras – Ba.

zip code: 47810-047.

e-mail: theo.santos@ufob.edu.br

**Abstract**

*Leishmania* parasites present lipid droplets (LD, or lipid bodies) and the molecular machinery responsible for synthesizing prostaglandins (PGs) and other bioactive lipids. We studied the effects of polyunsaturated fatty acids (PUFA) on LD biogenesis and eicosanoid production in distinct *Leishmania* species associated with different clinical forms of leishmaniasis. We also compared structural models of human-like cyclooxygenase-2 (GP63) and prostaglandin F synthase (PGFS) proteins of *Leishmania*, and we evaluated their enzymatic expression in logarithmic and stationary growth phases of procyclic *L. amazonensis*, *L. braziliensis* and *L. infantum*. PUFAs modulate the formation of LDs in *L. braziliensis* and *L. infantum*. Similar protein structures identified in *Leishmania* result in comparable tropism and clinical disease manifestations. No differences in GP63 expression were observed among *L. amazonensis*, *L. braziliensis* and *L. infantum*, however increased PGFS expression was detected during the parasite differentiation. Stimulation with arachidonic acid resulted in highly elevated production of hydroxyeicosatetraenoic acids compared to prostaglandins quantified by LC-MS/MS. The present findings open new perspectives on the role of eicosanoid metabolism in *Leishmania* and could contribute to the development of novel antiparasitic drugs.

**Keywords:** lipid droplet, lipid bodies, eicosanoid metabolism enzyme, polyunsaturated fatty acids, eicosanoid, *Leishmania*.

## INTRODUCTION

Lipid mediators are bioactive molecules derived from the metabolism of polyunsaturated fatty acids (PUFA) (Jordan and Werz, 2021). The most common lipid mediator precursors are derived from arachidonic (AA), eicosapentanoic (EPA), and docosahexaenoic (DHA) acids. (Jordan and Werz, 2021). Trypanosomatids, including *Leishmania*, can metabolize AA to eicosanoids by way of specific enzymes, such as cyclooxygenase (COX) and prostaglandin synthases (PG synthases) (Estrada-Figueroa et al., 2018; Kubata et al., 2007; Tavares et al., 2021). In addition, specialized lipid mediators are also identified in *Trypanosoma cruzi* (Colas, 2018; Paloque et al., 2019a; Tavares et al., 2021).

Lipid mediators are produced in the cytosol and in organelles termed lipid droplets (LD, lipid bodies) (Araújo-Santos et al., 2014; Bozza et al., 2011; de Almeida et al., 2018; Toledo et al., 2016), which are present in almost all organisms, including in trypanosomatid protozoa (Araújo-Santos et al., 2014; Olzmann and Carvalho, 2019; Onal et al., 2017; Tavares et al., 2021; Toledo et al., 2016). LDs are active sites for eicosanoid metabolism (Araújo-Santos et al., 2014; Bozza et al., 2011). Although protozoan parasites are known to produce a variety of specialized lipid mediators, studies investigating the role of these mediators in parasite biology and host-parasite interaction remain scarce.

Parasites possess the necessary machinery to synthesize lipid mediators (Kubata et al., 2007). *Leishmania* can metabolize AA to prostaglandins using PG synthases present in LDs (Araújo-Santos et al., 2014). Recently, the glycoprotein of 63 kDa (GP63) was described as a cox-like enzyme responsible to convert AA to prostaglandin in *L. mexicana* (Estrada-Figueroa et al., 2018). In addition to COX, trypanosomatids contain enzymes capable of synthesizing other eicosanoids, such as PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub> $\alpha$ . Both *T. cruzi* trypomastigotes and *L. infantum* respond to exogenous AA stimulation by producing prostaglandins (Araújo-Santos et al., 2014; Toledo et al., 2016). However, the presence of AA was not shown to alter PGF<sub>2</sub> $\alpha$  synthase (PGFS) production in *L. infantum* (Araújo-Santos et al., 2014). *L. infantum* LDs are capable of synthesizing PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , a mediator responsible for increasing parasite viability in the initial moments of infection via an as yet unknown mechanism (Araújo-Santos et al., 2014). *L. braziliensis* promastigotes and amastigotes also express PGFS, which may improve parasites fitness (Alves-Ferreira et al., 2020).

*Trypanosoma cruzi* trypomastigotes synthesize RvD1, RvE2 and RvD5, lipid mediators involved in the resolution of the inflammatory process (Colas, 2018). However, the role played by these mediators in the course of infection remains to be clarified. On the other hand, *T. cruzi*

can synthesize and release thromboxane A<sub>2</sub>, which may exacerbate infection (Ashton et al., 2007). Although the presence of a thromboxane receptor has been demonstrated in *T. cruzi*, its function has not been determined (Mukherjee et al., 2014). Another pathway of lipid mediator production was recently described through the identification of proteins (CYP1, CYP2 and CYP3) similar to cytochrome P450 (CYP450) in the genome of *L. infantum*, which appear to be responsible for specialized lipid precursors in this parasite species (Paloque et al., 2019b).

Advances have been made in our understanding of the metabolism of bioactive lipids found in parasites, as well as mechanisms involving LDs. Leishmaniasis presents a diversity of clinical forms and symptoms related to specific *Leishmania* species. Herein we compared the formation of LDs and the production of eicosanoids in different New World *Leishmania* species using PUFA precursors as stimulant. Differences were identified in lipid metabolism among the *Leishmania* species investigated, and the enzymes related to eicosanoid production were described.

## METHODS

### Parasites

*Leishmania infantum* (MCAN/BR/89/BA262) promastigotes were maintained for 7–9 days in hemoflagellate culture medium (HO-MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum until reaching stationary phase (Araújo-Santos et al., 2014). For the cultivation of *L. amazonensis* (MHOM/BR/1987/BA125) and *L. braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788), parasites were maintained in Schneider's insect medium supplemented with 20% fetal bovine serum, L-glutamine, 20mM penicillin (100 U/ml) and streptomycin (0.1 mg/ml) at 26°C. Parasites were used throughout the differentiation and division cycle (logarithmic phase), lasting around nine days for *L. infantum* and six days for *L. amazonensis* and *L. braziliensis*.

### Stimulation of *Leishmania*

*Leishmania spp* in logarithmic-phase promastigote cultures were either treated with progressively higher doses of EPA, DHA (3.75, 7.5, 15, 30µM) or AA (15µM), or with ethanol (vehicle), or medium alone (control), for 1h. Next, parasites were fixed in formaldehyde 3.7% v/v and analyzed by light microscopy as described below.

### Lipid droplet staining

Fixed parasites were centrifuged on glass slides at 550 rpm for 10 minutes. Cells were then washed with distilled water and subsequently kept in a 60% isopropanol solution for 5 minutes. Next, the cells were immersed in Oil Red O solution for 5 minutes. The slides were mounted in aqueous medium, and the LDs marked by Oil Red O were quantified in 50 cells per slide using optical microscopy.

### **Parasitic viability**

Following treatment with PUFAs, *Leishmania* promastigotes were placed on 96-well flat-bottom plates in the presence of tetrazole salt (XTT) (ROCHE Applied Science) and incubated at 26°C for 4 hours in the dark. Next, XTT reduction by mitochondrial metabolism was evaluated by quantifying optical density on a plate reader (spectrophotometer) (Varioskan, ThermoScientific) (Fig. S1).

### **Lipid extraction to identify PUFAs and eicosanoids in parasite cell extract**

After stimulation with AA, EPA or DHA, parasites isolated by centrifugation were subjected to hypotonic lysis in a 1:1 solution of deionized water and methanol at 4°C. Culture supernatants were diluted at the same volume ratio in methanol at 4°C. Samples were then stored at -80°C and sent for eicosanoid quantification at CEQIL, the Center of Excellence in Lipid Quantification and Identification (FCFRP-USP), using liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) on a Nexera-TripleTOF® 5600+ Target Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) system (SCIEX, Foster City, California). Next, oxylipid extraction was performed using the SPE (Solid Phase Extraction) method according to a previously described protocol (Sorgi et al., 2018). After lipid extraction, specimens were transferred to autosampler vials, and 10 µL of each sample was injected into the LC-MS/MS system as previously described by Sorgi et al., 2018. Final concentrations of oxylipids in culture extract and supernatants were quantified in accordance with standardized parameters (Sorgi et al., 2018).

### ***In silico* identification of enzymes involved in *Leishmania* eicosanoid metabolism**

At least two enzymes related to the production of lipid mediators have been identified in *Leishmania*: GP63 (human-like COX) (Díaz-gandarilla et al., 2018) and prostaglandin F2α synthase (PGFS) (Araújo-Santos et al., 2014; Kabututu et al., 2003; Tavares et al., 2021). Initially, we performed a search for annotated nucleotide sequences characteristic of GP63 and PGFS using *L. major* as a reference species in GenBank. Using the BLASTn tool, complete

genome sequences were identified and selected in the following species: *L. donovani*, *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. major* and *T. cruzi*. Only coding sequences (CDS) were considered for analysis (Table S1, S2). Multiple alignment of the obtained protein sequences was performed using the Clustal W (Codons) method. The Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA X) program was employed to construct a phylogenetic tree via the Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) using 1000 bootstraps (Kumar et al., 2018).

### **3D modeling of GP63 and PGFS proteins in Old and New World *Leishmania* species**

The Protein Data Bank (PDB) was used to search for *L. major* crystallographic structures in order to identify the structures of the GP63 and PGFS proteins (Berman, 2000); PDB IDs: 1LML for GP63 (Schlagenhauf et al., 1998) e PDB IDs: 4F40 for PGFS (Moen et al., 2015). The prediction of protein structures was then performed in other *L. spp* using the Interactive Threading Assembly Refinement (I-TASSER) bioinformatics method (Zhang, 2015). Using these structures, the PyMOL program was employed to create overlapping models and analyze the active site residues of these enzymes (DeLano, 2002).

### **Western blot**

Parasites in either stationary or logarithmic growth stages were lysed at a concentration of  $2 \times 10^8$ /mL in RIPA solution. Next, the total amount of protein was quantified using the Pierce BCA protein assay (Thermo Scientific). Total proteins were separated by electrophoresis on a 10% polyacrylamide SDS gel and then transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked in Tris saline buffer (TBS) containing 0.1% Tween 20 (TT) plus 5% milk for 1 h, followed by incubation with *L. infantum* anti-PGFS (1:1000) overnight (Araújo-Santos et al., 2014). The primary antibody was then removed, and the membranes were washed five times in TT followed by incubation with the secondary antibody (goat anti-mouse) (SeraCare's KPL Catalog 074-1806) conjugated to peroxidase (1:5000) for 1h. Finally, the membranes were washed 5x again and then incubated with Western Blotting substrate (Thermo Scientific Pierce ECL, Amersham, UK).

### **GP63 immunoassays**

Protein extracts of *Leishmania* in logarithmic and stationary phase were submitted to ELISA to measure GP63 expression. Briefly, 96-well immunoassay plates were sensitized with 30µg of *Leishmania* protein overnight at 4°C. Then, nonspecific binding was blocked with 0.1%

PBS Tween 20 (PBS-T) plus 5% milk for 2 hours. After blocking, the plates were incubated with anti-GP63 (1:50) (Catalog # MA1-81830) and incubated overnight at 4°C. Next, the plates were washed with PBS-T and incubated with the secondary antibody (SeraCare's KPL Catalog 074-1806) conjugated with peroxidase (1:2000) for 1 hour at room temperature. Finally, the plates were incubated with 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) for 30 minutes, after which the reaction was stopped using 3M HCl. Plates were read on a microplate reader (Molecular Devices Spectra Max 340PC) a wavelength of 450nm.

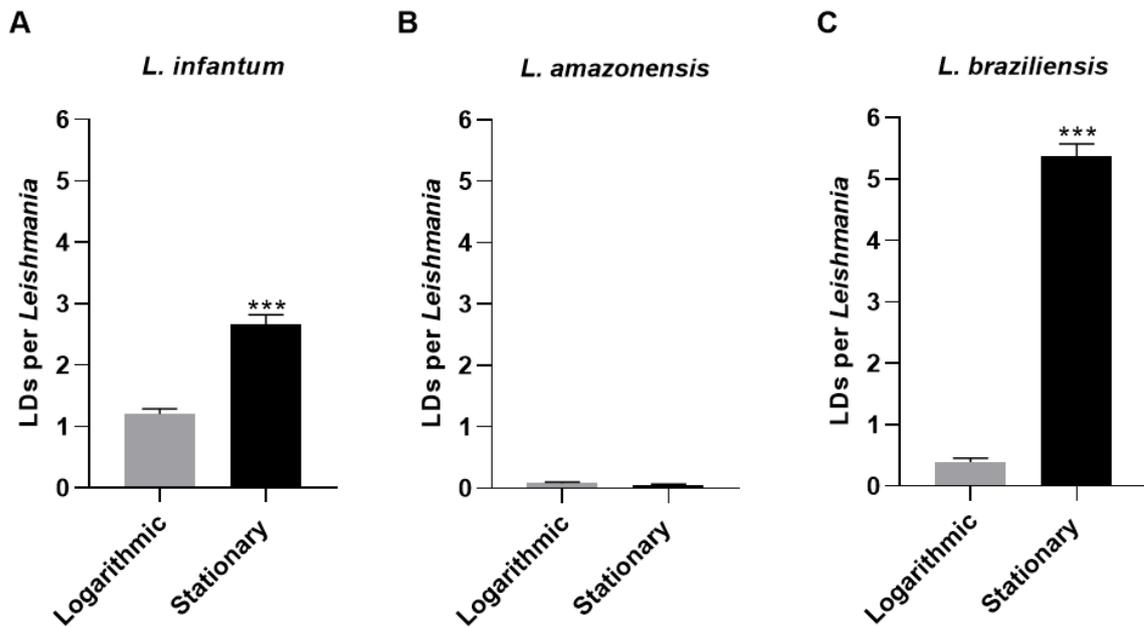
### **Statistical analysis**

Statistical analysis were performed using GraphPad-Prism v8.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA-USA). All obtained data are represented as means  $\pm$  standard error of the mean. Statistical analysis was performed using ANOVA or the Student Newman-Keuls test when comparing two groups, while Kruskal-Wallis was employed for three or more groups, at a significance level of  $p < 0.05$ . All experiments were performed in triplicate.

## **RESULTS**

### **Lipid droplets differ in quantity among *Leishmania* species**

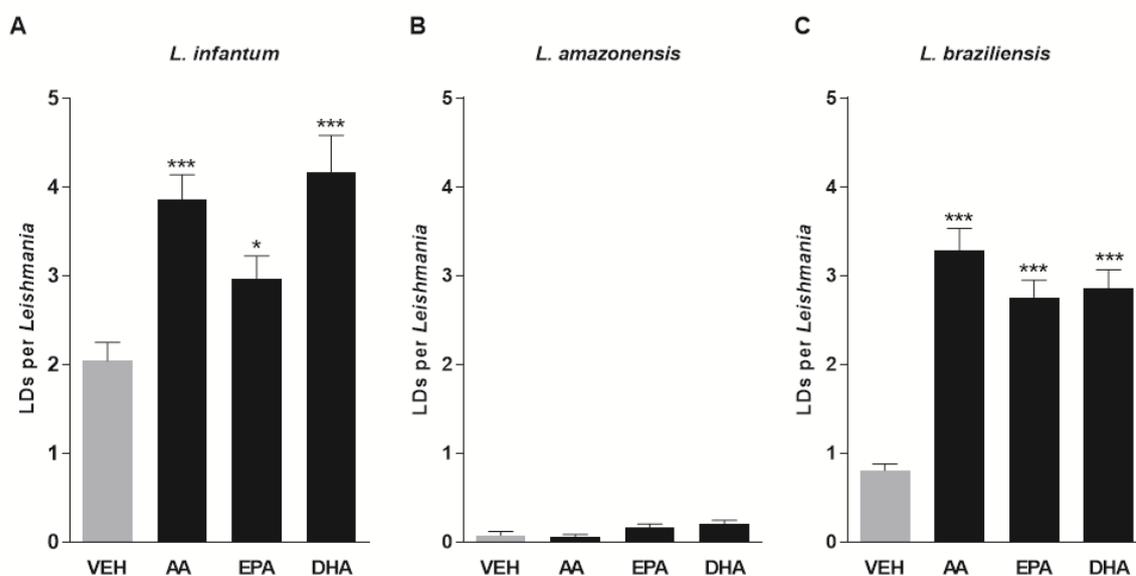
Our previous work demonstrated increasing numbers of LDs as *L. infantum* parasites differentiated into metacyclic forms in vitro (Araújo-Santos et al., 2014). Here, we also found higher numbers of LDs during the differentiation process in axenic cultures of *L. braziliensis* and *L. infantum*, but not in *L. amazonensis* (Fig. 1).



**Figure 1. Lipid droplets in procyclic forms of *Leishmania* spp.** Parasites in logarithmic and stationary growth phases were labeled with Oil Red O to count LDs. Data shown represent the mean  $\pm$  standard error of LDs in (A) *L. infantum*, (B) *L. amazonensis*, and (C) *L. braziliensis*. \*\*\*,  $p < 0.0001$  using student Mann-Whitney test for multiple comparison by pairs.

### PUFA stimulation increases lipid droplet formation in some *Leishmania* spp

LD formation was affected by stimulation with PUFAs; AA induced the formation of LDs in *L. braziliensis* and *L. infantum*, but not in *L. amazonensis* (Fig. 2). LD formation per parasite was found to be dose-dependent with regard to stimulation with EPA and DHA, as a statistically significant linear trend was observed for both *L. braziliensis* and *L. infantum*; however, no effect on LD formation was observed in *L. amazonensis* (Fig. 2 and Fig. S2).

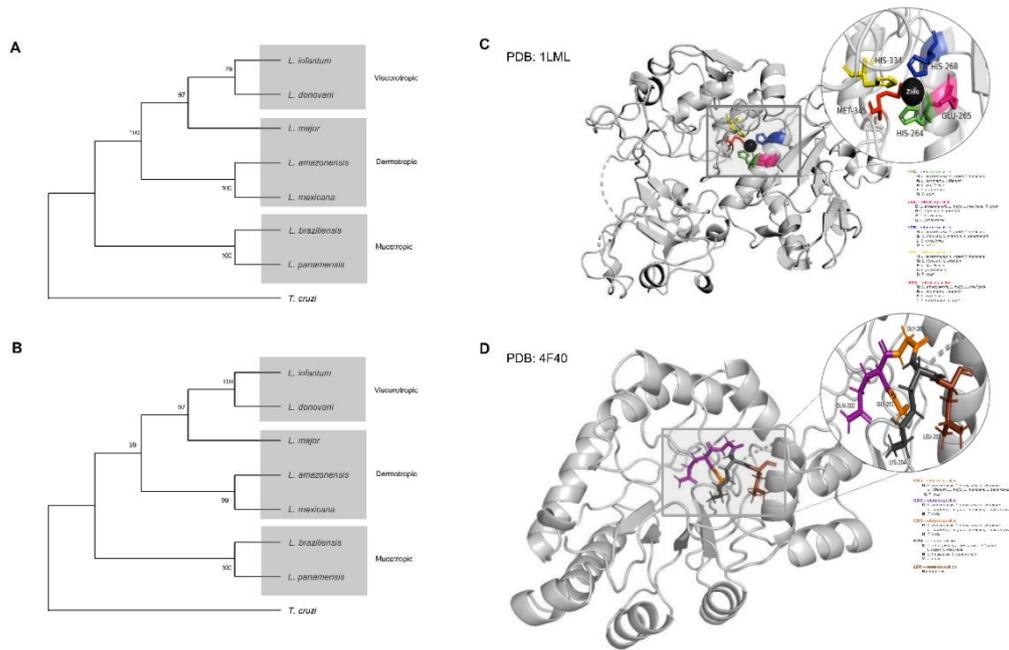


**Figure 2. Polyunsaturated fatty acids increase the formation of lipid droplets in procyclic forms of *Leishmania*.** Logarithmic growth phase promastigotes of (A) *L. infantum* (B) *L. amazonensis* and (C) *L. braziliensis* were stimulated with ethanol (vehicle) or AA (15  $\mu$ M), EPA (30  $\mu$ M) or DHA (30  $\mu$ M) for 1 hour, and then stained with Oil Red O to quantify LDs. Bars represent means  $\pm$  SEM of LDs per parasite. \*\*\* and \* represent  $p < 0.0001$  and  $p < 0.05$ , respectively, for multiple pairwise comparisons between stimuli and the vehicle using the student-Newman-Keuls test. AA: Arachidonic acid; EPA: Eicosapentaenoic acid; DHA: Docosahexaenoic acid.

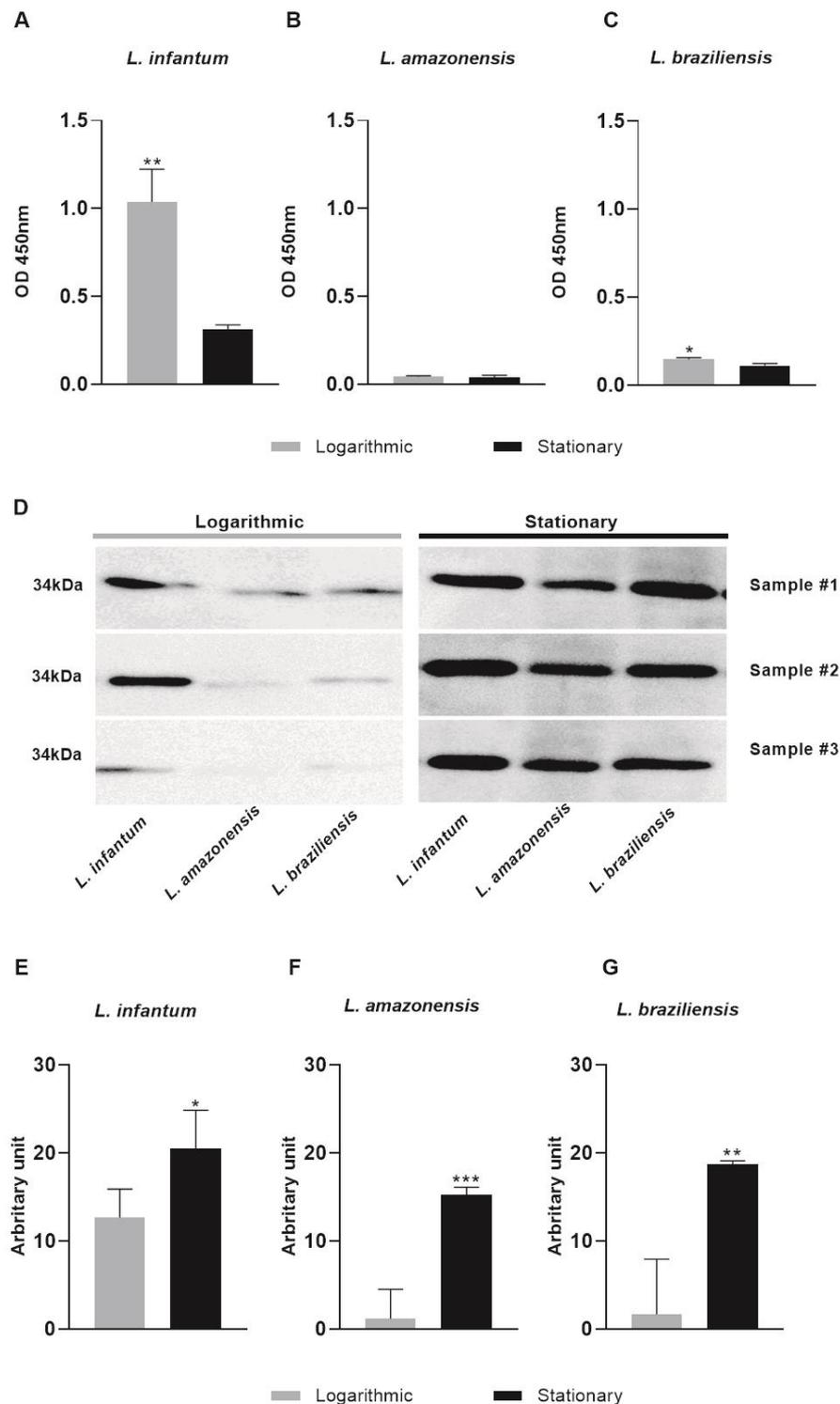
### Comparison of eicosanoid metabolism enzymes in Old and New World *Leishmania* spp.

Proteins associated with eicosanoid metabolism are present in *Leishmania* spp., such as a COX-like enzyme, previously known as GP63, and PGFS (Tavares et al., 2021). We performed a comparison of the primary protein structure sequences in silico (Fig. S3). In addition, the tertiary structures of these reference proteins exhibited high structural similarities across *Leishmania* spp, as well as *T. cruzi* (Figs S4, S5). Alignment and phylogenetic analysis of GP63 and PGFS indicated notable similarity and homology between the Old and New World *Leishmania* spp analyzed with respect to clinical manifestations of disease (viscerotropic, dermatropic or mucotropic; Fig. S3; Figs 3A, B). In addition, nonsynonymous mutations were identified in the amino acid residues at the active sites of GP63 (PDB ID: 1LML) and PGFS (PDB ID: 4F40). The residues H264, E265, H268, H334 and M345 at the active site of protein GP63 were conserved among *Leishmania* spp with regard to the etiology of clinical manifestations (Fig. 3C). Similarly, residues G201, Q202, G203, K204 and L205 at the active site of PGFS were also conserved according to *Leishmania* spp in accordance with tropism and disease manifestation (Fig. 3D). We then compared the gene expression of these two enzymes

involved in the production of eicosanoids in different *Leishmania* species. GP63 was more expressed in log-stage *L. infantum* and *L. braziliensis* parasites, but not in *L. amazonensis* (Fig. 4A-C). In addition, PGFS was more expressed in stationary parasites compared to log-stage procyclic forms in all three species of *Leishmania* (Fig. 4D-G).



**Figure 3. Homology of GP63 and PGFS proteins across different *Leishmania* spp.** GP63 and PGFS genes were identified in the reference genomes of etiologic pathogens related to human leishmaniasis. Phylogenetic trees of (A) GP63 and (B) PGFS were constructed using the UPGMA method (MEGA X software), considering 1000 bootstraps. Residues at the active sites of (C) GP63 and (D) PGFS proteins are highlighted by colors depicted in three-dimensional structures. Non-synonymous mutations among *Leishmania* spp. are listed.



**Figure 4. GP63 and PGFS protein expression in logarithmic and stationary axenic stages of *Leishmania* spp.** Parasites in logarithmic and stationary growth phases were lysed to measure GP63 protein expression in (A) *L. infantum*, (B) *L. amazonensis*, (C) *L. braziliensis* by immunoassay. Total protein (30 $\mu$ g) was incubated with anti-PGFS (1:500) for Western blot analysis. (D) Immunoblot comparing the abundance of PGFS in logarithmic and stationary stages incubated with anti-PGFS (1:1000) in (E) *L. infantum*, (F) *L. amazonensis*, (G) *L. braziliensis*. \*  $p < 0.05$  for multiple pairwise comparisons between stimuli and the vehicle using the student-Newman-Keuls test.

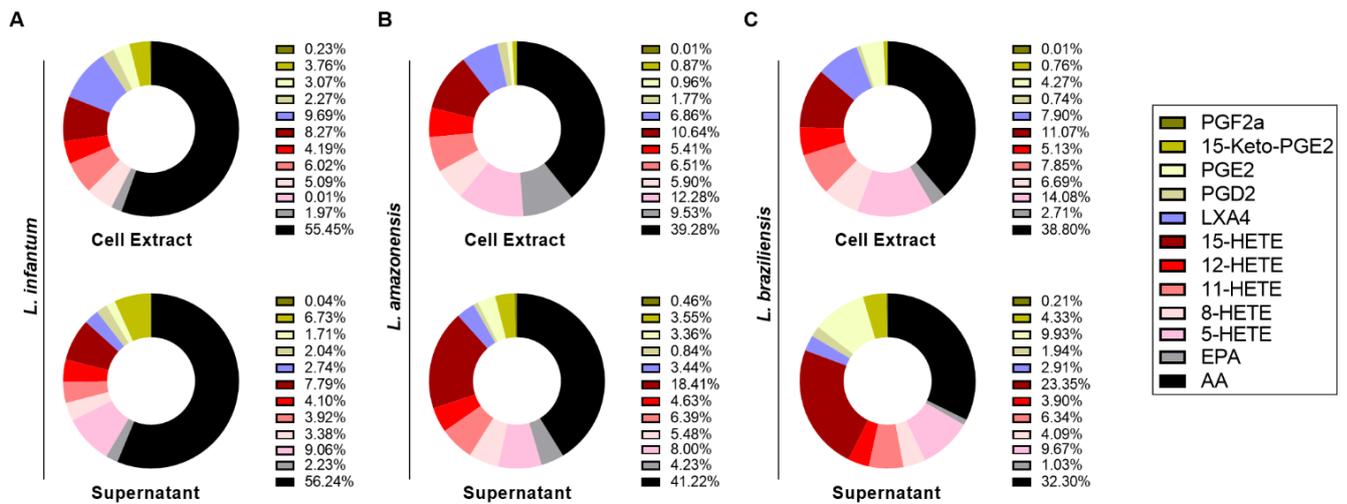
### Qualitative effects of PUFAs on eicosanoid production in *Leishmania spp.*

Trypanosomatids possess enzymatic machinery for the metabolization of PUFAs to specialized and conventional lipid mediators (Colas et al., 2018; Paloque et al., 2019; Tavares et al., 2021). Herein we used LC/MS to evaluate the presence of lipid mediator precursors, as well as eicosanoids, in *L. infantum*, *L. amazonensis* and *L. braziliensis* treated or not with AA, EPA or DHA. In all, 41 lipid mediators were analyzed in cell extracts and axenic culture supernatants. The presence of twelve bioactive lipids was identified: 15-keto-PGE<sub>2</sub>, LXA<sub>4</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, 5-HETE, AA, 12-HETE, 8-HETE, 11-HETE, EPA, 15-HETE, PGF<sub>2α</sub> (Table 1 and Fig. 5). However, mediators LTC<sub>4</sub>, PGB<sub>2</sub>, 6-keto-PGF<sub>1α</sub>, 17-RvD1, 12-oxo-LTB<sub>4</sub>, 20-OH-PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>, RvD1, RvD2, RvD3, LTB<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>, 6-trans-LTB<sub>4</sub>, 11-trans-LTD<sub>4</sub>, PDX, Maresin, PGJ<sub>2</sub>/PGA<sub>2</sub>, RvE1, 15-deoxy-PGJ<sub>2</sub>, 5-oxo-ETE, 20-HETE, 5,6-DiHETE, 12-oxo-ETE, 15-oxo-ETE, 11,12-DiHETrE, 14,15-DiHETrE, 5,6-DiHETrE, 20-OH-LTB<sub>4</sub> were not identified. As expected, AA-derived eicosanoids were the most prevalent in *Leishmania* extracts (Fig. 5).

Table 1. Quantitation of eicosanoids and their precursors in cell extract and supernatant of *Leishmania spp.* by LC-MS

Lipids	Standards*	Mass (m/z)		Lipid concentrations in cell extract and supernatant by <i>Leishmania spp.</i> (ng/mL)*					
		Precursor ion (m/z)	Fragment ion (m/z)	<i>L. infantum</i>		<i>L. amazonensis</i>		<i>L. braziliensis</i>	
				C	S	C	S	C	S
PGF <sub>2α</sub>	PGF <sub>2α</sub> -d4	353	309.2179	0.17	0.27	<0.01	4.68	<0.01	1.62
15-Keto-PGE <sub>2</sub>	PGE <sub>2</sub> -d4	349	287.2017	2.82	43.80	1.32	36.12	1.12	33.89
PGE <sub>2</sub>	PGE <sub>2</sub> -d4	351	189.1285	2.30	11.14	1.46	34.19	6.31	77.74
PGD <sub>2</sub>	PGD <sub>2</sub> -d4	351	189.1285	1.70	13.29	2.69	8.56	1.09	15.21
LXA <sub>4</sub>	LXA <sub>4</sub> -d5	351	217.1598	7.27	17.59	10.46	35.05	11.66	22.76
15-HETE	15-HETE-d8	319	175.1492	6.20	50.66	16.23	187.49	16.34	182.75
12-HETE	12-HETE-d8	319	179.1078	3.14	26.65	8.26	47.16	7.57	30.52
11-HETE	12-HETE-d8	319	167.1084	4.52	25.52	9.93	65.03	11.59	49.60
8-HETE	12-HETE-d8	319	155.0714	3.82	22.01	9.00	55.83	9.88	32.00
5-HETE	5-HETE-d8	319	115.0401	<0.01	58.94	18.74	81.46	20.79	75.68
EPA	AA-d11	301	257.2275	1.48	14.54	14.54	43.07	3.99	8.10
AA	AA-d11	303	259.2447	41.59	365.81	59.94	419.78	57.27	252.77

AA: Arachidonic Acid; EPA: Eicosapentaenoic acid; LX: Lipoxin; PG: prostaglandin; HETE: Hydroxyeicosatetraenoate; C: Cell extract; S: Supernatant;  
 \* Standard molecules containing Deuterium (d) atoms was used as an internal standard for the quantification of lipids by LC-mass spectrometry (MS).



**Figure 5. Identification of lipid mediators in different *Leishmania* spp.** Average distribution of the 10 abundant eicosanoids in the cell extract and supernatant of procyclic promastigotes of (A) *L. infantum*, (B) *L. amazonensis* and (C) *L. braziliensis* in logarithmic growth phase (with cell types labeled above each pie chart) stimulated with AA for 1 hour, displayed as parts of the whole. Data are in percentage of  $\eta\text{g/mL}$  of total lipid detected by LC-MS. EPA: Eicosapentanoic acid; 15-HETE: 15-hydroxyeicosatetraenoic acid; 8-HETE: 8-hydroxyeicosatetraenoic acid; 11-HETE: 11-Hydroxyeicosatetraenoic acid; 12-HETE: 12-hydroxyeicosatetraenoic acid; AA: Arachidonic acid; PGF<sub>2 $\alpha$</sub> : Prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub> ; 15-keto-PGE<sub>2</sub>: 15-keto-Prostaglandin E<sub>2</sub>; LXA<sub>4</sub>: Lipoxin A<sub>4</sub>; PGD<sub>2</sub>: Prostaglandin D<sub>2</sub>; 5-HETE: 5-hydroxyeicosatetraenoic acid.

## DISCUSSION

While lipid mediators and LDs have a potential role in the pathogenicity of *Leishmania* infection, the literature contains scarce data on eicosanoid metabolism in these parasites. Here we compared eicosanoid metabolism and LD formation in response to PUFAs in different species of *Leishmania* associated with distinct clinical forms. Our data show that, in contrast to *L. amazonensis*, LD formation can be modulated by PUFA stimulation in *L. infantum* and *L. braziliensis*. However, with regard to eicosanoid production, the same eicosanoids were detected across all three New World species when stimulated with AA, yet *L. amazonensis* did not respond similarly to the other two species investigated under stimulation with EPA and DHA.

LDs are organelles that synthesize lipid mediators in a variety of cell types (Bozza et al., 2011). However, the role of LDs in eicosanoid production in parasites remains poorly understood (Tavares et al., 2021). In *L. infantum*, LDs are sites of production for PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (Araújo-

Santos et al., 2014), but the literature contains scarce reports on the presence of enzymes related to the lipid metabolism of eicosanoids or bioactive lipids in other protozoa. Herein, we found that AA modulated the formation of LDs, which suggests the accumulation of AA in LDs that may serve as a platform for the synthesis of eicosanoids in some protozoa of the genus *Leishmania*.

Regarding the formation of lipid mediators, it is known that enzymatic machinery in protozoa is responsible for the synthesis of these bioactive compounds, such as GP63 (Díaz-gandarilla et al., 2018) and PGFS (Alves-Ferreira et al., 2020; Araújo-Santos et al., 2014; Kabututu et al., 2003; Tavares et al., 2021; Toledo et al., 2016); however, the enzymes that convert AA into lipid mediators have not been adequately studied. In *L. mexicana*, a GP63 protein was shown to be analogous to COX-2 (Díaz-gandarilla et al., 2018). These protein metalloproteases are described as the main surface antigen expressed in promastigotes of different *Leishmania* species (Isnard et al., 2012). Although the genes encoding the GP63 metalloproteases are organized in tandem (Ivens et al., 2006; Peacock et al., 2007), it has not been demonstrated whether COX-2 activity would arise from all of these encoded proteins. The production of PGF2 $\alpha$ , which enzyme PGFS is responsible for synthesizing (Kubata et al., 2007), activates the PGF2 $\alpha$  receptor, triggering the COX pathway (Ueno and Fujimori, 2011). While little is known about the role of parasite-derived PGFS, some studies suggest the potential role of this eicosanoid in host-parasite interaction (Alves-Ferreira et al., 2020; Araújo-Santos et al., 2014). Our comparison of protein sequences and GP63 and PGFS active site residues in both Old and New World *Leishmania* species revealed surprising similarity between these enzymes in accordance with the clinical form of disease caused by the parasite. Nonetheless, additional studies are needed to verify if, in fact, this similarity could be related to GP63 and PGFS expression, and to the development of a polarized response according to the clinical manifestation. Indeed, some studies in humans have shown altered production of lipid mediators depending on the cutaneous or visceral form of disease (Araújo-Santos et al., 2017; Malta-Santos et al., 2020).

An important aspect of our evaluation focused on the expression of enzymes involved in the metabolism of eicosanoids during the metacyclogenesis of different New World *Leishmania* species. Similar levels of GP63 were observed among *L. amazonensis*, *L. braziliensis* and *L. infantum* promastigotes, yet increased PGFS expression was detected during parasite differentiation. This finding may indicate that PGFS could influence the virulence of infective forms of *Leishmania spp.* Considering the differences in the structure of and family of genes

encoding these enzymes, further studies are needed to correlate these differences with the enzymatic activity exhibited by PGFS in *Leishmania*.

While some studies have advanced the understanding of lipid metabolism, the enzymes involved in parasites remain poorly described; however, knowledge on which metabolites are produced by zoonotic parasites is expanding (de Almeida et al., 2018; Díaz-gandarilla et al., 2018; Paloque et al., 2019; Toledo et al., 2016). Here, we investigated the metabolites produced by different *Leishmania* species, observing increased production of lipid mediators of the HETE class. Importantly, little is known about the role played by these metabolites during the host-parasite interaction process. Additional studies may shed light on whether these should be considered virulence factors and thus may serve as intervention targets, in addition to whether their currently unidentified receptors could elucidate mechanisms of pathogenicity. The present findings serve to open perspectives by providing evidence on how PUFAs lead to the modulation of LD formation in different Old and New World *Leishmania* species. We believe that our qualitative overview of lipid mediators potentially produced by these parasites contributes to the base of knowledge surrounding antiparasitic drug development.

#### **CONFLICT OF INTEREST STATEMENT**

The authors declare that this research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as potential conflicts of interest.

#### **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

Conceived and designed the experiments: VMB, CAS, TA-S. Data collection: MVC, VST, RSOS, YMFSA, CAS, TA-S; Data analysis: MVC, VST, RSOS, CAS, JLB, VMB, TA-S; Contributed materials/analysis tools: LHF, CAS, JLB, VMB, TA-S; Wrote the paper: YMFSA and TA-S.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (grant number #422696/2016-1) to TA-S and (grant number #431857/2018-0) to VMB; Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) (grant number #0418000600) to TA-S; Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (EMU grant number #2015/00658-1) to LHF; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) to RSOS, YMFSA; and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de

Nível Superior (CAPES). The authors would like to thank Andris K. Walter for critical analysis, English language revision and manuscript copyediting assistance.

## REFERENCES

Alves-Ferreira, E.V.C., Ferreira, T.R., Walrad, P., Kaye, P.M., Cruz, A.K., 2020. Leishmania braziliensis prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  synthase impacts host infection. *Parasit. Vectors* 13, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3883-z>

Araújo-Santos, T., Andrade, B.B., Gil-Santana, L., Luz, N.F., Dos Santos, P.L., De Oliveira, F.A., Almeida, M.L., De Santana Campos, R.N., Bozza, P.T., Almeida, R.P., Borges, V.M., 2017. Anti-parasite therapy drives changes in human visceral leishmaniasis-associated inflammatory balance. *Sci. Rep.* 7, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04595-8>

Araújo-Santos, T., Rodríguez, N.E., Moura-Pontes, S., Dixt, U.G., Abánades, D.R., Bozza, P.T., Wilson, M.E., Borges, V.M., 2014. Role of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  production in lipid bodies from *Leishmania infantum* chagasi: Insights on virulence. *J. Infect. Dis.* 210, 1951–1961. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu299>

Ashton, A.W., Mukherjee, S., Nagajyothi, F.N.U., Huang, H., Braunstein, V.L., Desruisseaux, M.S., Factor, S.M., Lopez, L., Berman, J.W., Wittner, M., Scherer, P.E., Capra, V., Coffman, T.M., Serhan, C.N., Gotlinger, K., Wu, K.K., Weiss, L.M., Tanowitz, H.B., 2007. Thromboxane A<sub>2</sub> is a key regulator of pathogenesis during *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med.* 204, 929–940. <https://doi.org/10.1084/jem.20062432>

Berman, H.M. et al, 2000. Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28, 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>

Bozza, P.T., Bakker-Abreu, I., Navarro-Xavier, R.A., Bandeira-Melo, C., 2011. Lipid body function in eicosanoid synthesis: An update. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 85, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2011.04.020>

Colas, R.A., Ashton, A.W., Mukherjee, S., Dalli, J., Akide-Ndunge, O.B., Huang, H., Desruisseaux, M.S., Guan, F., Jelicks, L.A., Santos, F.M. dos, Nagajyothi, J., Zingman, M.A., Reyes, J., Weiss, L.M., Serhan, C.N., Tanowitz, H.B., 2018. *Trypanosoma cruzi* Produces the Specialized Proresolving Mediators Resolvin D1, Resolvin D5, and Resolvin E2. *Infect. Immun.* 86, 1–10. <https://doi.org/10.1128/IAI.00688-17>

de Almeida, P.E., Toledo, D.A.M., Rodrigues, G.S.C., D'Avila, H., 2018. Lipid bodies as sites of prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis during Chagas disease: Impact in the parasite escape mechanism. *Front. Microbiol.* 9, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00499>

DeLano, W., 2002. The PyMOL molecular graphics system. Schrödinger LLC Version 1. <https://doi.org/10.1002/wcms.1298>

Díaz-gandarilla, A., Estrada-figueroa, L.A., Arrieta-gonz, M.M., Rosales-encina, L., Toledo-leyva, A., Osorio-trujillo, C., Talam, P., 2018. Biochimie *Leishmania mexicana* gp63 is the enzyme responsible for cyclooxygenase ( COX ) activity in this parasitic protozoa Ver o 151. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.05.016>

Isnard, A., Shio, M.T., Olivier, M., Bengoechea, J.A., 2012. Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling 2, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00072>

Ivens, A.C., Peacock, C.S., Worthey, E.A., Murphy, L., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M., Adlem, E., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Beck, A., Beverley, S.M., Bianchetti, G., Borzym, K., Bothe, G., Bruschi, C. V, Collins, M., Cadag, E., Ciarloni, L., Clayton, C., Coulson, R.M.R., Cronin, A., Cruz, A.K., Robert, M., Gaudenzi, J. De, Dobson, D.E., Duesterhoeft, A., Fosker, N., Frasch, A.C., Fraser, A., Fuchs, M., Goble, A., Goffeau, A., Harris, D., Hertz-fowler, C., Horn, D., Huang, Y., Klages, S., Knights, A., Kube, M., Matthews, K., Michaeli, S., Mottram, J.C., Müller-, S., Munden, H., Nelson, S., Norbertczak, H., Oliver, K., Neil, S.O., Pentony, M., Pohl, T.M., Price, C., Purnelle, B., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Reinhardt, R., Rieger, M., Rinta, J., Robben, J., Robertson, L., Ruiz, J.C., Rutter, S., Saunders, D., Schäfer, M., Schein, J., Schwartz, D.C., Seeger, K., Seyler, A., Sharp, S., Shin, H., Sivam, D., Squares, R., Squares, S., Tosato, V., 2006. Genoma *L\_Major*.Pdf. *Science* 309, 436–442.

Jordan, P.M., Werz, O., 2021. Specialized pro-resolving mediators: biosynthesis and biological role in bacterial infections. *FEBS J. febs*.16266. <https://doi.org/10.1111/febs.16266>

Kabututu, Z., Martin, S.K., Nozaki, T., Kawazu, S.I., Okada, T., Munday, C.J., Duszenko, M., Lazarus, M., Thuita, L.W., Urade, Y., Kubata, B.K., 2003. Prostaglandin production from arachidonic acid and evidence for a 9,11-endoperoxide prostaglandin H 2 reductase in *Leishmania*. *Int. J. Parasitol.* 33, 221–228. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00254-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00254-0)

Kubata, B.K., Duszenko, M., Martin, K.S., Urade, Y., 2007. Molecular basis for prostaglandin production in hosts and parasites. *Trends Parasitol.* 23, 325–331. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.05.005>

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nknyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

Malta-Santos, H., Fukutani, K.F., Sorgi, C.A., Queiroz, A.T.L., Nardini, V., Silva, J., Lago, A., Carvalho, L.P., Machado, P.L.R., Bozza, P.T., França-Costa, J., Faccioli, L.H., Carvalho, E.M., Andrade, B.B., Borges, V.M., 2020. Multi-omic Analyses of Plasma Cytokines, Lipidomics, and Transcriptomics Distinguish Treatment Outcomes in Cutaneous Leishmaniasis. *iScience* 23. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101840>

Moen, S.O., Fairman, J.W., Barnes, S.R., Sullivan, A., Nakazawa-Hewitt, S., Van Voorhis, W.C., Staker, B.L., Lorimer, D.D., Myler, P.J., Edwards, T.E., 2015. Structures of prostaglandin F synthase from the protozoa *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* with

NADP. *Acta Crystallogr. Sect. FStructural Biol. Commun.* 71, 609–614. <https://doi.org/10.1107/S2053230X15006883>

Mukherjee, S., Sidekar, N., Ashton, A.W., Huang, H., David, C., Lisanti, M.P., Machado, F.S., Weiss, L.M., Herbert, B., 2014. NIH Public Access 112, 1417–1425. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3271-5>. Identification

Olzmann, J.A., Carvalho, P., 2019. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 137–155. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0085-z>

Onal, G., Kutlu, O., Gozuacik, D., Dokmeci Emre, S., 2017. Lipid Droplets in Health and Disease. *Lipids Health Dis.* 16, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0521-7>

Paloque, L., Perez-Berezo, T., Abot, A., Dalloux-Chioccioli, J., Bourgeade-Delmas, S., Le Faouder, P., Pujo, J., Teste, M.A., François, J.M., Schebb, N.H., Mainka, M., Rolland, C., Blanpied, C., Dietrich, G., Bertrand-Michel, J., Deraison, C., Valentin, A., Cenac, N., 2019. Polyunsaturated fatty acid metabolites: Biosynthesis in *Leishmania* and role in parasite/host interaction. *J. Lipid Res.* 60, 636–647. <https://doi.org/10.1194/jlr.M091736>

Peacock, C.S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J.C., Quail, M.A., Peters, N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M., Kerhornou, A., Ivens, A., Fraser, A., Rajandream, M.A., Carver, T., Norbertczak, H., Chillingworth, T., Hance, Z., Jagels, K., Moule, S., Ormond, D., Rutter, S., Squares, R., Whitehead, S., Rabbinowitsch, E., Arrowsmith, C., White, B., Thurston, S., Bringaud, F., Baldauf, S.L., Faulconbridge, A., Jeffares, D., Depledge, D.P., Oyola, S.O., Hilley, J.D., Brito, L.O., Tosi, L.R.O., Barrell, B., Cruz, A.K., Mottram, J.C., Smith, D.F., Berriman, M., 2007. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat. Genet.* 39, 839–847. <https://doi.org/10.1038/ng2053>

Schlagenhauf, E., Etges, R., Metcalf, P., 1998. The crystal structure of the *Leishmania major* surface proteinase leishmanolysin (gp63). *Structure* 6, 1035–1046. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(98\)00104-X](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(98)00104-X)

Sorgi, C.A., Paula, A., Peti, F., Petta, T., Fávero, A., Meirelles, G., Fontanari, C., Alberto, L., Moraes, B. De, 2018. Data Descriptor: Comprehensive monitoring mass spectrometry for targeted eicosanoid assays 1–12.

Tavares, V. de S., de Castro, M.V., Souza, R. da S.O., Gonçalves, I.K.A., Lima, J.B., Borges, V. de M., Araújo-Santos, T., 2021. Lipid droplets of protozoan parasites: survival and pathogenicity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 116, e210270. <https://doi.org/10.1590/0074-02760210270>

Toledo, D.A.M., Roque, N.R., Teixeira, L., Milán-Garcés, E.A., Carneiro, A.B., Almeida, M.R., Andrade, G.F.S., Martins, J.S., Pinho, R.R., Freire-de-Lima, C.G., Bozza, P.T., D'Avila, H., Melo, R.C.N., 2016. Lipid body organelles within the parasite *trypanosoma cruzi*: A role for intracellular arachidonic acid metabolism. *PLoS ONE* 11, 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160433>

Ueno, T., Fujimori, K., 2011. Novel suppression mechanism operating in early phase of adipogenesis by positive feedback loop for enhancement of cyclooxygenase-2 expression through prostaglandin F2 $\alpha$  receptor mediated activation of MEK/ERK-CREB cascade. FEBS J. 278, 2901–2912. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08213.x>

Zhang, J.Y. and Y., 2015. Protein Structure and Function Prediction Using I-TASSER. Curr Protoc Bioinforma. 52, 1–5. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0508s52>.

## Supplementary Material

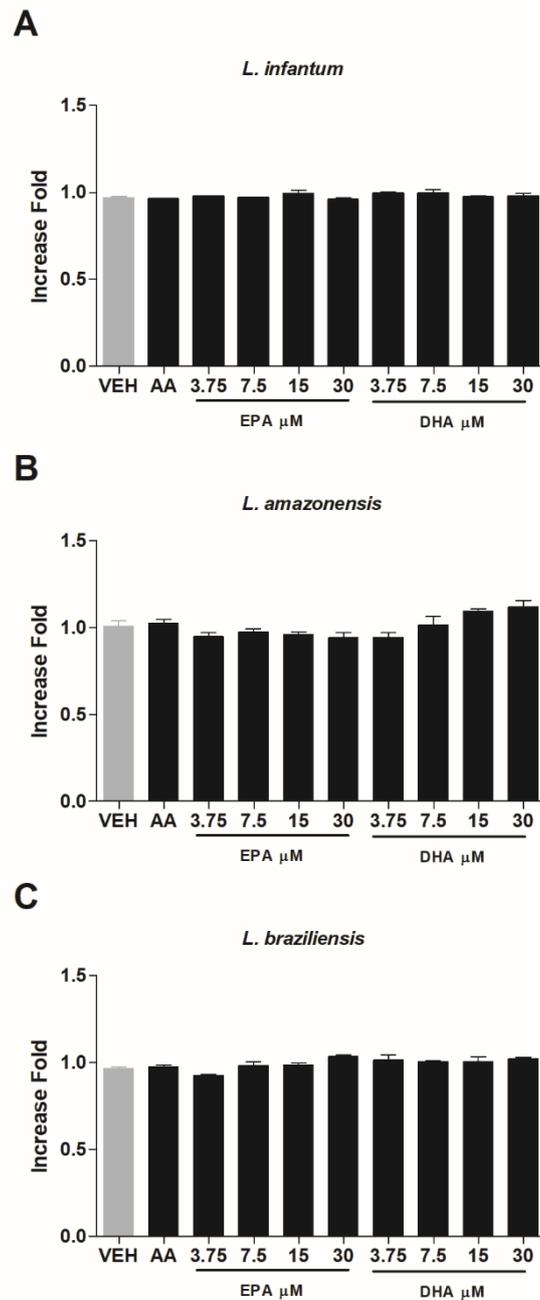
**Supplementary table 1. GP63 nucleotide sequences used in the study**

Species	GenBank Code	region (begin - end)	Size (bp)	UniprotKB code
<i>Leishmania infantum</i>	FR796442.1	222401 - 224197	1800	Q6LA77
<i>Leishmania donovani</i>	CP029509.1	257944 - 259743	1800	A0A3S7WR60
<i>Leishmania major</i>	Y00647.1	199 - 2007	1809	P08148
<i>Leishmania amazonensis</i>	CP040138.1	179953 - 181761	1809	No annotation
<i>Leishmania mexicana</i>	NC_018314.1	180317 - 182125	1809	E9AN54
<i>Leishmania braziliensis</i>	LS997609.1	224752 - 226554	1803	A0A3P3YZR7
<i>Leishmania panamensis</i>	AF037166.1	1 - 1770	1770	O46312
<i>Trypanosoma cruzi</i>	MKQG01002498.1	73636 - 75255	1630	No annotation

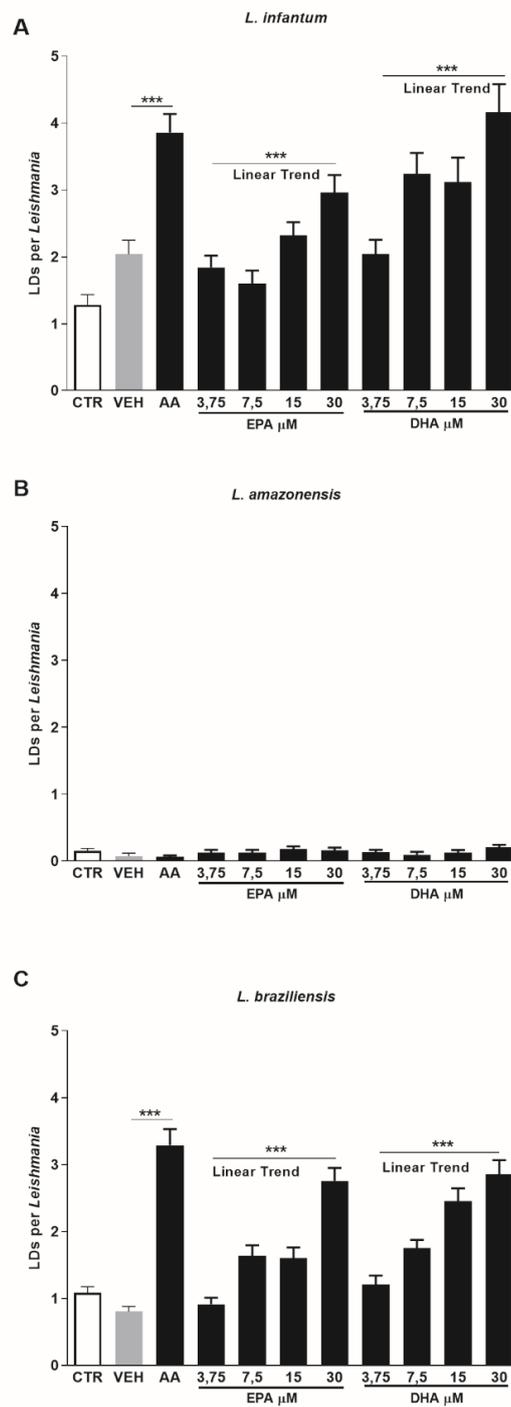
**Supplementary table 2. PGFS nucleotide sequences used in the study**

Species	GenBank Code	region (begin - end)*	Size (bp)	UniProtKB code
<i>Leishmania infantum</i>	FR796463.1	1034722 - 1035576	855	A4I6Z4
<i>Leishmania donovani</i>	FR799618.2	1062787 - 1063641	855	E9BMZ2
<i>Leishmania major</i>	FR796427.1	1050960 - 1051814	855	P22045
<i>Leishmania amazonensis</i>	CP040158.1	1024015 - 1023161	855	No annotation
<i>Leishmania mexicana</i>	FR799583.1	1026690 - 1027544	855	E9B215
<i>Leishmania braziliensis</i>	FR799006.1	1114033 - 1114887	855	A4HJJ7
<i>Leishmania panamensis</i>	CP009400.1	936089 - 936943	855	A0A088RXB1
<i>Trypanosoma cruzi</i>	AAHK01000429.1	11770 - 12618	849	Q4DJ07

\*gene identified in the reverse complementary sequence

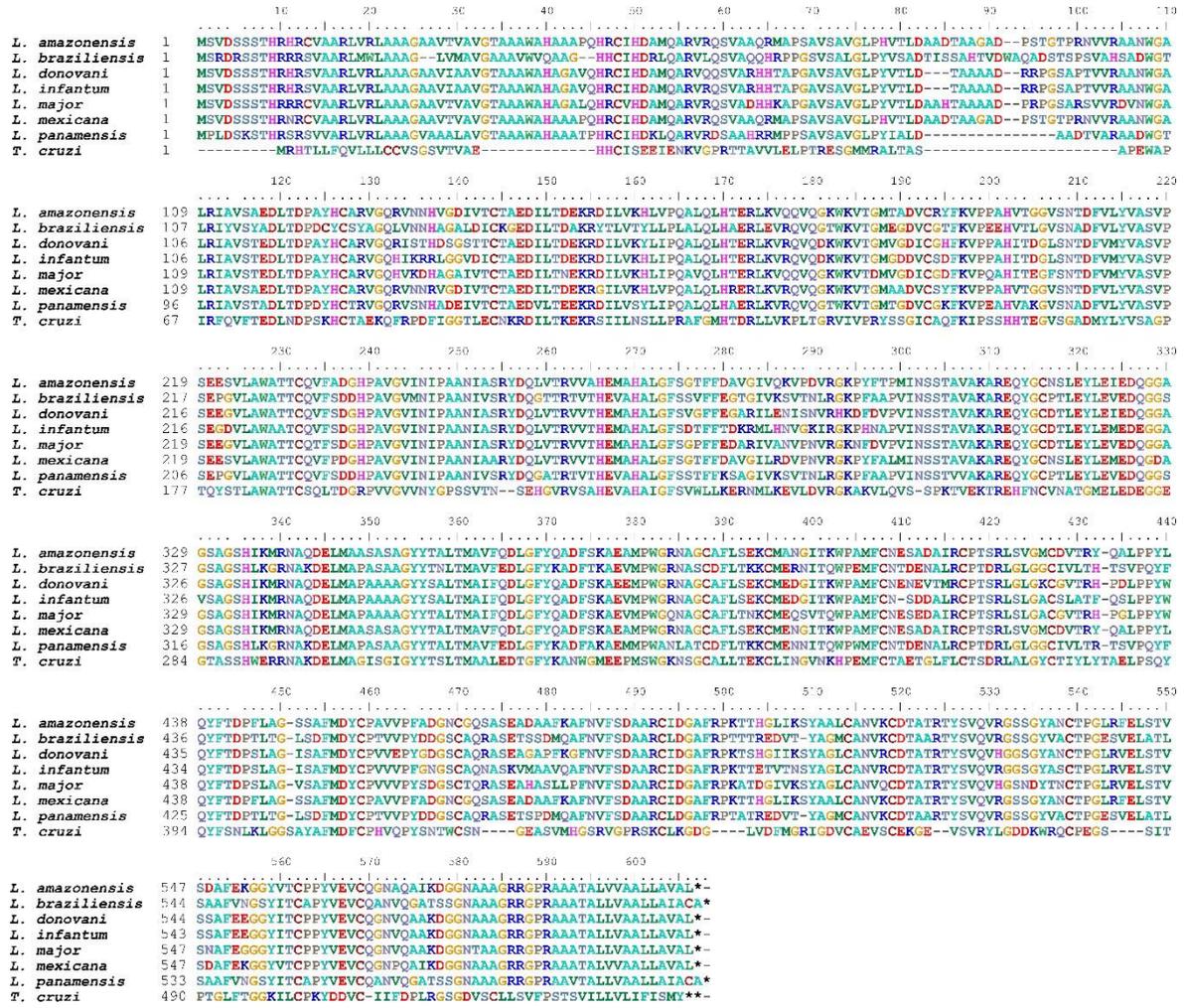


**Supplementary figure 1. Polyunsaturated fatty acids stimulation does not affect *Leishmania* viability.** Procyclic promastigotes of (A) *L. infantum*, (B) *L. amazonensis* and (C) *L. braziliensis* in logarithmic growth phase were stimulated with AA, EPA or DHA for 1 hour. Next, tetrazolium salt (XTT) reduction was measured by spectrophotometry. Data are represented as means  $\pm$  standard error of optical density readings.

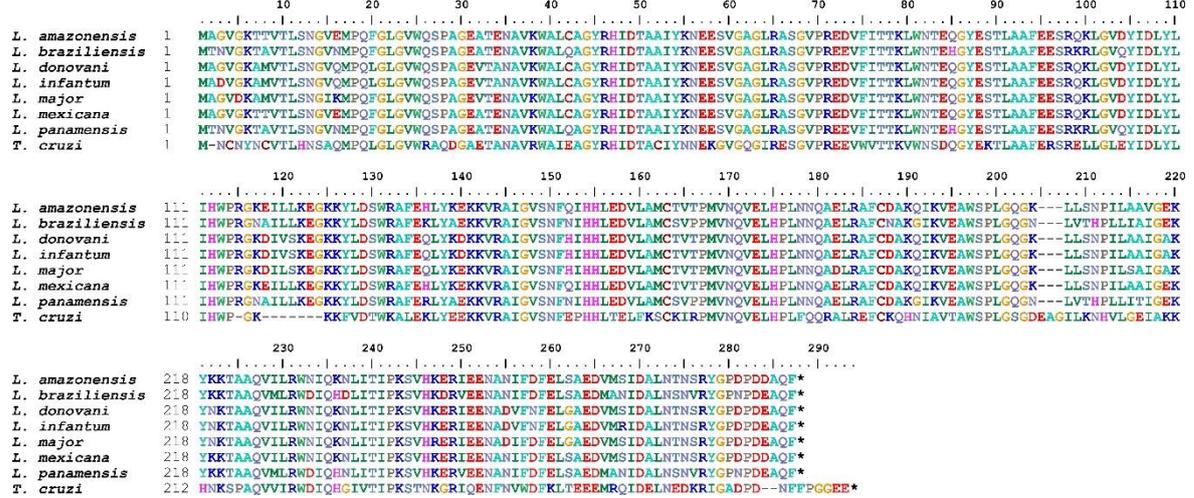


**Figure 2. Polyunsaturated fatty acids increase the formation of lipid droplets in procyclic forms of *Leishmania*.** Logarithmic growth phase promastigotes of (A) *L. infantum* (B) *L. amazonensis* and (C) *L. braziliensis* were stimulated with ethanol (vehicle) or AA (15  $\mu$ M), EPA (3.75, 7.5, 15 or 30  $\mu$ M) or DHA (3.75, 7.5, 15 or 30  $\mu$ M) for 1 hour, and then stained with Oil Red O to quantify LDs. Bars represent means  $\pm$  SEM of LDs per parasite. \*\*\* represent  $p < 0.0001$ , for pairwise comparison between AA and the vehicle using the Student's t-test. The significance was tested by 1-way ANOVA with post-test linear trend to dose response stimuli. AA: Arachidonic acid; EPA: Eicosapentaenoic acid; DHA: Docosahexaenoic acid.

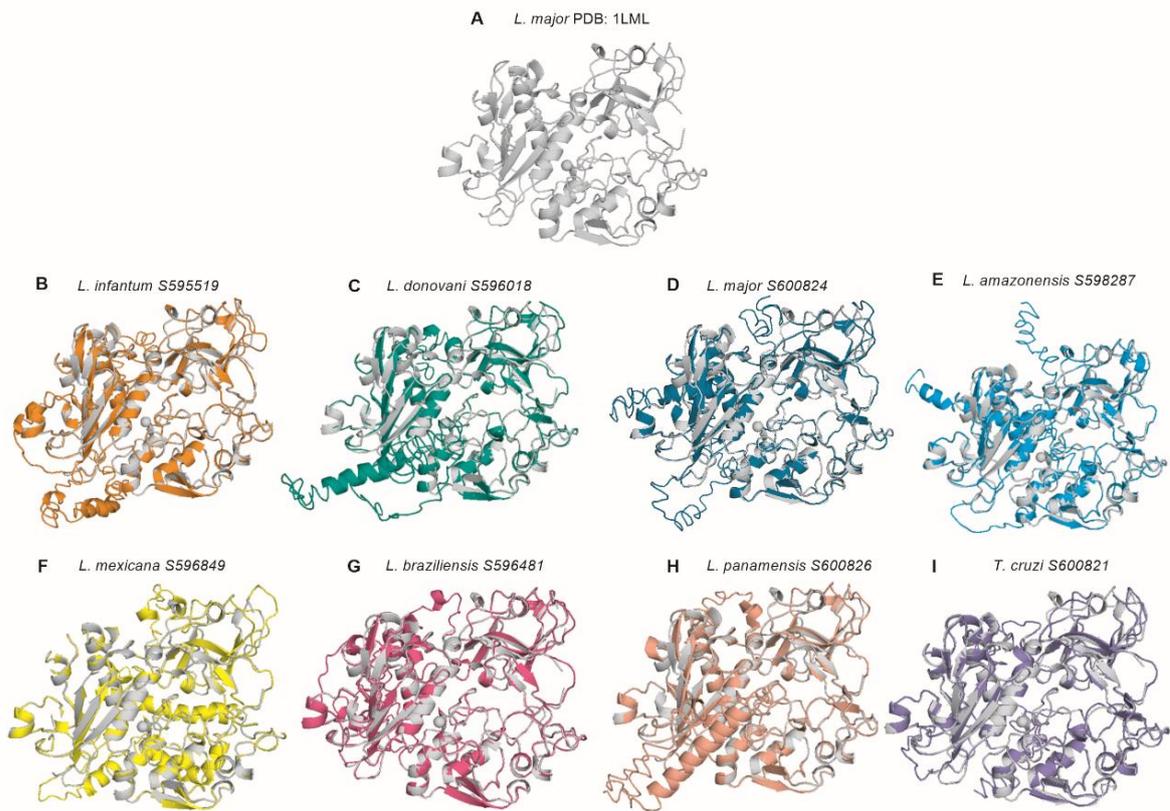
A



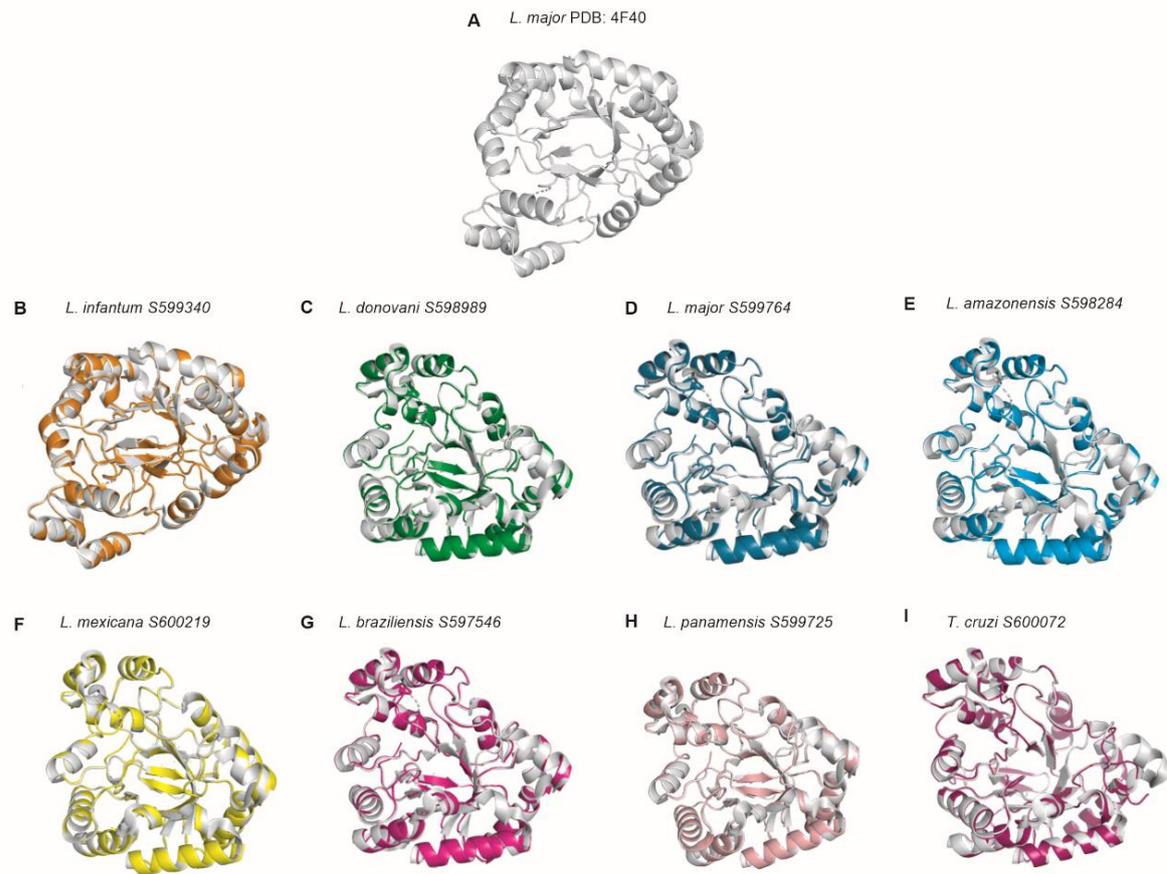
B



Supplementary figure 3. Comparative analysis of the primary structure of GP63 and PGFS proteins across New and Old World *Leishmania* spp. Protein sequences of (A) GP63 or (B) PGFS were aligned using the ClustalW algorithm.



**Supplementary figure 4. Comparative analysis of the tertiary structure of GP63 protein in *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*.** The GP63 protein was modeled using the I-TASSER algorithm and structures were aligned over the *L. major* protein (grey). GP63 tertiary structure overlap shows similarities between (A) *L. major* PDB: 1LML and (B) *L. infantum*, (C) *L. donovani*, (D) *L. major*, (E) *L. amazonensis*, (F) *L. mexicana*, (G) *L. braziliensis*, (H) *L. panamensis* and (I) *T. cruzi*.



**Supplementary figure 5. Comparative analysis of the tertiary structure of PGFS protein in *Leishmania spp.* and *Trypanosoma cruzi*.** The PGFS protein was modeled using the I-TASSER algorithm and structures were aligned over the *L. major* protein (grey). PGFS tertiary structure overlap shows similarities between (A) *L. major* PDB: 4F40 and (B) *L. infantum*, (C) *L. donovani*, (D) *L. major*, (E) *L. amazonensis*, (F) *L. mexicana*, (G) *L. braziliensis*, (H) *L. panamensis* and (I) *T. cruzi*.

## 4 PARTE II

### 4.1 HIPÓTESE

Os níveis teciduais e plasmáticos de eicosanoides em *Mesocricetus auratus* é alterado durante a fase crônica da leishmaniose visceral e está relacionado com a gravidade da doença.

### 4.2 OBJETIVOS

#### 4.2.1 Objetivo geral

Avaliar a síntese de eicosanoides em *Mesocricetus auratus* durante a fase crônica da leishmaniose visceral.

#### 4.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar características clínicas e laboratoriais de hamsters Golden Syrian após cinco meses de infecção por *L. infantum*;
- Avaliar alterações histológicas do baço e fígado dos animais;
- Avaliar carga parasitária no baço e fígado dos animais;
- Analisar o perfil de eicosanoides sintetizados em amostras de plasma, baço e fígado de *Mesocricetus auratus* após cinco meses de infecção por *L. infantum*;
- Correlacionar alterações clínicas observadas com a síntese de mediadores lipídicos

### 4.3 MANUSCRITO II EM ELABORAÇÃO

**Eicosanoides da classe do Ácido hidroxi-eicosatetraenóico estão associados com aumento da carga parasitária de *Leishmania infantum* e alterações sítio específicas durante a fase crônica da leishmaniose visceral em *Mesocricetus auratus***

Yasmin Monara Ferreira de Sousa Andrade<sup>1,3</sup>, Jonathan Luís Magalhães Fontes<sup>1,3</sup>, Bianca Ramos Mesquita<sup>1,3</sup>, Flávio Henrique de Jesus Santos<sup>1,3</sup>, Astrid Madeleine Calero Goicochea<sup>1,3</sup>, Hayna Malta Santos<sup>1,3</sup>, Jéssica Rebouças Silva<sup>1,3</sup>, Vanessa Mançur Santos<sup>1,3</sup>, Caroline Vilas Boas de Melo<sup>1</sup>, Nicole Hlavac Vicenzi<sup>6</sup>, Bruna Martins Macedo Leite<sup>1,3</sup>, Icaro Bonyek Santos

da Silva<sup>1,3</sup>, Deborah Bittencourt Mothé Fraga<sup>1,3</sup>, Carlos Arterio Sorgi<sup>4,5</sup>, Washington Luis Conrado Dos Santos<sup>1,3</sup>, Théo Araújo-Santos<sup>1,2</sup>, Valéria de Matos Borges<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brasil

<sup>2</sup> Núcleo de Estudos de Agentes Infecciosos e Vetores, Centro das Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Oeste da Bahia, Barreiras, Bahia, Brasil

<sup>3</sup> Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Bahia, Brasil

<sup>4</sup> Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

<sup>5</sup> Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

<sup>6</sup> Hospital Veterinário da Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil

\*Corresponding author:

Valéria de Matos Borges, Ph.D.

Address: Laboratório de Inflamação e Biomarcadores, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Universidade Federal da Bahia, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador – Ba.

zip code: 40296-710

e-mail: [valeriaborges.br@gmail.com](mailto:valeriaborges.br@gmail.com)

## Resumo

A leishmaniose ainda é uma das doenças mais negligenciadas do mundo, afetando principalmente países pobres e em desenvolvimento. Dentre as diferentes formas clínicas das leishmanioses, a leishmaniose visceral (LV) apresenta maior gravidade devido suas manifestações sistêmicas. Dados publicados anteriormente demonstram uma alteração no perfil de eicosanoides produzidos durante a fase crônica da LV humana. Neste estudo, nós avaliamos a produção de eicosanoides durante a fase crônica da LV no modelo experimental de infecção em *Mesocricetus auratus*, tendo em vista que hamster é o modelo animal mais parecido com a doença humana. Para isto, nós infectamos os animais com *Leishmania infantum* pela via intraperitoneal e avaliamos o desenvolvimento da doença por parâmetros clínicos, laboratoriais e histopatológicos. Após 5 meses de infecção, os animais foram sacrificados e foram avaliadas a carga parasitária e a produção de eicosanoides no plasma, baço e fígado dos animais. Nós identificamos que os animais desenvolveram LV com características clínicas e laboratoriais semelhantes àquelas observadas no ser humano, com a presença de trombocitopenia, anemia, linfocitose, alterações renais e icterícia. A carga parasitária foi maior no baço, assim como os níveis de ácido hidroxieicosatetraenóico (HETE). Além disso, nós identificamos uma correlação positiva entre os níveis de 11-HETE, carga parasitária e alterações microscópicas no baço e entre 5-HETE e estas no fígado. Desta forma, os nossos dados indicam que os HETEs podem estar associados com a gravidade da LV. Estudos adicionais são necessários para identificar os possíveis mecanismos envolvidos na relação entre os HETEs e o parasitismo na LV, uma vez que a efeitos biológicos dos HETEs, bem como receptores e mecanismos de produção destas moléculas ainda estão em curso.

**Palavra-chave:** *Leishmania infantum*, *Mesocricetus auratus*, Leishmaniose visceral, eicosanoides, ácido hidroxieicosatetraenóico, carga parasitária

## INTRODUÇÃO

A leishmaniose ainda é uma das doenças mais negligenciadas do mundo, afetando principalmente países pobres e em desenvolvimento. A doença é causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que são transmitidos a animais e humanos através da picada de insetos flebotomíneos (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Dentre as leishmanioses, a Leishmaniose Visceral (LV), que tem como agente etiológico *Leishmania infantum*, é considerada a forma mais grave por comprometer órgãos e tecidos hematopoiéticos e se não tratada adequadamente pode ocasionar a morte de pacientes (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

No processo de interação com o parasita, a célula hospedeira ativa seus mecanismos microbicidas e sintetiza importantes moléculas que controlam processos celulares em condições fisiológicas e patológicas, com os eicosanoides, que são mediadores derivados da oxidação do ácido araquidônico (AA) e produzidos em corpúsculos lipídicos (BOZZA et al., 2011; MELO et al., 2016). A produção de eicosanoides é iniciada pela ação das fosfolipases citosólicas (cPLA<sub>2</sub>) sob lipídios celulares, liberando moléculas de AA que serão transportadas para dentro dos corpúsculos lipídicos por proteínas de membrana presente nessas organelas, como as perilipinas (PLIN-1) (BOZZA et al., 2011; MELO et al., 2016). Então, as moléculas de AA podem ser metabolizadas por diferentes enzimas, como as cicloxigenases (COX), lipoxigenases (LOX) ou proteínas semelhantes ao citocromo P450 (CYP450), levando a produção de prostaglandinas ou tromboxanos, leucotrienos e ácido hidroxieicosatetraenóico (HETE), respectivamente (SORGI et al., 2018).

Estudos apontam que cães com LV grave tem níveis reduzidos com PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> (SOLCA et al., 2016) e que os níveis séricos de LTB<sub>4</sub> de pacientes com LV foram reduzidos após 15 dias de tratamento com antimoniais pentavalentes (ARAÚJO-SANTOS et al., 2017). Órgãos alvo da LV como baço e fígado exibiram parasitismo oposto, além disso, a via da 5-lipoxigenase (5-LO) foi protetora ao reduzir a sobrevivência de *L. donovani* no fígado de hamsters (SAINI et al., 2020). Contudo, a participação de mediadores lipídicos na patogênese da LV ainda é pouco explorada. Neste sentido, propomos aqui avaliar o perfil de eicosanoides sistêmicos e teciduais, e correlacioná-los com as características clínicas durante a fase crônica da LV em Hamsters Golden Syrian (*Mesocricetus auratus*). Tal investigação da síntese de eicosanoides pode trazer uma nova luz para o entendimento da complexa relação parasito-hospedeiro, bem como contribuir para identificação de biomarcadores e desenvolvimento de terapias contra a LV.

## **METODOLOGIA**

### **Cultivo de *Leishmania infantum***

Promastigotas de *L. infantum*, cepa MCAN/BR/89/BA262, foram mantidas em meio modificado para cultivo de hemoflagelados (HO-MEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal a 26°C até a atingirem a fase estacionária após 7–9 dias (YAO, et al., 2008).

### **Infecção dos Hamsters**

Foram utilizados animais da espécie *Mesocricetus auratus* da linhagem Golden Syrian. Os animais foram obtidos da colônia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, após aprovação do conselho de ética para uso de animais (CEUA), protocolo 004/2020. Os animais foram mantidos nas áreas de experimentação do mesmo biotério com ração específica e água ad libitum, sob regime fisiológico controlado de temperatura e períodos de claro e escuro. Ao atingir 6-8 semanas de idade, os hamsters foram inoculados com solução salina ou com  $10^7$  promastigotas/ml de *L. infantum* via intraperitoneal, no quadrante inferior direito do animal.

### **Eutanásia e Necrópsia**

Após 150 dias ou cinco meses de infecção, os hamsters foram anestesiados com quetamina (100mg/kg) e xilazina (5mg/kg) (FLECKNELL et al., 2015) e avaliados clinicamente, sendo tomada a medida dos seguintes parâmetros: peso total, lesões de pele ou mucosas e alopecia. Em seguida, o sangue dos animais foi obtido por punção cardíaca e devidamente armazenados em tubos com ou sem EDTA. Após a obtenção do sangue, houve a administração de dose letal de quetamina (600mg/kg) e xilazina (30mg/kg) (FAVORETTO et al., 2019) e, então, os animais foram submetidos à necropsia, sendo estimado o peso e dimensões do baço e fígado que foram coletados e devidamente armazenados para análises posteriores.

### **Análises hematológicas e bioquímicas**

As amostras de sangue obtidas por punção cardíaca foram alocadas em tubos com EDTA e rapidamente enviadas para o Hospital Veterinário da UFBA (HOSPMEV), onde foi realizada a contagem de eritrócitos, a dosagem de hemoglobina, contagem de plaquetas e contagem diferencial de leucócitos. Parte do sangue obtido foi centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos para coleta do soro. Estas amostras também foram encaminhadas ao HOSPMEV para dosagens de proteínas totais, albumina, ureia, creatinina, as enzimas aspartato

aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), lipoproteína de alta densidade (HDL), bilirrubina total e frações e ferro sérico.

### **Histopatologia**

Os fragmentos do baço e fígado coletados na necrópsia foram inicialmente estocados em formalina tamponada a 10%, em temperatura ambiente durante 48hs. Em seguida, fragmentos dos tecidos com 3-4 mm de espessura foram acondicionados em cassetes de processamento histológico, embebidos em parafina para obtenção das secções com 3-4 µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina. Por fim, as lâminas foram analisadas por um patologista de referência na área, que também determinou os parâmetros examinados no baço, sendo estes: presença de granulomas, tamanho do folículo linfóide, proporção da polpa branca e vermelha, perisplenite e composição celular. No fígado foram avaliados mobilidade de células de Kupffer, leucocitose intrasinusoidal, granulomas e infiltrados portais. A frequência dos eventos foi determinada pela análise de uma lâmina por animal que continha três secções dos tecidos.

### **Carga parasitária**

A carga parasitária do baço e fígado dos hamsters foi determinada por uma qPCR duplex, que detecta simultaneamente DNA do cinetoplasto de *L. infantum* (kDNA) e uma região conservada do gene housekeeping 18S rRNA de mamíferos (RAMPAZZO et al., 2017), como descrito resumidamente a seguir. A extração do DNA de 10mg do baço e 25mg do fígado foi realizada conforme instruções do fabricante (DNeasyR Blood & Tissue KIT, Qiagen). Em seguida, o DNA total extraído das amostras foi quantificado, sendo utilizado 10ng/µl de DNA de cada amostra para a qPCR. Os oligonucleotídeos para detecção de kDNA de *L. infantum* foram: LEISH-1, 5'-AACTTTTCTGGTCCCCGGGTAG-3'; LEISH-2, 5'-ACCCCAGTTTCCCGCC-3'; e LEISH-P, 5'-FAM-AAAATGGGTGCAGAAAT-MGB/NFQ-3' (FRANCINO et al., 2006). Os oligonucleotídeos para amplificação da sequência housekeeping: 18S\_F, 5'-TGCGAATGGCTCATTAATC-3'; 18S\_R, 5'-CGTCGGCATGTATTAGCTCT-3'; e 18S\_P, 5'-HEX-TGGTTCCTTTGGTCGCTCGCT-BHQ1-3' (RAMPAZZO et al., 2017). A qPCR duplex continha 5 µL de DNA extraído, Multiplex PCR Mastermix (IBMP/Fiocruz-PR, Brasil), 160 nM de 18S\_F e 18S\_R, 40 nM de 18S\_P, 200 nM de LEISH-P e 900 nM de LEISH- 1 e LEISH-2 (RAMPAZZO et al., 2017). As reações foram realizadas em duplicata e executadas em um sistema ABI7500 Fast Real-Time PCR (Life Technologies, EUA) configurado com o seguinte protocolo: 1 × 95 °C/10 min; 45x

[95°C/15s, 60°C/60s]. Os dados foram expressos como valores médios de limiar de ciclo (Ct). A positividade para DNA de *L. infantum* na reação duplex qPCR foi determinada por valores de corte de Ct obtidos usando uma análise da curva Receiver Operating Characteristic (ROC) para cada tecido, conforme descrito anteriormente (SOLCÀ et al., 2014).

### **Extração lipídica para identificação de eicosanoides**

Amostras de plasma (250µl) e 100mg do baço e fígado foram submetidos à extração lipídica, que resumidamente envolve a lise hipotônica em solução 1:1 de água deionizada e metanol a 4°C. Em seguida, as amostras foram armazenadas a -80°C e enviadas para a quantificação de eicosanoides no Centro de Excelência de Quantificação e Identificação de Lipídios – (CEQIL) pelo método LC/MS (Nexera-TripleTOF® 5600+).

### **Análise lipídica por LC-MS**

As amostras de plasma, baço e fígado foram enriquecidas com solução interna padrão (IS) (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan), então foi feita a precipitação de proteínas com 1,5 mL de metanol/acetonitrila (1:1) a 4°C e deixada desnaturar overnight. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4°C e 800x g. As proteínas desnaturadas foram quantificadas pelo ensaio de proteína Bradford para normalizar a concentração lipídica de cada amostra, e os sobrenadantes resultantes foram diluídos com água Milli-Q para diminuir o solvente orgânico para uma concentração máxima de 10-15%. Para o protocolo de extração SPE, o cartucho (Hypersep C18-500 mg, 3 mL, Thermo Scientific, Bellefonte, Pensilvânia) foi lavado com 4 mL de MeOH e equilibrado com 4 mL de H<sub>2</sub>O usando um coletor de extração (Waters, Milford, Connecticut). Após o carregamento das amostras diluídas, os cartuchos foram novamente lavados com 4 mL de H<sub>2</sub>O para remover as impurezas hidrofílicas. Os analitos foram eluídos com 1 mL de MeOH. O solvente foi removido em vácuo (Concentrator Plus, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) à temperatura ambiente e redissolvido em 50 µL de MeOH/H<sub>2</sub>O (7:3) para análise por LC-MS/MS. As amostras de extração lipídica foram transferidas para os frascos de amostrador automático e 10 µL de cada amostra foram injetadas no sistema de espectrometria de massa em tandem para cromatografia líquida alvo TripleTOF® 5600+ (LC-MS/MS) (Sciex, Foster City, Califórnia), como descrito anteriormente (SORGI et al., 2018). O método usado para o sistema de Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC) (Nexera X2, Shimadzu, Kyoto, Japão) foi feito usando uma coluna Ascentis Express C18 (100 × 4,6 mm e tamanho de partícula de 2,7 µm (Supelco, St. Louis, Missouri)). A eluição foi conduzida sob um sistema de gradiente binário com Fase A, H<sub>2</sub>O/ACN/ácido acético

(69,98: 30: 0,02) a pH 5,8 e Fase B, um ACN/isopropanol (70:30). A eluição em gradiente foi realizada por 25 min a uma taxa de fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>. Uma fonte de ionização por eletropulverização (ESI) no modo de íon negativo foi usada para varredura de monitoração de reação múltipla de alta resolução (MRMHR). Parâmetros instrumentais adicionais: gás nebulizador (GS1), 50 psi; turbo-gás (GS2), 50 psi; gás de cortina (CUR), 25 psi; tensão de eletropulverização (ISVF), -4,0 kV; e temperatura da fonte de pulverização de turbo íons, 550 ° C. As aquisições de dados foram realizadas usando o Analyst™ Software (Sciex, Foster, Califórnia). O processamento de dados prosseguiu através de várias etapas, incluindo filtragem, detecção de recursos, alinhamento e normalização. Em seguida, foi usado o software PeakView 2.1 (Sciex, Foster, Califórnia) para identificar as espécies lipídicas e o software MultiQuant (Sciex, Foster, Califórnia) para análise quantitativa. A concentração final de oxilipídios nas amostras foi normalizada pela concentração de proteínas (SORGI et al., 2018).

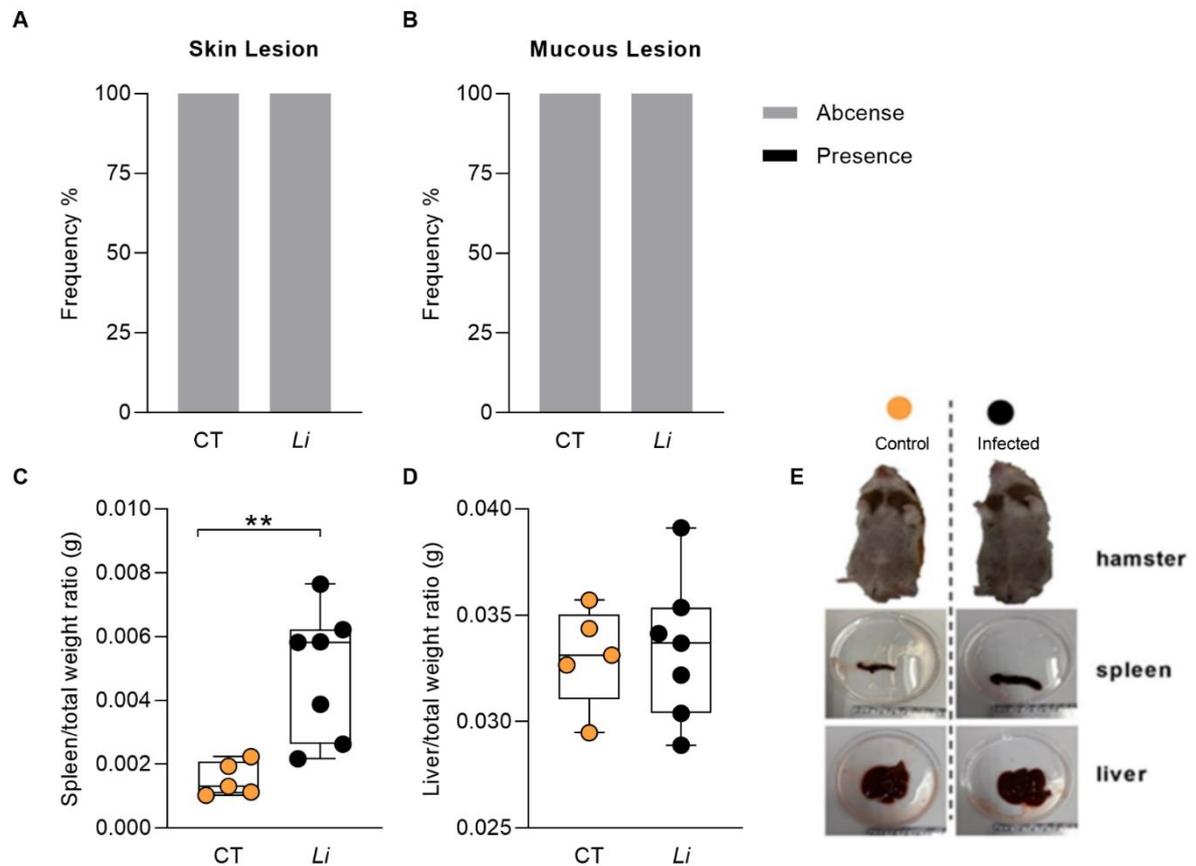
### **Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad-Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA-USA). A significância estatística das diferenças observadas entre os dois grupos foi determinada através de testes não paramétricos de comparação de medianas (Mann-Whitney) e com nível de significância de  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### **Alterações clínicas induzidas por *L. infantum***

Os animais infectados com *L. infantum* não apresentaram alterações de pele, mucosas, peso total e no peso do fígado quando comparados com o grupo controle. Entretanto, a esplenomegalia foi observada nos hamsters infectados após 150 dias de infecção (Figura 1).

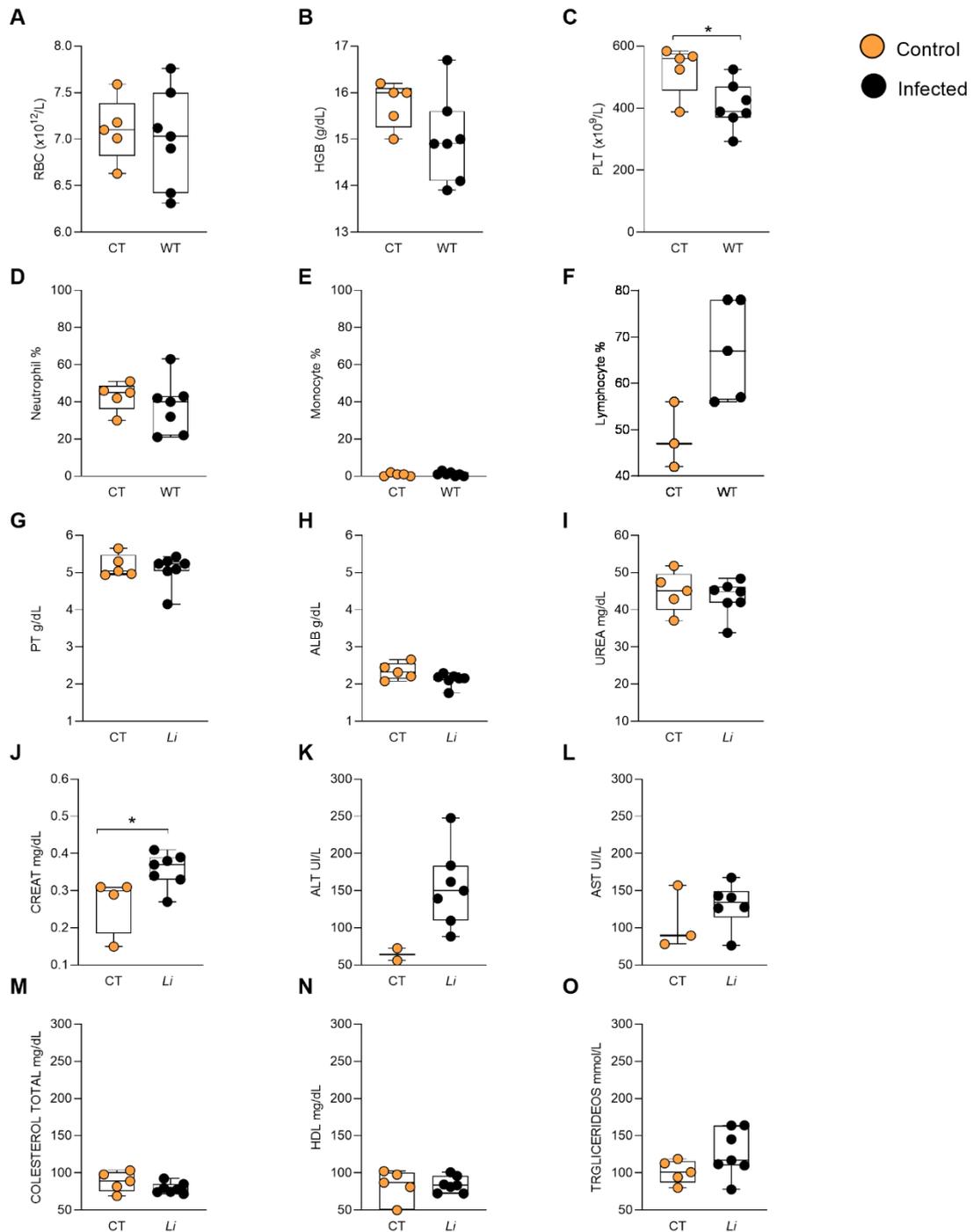


**Figura 1. Condições clínicas de hamsters após 150 dias de infecção por *L. infantum*.** Critérios clínicos como alterações de (A) pele e (B) mucosas, alterações nos pesos do baço (C) e fígado (D) em relação ao peso total do animal. (E) O estado geral dos animais, bem como análise macroscópica no baço e fígado foram registrados e comparados entre os grupos controle (CT) e infectado (*Li*). Os dados são expressos como a mediana de um experimento representativo e os grupos foram analisados estatisticamente usando o teste de Mann-Whitney, \*\*  $p < 0,05$ .

### **Alterações hematológicas e bioquímicas na infecção por *L. infantum***

Quanto aos aspectos hematológicos, os animais infectados com *L. infantum* apresentaram plaquetopenia, no entanto, outros parâmetros como a contagem de eritrócitos, contagem diferencial de leucócitos (neutrófilos, monócitos e linfócitos) e a dosagem de hemoglobina não sofreram alterações quando comparados com o grupo controle. Foi utilizado também como parâmetro de possíveis alterações séricas nos animais a dosagem das proteínas totais, a concentração de albumina, ureia, creatinina, ALT, AST, colesterol total, HDL e triglicerídeos.

Dentre estes, observou-se aumento da concentração de creatinina nos animais infectados, como identificado em estudos anteriores (DORES MOREIRA et al., 2016) (Figura 2).

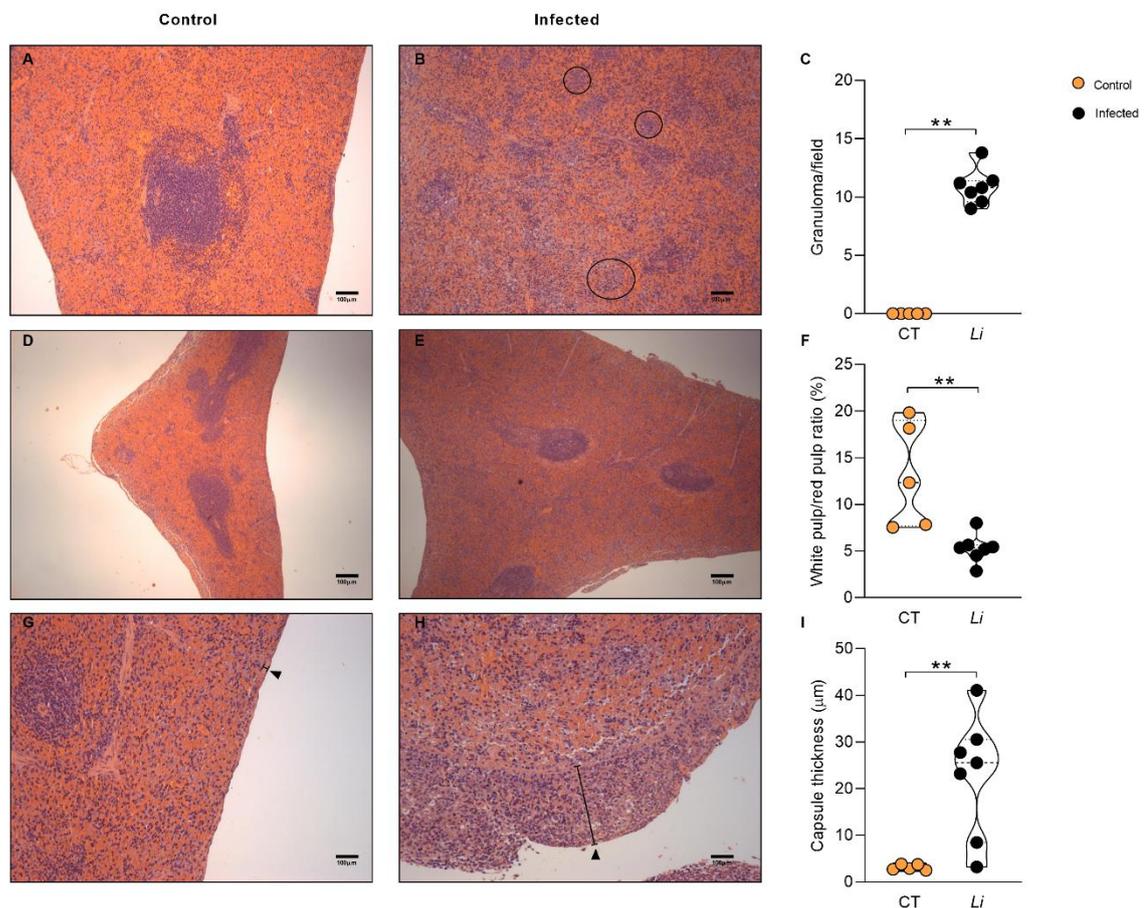


**Figura 2. Aspectos hematológicos e bioquímicos de hamsters após 150 dias de infecção por *L. infantum*.** Doses anestésicas de quetamina (100mg/kg) e xilazina (5mg/kg) foram injetadas intraperitonealmente nos hamsters e o sangue dos animais foi obtido por punção cardíaca. Em seguida, 200uL de sangue foram armazenados em tubos com anticoagulante e rapidamente encaminhados para um hospital veterinário referência para esse tipo de análise. As

quantificações de (A) eritrócitos (RBC); (B) hemoglobina (HGB); (C) plaquetas (PLT); (D) neutrófilos; (E) monócitos, (F) linfócitos, (G) proteínas totais (PT), (H) albumina (ALB), (I) ureia, (J) creatinina (CREAT), (K) alanina aminotransferase (ALT), (L) aspartato aminotransferase (AST), (M) colesterol total, (N) HDL e (O) triglicerídeos foram analisadas usando o teste de Mann-Whitney para comparação de dados e considerados estatisticamente significante com  $p < 0,05$ .

### ***L. infantum* altera características histológicas do baço e fígado**

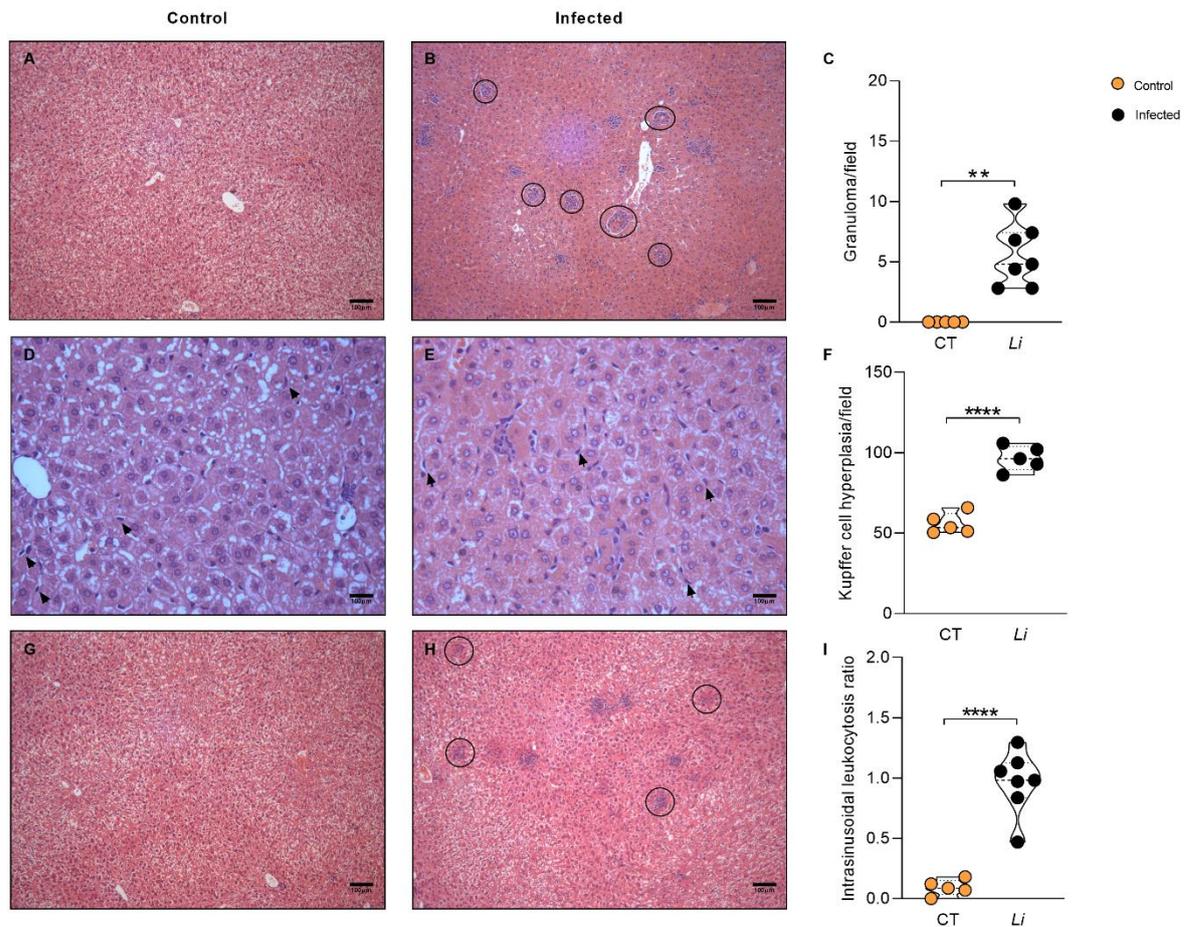
O baço dos hamsters infectados apresentou granulomas, hipoplasia da polpa branca e inflamação da cápsula (perisplenite), sugerindo assim uma desorganização estrutural deste tecido quando comparado ao grupo controle (Figura 3).



**Figura 3. Histopatologia do baço de hamsters após 150 dias de infecção por *L. infantum*.** **Histopatologia do baço de hamsters após 150 dias de infecção por *L. infantum*.** Alterações esplênicas induzidas por *L. infantum* incluem formação de granulomas, hipoplasia de polpa branca e perisplenite. (A) Fotomicrografia do baço de um animal não infectado. Coloração HE, aumento de 100x, escala de 100µm. (B) Fotomicrografia esplênica de um animal infectado apresentando granulomas que estão circundados por círculos. Coloração HE, aumento de 100x,

escala de 100 $\mu$ m. (C) Gráfico representativo da contagem de granulomas a partir do registro de cinco campos aleatórios para cada animal dos grupos controle (CT) e infectado (*Li*). Teste Mann-Whitney foi usado para comparação dos dados. Para avaliação da hipoplasia da polpa branca, fotomicrografias de baços não infectado (D) e infectado (E) foram obtidas, coradas com HE e aumentadas 40x. (F) Representação gráfica da porcentagem de redução da área de polpa branca em relação a área total do baço para cada um dos animais avaliados. As áreas correspondentes foram determinadas pelo software ImageJ. (G) Fotomicrografia do baço não infectado com ausência de inflamação da cápsula, indicada pela seta preta e analisada por coloração HE e aumento de 200x. (H) Fotomicrografia de baço infectado com aumento da espessura da cápsula, indicada pela seta preta e barra de espessura. Tal alteração foi observada usando coloração HE e aumento 200x. (I) Medições da espessura da cápsula foram realizadas a partir de cinco pontos aleatórios ao redor do baço de animais não infectados e infectados. As espessuras foram determinadas pelo software ImageJ e o teste Mann-Whitney foi utilizado para a comparação de dados entre os diferentes grupos e considerado significativo com  $p < 0,05$ .

O fígado dos animais doentes também apresentou consideráveis alterações em relação ao grupo não infectado. Foram observados granulomas, corpos de Schaumann, hiperplasia das células de Kupffer e leucocitose intrasinusoidal (Figure 4).



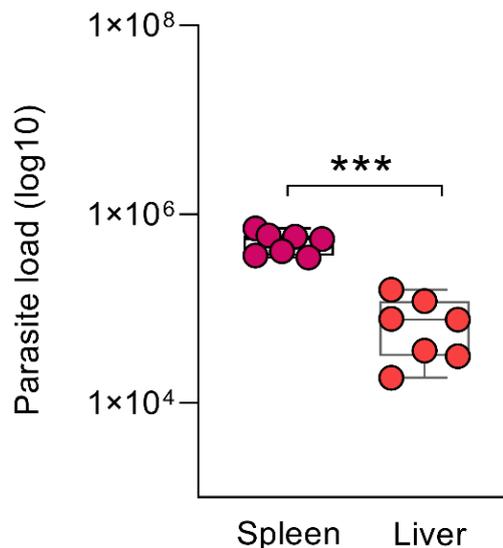
**Figura 4. Histopatologia hepática de hamsters após 150 dias de infecção por *L. infantum*.**

Alterações hepáticas induzidas por *L. infantum* incluem formação de granulomas, hiperplasia de células de Kupffer e leucocitose intrasinusoidal. É notável presença de granulomas no parênquima hepático quando se compara fotomicrografias do fígado não infectado (A) e infectado (B), em que os granulomas estão circundados por círculos de bordas pretas. Estas fotomicrografias foram avaliadas por coloração HE, aumento de 100x e escala de 100 $\mu$ m. (C) A quantificação de granulomas foi realizada a partir da observação de cinco campos aleatórios do fígado de cada um dos animais e a comparação dos dados foi feita por Mann-Whitney, considerando significância quando  $p < 0,05$ . Para avaliação da hiperplasia de células de Kupffer, fotomicrografias coradas com HE, aumentadas 400x com escala de 100 $\mu$ m foram obtidas de animais não infectados (D) e infectados (E). Nestes, as setas pretas indicam a presença dessas células. (F) A quantificação de células de Kupffer foi feita pelo software ImageJ e a comparação dos dados entre os grupos foi analisada pelo teste Mann-Whitney. Fotomicrografias foram avaliadas quanto a presença ou não de leucocitose intrasinusoidal entre os grupos controle (G) e infectado (H), onde pequenas áreas de leucocitose estão circundadas por círculos com bordas

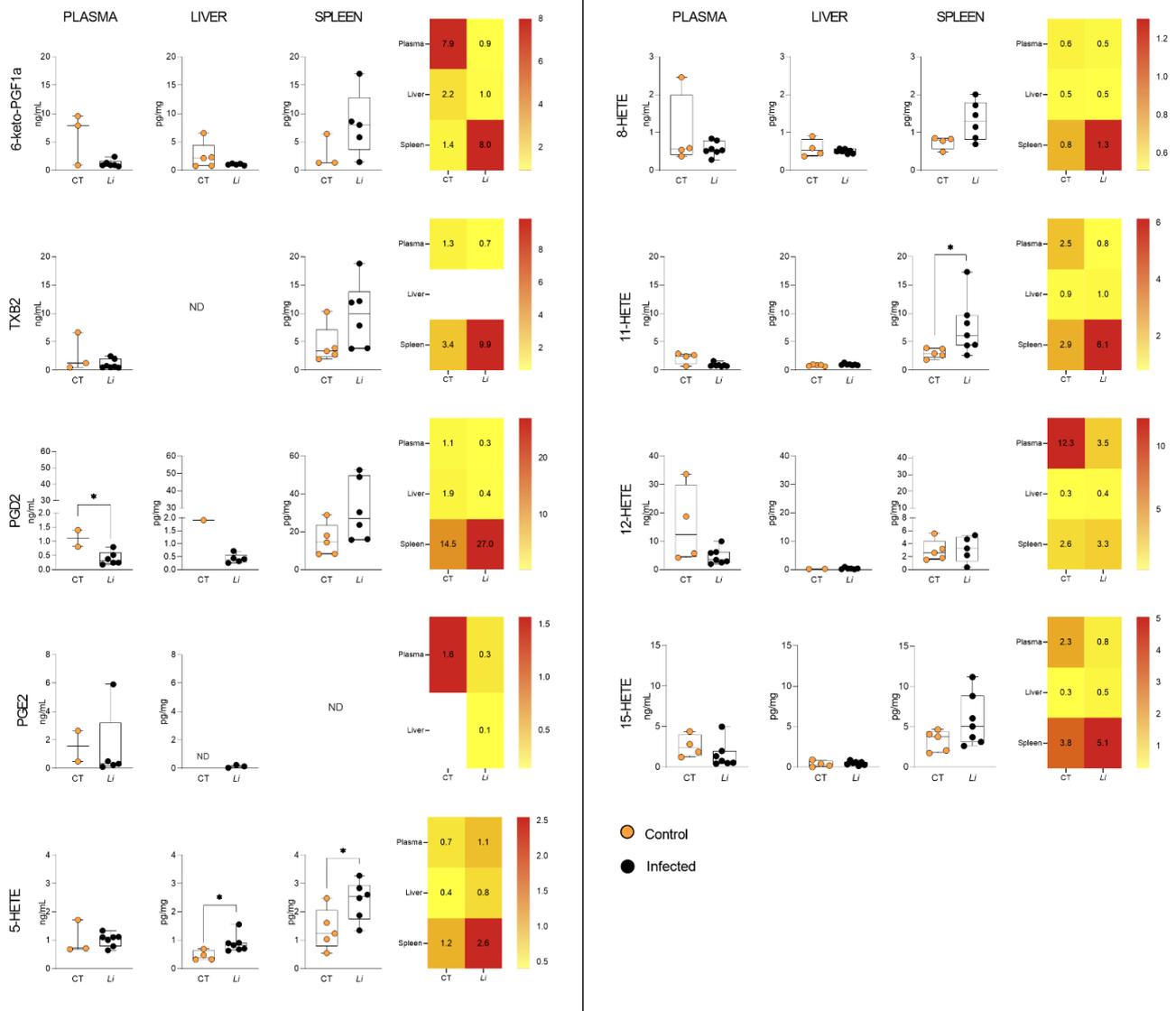
pretas. (I) Área de leucocitose em relação a área total foi avaliada entre os grupos usando teste Mann-Whitney.

### **A síntese de eicosanoides HETEs teciduais está relacionada ao microambiente inflamatório na infecção por *L. infantum***

Ao comparar a carga parasitária do baço e fígado, observou-se que o baço é significativamente mais infectado que o fígado (Figura 5). Concomitantemente, avaliamos a produção dos eicosanoides 6-keto-PGF<sub>1α</sub>, TXB<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, 5-HETE, 8-HETE, 11-HETE, 12-HETE e 15-HETE no plasma, baço e fígado dos animais e observamos o aumento de PGD<sub>2</sub> no plasma dos hamsters, indução de 5-HETE no fígado, assim como maior síntese de 5-HETE e 11-HETE no baço. De modo geral, os animais infectados e não infectados exibem perfis distintos na produção destes eicosanoides, principalmente no plasma e baço (Figura 6).

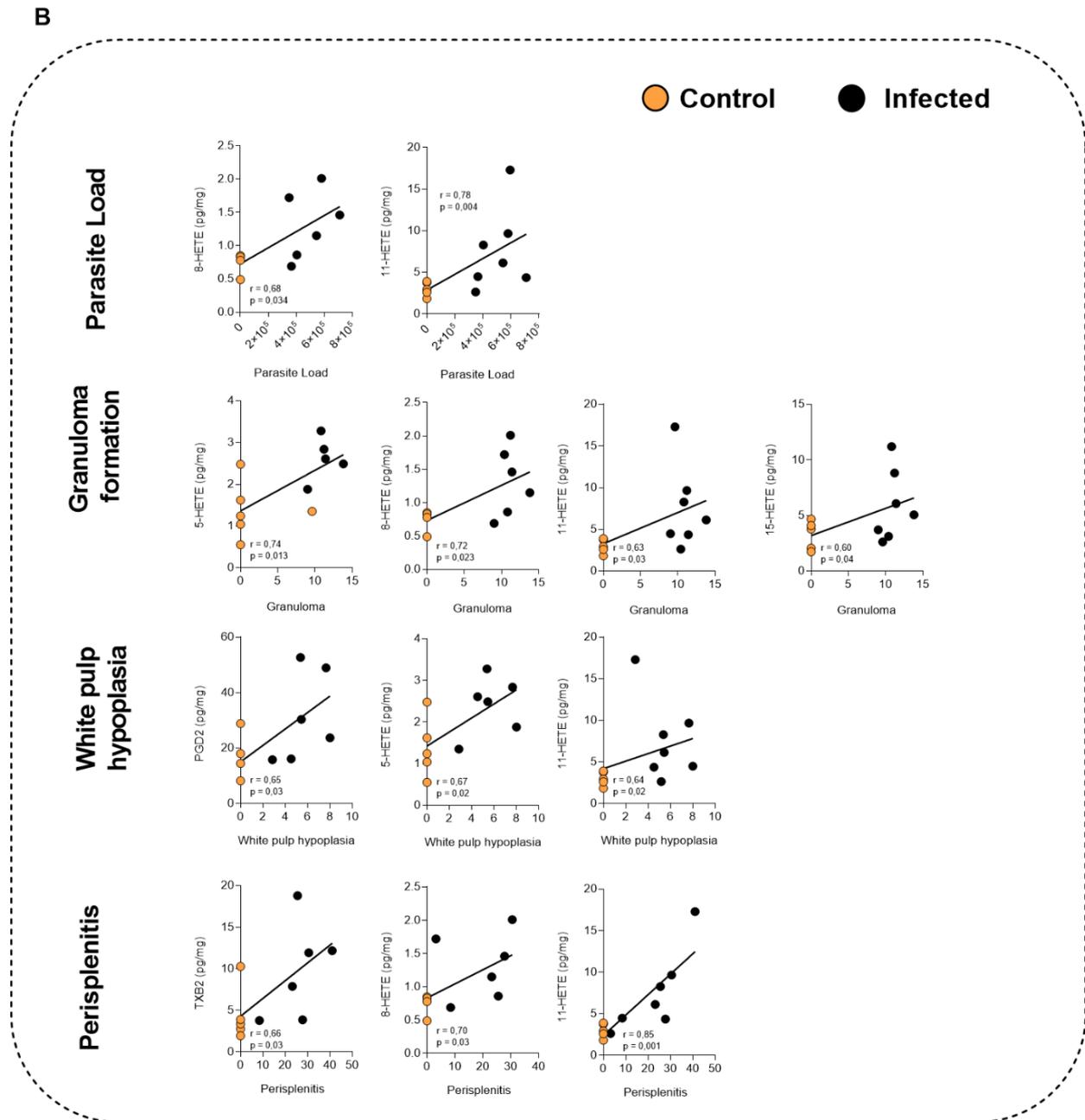


**Figura 5. Carga parasitária em órgãos alvo da leishmaniose visceral.** O número de parasitas no baço e fígado de hamsters infectados por *L. infantum* foi determinado por valores de amplificação derivados de uma curva padrão pré-estabelecida em ensaio de qPCR. Os dados foram comparados estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney e considerados significativos com  $p < 0,05$ .



**Figura 6. Avaliação da síntese de eicosanoides sistêmicos e teciduais em hamsters durante fase crônica da leishmaniose visceral.** A identificação e quantificação de eicosanoides no plasma, fígado e baço foi realizada por meio da espectrometria de massa por cromatografia em fase líquida (HPLC-MS). Os dados foram estatisticamente comparados entre os grupos controle (CT) e infectado (Li) pelo teste de Mann-Whitney e considerados significativos com  $p < 0,05$ . Mapas de calor também foram construídos para os eicosanoides quantificados, sendo que quanto maior a produção, mais intensa é vermelha.

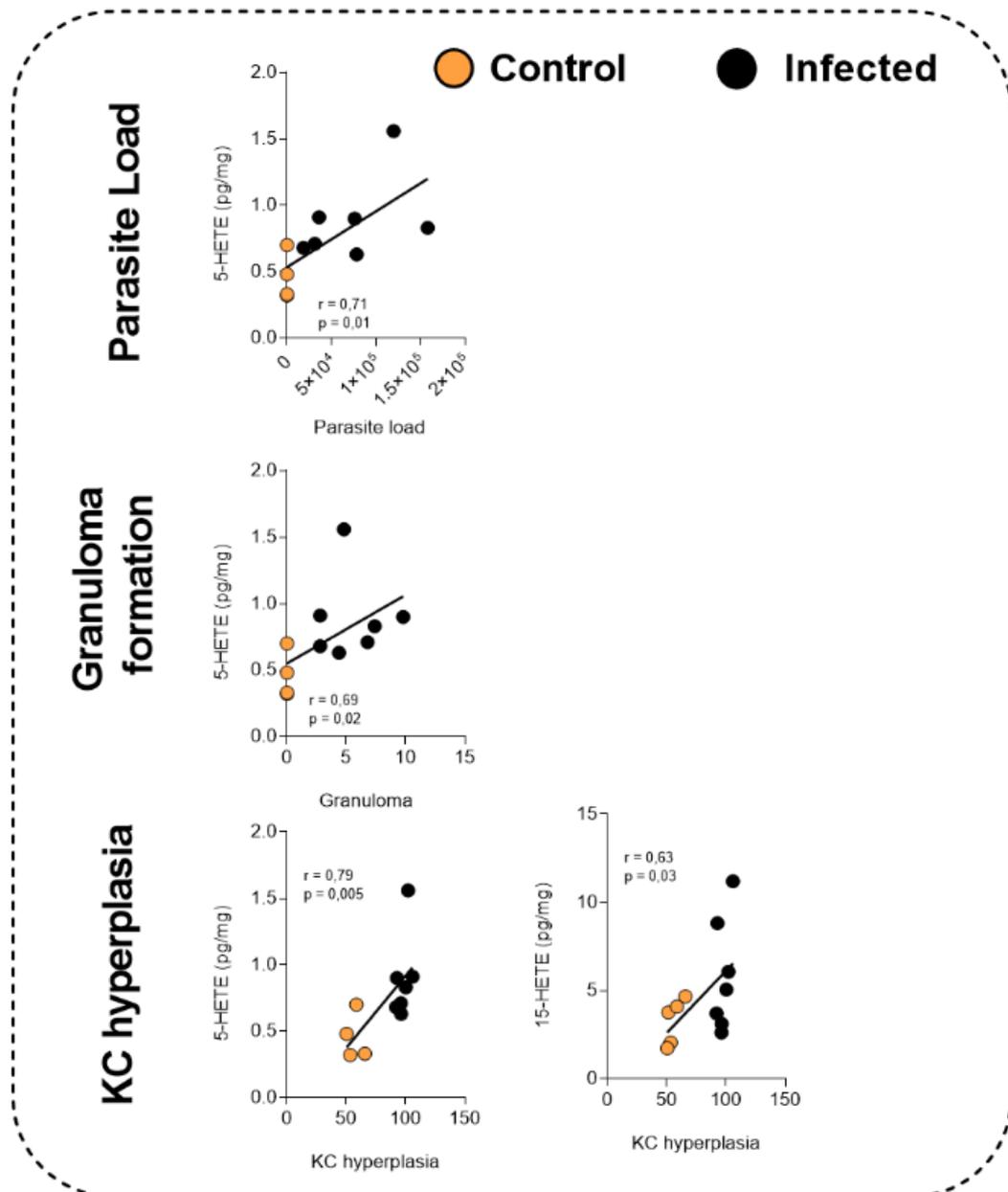




**Figura 7. Correlação entre os aspectos histopatológicos e a síntese de eicosanoides no baço durante fase crônica da leishmaniose visceral.** (A) A matriz de correlação da carga parasitária, formação de granulomas, hipoplasia de polpa branca e perisplenite com a produção de eicosanoides foi estabelecida usando níveis de significância para o teste de Spearman. As correlações com  $p < 0,05$  são destacadas no mapa de calor, bem como estão representadas graficamente em (B).



B



**Figura 8. Correlação entre os aspectos histopatológicos e a síntese de eicosanoides no fígado durante fase crônica da leishmaniose visceral.** (A) A matriz de correlação da carga parasitária, formação de granulomas, hiperplasia das células de Kupffer (KC) e leucitose intrasinusoidal com a produção de eicosanoides foi estabelecida usando níveis de significância para o teste de Spearman. As correlações com  $p < 0,05$  são destacadas pela cor no mapa de calor, bem como estão representadas graficamente em (B).

## 5 DISCUSSÃO

Nesta parte do estudo, foi avaliado pela primeira vez a produção de eicosanoides sistêmica e nos tecidos de maior tropismo parasitário durante a LV. Hamsters infectados apresentaram sinais clínicos e laboratoriais, como esplenomegalia, redução de plaquetas, aumento de creatinina. Tais alterações são compatíveis com LV humana e canina (ARAÚJO-SANTOS et al., 2017; DOS-SANTOS et al., 2014; LIMA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2010). O aumento esperado do nível das transaminases hepáticas, ALT e AST, observado em outros estudos (DORES MOREIRA et al., 2016; JIMÉNEZ-ANTÓN et al., 2019; RESENDE et al., 2020) também foi demonstrada em nossos resultados. Como os lipídios são metabolicamente alterados em resposta à infecção, a redução do colesterol e o aumento de triglicérides no soro de hamsters infectados é esperado, assim como ocorre no soro de indivíduos com LV (GHOSH et al., 2011; LAL et al., 2016; LIBEROPOULOS et al., 2014). Isso pode ser causado pela retenção de colesterol no vacúolo parasitóforo em macrófagos infectados por *Leishmania* (SEMINI et al., 2017). Além disso, a diminuição do colesterol sérico está relacionada com alta carga de amastigotas no baço (GHOSH et al., 2011). A estrutura e a função esplênica são afetadas no curso de muitas doenças crônicas e, neste estudo, ocorreram alterações histológicas relevantes caracterizadas pela intensidade de granulomas, presença de perisplenite e hipoplasia de polpa branca. Tal desorganização do baço decorrente da infecção por *L. infantum* já foi relatada em humanos, cães, murinos (HERMIDA et al., 2018; LIMA et al., 2014; MELO et al., 2020; VERESS; OMER; SATIR, 1977) e pode prejudicar a capacidade do hospedeiro de responder à infecção por *Leishmania* e outros patógenos (HERMIDA et al., 2018). Contudo, não foram observadas neste estudo diferenças da intensidade de células que compõem a polpa vermelha do baço.

O fígado também desempenha papel importante no desenvolvimento da LV canina e (LIMA et al., 2019), em humanos, diferentes padrões de resposta inflamatória no neste órgão têm sido associados à suscetibilidade ou resistência à infecção por LV (HAG et al., 1994). Aqui, demonstramos alterações já descritas em estudos de LV humana e canina (HAG et al., 1994; LIMA et al., 2019), que incluem: presença de granulomas e até mesmo corpos de Schaumann, hiperplasia das células de Kuffer e leucocitose intrasinusoidal. Os granulomas podem ser permissivos ou não à *Leishmania*, pois, embora sua formação possa constituir um passo para o controle da infecção, os parasitas podem ser capazes de subverter os granulomas para favorecer a sobrevivência e o crescimento (MURRAY, 2001). Além disso, a hiperplasia das células de Kupffer pode sugerir que os granulomas representam uma segunda linha de defesa após a

ativação das células de Kupffer não matar os parasitas (LIMA et al., 2019). A leucocitose intrasinusoidal e agregados leucocitários podem representar um estágio inicial de disseminação parasitária em órgãos internos, já que redução da carga parasitária no fígado é seguido pelo aumento de parasitismo no baço (ENGWERDA; KAYE, 2000), o que também foi observado neste estudo.

Os atuais tratamentos contra a LV apresentam efeitos adversos, além dos relatos de resistência aos medicamentos (MANSURI; SINGH; DIWAN, 2020). Assim, a investigação de alterações metabólicas durante LV pode determinar novos alvos para tratamento. Tendo em vista a importância de metabolismo lipídico em processos inflamatórios, também avaliamos em nosso modelo experimental a síntese de eicosanoides envolvidos na fase crônica da LV. PGD<sub>2</sub>, um eicosanoide regulador de diversos processos como adipogênese e tumorigênese (HARRIS et al., 2002). Também é reconhecido por sua atividade proinflamatória (AMORIM et al., 2018), sendo assim produzido por mastócitos, células T, macrófagos alveolares, plaquetas (HARRIS et al., 2002) e eosinófilos (AMORIM et al., 2018). Estudo recente mostrou que PGD<sub>2</sub> derivado de eosinófilos controlou o aumento do número de amastigotas de *L. amazonensis* em macrófagos (DA SILVA MARQUES et al., 2021). Aqui, a redução de PGD<sub>2</sub> observada no plasma dos hamsters sugere uma regulação proinflamatória insuficiente para o controle do parasito. A identificação de mediadores lipídicos é importante para o estabelecimento de biomarcadores em infecções, já que, uma bioassinatura de lipídios derivados do plasma foi capaz de prever com precisão a falha do tratamento leishmanicida em pacientes com LC (MALTA-SANTOS et al., 2020a).

Considerando os sintomas da LV e o tropismo parasitário, estudo recente analisou metabólitos em amostras de baço, fígado, cérebro, soro e urina de camundongos infectados por *L. donovani*, outro agente causador da LV, e observaram alterações em ácidos graxos, ácidos dicarboxílicos, aminoácidos e piridinas (DAS; SAHA; SHAHA, 2021). Além disso, glicerofosfolipídios, ácido  $\alpha$ -linoleico e ácido araquidônico foram os metabólitos mais afetados no soro de hamsters (QIN et al., 2022), enquanto que glicerofosfolipídios, ceramidas, acilcarnitinas, peptídeos, purinas, aminoácidos e lipídios foram afetados no baço, fígado e intestino de hamsters com LV (LESANI et al., 2022). Contudo, faltam análises de eicosanoides de origem tecidual em hamsters usando LC-MS. Por isso, avaliamos também a produção desses mediadores no baço e fígado dos animais. Notamos que alguns eicosanoides da classe HETEs foram mais produzidos e estão relacionados com características do microambiente inflamatório induzido por *L. infantum*, como a formação de granulomas. Neste sentido, já foi observado que a inibição de triglicerídeos de granulomas impactou a produção de eicosanoides e reduziu carga

de *Mycobacterium tuberculosis* em camundongos com tuberculose (DAWA et al., 2021). A redução de triglicerídeos no soro e alteração do metabolismo lipídico também foi observada em camundongos infectados por *Schistosoma japonicum*, ao passo que houve alteração do epitélio do cólon e formação de granulomas (YANG et al., 2021). Além disso, o aumento de fosfatidilgliceróis foi correlacionado com granulomas hepáticos na infecção por *L. donovani*, assim como foi demonstrado colocalização de fosfolipídios com AA em granulomas (TANS et al., 2022).

Quanto a síntese de eicosanoides HETEs aqui observadas, sabe-se que estes mediadores são reconhecidos por sua atividade pró-inflamatória, no entanto, a descoberta de enantiômeros R e S de um HETE indicam diferenças biológicas e enfatizam a complexidade química desses eicosanoides (SPECTOR; GORDON; MOORE, 1988). Maiores investigações são necessárias para obter um quadro completo do papel dos HETEs nos sistemas biológicos. Além disso, ainda não existem receptores, bem como antagonistas específicos para HETEs, o que abre um campo para investigações futuras sobre o mecanismo desses mediadores, assim como o impacto destes para o curso da LV.

Desse modo, nossos dados mostram que a interação *L. infantum*-hospedeiro conduziu às mudanças na síntese de eicosanoides em microambientes inflamatórios, sugerindo modulação a favor do parasito, ao passo que este usa dos mecanismos imunometabólicos do hospedeiro para sobreviver.

## 6 CONCLUSÕES

Em nosso modelo experimental foram observadas características idênticas a fase crônica da LV humana, a saber: esplenomegalia, aumento da carga parasitária no baço e redução dos níveis de plaquetas, creatinina, alteração das transaminases, colesterol e triglicerídeos. Além disso, a infecção por *L. infantum* induziu síntese de eicosanoides no baço e fígado dos hamsters, com o predomínio da produção de mediadores lipídicos da classe HETE. A síntese destes lipídios bioativos foi correlacionada com a carga parasitária, formação de granulomas e com as alterações histológicas tecido específica. Contudo, maiores investigações são necessárias para compreender o papel dos HETEs em sistemas biológicos e sua participação no contexto da LV.

### DISCUSSÃO GERAL

A leishmaniose é uma das doenças tropicais negligenciadas, causada pelo protozoário *Leishmania*. As diferentes espécies de *Leishmania* se associam a diferentes sintomas da doença, que são distinguidas pela localização e gravidade do tecido infectado, e incluem leishmaniose cutânea (LC), mucocutânea (LM) e visceral (LV) (LESANI et al., 2022). Os tratamentos para as leishmanioses são limitados e muitas vezes há necessidade de aumentos na dose e na duração do tratamento, levando a efeitos adversos agravados, como danos renais, problemas cardíacos e hepáticos (LESANI et al., 2022). Neste contexto, o estudo do metabolismo lipídico tem grande relevância para a identificação de novos alvos para tratamentos mais eficazes contra as leishmanioses, visto que uma série de alterações lipídicas ocorrem tanto nos protozoários (TAVARES et al., 2021) quanto no hospedeiro (PARAB; MCCALL, 2021).

*Leishmania* modula o metabolismo do hospedeiro para favorecer seu próprio crescimento. Sobre as alterações no metabolismo lipídico, demonstramos que os CLs de *Leishmania* são locais de armazenamento e metabolismo de lipídios bioativos e que é possível realizar a modulação da formação de CLs, assim como a produção de eicosanoides pelo uso exógeno de ácidos graxos poliinsaturados, mas que a dinâmica de modulação varia a depender da espécie de *Leishmania* envolvida. Sabe-se que os CL dos protozoários *Leishmania* sintetizam  $PGF_{2\alpha}$  (ARAÚJO-SANTOS et al., 2014b) e possuem maquinaria enzimática para produção de lipídios bioativos como GP63 (ESTRADA-FIGUEROA et al., 2018) e PGFS. Comparação *in silico* de GP63 e PGFS revelou similaridade entre essas enzimas de acordo com a forma clínica da doença e, de fato, alguns estudos em humanos mostraram produção alterada de mediadores lipídicos dependendo da forma cutânea ou visceral da doença (ARAÚJO-SANTOS et al., 2017; MALTA-SANTOS et al., 2020b). Também demonstramos que o aumento da expressão de PGFS durante a diferenciação do parasito pode influenciar a

virulência de formas infecciosas de *Leishmania spp.* e que houve indução da produção de mediadores HETEs nos parasitos, no entanto, pouco se sabe sobre o papel desempenhado por esses metabólitos durante o processo de interação parasita-hospedeiro e a identificação de receptores poderiam elucidar mecanismos de patogenicidade.

Considerando a gravidade da forma visceralizante da leishmaniose (F. et al., 2018), é importante identificar potenciais alvos lipídicos para novas terapias (ARAÚJO-SANTOS et al., 2017; MALTA-SANTOS et al., 2020b). Os mecanismos de defesa, síntese de metabólitos, entre outras características inerentes às células hospedeiras são cruciais na complexa relação com *Leishmania* (KAYE; SCOTT, 2011). Sabe-se também que este protozoário altera o metabolismo lipídico do hospedeiro (KAYE; SCOTT, 2011; MARTÍNEZ; RUIZ, 2019), no entanto, estudos sobre o perfil lipídico alterado sistemicamente e em órgãos alvo durante na fase crônica da doença são escassos. Desse modo, nosso estudo demonstrou alterações da síntese de eicosanoides no plasma, baço e fígado de hamsters. Observamos, principalmente, indução dos mediadores da classe HETE, que foram positivamente correlacionados com a carga parasitária, formação de granulomas e com as alterações histopatológicas tecido específicas (baço: hipoplasia da polpa branca e perisplenite/ fígado: hiperplasia de células de Kupffer). Isso pode sugerir uma modulação que contribui para a cronicidade da infecção. Também é possível que esses eicosanoides elevados sejam derivados dos parasitos. Portanto, evidenciamos aqui a produção dos eicosanoides HETEs por parasitos do gênero *Leishmania* e em tecidos específicos do hospedeiro, deixando ainda em aberto o papel dos eicosanoides HETEs na interação hospedeiro-*Leishmania*. A identificação de receptores HETEs, assim como a geração de parasitos e/ou hospedeiros experimentais nocautes para o gene responsável pela síntese destes eicosanoides são perspectivas que podem contribuir para elucidar a atuação dos HETEs e por quais mecanismos estes modulam a infecção e progressão das leishmanioses.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As gotículas lipídicas de diferentes protozoários patogênicos não são simplesmente locais de armazenamento de lipídios, são organelas dinâmicas e especialmente importantes para que o parasita funcione no contexto de interação com a célula hospedeira. Estudos genômicos, proteômicos e lipidômicos de protozoários ainda são necessários para estabelecer as funções desempenhadas por essas organelas. A compreensão do metabolismo de lipídios bioativos e o papel dos CLs de protozoários nesse contexto, podem ajudar a identificar potenciais alvos para o desenvolvimento de drogas antiparasitárias baseados na biologia celular de protozoários patogênicos. Além dos parasitos, a modulação do metabolismo lipídico do hospedeiro também é descrita como uma nova abordagem para o tratamento de doenças tropicais negligenciadas. Nossos achados mostram que a infecção por *L. infantum* levou a alterações na síntese de eicosanoides sistêmico e tecidual, e que tais modificações estão correlacionadas com a gravidade da doença. Contudo, mais estudos são necessários para determinar o porquê dessas alterações, os potenciais biomarcadores para o diagnóstico de LV, assim como, podem nos levar a encontrar tratamentos mais eficazes para aumentar a tolerância ou resistência do hospedeiro na LV.

## REFERÊNCIAS

- ALLEN, P. E.; MARTINEZ, J. J. Modulation of host lipid pathways by pathogenic intracellular bacteria. **Pathogens**, v. 9, n. 8, p. 1–22, 2020.
- ALMEIDA, V. et al. Hematological changes in dogs with visceral leishmaniasis are associated with increased ifn- $\gamma$  and tnf gene expression levels in the bone marrow. **Microorganisms**, v. 9, n. 8, 2021.
- ALVES-FERREIRA, E. V. C. et al. Leishmania braziliensis prostaglandin F $2\alpha$  synthase impacts host infection. **Parasites and Vectors**, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2020.
- AMORIM, N. R. T. et al. Leptin elicits LTC $4$  synthesis by eosinophils mediated by sequential two-step autocrine activation of CCR3 and PGD2 receptors. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. SEP, p. 1–11, 2018.
- ARAÚJO-SANTOS, T. et al. Prostaglandin E $2$ /Leukotriene B $4$  balance induced by Lutzomyia longipalpis saliva favors Leishmania infantum infection. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2014a.
- ARAÚJO-SANTOS, T. et al. Role of prostaglandin F $2\alpha$  production in lipid bodies from Leishmania infantum chagasi: Insights on virulence. **Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 12, p. 1951–1961, 2014b.
- ARAÚJO-SANTOS, T. et al. Anti-parasite therapy drives changes in human visceral leishmaniasis-associated inflammatory balance. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.
- ASHTON, A. W. et al. Thromboxane A $2$  is a key regulator of pathogenesis during Trypanosoma cruzi infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 4, p. 929–940, 2007.
- ATAYDE, V. D. et al. Leishmania exosomes and other virulence factors : Impact on innate immune response and macrophage functions. **Cellular Immunology**, v. 309, p. 7–18, 2016.
- BARLETTA, A. B. F. et al. Emerging role of lipid droplets in Aedes aegypti immune response against bacteria and Dengue virus. **Scientific Reports**, v. 6, n. February, p. 1–13, 2016.
- BARRAL, A. J. C. Leishmanias E a Leishmaniose Tegumentar Nas Américas. v. 01, p. 91–94; 103- 107;115- 119., 2011.
- BONYEK-SILVA, I. et al. Unbalanced production of LTB $4$ /PGE $2$  driven by diabetes increases susceptibility to cutaneous leishmaniasis. **Emerging Microbes and Infections**, v. 9, n. 1, p. 1275–1286, 2020.
- BOSCH, M. et al. Mammalian lipid droplets are innate immune hubs integrating cell metabolism and host defense. **Science**, v. 370, n. 6514, 2020.
- BOSCH, M. et al. Lipid droplets and the host–pathogen dynamic: Fatal attraction? **Journal of Cell Biology**, v. 220, n. 8, p. 1–18, 2021.

BOZZA, P. T. et al. Lipid body function in eicosanoid synthesis: An update. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 85, n. 5, p. 205–213, 2011.

BOZZA, P. T.; MAGALHÃES, K. G.; WELLER, P. F. Leukocyte lipid bodies - biogenesis and functions in inflammation. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1791, n. 6, p. 540–551, 2009.

BRITTINGHAM, A.; MORRISON, C. J. Role of the Leishmania surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **The Journal of Immunology**, v. 6, n. 155, p. 3102–3111, 1995.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.

CECÍLIO, P.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; OLIVEIRA, F. Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with Leishmania parasites. **Communications Biology**, v. 5, n. 1, 2022.

CHAOQUN YAO, YANI CHEN, BAYAN SUDAN, JONH E. DONELSON, M. E. W. Leishmania chagasi: Homogenous metacyclic promastigotes isolated by buoyant density are highly virulent in a mouse model. **Exp Parasitol.**, v. 118, n. 1, p. 129–133, 2008.

COLAS, R. A. ETAL. Trypanosoma cruzi Produces the Specialized Proresolving Mediators Resolvin D1, Resolvin D5, and Resolvin E2. **Infect Immun.**, v. 86, p. 1–10, 2018.

COUTINHO-ABREU IV, ORISTIAN J, D. et al. Binding of Leishmania infantum Lipophosphoglycan to the Midgut Is Not Sufficient To Define Vector Competence in Lutzomyia longipalpis Sand Flies. **mSphere**, n. August, p. 1–16, 2020.

DA SILVA GOMES DIAS, S. et al. Lipid droplets fuel SARS-CoV-2 replication and production of inflammatory mediators. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 12, p. 1–19, 2020.

DA SILVA LIRA FILHO, A. et al. Leishmania Exosomes/Extracellular Vesicles Containing GP63 Are Essential for Enhance Cutaneous Leishmaniasis Development Upon Co-Inoculation of Leishmania amazonensis and Its Exosomes. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. February, p. 1–14, 2022.

DA SILVA MARQUES, P. et al. Eosinophils increase macrophage ability to control intracellular Leishmania amazonensis infection via PGD2 paracrine activity in vitro. **Cellular Immunology**, v. 363, n. February, p. 4–9, 2021.

DA SILVA VIEIRA, T. et al. Leishmania braziliensis: Strain-Specific Modulation of Phagosome Maturation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. September, p. 1–12, 2019.

DAS, S.; SAHA, T.; SHAHA, C. Tissue/Biofluid Specific Molecular Cartography of Leishmania donovani Infected BALB/c Mice: Deciphering Systemic Reprogramming. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. July, p. 1–15, 2021.

DAWA, S. et al. Inhibition of Granuloma Triglyceride Synthesis Imparts Control of Mycobacterium tuberculosis Through Curtailed Inflammatory Responses. **Frontiers in**

**Immunology**, v. 12, n. September, p. 1–16, 2021.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in Leishmania infectivity. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1455, n. 2–3, p. 341–352, 1999.

DÍAZ-GANDARILLA, A. et al. Biochimie Leishmania mexicana gp63 is the enzyme responsible for cyclooxygenase ( COX ) activity in this parasitic protozoa Ver o. v. 151, 2018.

DORES MOREIRA, N. DAS et al. Clinical, hematological and biochemical alterations in hamster (*Mesocricetus auratus*) experimentally infected with *Leishmania infantum* through different routes of inoculation. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2016.

DOS-SANTOS, W. L. C. et al. A case of conventional treatment failure in visceral leishmaniasis: Leukocyte distribution and cytokine expression in splenic compartments. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 1–7, 2014.

ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Organ-specific immune responses associated with infectious disease. **Immunology Today**, v. 21, n. 2, p. 73–78, 2000.

ESTRADA-FIGUEROA, L. A. et al. Leishmania mexicana gp63 is the enzyme responsible for cyclooxygenase (COX) activity in this parasitic protozoa. **Biochimie**, v. 151, p. 73–84, 2018.

F., A. et al. Recent Development of Visceral Leishmaniasis Treatments: Successes, Pitfalls, and Perspectives. **Clinical microbiology reviews**, v. 31, n. 4, p. 1–30, 2018.

FARESE, R. V.; WALTHER, T. C. Lipid Droplets Finally Get a Little R-E-S-P-E-C-T. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 855–860, 2009.

FAVORETTO SM; SEABRA DI; OLIVATO MCM. Guia de eutanásia para animais de ensino e pesquisa. **Unifesp**, p. 1–51, 2019.

FLECKNELL, P. et al. **Preanesthesia, Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia**. Third Edit ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2015.

FONG, D.; CHANG, K. P. Surface antigen change during differentiation of a parasitic protozoan, *Leishmania mexicana*: Identification by monoclonal antibodies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 23 I, p. 7366–7370, 1982.

FORESTIER, C.-L. Imaging host – Leishmani a interactions: significance in visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, n. June, p. 256–266, 2013.

FORESTIER, C. L.; GAO, Q.; BOONS, G. J. Leishmania lipophosphoglycan: How to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, n. January, p. 1–7, 2014.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 3–4, p. 214–221, 2006.

FRANCO, L. H.; BEVERLEY, S. M.; ZAMBONI, D. S. Innate immune activation and

subversion of mammalian functions by *Leishmania* lipophosphoglycan. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, 2012.

FROMMEL, T. O. et al. The major surface glycoprotein (GP63) is present in both life stages of *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 38, n. 1, p. 25–32, 1990.

GHOSH, J. et al. Human visceral leishmaniasis: Decrease in serum cholesterol as a function of splenic parasite load. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 105, n. 3, p. 267–271, 2011.

GUIJAS, C. et al. Phospholipase A2 regulation of lipid droplet formation. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1841, n. 12, p. 1661–1671, 2014.

HAG, I. A. EL et al. Liver morphology and function in visceral leishmaniasis (Kala-azar). **Journal of Hepatology**, p. 547–551, 1994.

HARHAY, M. O. et al. Who is a typical patient with visceral leishmaniasis? Characterizing the demographic and nutritional profile of patients in Brazil, East Africa, and South Asia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 4, p. 543–550, 2011.

HARRIS, S. G. et al. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 3, p. 144–150, 2002.

HERMIDA, M. D. E. R. et al. Histological Disorganization of Spleen Compartments and Severe Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, n. November, p. 394, 2018.

IVENS, A. C. et al. The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 436–442, 2006.

JESUS-SANTOS, F. H. et al. LPG2 Gene Duplication in *Leishmania infantum*: A Case for CRISPR-Cas9 Gene Editing. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. August, p. 1–11, 2020.

JIMÉNEZ-ANTÓN, M. D. et al. Efficient infection of hamster with *Leishmania donovani* by retro-orbital inoculation. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 711–718, 2019.

JOSHI, P. B. et al. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 33–40, 2002.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.

LACOMBLE, S. et al. Three-dimensional cellular architecture of the flagellar pocket and associated cytoskeleton in trypanosomes revealed by electron microscope tomography. **Journal of Cell Science**, v. 122, n. 8, p. 1081–1090, 2009.

LAL, C. S. et al. Hypertriglyceridemia: a possible diagnostic marker of disease severity in visceral leishmaniasis. **Infection**, v. 44, n. 1, p. 39–45, 2016.

- LÁZARO-SOUZA, M. et al. Leishmania infantum lipophosphoglycan-deficient mutants: A tool to study host cell-parasite interplay. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. APR, p. 1–10, 2018.
- LESANI, M. et al. Impact of Visceral Leishmaniasis on Local Organ Metabolism in Hamsters. **Metabolites**, v. 12, n. 9, 2022.
- LIBEROPOULOS, E. N. et al. Visceral leishmaniasis is associated with marked changes in serum lipid profile. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 44, n. 8, p. 719–727, 2014.
- LIMA, I. S. et al. Severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs with disruption of the splenic white pulp. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.
- LIMA, I. S. et al. Assessment of histological liver alterations in dogs naturally infected with Leishmania infantum. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 2019.
- LIMA, J. B. et al. Leishmania infantum lipophosphoglycan induced-Prostaglandin E2 production in association with PPAR- $\gamma$  expression via activation of Toll like receptors-1 and 2. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.
- LOEUILLET, C.; BAÑULS, A. L.; HIDE, M. Study of Leishmania pathogenesis in mice: Experimental considerations. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2016.
- MALAFAIA, G. Protein-energy malnutrition as a risk factor for visceral leishmaniasis: A review. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 10, p. 587–596, 2009.
- MALTA-SANTOS, H. et al. Resolvin D1 drives establishment of Leishmania amazonensis infection. **Scientific Reports**, v. 7, n. April, p. 1–8, 2017.
- MALTA-SANTOS, H. et al. Multi-omic Analyses of Plasma Cytokines, Lipidomics, and Transcriptomics Distinguish Treatment Outcomes in Cutaneous Leishmaniasis. **iScience**, v. 23, n. 12, 2020a.
- MALTA-SANTOS, H. et al. Multi-omic Analyses of Plasma Cytokines, Lipidomics, and Transcriptomics Distinguish Treatment Outcomes in Cutaneous Leishmaniasis. **iScience**, v. 23, n. 12, p. 1–14, 2020b.
- MANN, S. et al. A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 8, n. 2, p. 121–132, 2021.
- MANSURI, R.; SINGH, J.; DIWAN, A. An Insight into the Current Perspective and Potential Drug Targets for Visceral Leishmaniasis (VL). **Current Drug Targets**, v. 21, n. 11, p. 1105–1129, 2020.
- MARQUIS, J. F.; GROS, P. Intracellular Leishmania: your iron or mine? **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 93–95, 2007.
- MARTÍNEZ, C. R.; RUIZ, C. J. Alterations in Host Lipid Metabolism Produced During Visceral Leishmaniasis Infections. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 6, n. 4, p. 250–255, 2019.

- MATLASHEWSKI, G. Leishmania infection and virulence. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 190, n. 1–2, p. 37–42, 2001.
- MATTE, C. et al. Leishmania major Promastigotes Evade LC3- Associated Phagocytosis through the Action of GP63. **PLoS Pathogens**, p. 1–17, 2016.
- MATTE, C. et al. Leishmania donovani Metacyclic Promastigotes Impair Phagosome Properties in Inflammatory Monocytes. **Infect and Immun**, v. 89, n. 7, p. 1–14, 2021.
- MCGWIRE, B. S. et al. Extracellular Release of the Glycosylphosphatidylinositol ( GPI ) - linked Leishmania Surface Metalloprotease , gp63 , Is Independent of GPI Phospholipolysis. v. 277, n. 11, p. 8802–8809, 2002.
- MCGWIRE, B. S.; CHANG, K.; ENGMAN, D. M. Migration through the Extracellular Matrix by the Parasitic Protozoan. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 2, p. 1008–1010, 2003.
- MELBY, P. C. et al. Leishmania donovani: Evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. **Experimental Parasitology**, v. 99, n. 1, p. 17–25, 2001.
- MELO, C. V. B. DE et al. Phenotypical Characterization of Spleen Remodeling in Murine Experimental Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. April, p. 1–13, 2020.
- MELO, R. C. N. et al. Lipid droplets in leukocytes: Organelles linked to inflammatory responses. **Exp Cell Res**, v. 340, n. 2, p. 193–197, 2016.
- MIURA, S. et al. Functional conservation for lipid storage droplet association among perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, Drosophila, and Dictyostelium. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 35, p. 32253–32257, 2002.
- MONSON, E. A. et al. Intracellular lipid droplet accumulation occurs early following viral infection and is required for an efficient interferon response. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 2020.
- MUKHERJEE, S. et al. Identification of a functional prostanoid-like receptor in the protozoan parasite, Trypanosoma cruzi. **Parasitol Res.**, v. 112, n. 4, p. 1417–1425, 2013.
- MULE, S. N. et al. Protein glycosylation in: Leishmania spp. **Molecular Omics**, v. 16, n. 5, p. 407–424, 2020.
- MURRAY, H. W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 82, n. 5, p. 249–267, 2001.
- NIETO, A. et al. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 39, 2011.
- NOLAN, S. J. et al. Lipids Affect the Cryptococcus neoformans-Macrophage Interaction and Promote Nonlytic Exocytosis. **Infect Immun**, v. 85, n. 12, p. 1–18, 2017.
- OGBADOYI, EMMANUEL O., D. R. R. AND K. G. A High-Order Trans-Membrane Structural Linkage Is Responsible for Mitochondrial Genome Positioning and Segregation by

Flagellar Basal Bodies in Trypanosomes □. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, p. 1769–1779, 2003.

OLIVEIRA, M. J. C. et al. Risk factors for acute kidney injury in visceral leishmaniasis (Kala-Azar). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 3, p. 449–453, 2010.

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: A signaling point of view. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 2, p. 293–305, 2005.

OLZMANN, J. A.; CARVALHO, P. Dynamics and functions of lipid droplets. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 3, p. 137–155, 2019.

PAHO. **Manual of procedures for surveillance and control of leishmaniasis in the Americas**. [s.l: s.n.].

PAHO. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas. **Intitutional Repository for Information Sharing**, n. 10, p. 10, 2021.

PALOQUE, L. et al. Polyunsaturated fatty acid metabolites: Biosynthesis in Leishmania and role in parasite/host interaction. **Journal of Lipid Research**, v. 60, n. 3, p. 636–647, 2019.

PARAB, A. R.; MCCALL, L. I. Tryp-ing up metabolism: Role of metabolic adaptations in kinetoplastid disease pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 89, n. 4, 2021.

PEACOCK, C. S. et al. Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease. **Nature Genetics**, v. 39, n. 7, p. 839–847, 2007.

PENNISI, M. G. et al. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–18, 2015.

PEREIRA-DUTRA, F. S. et al. Fat, fight, and beyond: The multiple roles of lipid droplets in infections and inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 106, n. 3, p. 563–580, 2019.

QIN, H. et al. Metabolic characterization and biomarkers screening for visceral leishmaniasis in golden hamsters. **Acta Tropica**, v. 225, n. 17, 2022.

QUINTELA-CARVALHO, G. et al. Leishmania infantum Defective in Lipophosphoglycan Biosynthesis Interferes With Activation of Human Neutrophils. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, n. April, p. 1–11, 2022.

RAMPAZZO, R. DE C. P. et al. A ready-to-use duplex qPCR to detect Leishmania infantum DNA in naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 246, n. September, p. 100–107, 2017.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–596, 2007.

RESENDE, L. A. et al. In vitro Infectivity of Strains Isolated From Dogs Naturally Infected With Leishmania infantum Present a Distinct Pathogenic Profile in Hamsters. **Frontiers in**

**Medicine**, v. 7, n. August, p. 1–11, 2020.

ROUAULT, E. et al. Imaging visceral leishmaniasis in real time with golden hamster model: Monitoring the parasite burden and hamster transcripts to further characterize the immunological responses of the host. **Parasitology International**, v. 66, n. 1, p. 933–939, 2017.

RUIZ-POSTIGO, J. A. et al. Global leishmaniasis surveillance: 2019-2020, a baseline for the 2030 roadmap. **World Health Organization**, v. 35, p. 19, 2021.

SACKS, D. L. et al. The role of phosphoglycans in Leishmania-sand fly interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 1, p. 406–411, 2000.

SACKS, D. L. Leishmania-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. **Cellular Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 189–196, 2001.

SAINI, S.; RAI, A. K. Hamster, a close model for visceral leishmaniasis: Opportunities and challenges. **Parasite Immunology**, v. 42, n. 10, p. 1–11, 2020.

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, 2017.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581–592, 2016.

SEMINI, G. et al. Changes to cholesterol trafficking in macrophages by Leishmania parasites infection. **MicrobiologyOpen**, v. 6, n. 4, p. 1–13, 2017.

SEREZANI, C. H. et al. Leukotrienes Are Essential for the Control of Leishmania amazonensis Infection and Contribute to Strain Variation in Susceptibility. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 5, p. 3201–3208, 2006.

SERHAN, C. N.; LEVY, B. D. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 7, p. 2657–2669, 2018.

SINGH, N. et al. Age-influenced population kinetics and immunological responses of Leishmania donovani in hamsters. **Parasitology Research**, v. 101, n. 4, p. 919–924, 2007.

SOLCÀ, M. D. S. et al. Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.

SORGI, C. A. et al. Data descriptor: Comprehensive high-resolution multiple-reaction monitoring mass spectrometry for targeted eicosanoid assays. **Scientific Data**, v. 5, p. 1–12, 2018.

SPECTOR, A. A.; GORDON, J. A.; MOORE, S. A. Hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs). **Progress in Lipid Research**, v. 27, n. 4, p. 271–323, 1988.

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: From textbook descriptions to biological understanding. **Open Biology**, v. 7, n. 9, 2017.

TANS, R. et al. Mass spectrometry imaging identifies altered hepatic lipid signatures during experimental Leishmania donovani infection. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. July, p. 1–14, 2022.

TAVARES, N. M. et al. Understanding the mechanisms controlling leishmania amazonensis infection in vitro: The role of LTB<sub>4</sub> derived from human neutrophils. **Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 4, p. 656–666, 2014.

TAVARES, V. D. S. et al. Lipid droplets from protozoan parasites: Survival and pathogenicity. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 116, n. 6, 2021. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/mioc/a/QKrmYSTpbNbr7xCcSJPfKR/?lang=en&format=pdf>>.

TRAVI, B. L. et al. Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with Leishmania spp. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 5, p. 2288–2296, 2002.

TURCO, S. J.; DESCOTEAUX, A. The Lipophosphoglycan of Leishmania Parasites. **Annual Review of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 65–92, 1992.

VAN MEER, G.; VOELKER, D. R.; FEIGENSON, G. W. Membrane lipids: Where they are and how they behave. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 112–124, 2008.

VERESS, B.; OMER, A.; SATIR, A. A. Morphology of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis. **Immunology**, v. 33, p. 605–610, 1977.

WEGNER, K. M. et al. Parasites and individual major histocompatibility complex diversity - An optimal choice? **Microbes and Infection**, v. 6, n. 12, p. 1110–1116, 2004.

WHO. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. **World Health Organization**, p. 1–184, 2010.

WHO. Leishmaniasis. **WHO Institutional Repository**, n. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>, p. Acesso em 2022, 2018.

WILFLING, F. et al. Growth by Relocalizing from the ER to Lipid Droplets. **Developmental Cell**, v. 24, n. 4, p. 384–399, 2013.

YANG, X. et al. Schistosoma japonicum Infection Leads to the Reprogramming of Glucose and Lipid Metabolism in the Colon of Mice. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, n. March, p. 1–10, 2021.

ZACARIAS, D. A. et al. Causes and consequences of higher Leishmania infantum burden in patients with kala-azar: a study of 625 patients. **Tropical Medicine and International Health**, v. 22, n. 6, p. 679–687, 2017.