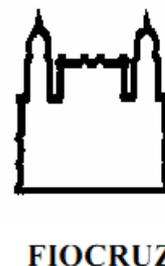




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PAPEL DO FATOR DE ATIVAÇÃO DE PLAQUETAS NA INFECÇÃO DE
MACRÓFAGOS POR *LEISHMANIA INFANTUM* E IDENTIFICAÇÃO DE
UMA PAF-ACETILHIDROLASE NO PARASITA.**

VINICIUS COSTA SOUZA FERREIRA

Salvador-Bahia

2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**PAPEL DO FATOR DE ATIVAÇÃO DE PLAQUETAS NA
INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR *LEISHMANIA*
INFANTUM E IDENTIFICAÇÃO DE UMA
PAF-ACETILHIDROLASE NO PARASITA.**

VINICIUS COSTA SOUZA FERREIRA

Orientadora: Prof^a Dra. Aldina Barral
Co-orientador: Dr. Petter Franco Entringer

Dissertação apresentada ao
Colegiado do Curso de Pós
Graduação em Patologia Humana,
para obtenção do título de Mestre.

**Salvador – Bahia
2014**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Ferreira, Vinicius Costa Souza

F383p Papel do fator de ativação de plaquetas na infecção de macrófagos por
Leishmania infantum e identificação de uma Paf-acetilhidrolase no parasita.

/ Vinicius Costa Souza Ferreira. - 2014.

77f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof^a Dra. Aldina Barral, Laboratório de Imunoparasitologia.

Dissertação (Mestrado Patologia Humana) – Universidade federal da Bahia.

Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2014.

1. Fator de ativação de plaquetas. 2. PAF-acetilhidrolase. 3. Macrófago.4.
Leishmaniainfantum. I.Título.

CDU 616.993.161

PAPEL DO FATOR DE ATIVAÇÃO DE PLAQUETAS NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR *LEISHMANIA INFANTUM* E IDENTIFICAÇÃO DE UMA PAF-ACETILHIDROLASE NO PARASITA.

VINICIUS COSTA SOUZA FERREIRA

FOLHA DE APROVAÇÃO
COMISSÃO EXAMINADORA

Dra Patricia Tavares Veras
CPqGM-FIOCRUZ
Pesquisadora Titular

Dra Gyselle Chrystina Baccan
ICS – UFBA
Professora Associada

Dra. Aldina Barral
CPqGM-FIOCRUZ-BA
Pesquisadora Titular

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família pelo suporte emocional, à minha mãe Dagmar Alexandria e ao meu Pai Ednaldo Alexandria por me apoiarem em meus caminhos e a minha irmã Maiara Ferreira pelo carinho.

Agradeço aos meus amigos do CPqGM, em especial a Grazielle, Rômulo, Katrine, Marieta, Kleverton, Filip por tornarem a jornada mais prazerosa.

Aos colegas do LIP/LIMI, em especial Fabiana, Rebecca, Nívea e Juqueline pelas ajudas nos experimentos. Agradeço também a Leonardo Arruda que me ajudou muito com os trabalhos de biologia molecular.

Aos meus colaboradores pelo suporte intelectual e ao CNPq, FAPESB e FIOCRUZ pelo suporte financeiro.

Aos meus orientadores, Dra. Aldina Barral por me acolher no LIP e tornar possível a realização deste trabalho, bem como ao Dr. Petter Entringer por me ensinar muito do que eu sei desde a iniciação científica. Serei sempre grato a todos!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE	12
1.2 MEDIADORES LIPÍDICOS	13
1.3 FATOR DE ATIVAÇÃO DE PLAQUETAS	17
1.4 FOSFOLIPASES A ₂ E PAF-ACETILHIDROLASE	20
2 HIPÓTESE	23
PAF diminui a infecção de macrófagos por <i>L. infantum</i> e o parasito possui uma enzima PAF-acetilhidrolase envolvida em sua virulência	23
3 OBJETIVOS	23
3.1 OBJETIVO GERAL	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 ANIMAIS	24
4.2 PARASITAS	24
4.3 REAGENTES	24
4.4 CÉLULAS	25
4.5 INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS COM <i>L. INFANTUM</i>	25
4.6 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR – MTT	26
4.7 DOSAGEM DE NO	26
4.8 CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>L. INFANTUM</i>	27
4.9 CLONAGEM DE PLA ₂ /PAF-ACETILHIDROLASE DE <i>L. INFANTUM</i>	27
4.10 EXPRESSÃO RECOMBINANTE DA PLA ₂ /PAF-ACETILHIDROLASE DE <i>L. INFANTUM</i>	28
4.11 FRACIONAMENTO SUBCELULAR DE <i>L. INFANTUM</i>	29
4.12 ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA A ₂ EM FRAÇÕES CELULARES E DA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE <i>L. INFANTUM</i>	30
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
5 DESENHO EXPERIMENTAL	32
6 RESULTADOS	34
PARTE I	34
6.1 EFEITO DE PAF SOBRE A INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS POR <i>L. INFANTUM</i>	34
6.2 DINÂMICA DA ATUAÇÃO DE PAF	38
6.3 PAPEL DO PAFR NO EFEITO DE PAF NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR <i>L. INFANTUM</i>	40
6.4 EFEITO DE ANTAGONISTAS DE PAF SOBRE A INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR <i>L. INFANTUM</i>	42
6.5 EFEITO DE PAF NA VIABILIDADE DOS MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS SELVAGENS E PAFR ^{-/-}	44
6.6 EFEITO DE PAF NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	46
6.7 EFEITO DE PAF SOBRE O CRESCIMENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. INFANTUM</i> EM CULTURA	48
PARTE II	49
6.8 IDENTIFICAÇÃO E CLONAGEM E DE UMA POSSÍVEL FOSFOLIPASE A ₂ DE <i>L. INFANTUM</i>	49
6.9 EXPRESSÃO DA POSSÍVEL PAF-ACETILHIDROLASE DE <i>L. INFANTUM</i>	52
6.10 ATIVIDADE PAF-ACETILHIDROLASE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i>	54
6.11 ATIVIDADE PAF - ACETILHIDROLASE EM FRAÇÕES CELULARES DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i>	56
7 DISCUSSÃO	58
8 CONCLUSÕES	66
9 REFERÊNCIAS	67

LISTA DE ABREVIATURAS

- AA Ácido araquidônico
- ATP Adenosina trifosfato
- COX Ciclooxigenase
- CXCL1 “*Chemokine (C-X-C motif) ligand 1*”
- CXCL2 “*Chemokine (C-X-C motif) ligand 2*”
- DMSO Dimetilsulfóxido
- EGTA “*ethylene glycol tetraacetic acid*”
- ERK “*extracellular-signal-regulated kinases*”
- GFP Proteína verde fluorescente
- GMCSF “*granulocyte/macrophage colony stimulating factor*”
- IFN γ Interferon gamma
- IL-1 Interleucina 1
- IL-10 Interleucina 10
- IL-12 Interleucina 12
- IL-4 Interleucina 4
- IL-6 Interleucina 6
- IL-8 Interleucina 8
- iNOS Óxido nítrico sintase induzida
- LB “*Lipid body*”
- LPS Lipopolisacarídeo
- LT Leucotrieno
- LTB $_4$ Leucotrieno B $_4$
- LV Leishmaniose visceral
- MAPK “*Mitogen-activated protein kinases*”
- NETS “*neutrophil extracellular traps*”
- NF- κ B Fator de transcrição nuclear kappa B
- NO “*Nitric oxide*”
- PAF Fator de ativação de plaquetas
- PAF-AH PAF acetilhidrolase
- PAFR Receptor do fator de ativação de plaquetas

- PCR *"Polymerase Chain Reaction"*
- PG Prostaglandina
- PGE₂ Prostaglandina E₂
- PGF_{2α} Prostaglandina F_{2α} sintase
- PKC *"Protein kinase C"*
- PLA₂ Fosfolipase A₂
- SDS *"Sodium dodecyl sulfate"*
- Th1 *"T helper type 1"*
- Th2 *"T helper type 2"*
- TLR-4 *"Tool like receptor 4"*
- TNF-α Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via biosintética de eicosanóides e PAF.	15
Figura 2. Efeito de PAF na infecção de macrófagos murinos por <i>L. infantum</i> .	35
Figura 3. Efeito de PAF na carga parasitária de macrófagos infectados por <i>L. infantum</i> .	37
Figura 4. Dinâmica do efeito de PAF na infecção de macrófagos por <i>L. infantum</i> .	39
Figura 5. Efeito do PAF na infecção de macrófagos PAFR ^{-/-} por <i>L. infantum</i> .	40
Figura 6. Efeito de PAF na carga parasitária de macrófagos PAFR ^{-/-} infectados por <i>L. infantum</i> .	41
Figura 7. Efeito dos antagonistas de PAF sobre a infecção de macrófagos por <i>L. infantum</i> .	43
Figura 8. Efeito de PAF sobre a viabilidade de macrófagos.	45
Figura 9. Efeito de PAF sobre a produção de Óxido Nítrico.	47
Figura 10. Efeito de PAF sobre o crescimento de formas promastigotas de <i>L. infantum</i> em cultura.	48
Figura 11. Sequência gênica da PLA ₂ /PAF-AH de <i>L. infantum</i> .	50
Figura 12. Alinhamento protéico de PLA ₂ /PAF-AH.	51
Figura 13. Expressão de uma possível PAF-acetilhidrolase de <i>L. infantum</i> .	53
Figura 14. Atividades PAF- AH da proteína recombinante de <i>L. infantum</i> .	55
Figura 15. Atividade PAF – AH em frações celulares de <i>L. infantum</i> .	57

FERREIRA, Vinicius Costa Souza. Papel do Fator de Ativação de Plaquetas na infecção de macrófagos por *Leishmania infantum* e identificação de uma PAF-acetilhidrolase no parasita. 77 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

RESUMO

A leishmaniose visceral é causada pelo parasita *Leishmania infantum*. A infecção ocorre quando flebotomos infectados se alimentam na derme do hospedeiro vertebrado, inoculando o parasita. A infecção produz uma resposta com diversas moléculas inflamatórias, como os mediadores lipídicos. O fator de ativação de plaquetas (PAF) é um potente mediador lipídico derivado de um lisofosfolípido. PAF participa da fisiologia normal da célula e possui um perfil pró-inflamatório. A participação de mediadores lipídicos, como eicosanóides e PAF, já foi identificada na imunopatogênese das leishmanioses. PAF gerado pelo hospedeiro tem efeito leishmanicida e de controle da infecção por *L. amazonensis*. PAF-acetilhidrolases (PAF-AH) são fosfolipases A_2 que hidrolisam PAF e foi demonstrado que PAF-AH podem ser um fator de virulência devido a essa habilidade. O objetivo desse estudo foi avaliar o papel do PAF e de uma PAF-AH na infecção de macrófagos por *L. infantum*. Foi observado que PAF 1 μ M, quando adicionado durante e após a infecção, foi capaz de diminuir 50% da infecção após 72 horas, bem como a viabilidade dos parasitas dentro dos macrófagos num mecanismo independente do seu receptor PAFR e da produção de óxido nítrico. PAF 10 μ M interrompeu o crescimento de promastigotas de *L. infantum* em cultura axênica. Uma PAF-AH, com elevada identidade e semelhança com PLA2/PAF-AH de outros tripanossomatídeos, foi identificada no genoma de *L. infantum*. A clonagem e expressão recombinante produziu uma proteína de cerca de 69kDa, com atividade PAF-AH. Frações celulares do parasita, enriquecidas com estruturas de membrana também apresentaram atividade PAF-AH. Os resultados indicam que PAF é capaz de diminuir a infecção de macrófagos por *L. infantum* e que o parasita possui uma PAF-AH funcional possivelmente envolvida com sua virulência.

PALAVRAS CHAVE: Fator de ativação de plaquetas, PAF-acetilhidrolase, macrófago, *Leishmania infantum*.

FERREIRA, Vinicius Costa Souza. Role of platelet activating factor on macrophage infection by *leishmania infantum* and identification of a parasite paf-acetylhidrolase. 77 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is caused by *Leishmania infantum* parasites. Infection occurs when infected sandflies feed on vertebrate host skin delivering the parasite which survive, multiply and spread on the parasitophorous vacuoles of macrophages. The inflammatory response during the infection leads to the production of diverse bioactive molecules, as lipid mediators. The platelet activating factor (PAF) is a lipid mediator derived from a lysophospholipid. PAF has a role in normal cellular physiology, acting as proinflammatory molecule. The participation of some lipid mediators, as eicosanoids and PAF has been identified in leishmaniasis. PAF produced by the host is able to kill the parasite and control the infection by *L. amazonensis*. PAF-acetylhydrolases (PAF-AH) are phospholipases A₂ (PLA₂) that hydrolyse PAF, and possibly involved in pathogen virulence. The aim of this study was to evaluate the role of PAF on macrophages infection by *L. infantum* and identify a PAF-AH expressed by the parasite. PAF 1µM, added during and after the infection, was able to reduce approximately 50% of infection, as well as, the viability of parasites inside macrophages. Apparently this reduction occurs by an classical PAF receptor and nitric oxide production independent mechanism. PAF 10µM inhibited *L. infantum* promastigotes growing in axenic culture. A PAF-AH with high identity to PLA₂/PAF-AH of others trypanosomatids was identified in *L. infantum* genome. The cloning and recombinant expression produced a 69kDa protein with PAF-AH activity. Cellular fractions from parasites, with membrane structures also presented PAF-AH activity. The results suggest that PAF is able to decrease machophage infection by *L. infantum* witch has a functional PAF-AH possibly related to its virulence.

KEY WORDS: Platelet activating factor, PAF-acetylhydrolase, machophage, *Leishmania infantum*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE

A leishmaniose compreende um grupo de doenças causadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania* e transmitidas por insetos vetores da família *Phlebotomineae* (DESJEUX, 2004). Na América do Sul a Leishmaniose Visceral (LV) é causada principalmente pelos parasitas da espécie *Leishmania infantum*, até recentemente denominada *Leishmania chagasi*, e transmitida por insetos vetores da espécie *Lutzomyia longipalpis* (LAINSON; RANGEL, 2005).

A Organização Mundial da Saúde classifica as leishmanioses como doenças emergentes e negligenciadas. A doença é considerada endêmica em 98 países, com 1,3 milhões de novos casos por ano e cerca de 310 milhões de pessoas expostas ao risco de contrair a doença. No que diz respeito à epidemiologia da LV, 300 mil novos casos são registrados por ano sendo que quase 10% desses casos são letais (WHO, 2013). No Brasil 3 mil casos foram registrados entre 2005 e 2009, com 5,8% de letalidade (PELLISSARI et al., 2011).

O tratamento da LV recomendado pelo Ministério da Saúde no Brasil é Antimoniato de Meglumina (Glucantime) com opções de Anfotericina B Desoxicolato (Fungizome) e Anfotericina B Lipossomal (Ambisome) para casos específicos (MELO, DE; FORTALEZA, 2013). A ausência de uma vacina eficaz contra a doença tem incentivado pesquisas por antígenos que possam ser utilizados como possíveis candidatos vacinais (PALATNIK-DE-SOUSA, 2008). Além da procura por antígenos, a busca por estratégias terapêuticas alternativas para o tratamento também se faz necessária.

A transmissão da leishmaniose ocorre quando fêmeas de flebotomíneos infectadas com os parasitas fazem o repasto sanguíneo na superfície de hospedeiros vertebrados, liberando os parasitas em sua forma promastigota na derme do hospedeiro. O trauma causado pelo repasto sanguíneo causa uma resposta inflamatória atraindo células para o sítio de inoculação (DE ALMEIDA

et al., 2003; RIBEIRO, 1987). As formas promastigotas liberadas são internalizadas por células, como neutrófilos, células dendríticas ou macrófagos onde sobrevivem e diferenciam em formas amastigotas, tornando o hospedeiro infectado. Em um novo repasto sanguíneo as fêmeas de flebotomíneos se infectam com o sangue de hospedeiros vertebrados contendo células infectadas com o parasita em sua forma amastigota, dando início a um novo ciclo de infecção (BOGDAN et al., 2000; RITTIG; BOGDAN, 2000).

Apesar de infectar diversas células do sistema fagocítico, os macrófagos são as células hospedeiras preferenciais da leishmania. Dentro do macrófago, no vacúolo parasitóforo, o parasita é capaz de sobreviver e se multiplicar (LIU; UZONNA, 2012).

A picada do flebótomo e a presença do parasita induzem uma resposta inflamatória com recrutamento de leucócitos e produção de moléculas inflamatórias como citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos (MÜLLER et al., 2001; LAWRENCE et al., 2002). Em camundongos balb/c, um perfil de resistência à leishmaniose causada por *Leishmania major* está associado a uma resposta Th1 com a produção de IL-12 e IFN γ enquanto que camundongos susceptíveis apresentam um perfil de resposta Th2 com produção de IL-4 e IL-10 (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). Uma variedade de quimiocinas como IL-8, CXCL1 e CXCL2 também são produzidas, atuando principalmente no recrutamento celular (TEIXEIRA et al., 2006). A LV é caracterizada pela alta produção de IL-4, IL-10 e perda de função do IFN γ , tendo a IL-10 um importante papel na patologia da doença devido a sua capacidade imunossupressora que desativa macrófagos permitindo a sobrevivência do parasita (BHATTACHARYA; ALI, 2013).

1.2 MEDIADORES LIPÍDICOS

Mediadores lipídicos compõem uma classe de moléculas bioativas com natureza lipídica e podem ser classificados em 3 tipos: (i) eicosanóides derivados do ácido araquidônico, como as prostaglandinas e os leucotrienos, (ii) lisofosfolípidios, e (iii) os ácidos graxos poliinsaturados derivados do ω 3.

Essas moléculas estão envolvidas em vários processos fisiológicos e sua desregulação está associada a doenças inflamatórias, infertilidade, aterosclerose, isquemia, síndrome metabólica e câncer (MURAKAMI, 2011).

Nos estágios iniciais da inflamação, mediadores lipídicos com perfil pró-inflamatório são produzidos e contribuem no processo de vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de neutrófilos, enquanto que nos estágios tardios os mediadores lipídicos produzidos possuem um perfil anti-inflamatório, reduzindo o influxo de células ao local da lesão associado ao processo de resolução da inflamação (LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002).

Os mediadores lipídicos mais estudados são os eicosanóides. Estes mediadores são produzidos a partir do ácido araquidônico (AA) liberado de fosfolípidios de membrana sob a ação de uma fosfolipase A₂ (PLA₂). Ao ser liberado, o AA poderá ser metabolizado principalmente por duas classes de enzimas, as cicloxigenases (COX) e as lipoxigenases, dando origem a prostaglandinas (PG) e leucotrienos (LT) (Figura 1) (MILLER, 2006).

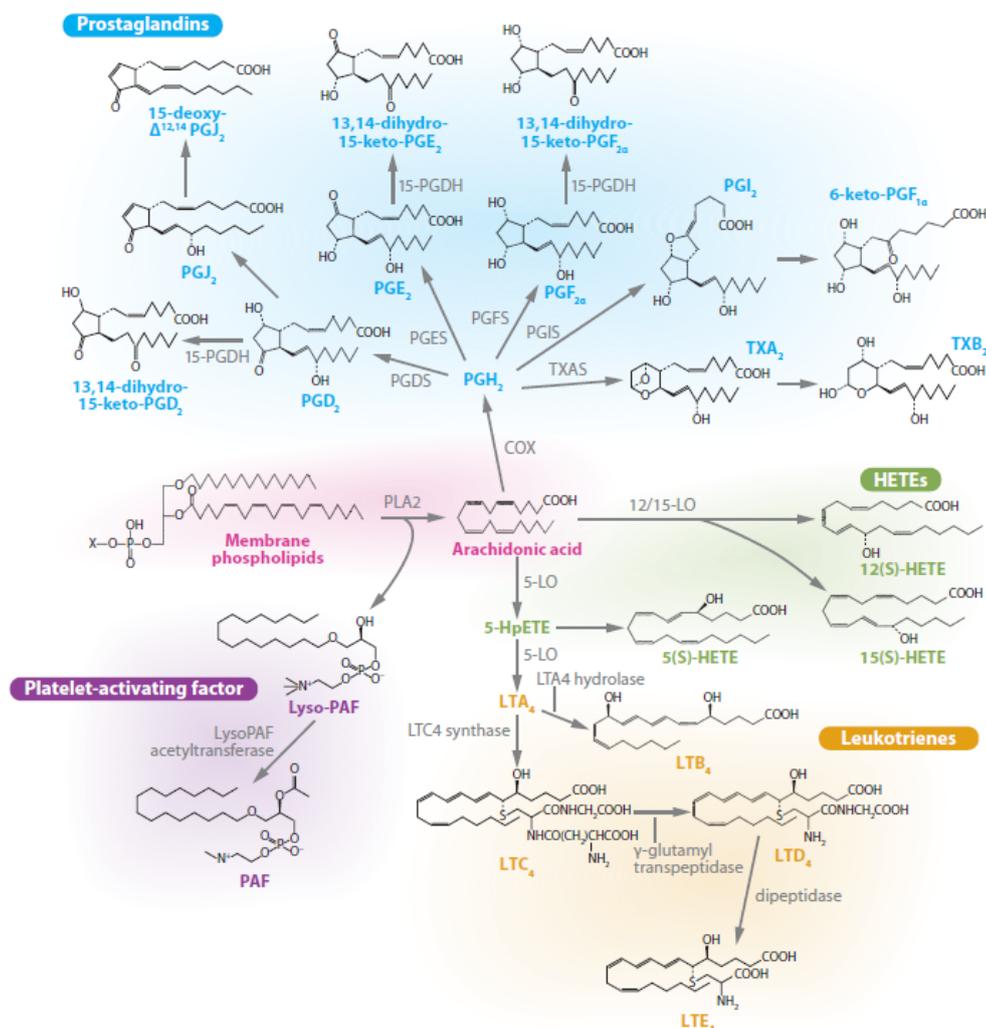


Figura 1. Via biosintética de eicosanóides e PAF (Adaptado de SHIMIZU, 2009).

As PGs são produzidas por diversos tipos celulares sob a ação das cicloxigenases levando a respostas como vasodilatação, vasoconstrição, quimiotaxia, febre e dor (MILLER, 2006), processos que fazem parte da resposta inflamatória. Os LTs são produzidos pelas lipoxigenases em células inflamatórias como leucócitos, macrófagos e mastócitos desencadeando quimiotaxia, adesão de leucócitos a células endoteliais, broncoconstrição e edema (SHIMIZU, 2009).

Prostaglandinas e leucotrienos também têm sido relacionadas às doenças infecciosas. No que diz respeito às leishmanioses, a produção de prostaglandinas tem sido associada a um perfil de susceptibilidade a infecção. Foi observado *in vitro* que células do baço e macrófagos infectados com *Leishmania donovani* produzem maiores quantidades de PGE₂ dependente da

expressão de COX-2 (REINER; MALEMUD, 1984; MATTE et al., 2001). PGE₂ exógeno foi capaz de aumentar a infecção *in vitro* de macrófagos por *Leishmania amazonensis* (LONARDONI et al., 1994) e o tratamento com indometacina, um inibidor de prostaglandinas, foi capaz de diminuir o tamanho das lesões e a carga parasitária em camundongos infectados com *L. amazonensis* (GUIMARÃES et al., 2006). A participação dos receptores de PGE₂, EP1, EP2, EP3 e EP4, foi avaliada e observou-se que durante a infecção de macrófagos com amastigotas de *Leishmania major* a expressão de EP1 e EP3 era regulada positivamente, enquanto que EP2 e EP4 era regulada negativamente. Também foi observado que a ativação de EP2 e EP4 com agonistas levou a diminuição da infecção, enquanto que a ativação de EP1 e EP3 levou ao aumento. De maneira semelhante, animais Balb/c tratados com agonistas de EP2 e EP4 tiveram menor carga parasitária, e animais tratados com antagonistas dos receptores EP1 e EP3 também tiveram a carga parasitária no linfonodo diminuída, mostrando papéis distintos dos receptores durante a infecção (PENKE et al., 2013).

Foi demonstrado que a saliva de *L. longipalpis* tem um papel importante nos momentos iniciais da infecção por leishmania, contribuindo para seu aumento (TITUS; RIBEIRO, 1988; NORSWORTHY et al., 2004; PRATES et al., 2011). Nosso grupo mostrou que a saliva de *L. longipalpis* é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos (LB) e produção de PGE₂ por macrófagos via COX-2 por uma via dependente da ativação de PKC e ERK (ARAÚJO-SANTOS et al., 2010). Recentemente, em outro trabalho foi observado que *L. infantum* também possui LBs e sua quantidade aumenta durante o ciclo de vida do parasita, da mesma forma que uma PGF_{2α} sintase. Além disso, um receptor para PGF_{2α} na superfície do vacúolo parasitóforo contribui para a infecção (ARAÚJO-SANTOS et al., 2014).

Assim como as prostaglandinas, os leucotrienos também são produzidos durante a infecção células mononucleares derivadas do baço por *L. donovani*, entretanto leucotrienos têm sido associados a um perfil de resistência à infecção (REINER; MALEMUD, 1984, 1985). Serezani e colaboradores (2006) demonstraram que um inibidor da 5-lipoxigenase foi capaz de aumentar a infecção por *L. amazonensis* indicando que os leucotrienos produzidos endogenamente são importantes no controle da infecção. Nesse mesmo

trabalho foi verificado que LTB₄ exógeno foi capaz de diminuir a infecção de macrófagos através da produção de óxido nítrico (NO) e que camundongos *knockout* para 5-lipoxigenase desenvolveram lesões maiores quando comparados com selvagens. Neutrófilos humanos infectados com *L. amazonensis* também liberam LTB₄ e este é importante para o controle da infecção nos momentos iniciais (TAVARES et al., 2014). Chaves e colaboradores (2014) mostraram que LTB₄ está envolvido na diminuição da carga de *L. amazonensis* em macrófagos tratados com ATP via seu receptor P2X7. Desta forma os mediadores lipídicos parecem desempenhar um importante papel durante a infecção por leishmania.

1.3 FATOR DE ATIVAÇÃO DE PLAQUETAS

O fator de ativação de plaquetas (PAF) é um mediador lipídico, descoberto na década de 1970, e considerado o primeiro lipídio com atividade biológica descrito (BENVENISTE et al., 1972; DEMOPOULOS et al., 1979), promovendo agregação plaquetária e ativação de leucócitos (PRESCOTT et al., 2000). Diferente dos eicosanóides, o PAF não é derivado do AA, mas de um lisofosfolipídio.

PAF pode ser produzido por diversos tipos celulares, incluindo células endoteliais, neutrófilos, macrófagos e eosinófilos (ISHII; SHIMIZU, 2000). Em um primeiro passo uma fosfolipase A₂ citosólica é ativada por Ca²⁺, hidrolisando a fosfatidilcolina, um fosfolipídeo de membrana, em duas moléculas: um lisofosfolipídio e um AA. Em um segundo passo, o lisofosfolipídio produzido sofre a ação de uma outra enzima, a lisoPAF-acetiltransferase, que adiciona um grupo acetil na posição sn-2, dando origem ao PAF (Figura 1). Essa é a principal via pela qual PAF é sintetizado na célula, chamada de via de remodelação, mas PAF pode também ser produzido a partir da via *de novo* (HANAHAN, 1986; PRESCOTT et al., 2000)

Após ser sintetizado, PAF pode atuar tanto nas células adjacentes como na célula que o produziu. PAF se liga especificamente a um receptor de membrana acoplado à proteína G, o PAFR. Quando ativado, o PAFR promove

a ativação de segundos mensageiros que incluem cálcio, AMP cíclico, inositol 1,4,5 trifosfato e diacilglicerol. Além dessas moléculas, ativação de kinases e fosforilases como MAPK, PKC e algumas fosfolipases estão envolvidas na cascata de sinalização intracelular (ISHII; SHIMIZU, 2000). Tal ativação do PAFR resulta em respostas como agregação de plaquetas (BENVENISTE et al., 1972), ativação de leucócitos (PRESCOTT et al., 1984), quimiotaxia (CZARNETZKI, 1983), adesão celular (LORANT et al., 1995), geração de óxido nítrico (RAMÍREZ et al., 1995), expressão de COX-2, IL-6, IL-8 e síntese de PGE₂ (PEI et al., 1998) e síntese de IL-1 e TNF- α (POUBELLE et al., 1991).

PAF está envolvido na patologia de algumas doenças inflamatórias, como a sepse, anafilaxia, aterosclerose e asma (VENABLE et al., 1993; YOST et al., 2010). Na sepse, foi demonstrado que o PAF produzido é capaz de ativar neutrófilos, monócitos e plaquetas, induzir a liberação de *neutrophil extracellular traps* (NETs) (YOST et al., 2009) e a produção de IL-1 em plaquetas humanas (LINDEMANN et al., 2001). Em modelos experimentais, o uso de antagonistas do receptor de PAF bem como animais *knockout* para o receptor alteraram o perfil síndrome e melhoraram a sobrevivência dos animais (COUGHLAN et al., 1994; ISHII et al., 1997). Ainda, a atividade da PAF-acetilhidrolase (PAF-AH), uma enzima que regula a disponibilidade de PAF, estava diminuída tanto no plasma de pacientes como de animais que desenvolveram sepse (GOMES et al., 2006). Na anafilaxia PAF parece ter um papel muito semelhante. Mastócitos, células importantes na patologia da síndrome, liberam PAF e histamina, que se mostrou capaz de induzir a liberação de PAF por células endoteliais (MCINTYRE et al., 1985). O soro de pacientes com alergia aguda e anafilaxia severa mostrou níveis de PAF mais altos. Da mesma forma, animais *knockout* para o receptor de PAF e tratamento com PAF-acetilhidrolase recombinante melhoraram o perfil de resposta para anafilaxia e a atividade da PAF-AH foi menor em soro de pacientes com anafilaxia mais severa (ISHII et al., 1998; VADAS et al., 2008).

Diversos estudos têm mostrado a participação de PAF em doenças infecciosas. Por exemplo, foi demonstrado que o pré-tratamento de camundongos com PAF é capaz de aumentar a resistência a infecção com *Candida albicans* dependente da ativação de NF- κ B, expressão de óxido nítrico sintase (iNOS) e produção de óxido nítrico (NO) (KIM et al., 2008). PAF pode

também atuar diretamente sobre bactérias gram-positivas, diminuindo seu crescimento (STEEL et al., 2002).

No que diz respeito à tripanossomatídeos, foi demonstrado que PAF é capaz de diminuir a infecção de macrófagos peritoneais infectados com *Trypanossoma cruzi* por um mecanismo dependente da produção de TNF- α e NO. Além disso, camundongos Balb/c tratados com WEB 2170, um antagonista de PAF, apresentaram maior parasitemia e menor sobrevida (ALIBERTI et al., 1999). Ainda, animais deficientes para o receptor de PAF quando infectados com *T. cruzi* apresentaram maior parasitemia e menor sobrevida (TALVANI et al., 2003).

Com relação aos parasitas do gênero *Leishmania* alguns trabalhos têm mostrado que PAF é capaz de modular a infecção. Lonardoni e colaboradores (2000) mostraram que PAF endógeno contribui para o controle da infecção, visto que, quando os macrófagos peritoneais foram incubados com o antagonista de PAF, o WEB2086 e o BN52021, houve um aumento da infecção de macrófagos por *L. amazonensis*. Da mesma forma, PAF exógeno quando adicionado foi capaz de diminuir a infecção dos macrófagos em um mecanismo aparentemente envolvendo a produção de NO. Além disso, camundongos C57BL/6 tratados com antagonistas de PAF desenvolveram maiores lesões na pata e maior carga parasitária no linfonodo e no baço. Em outro trabalho, Rosa e colaboradores (2001) observaram o mesmo efeito de PAF sobre a infecção de macrófagos por *L. amazonensis*. Entretanto, os parasitas pré-tratados com 1 μ M de PAF foram capazes de aumentar a infecção.

Santiago e colaboradores (2006) utilizaram animais *knockout* para o receptor de PAF e avaliaram o seu papel durante a infecção por *L. amazonensis*. Foi observado que os animais *knockout* se mostraram mais susceptíveis à infecção, com lesões maiores e maior quantidade de parasitas. Além disso, foi observado que os animais sem o receptor tiveram uma menor expressão de INF- γ , bem como de iNOS. Também foi avaliado o papel de PAF na diminuição da infecção de macrófagos incubados com neutrófilos inflamatórios. Foi observado que quando os macrófagos foram incubados com neutrófilos na presença do antagonista de PAF, WEB2086 houve um aumento na taxa de infecção, mas nenhuma mudança na produção de NO (SOUZA CARMO, DE et al., 2010). Desta forma PAF endógeno parece ter um

importante papel no controle da infecção por leishmania, sendo capaz de diminuir a infecção.

1.4 FOSFOLIPASES A₂ E PAF-ACETILHIDROLASE

PLA₂ são enzimas importantes na biologia de PAF, sendo a primeira enzima na via de síntese de PAF ou controlando sua disponibilidade através das PAF-acetilhidrolases (DENNIS et al., 2011). PLA₂ compreendem um grupo de enzimas capazes de atuar sobre fosfolipídios hidrolisando-os na posição sn-2. Há 5 diferentes tipos de PLA₂: as PLA₂ secretadas (sPLA₂); as PLA₂ citosólicas (cPLA₂), ambas dependentes de Ca⁺²; as iPLA₂ independente de Ca⁺²; as PLA₂ lisossomais (IPLA₂) e as PAF acetilhidrolases (PAF-AH). PLA₂ exercem um papel na homeostasia, tendo participação em diversos processos biológicos, como atividade antibacteriana e antiviral, produção de mediadores lipídicos, remodelamento de membranas, metabolismo de fosfolipídios, digestão de lipídios e no sistema imunológico (MURAKAMI et al., 2010).

PAF-AH são PLA₂ com a capacidade de hidrolisar PAF na posição sn-2 liberando um lisofosfolipídio e um grupo acetil (BLANK et al., 1981) controlando a disponibilidade de PAF bem como sua atividade biológica (DENNIS et al., 2011). Além de PAF, essas enzimas são capazes de promover a hidrólise dos produtos oxidados da fosfatidilcolina devido a semelhanças estruturais com PAF (HEERY et al., 1995; SUBRAMANIAN et al., 1999). Alguns trabalhos têm associado a ausência da atividade PAF-AH com doenças inflamatórias como aterosclerose (HIRAMOTO et al., 1997), enterocolite necrozante (IMAIZUMI et al., 1995), asma, entre outros (STAFFORINI, 2001; CASTRO FARIA NETO et al., 2005). Foi demonstrado que a mutação V279F leva a perda da atividade de uma PAF-AH (STAFFORINI et al., 1996) e em homens da Coréia do Sul essa mutação foi considerada um fator de proteção para doenças da artéria coronária (JANG et al., 2011). A administração de PAF-AH recombinante foi capaz de bloquear a inflamação e aumentar a sobrevivência de animais em modelos experimentais de sepse. Além disso, a atividade da PAF-AH

endógena estava diminuída tanto na sepse (GOMES et al., 2006) quanto em soro de pacientes com anafilaxia (VADAS et al., 2008).

A presença de PLA₂ tem sido descrita não só em mamíferos, mas também outros microorganismos como bactérias, fungos e protozoários e em alguns casos associada à virulência destes (SITKIEWICZ et al., 2007). Em *Pseudomonas aeruginosa* uma proteína efetora chamada ExoU possui atividade PLA₂ com efeitos citotóxicos em células endoteliais, considerada um fator de virulência para uma doença aguda e disseminação sistêmica pelo organismo (ALLEWELT et al., 2000; SHAVER; HAUSER, 2004). Ainda, uma esterase de *Streptococcus* Grupo A, sorotipos M1 e M28, apresentaram atividade PAF-AH e a mutação dessa enzima levou a um maior recrutamento de neutrófilos ao local da infecção e diminuição da infecção, enquanto que a reversão da mutação levou a uma diminuição do recrutamento e aumento da infecção, mostrando a participação da PAF-AH do patógeno na evasão do sistema imune e virulência (LIU et al., 2012, 2013).

Em tripanossomatídeos uma PLA₂ foi isolada de *Trypanosoma congolense* (NOK et al., 1993). Em *Trypanosoma brucei* foi descrita uma atividade PLA₂ associada ao influxo de Ca⁺² e eventos de sinalização (BELAUNZARÁN et al., 2011). Em *T. cruzi* a presença de PLA₂ aumentou significativamente a associação entre o parasita e macrófagos. Além disso, os mesmos autores identificaram uma PLA₂ em frações transmembrana de *T. cruzi* e o uso de inibidores de fosfolipases bloqueou a interação entre o parasita e macrófagos, indicando um papel para PLA₂ endógena nos estágios iniciais da infecção celular por *T. cruzi* (CONNELLY; KIERSZENBAUM, 1984).

Em relação a leishmanias pouco se sabe a respeito de PLA₂. Passero e colaboradores (2008) demonstraram que uma PLA₂ isolada do veneno de uma serpente *Crotalus durissus collilineatus* quando adicionada a cultura de macrófagos juntamente com promastigotas de *L. amazonensis* foi capaz de estimular a infecção pelo parasita. Além disso, em estudos *in vivo* em camundongos balb/c, foi verificado que promastigotas de *L. amazonensis* quando tratadas com PLA₂ desencadearam lesões maiores nos animais que os parasitas não tratados. A análise histopatológica mostrou inúmeras regiões necróticas apresentando alta densidade de polimorfonucleares, mononucleares e amastigotas.

Recentemente, um estudo identificou uma PLA₂ com identidade com PAF-AH em *L. major*. Essa enzima foi responsável pela atividade PAF-AH do parasita e não estava envolvida na degradação de glicerofosfolípidios. Parasitas *knockouts* para a enzima desencadearam menores lesões e carga parasitária, demonstrando o papel da enzima na virulência do organismo (PAWLOWIC; ZHANG, 2012). Desta forma as fosfolipases A₂ parecem ter um papel relevante na infectividade de tripanossomatídeos.

2 HIPÓTESE

PAF diminui a infecção de macrófagos por *L. infantum* e o parasito possui uma enzima PAF-acetilhidrolase envolvida em sua virulência.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito de PAF na infecção de macrófagos por *L. infantum* e a existência de PLA₂/PAF-acetilhidrolase no parasita.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de PAF sobre a infecção *in vitro* de macrófagos murinos por *L. infantum*.
- Verificar a participação do PAFR no efeito de PAF na infecção por *L. infantum*.
- Clonar e expressar uma PLA₂/PAF-acetilhidrolase de *L. infantum*.
- Avaliar atividade fosfolipásica PAF-AH em frações celulares de *L. infantum*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos BALB/c machos, com idade entre 4 e 8 semanas, fornecidos pelo biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ/BA e mantidos em condições livre de patógenos. Camundongos BALB/c machos *knockout* para o receptor de PAF (PAFR^{-/-}) foram doados pela Dr^a Sônia Jancar do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Todos os protocolos de experimentação utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal do CPqGM/FIOCRUZ – protocolo L-08/2012.

4.2 PARASITAS

Promastigotas de *L. infatum* (MCAN/BR/89/BA262) foram mantidos em meio de cultura *hemoflagellate-modified minimal essential medium* (HO-MEM) contendo Meio mínimo essencial 10%, MEM aminoácidos 1%, MEM aminoácidos não essenciais 1%, Sódio piruvato 1,1mM; Glicose 1,5g/L; Bicarbonato de sódio 2,2g/L; Biotina 0,1mg/L; Ácido paraminobenzoico 1mg/L; HEPES buffer 0,1mM; Gentamicina 0,05 mg/L; L-glutamina 2mM; Biopterina 1,2mg/L e Hemina 6mg/L preparada em NaOH 1N como descrito por Berens e colaboradores (1976). Os parasitas foram cultivados em meio suplementado com 11% de soro fetal bovino inativado a 26°C.

4.3 REAGENTES

PAF (1-O-octadecyl-2-O-methyl-*sn*-glyceryl-3-phosphorylcholine), WEB2086 e BN52021 foram adquiridos comercialmente da Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). PAF foi diluído em etanol e utilizado nas concentrações de 10µM, 1µM e 0,1µM. WEB2086 e BN52021 foram diluídos em DMSO e utilizados nas concentrações de 10µM. A concentração final dos diluentes etanol foi de 0,01% e a de DMSO 0,1% em todos os experimentos.

4.4 CÉLULAS

Macrófagos foram obtidos a partir de células retiradas da medula óssea segundo protocolo de diferenciação proposto por Marim e colaboradores (2010). Femur e tíbia dos camundongos BALB/c selvagens ou PAFR^{-/-} foram dissecados e triturados em meio RPMI. A suspensão celular obtida foi passada através de um filtro de 40µM, submetida a lise de hemácias com solução de ACK (Ammonium-Chloride-Potassium) durante 5 minutos, centrifugada a 405xg e ressuspensa em meio de cultura RPMI1640 (Gibco). As células foram diferenciadas em placas de Petri em meio suplementado com soro fetal bovino 10%, penicilina/streptomicina 1% e sobrenadante de cultura de células L929 durante 7 dias como fonte de GMCSF.

4.5 INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS COM *L. INFANTUM*

Macrófagos derivados de medula óssea foram aderidos em placas de 24 poços, contendo ou não lamínulas circulares, na concentração final de 3×10^5 /mL, em meio RPMI suplementado, a 37° C, com 5% de CO₂, durante 16 horas. Em seguida as células foram infectadas com formas promastigotas estacionárias de *L. infantum* na proporção de 10 parasitas para 1 macrófago durante 4 horas. De acordo com o experimento, as infecções ocorriam na presença de diferentes concentrações – 0,1µM, 1µM e 10µM – de PAF (1-O-octadecyl-2-O-methyl-*sn*-glyceryl-3-phosphorylcholine) (Cayman Chemical) ou seu veículo, etanol.

Nos experimentos em que os antagonistas de PAF – WEB 2086 e BN52021 (Cayman Chemical) – foram utilizados, as células foram pré-incubadas com os antagonistas durante 1 hora e os mesmos mantidos durante a infecção, assim como seus diluentes. Após o período de infecção, as células foram lavadas com salina estéril para retirada dos parasitas não fagocitados, os reagentes foram respostos nas mesmas concentrações e as células mantidas em RPMI suplementado, a 37° C, com 5% de CO₂ por 24 e 72 horas. Após esses tempos as lamínulas foram fixadas com metanol, coradas com hematoxilina/eosina e a infecção avaliada por

microscopia óptica. Pelo menos dez campos foram contados por cada lamínula e, tanto o número de macrófagos infectados, quanto o número de amastigotas presentes em 100 células foram determinados. Para determinar o número de parasitas viáveis foi utilizando o método do Schneider adaptado de Ribeiro-Gomes e colaboradores (2004). Após 72 horas o meio RPMI foi substituído por meio Schneider e as células mantidas a 26° C por 7 dias. As formas promastigotas móveis foram quantificadas em câmara de Neubauer no 3º, 5º e 7º dia após a substituição do meio.

4.6 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR – MTT

A viabilidade das células foi avaliada através da quantificação das células metabolicamente ativas, pelo método do MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5- diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (Sigma), de acordo com as especificações do fabricante. Macrófagos derivados de medula óssea foram plaqueados na concentração de 5×10^5 /mL em meio RPMI e incubados com PAF 1µM, ou etanol, a 37° C, com 5% de CO₂ durante 72 horas. Em seguida o meio RPMI foi substituído por meio 199 com 5% de soro fetal bovino inativado, 1% de penicilina/streptomina, glutamina e 10µL (5mg/mL) do reagente de MTT. As células foram incubadas por mais 4 horas, nas mesmas condições. Em seguida SDS 10% foi adicionado ao meio e foi feita a leitura da densidade óptica no leitor de ELISA nos comprimentos de onda 570-690 nm.

4.7 DOSAGEM DE NO

Sobrenadantes de cultura de macrófagos infectados com *L. infantum* (3×10^5 células em 200µL de RPMI suplementado) e estimulados com 10 ng/mL de IFN-γ (100 unidades) e 40 ng/mL de LPS foram analisados quanto à produção de nitrito pela reação de Griess, como uma medida indireta da produção de NO (Green et al., 1982). Para medir a produção de nitrito, alíquotas de 50µl das amostras foram incubadas com 50µl dos reagentes (25uL da solução de sulfanilamida 1% e 25uL de solução de N-

naphthylenediaminedihydrochloridre 0,1% em 2,5% de H₃PO₄). A densidade óptica foi quantificada em leitor de ELISA em 560nm.

4.8 CURVA DE CRESCIMENTO DE *L. INFANTUM*

Formas promastigotas de *L. Infantum* foram cultivadas em meio HO-MEM na presença de diferentes concentrações de PAF durante 5 dias e as formas promastigotas móveis proliferativas foram quantificadas em câmara de Neubauer.

4.9 CLONAGEM DE PLA₂/PAF-ACETILHIDROLASE DE *L. INFANTUM*

A partir de sequências genômicas de *Leishmania infantum* anotadas no site GeneDB (www.genedb.org), buscamos por possíveis notações relacionadas a atividades fosfolipásicas. A sequência “LinJ.35.3070” foi identificada como uma possível Fosfolipase A₂. A partir desta sequência foram desenhados iniciadores específicos, sense: LiPLA2 Xba I (5'-GCTCTAGACATGCACCACCATCACCACCACCCGATCTTTTCGACTAC-3') e antisense: LiPLA2 Kpn I (5'-GGGGTACCATGGGCCATGCACCCGATCTTCGACTAC-3') com os quais foram feitas reações de amplificação de um fragmento de 1362 pares de base, utilizando como molde DNA genômico de *L. infantum* (MCAN/BR/89/BA262). Os produtos da PCR foram extraídos do gel de agarose e purificados. O tratamento com as enzimas de restrição *Xba*I e *Kpn*I (Thermo Fisher Scientific) garantiu a ligação correta, em presença da enzima T4 DNA ligase (USB Affymetrix), do fragmento amplificado ao plasmídeo pBlueScript. Células de *Escherichia coli*-XL1Blue competentes foram transformadas com o plasmídeo e multiplicadas. Algumas colônias resistentes a Ampicilina foram selecionadas e cultivadas em meio contendo o antibiótico de seleção (50 ng/mL). Os plasmídeos foram extraídos utilizando-se o kit “Plasmid Purification - Megaprep” (Qiagen) e a presença do fragmento desejado foi checada por enzimas de restrição e sequenciamento.

Em seguida o fragmento foi clonado no vetor de expressão em eucarioto pLESXY-neo2 (Jena Bioscience) que possui um peptídeo sinal que promove o transporte da proteína recombinante para o meio de cultivo (BREITLING et al., 2002). Inicialmente o fragmento de 1362 pb foi isolado do plasmídeo pBlueScript através da utilização das enzimas *Xba*I e *Kpn*I e ligado ao plasmídeo pLESXY-neo2. *E. coli* competentes foram transformadas com este plasmídeo, multiplicadas e os clones positivos selecionados. O plasmídeo foi extraído e sua identidade checada por enzimas de restrições sequenciamento.

4.10 EXPRESSÃO RECOMBINANTE DA PLA₂/PAF-ACETILHIDROLASE DE *L. INFANTUM*

A expressão recombinante da PAF-Acetilhidrolase de *Leishmania infantum* foi realizada utilizando-se um sistema comercial de expressão que utiliza outra espécie de leishmania, *Leishmania tarentolae*, que não é patogênico em mamíferos.

L. tarentolae, cepa P10, (Jena Bioscience) foi cultivada em meio BHI com penicilina (50 U/mL), estreptomicina (50 µg/mL) e hemina (5 µg/mL) (Jena Bioscience) a 26 °C de acordo com as instruções do fornecedor. Para manter a culturas as células eram passadas duas vezes por semana, em diluições a 1:20.

Para transferir o DNA nas células de *L. tarentolae*, 2µg do plasmídeo pLESXY-neo2 contendo o gene da PLA₂ foi digerido com *Swa*I. 10⁸ parasitas de *Leishmania tarentolae*, no terceiro dia de cultivo, foram centrifugados (2000xg, por 10 minutos, a 4° C) e resuspensados em 1 mL do próprio meio de cultivo. Desses, 350 µL foram misturados com 50 µL do plasmídeo digerido e mantidos em gelo, por 10 minutos. As células foram então transferidas para uma cubeta de 4.0 mm (Bio-Rad) eletroporadas com 2 pulsos (25µF, 3.75 kV cm⁻¹, Ω = infinito). Após 10 minutos de incubação em gelo, as células eletroporadas foram transferidas para 10 mL de meio BHI.

Dois dias após a eletroporação, 5 mL da cultura foram centrifugados (2000xg, por 10 minutos) e o pellet ressuspendido em 80 µL do meio. Os parasitas foram semeados em placas com agar contendo BHI, antibióticos,

hemina, o marcador de seleção neomicina (50 µg/mL), 10% de soro fetal bovino e HEPES 1M. As placas foram seladas e incubadas a 27° C. Aproximadamente 1 semana depois, colônias individuais foram picadas e transferidas para 100 µL de meio BHI contendo neomicina. Posteriormente as células proliferativas foram cultivadas e expandidas. Parte foi armazenada em glicerol 80%, a -80 °C.

Para avaliar a expressão da proteína, 10 mL de cultura de *L. tarentolae*, transformadas e selecionadas, foi centrifugado (2000xg, 10 minutos) e o sobrenadante concentrado. Parte desse material foi ressuspenso em tampão Laemmli contendo SDS. O perfil de proteínas foi analisado por gel de poliacrilamida.

4.11 FRACIONAMENTO SUBCELULAR DE *L. INFANTUM*

O protocolo de fracionamento subcelular foi adaptado de Benaim e colaboradores (1993). Formas promastigotas de *L. infantum* na fase logarítmica ($4,2 \times 10^9$) e estacionária ($9,3 \times 10^9$) foram obtidas por centrifugação (1620xg, por 15 minutos, a 4° C). O sobrenadante recuperado, correspondente ao meio de cultura, foi concentrado utilizando concentradores por centrifugação (Vivaspin 20, 10,000 MWCO, Sartorius Stedim Biotech). Os parasitas foram lavados 2 vezes em PBS, pH 7,4 (1620xg, por 15 minutos, a 4° C) e lisados através de sete ciclos de congelamento e descongelamento (-196°C/37°C) na presença de coquetel de inibidores de proteases (complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail, Roche). O lisado de parasitas foi centrifugado (600xg, durante 10 minutos, a 4° C) e o pellet produzido, referente à fração enriquecida em núcleo, foi separado. O sobrenadante resultante foi centrifugado (15.000xg, por 10 minutos, a 4° C) e o pellet obtido, correspondente à fração enriquecida em organelas também foi separado. O sobrenadante resultante foi então centrifugado (105.000xg, durante 60 minutos, a 4° C) e o pellet obtido, correspondente à fração enriquecida em membranas foi separado do sobrenadante que corresponde a fração solúvel. As amostras foram mantidas em nitrogênio líquido até serem utilizadas.

4.12 ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA A₂ EM FRAÇÕES CELULARES E DA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE *L. INFANTUM*

Para mensurar a atividade fosfolipásica A₂ foi utilizado método descrito por Kitsiouli e cols. (1999) com modificações. O 1-Acil-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoil]-sn- glicero-3-fosfocolina (Acil 6:0 NBD PC) e 1-acil-2-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoil]-sn-glicero-3-fosfocolina (Acil 12:0 NBD PC) (Avanti Polar Lipids Inc) foram usados como substratos. A concentração dos mesmos foi ajustada para acima da concentração micelar crítica, em solução 0.15 M de NaCl. As vesículas dos substratos foram formadas através do processo de sonicação utilizando 10% da amplitude máxima do Branson digital sonifier (Model 102C(CE) durante 1 minuto e 40 segundos, com intervalos de 10 segundos, a 4° C. A reação foi realizada em 250 µL de meio reacional padrão composto por 20µM de Acil 12:0 NBD PC, 20 mM TRIS-HCl(tris(hidroximetil)aminometano) pH 7,5 e 2 mM de CaCl₂. Após uma hora de ensaio era adicionado EGTA a uma concentração final de 10mM, seguido de mais um hora de leitura. Após esse tempo, foi adicionado o 6:0 NBD PC, seguido de mais uma hora de leitura das amostras. O conteúdo total de proteínas de cada amostra foi determinado conforme descrito anteriormente por Lowry e cols (1951), utilizando albumina sérica bovina como padrão. Para os ensaios o total de proteína presente nas amostras foi normalizada em 5, 25 e 50µg por ensaio. A fluorescência proveniente dos ácidos graxos livres marcados com NBD foi mensurada continuamente por fluorímetro Victor™X5 Multilabelplaterreader (Perkin Elmer) a 37°C, com comprimentos de onda de excitação e emissão de 460 nm e 534 nm, respectivamente.

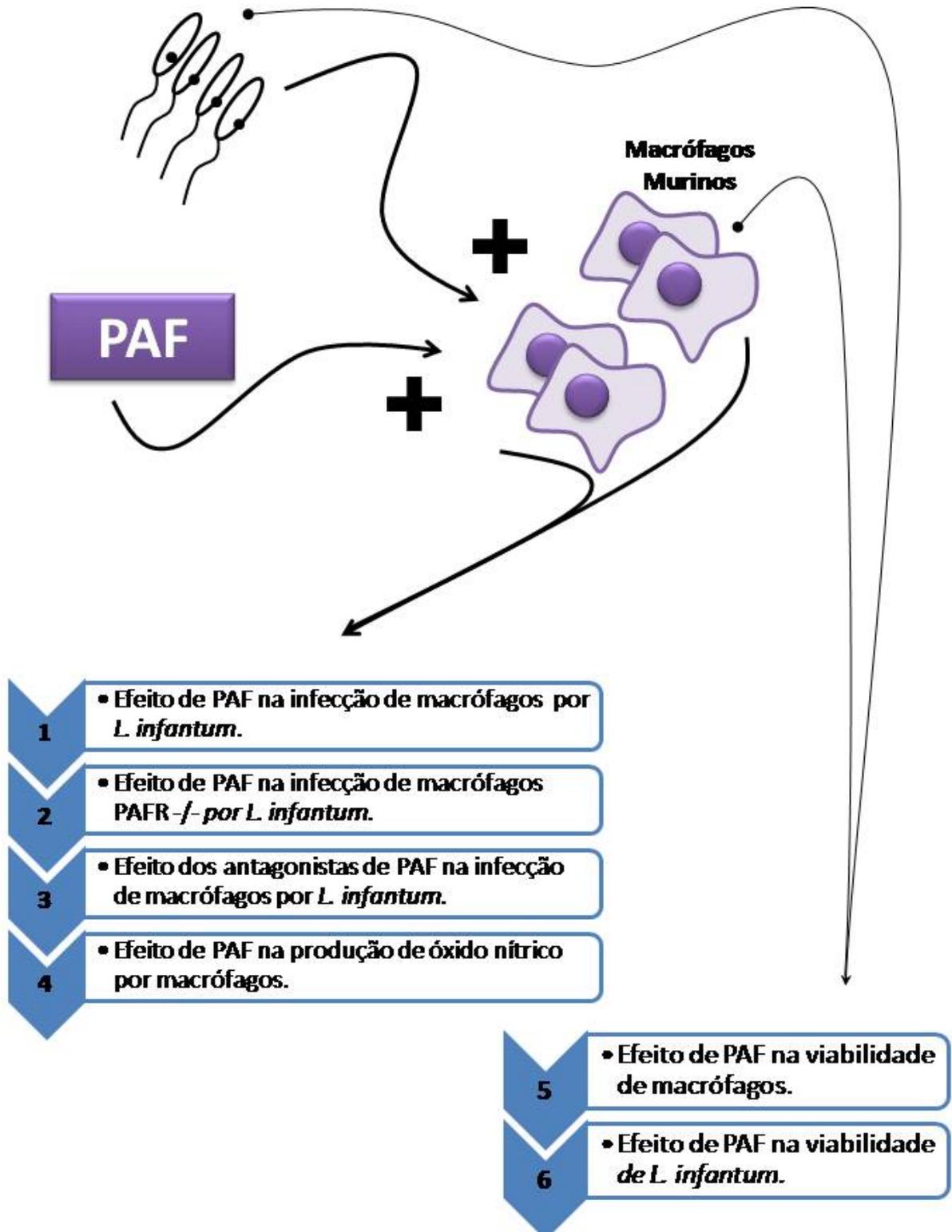
Os valores de emissão de fluorescência geraram uma planilha de Excel com os valores de emissão durante 1 hora. Esses valores foram avaliados quantos ao valor de correlação, interceptação da reta formada nos eixo Y e o valor de inclinação da reta. Os valores de inclinação da reta foram usados como medida indireta da atividade PAF-acetilhidrolase dada pela equação: $[b = \frac{\sum(x-x_{\text{barra}})(y-y_{\text{barra}})}{\sum(x-x_{\text{barra}})^2}]$.

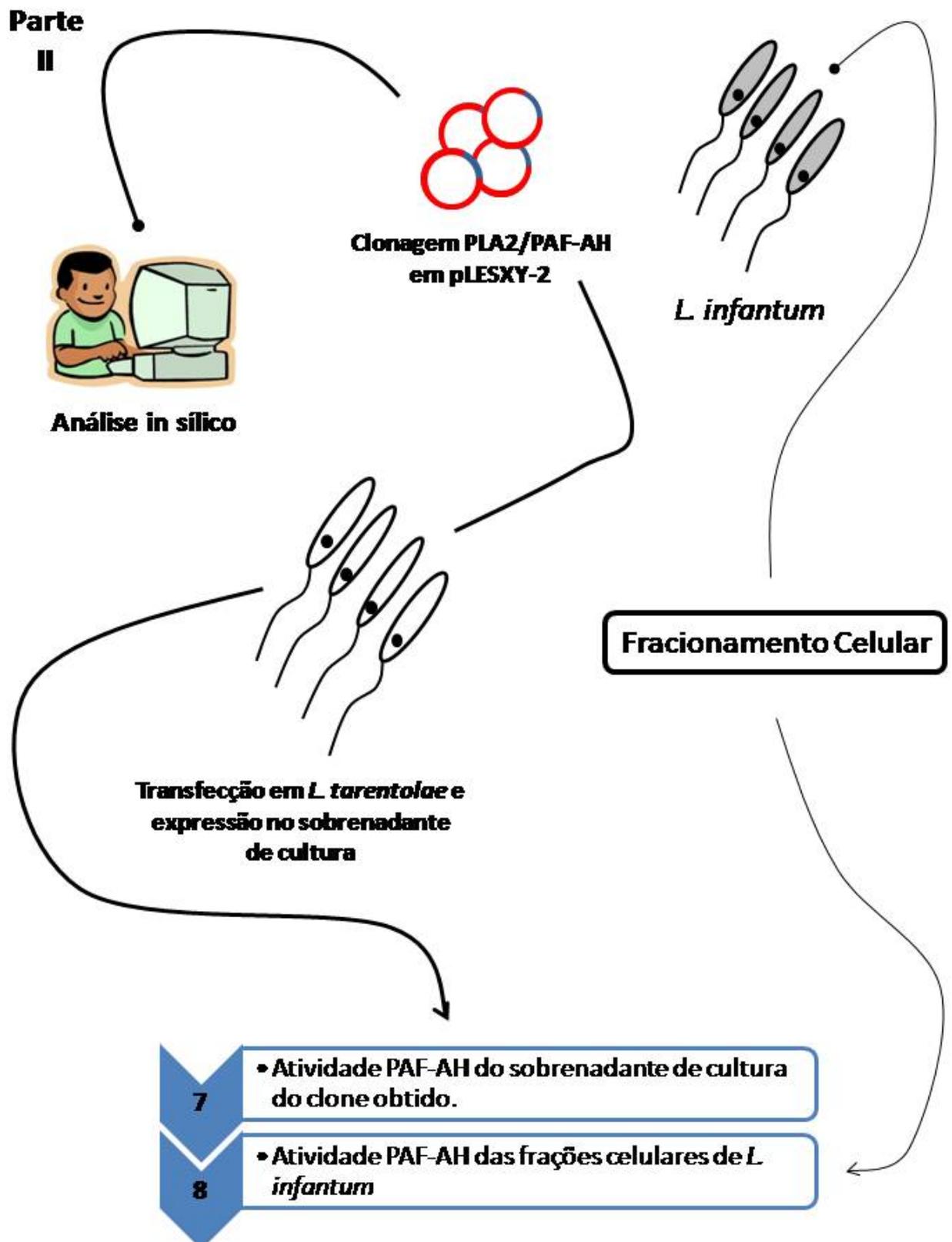
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram avaliados quanto às diferenças estatísticas. Para múltiplas comparações foi utilizado Kruskal-Wallis com intervalo de confiança de 95%, sendo os valores considerados estatisticamente significantes quando o valor de $p < 0.05$.

5 DESENHO EXPERIMENTAL

Parte
I





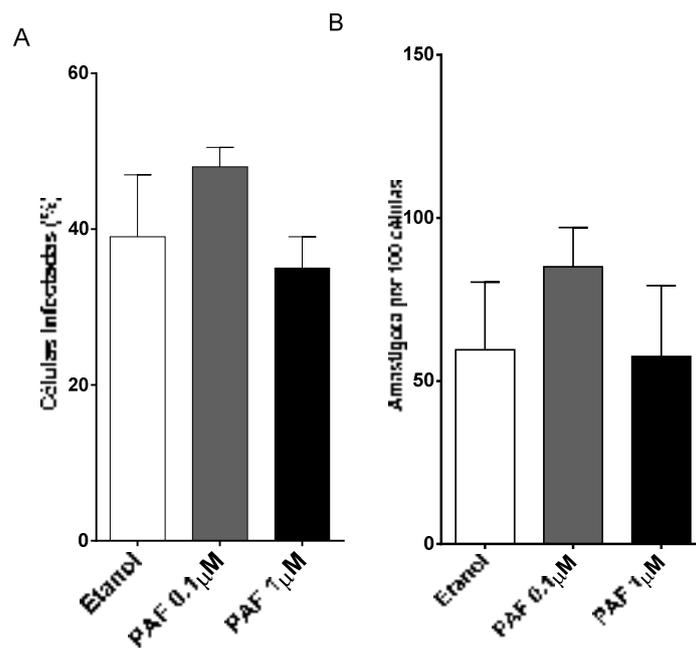
6 RESULTADOS

PARTE I

6.1 EFEITO DE PAF SOBRE A INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS POR *L. INFANTUM*

Neste trabalho foi avaliado o efeito de PAF sobre a infecção de macrófagos murinos por *L. infantum*. No tempo de 24h não foi observada diferença estatística nos parâmetros analisados, nas concentrações testadas de PAF. Entretanto, após 72 horas houve uma diminuição estatisticamente significativa da taxa de infecção dos macrófagos e da quantidade de formas amastigotas por 100 células, na presença de PAF 1 μ M, comparado com o grupo controle que não recebeu PAF (Figura 2). Neste mesmo tempo, PAF 0.1 μ M também promoveu uma pequena diminuição da infecção, mas sem significância estatística.

24 horas



72 horas

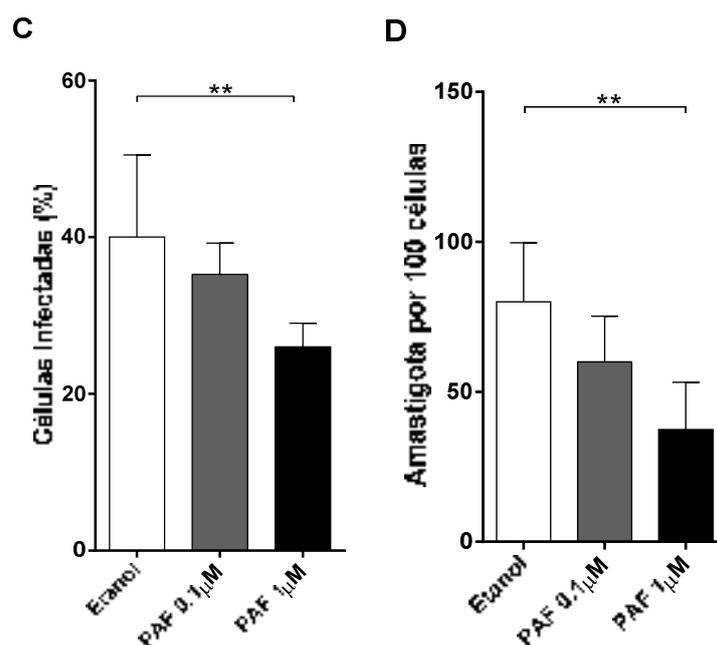


Figura 2. Efeito de PAF na infecção de macrófagos murinos por *L. infantum*. Macrófagos foram infectados com *L. infantum* na presença de PAF e a taxa de infecção (A, C) e quantidade de amastigotas por 100 células (B, D) foram avaliadas após 24 e 72 horas. Os resultados são representativos de 3 experimentos e apresentam a mediana e desvio interquartil de 5 lamínulas examinadas. Asterisco indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (**, $p < 0,01$).

A carga parasitária em macrófagos infectados com *L. infantum*, na presença e ausência de PAF foi também estimada após a incubação com meio Schneider pela contagem de promastigotas viáveis liberados no sobrenadante das culturas. No tempo de 24 horas, as contagens nos 5º e 7º dias após a infecção mostraram que, curiosamente, nos poços onde se adicionou PAF 0,1µM ocorreu uma tendência de aumento de promastigotas proliferativos em relação ao grupo controle que não recebeu PAF, principalmente na análise feita no 5º dia (Figura 3A). No entanto, em ambos os tempos não foi observada diferença estatística. Por outro lado, após 72 horas houve uma diminuição estatisticamente significativa das formas promastigotas móveis na presença de PAF 1µM (Figura 3B).

Dessa forma, foi verificado por diferentes parâmetros que PAF 1 µM é capaz de diminuir a infecção *in vitro* de macrófagos murinos por *L. infantum*, no tempo de 72h de incubação. A partir desses resultados a atuação de PAF foi avaliada utilizando apenas a concentração de 1 µM após 72 horas de infecção.

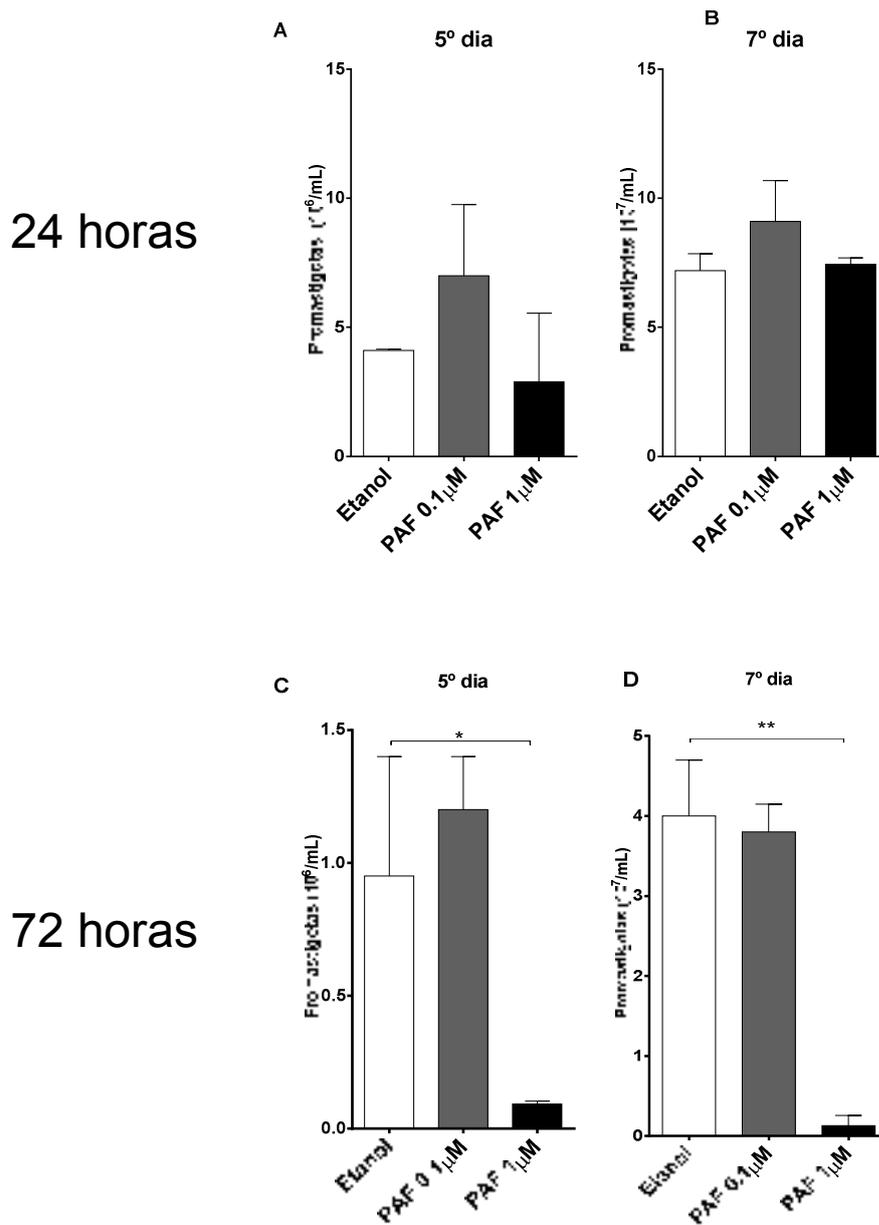


Figura 3. Efeito de PAF na carga parasitária de macrófagos infectados por *L. infantum*. Macrófagos foram incubados com *L. infantum* na presença de PAF ou etanol durante 4 horas, em meio RPMI. As células foram lavadas, o meio e aditivos foram repostos. Após 24 (A e B) e 72 horas (C e D) o RPMI foi trocado por meio Schneider e incubado a 24° C. Depois de 5 (A e C) e 7 dias (B e D) as formas promastigotas móveis proliferativas de *L. infantum* foram quantificadas. Os resultados são representativos de 3 experimentos e apresentam a mediana e desvio interquartil de 5 poços examinados. Asterisco indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (* , p<0,05) (** , p<0,01).

6.2 DINÂMICA DA ATUAÇÃO DE PAF

Foi avaliado o momento de atuação de PAF em relação à infecção. A pré-incubação das células com PAF não alterou a taxa de infecção em relação ao controle, embora tenha causado um aumento na quantidade de amastigotas nas células infectadas, mas que não teve diferença estatística. A co-incubação, de PAF e parasitas, sem reposição da droga, diminuiu levemente a infecção, mas sem significância estatística. PAF diminuiu significativamente a taxa de infecção e a quantidade de amastigotas por 100 células quando co-incubado com *L. infantum* durante a infecção e repostado durante as 72h (Figuras 4A e 4B). Esses resultados sugerem que o efeito leishmanicida de PAF é em longo prazo, ocorrendo principalmente no período após o estabelecimento da infecção, e não nos momentos iniciais. Os demais experimentos foram realizados, sempre repondo PAF após o período de infecção.

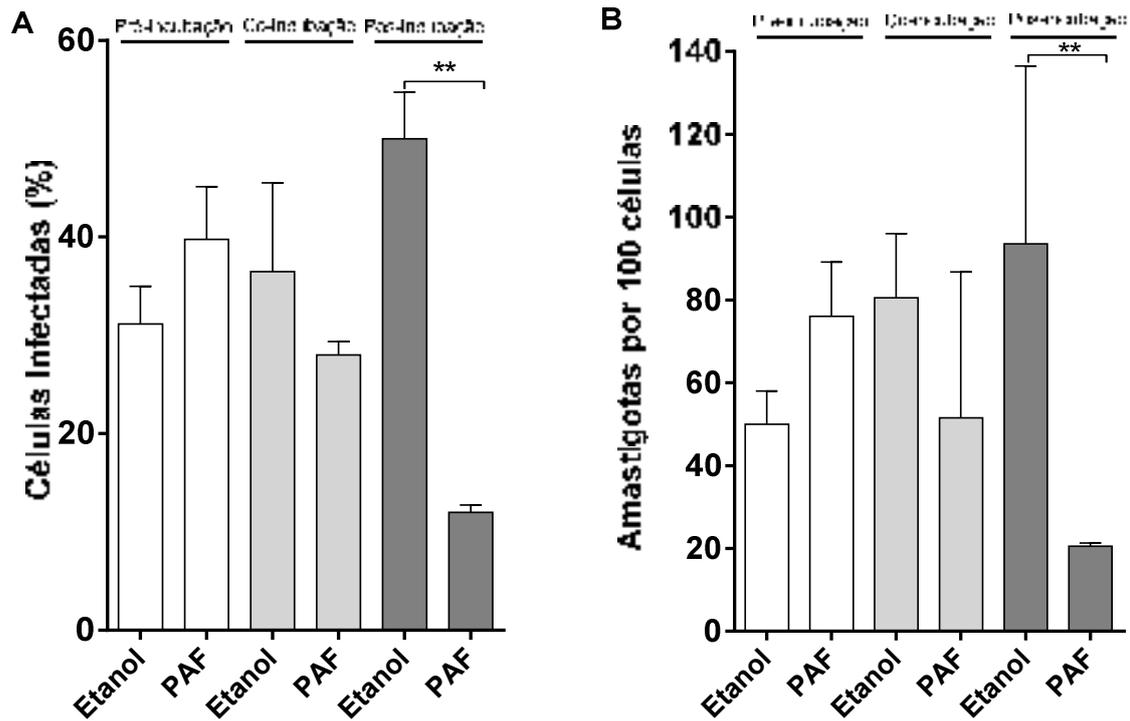


Figura 4. Dinâmica do efeito de PAF na infecção de macrófagos por *L. infantum*. Macrófagos foram incubados na presença de PAF 1 μ M ou etanol em 3 momentos distintos da infecção com *L. infantum*: 1 hora antes da infecção (Pré-incubação); concomitante com as 4 horas de infecção, seguida da remoção de PAF (Co-incubação); e co-incubação seguida da reposição de PAF (Pós-incubação). A taxa de infecção (A) e a quantidade de amastigotas por 100 células (B) foram avaliadas após 72 horas. Experimento representativo de 2 experimentos realizados. Os resultados representam a mediana e desvio interquartil de 5 lamínulas examinadas e foram analisados pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (**, $p < 0,01$).

6.3 PAPEL DO PAFR NO EFEITO DE PAF NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR *L. INFANTUM*

Para entender os mecanismos pelo qual PAF está causando a diminuição da infecção de macrófagos por *L. infantum* foi avaliado o papel do receptor de PAF nos efeitos observados. Foi observada uma diminuição estatisticamente significativa da taxa de infecção dos macrófagos PAFR^{-/-} (Figura 5A) e da quantidade de amastigotas por 100 células (Figura 5B) na presença de PAF quando comparado com os grupos controles que não receberam PAF. Essa diminuição foi de forma semelhante à observada nas células de camundongos selvagens (Figura 5).

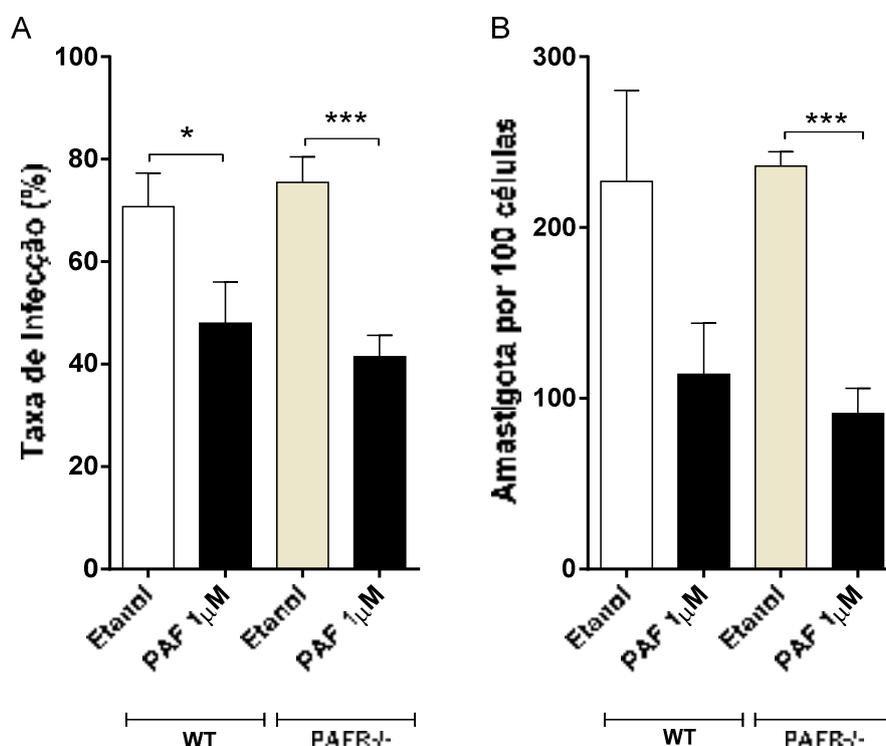


Figura 5. Efeito do PAF na infecção de macrófagos PAFR^{-/-} por *L. infantum*. Macrófagos selvagens (WT) e *knockout* para o receptor de PAF (PAFR^{-/-}) foram incubados com *L. infantum* na presença de PAF 1 μ M durante 4 horas. As células foram então lavadas e o meio com seus aditivos repostos. A taxa de infecção (A) e a quantidade de amastigotas por 100 células (B) foram avaliadas após 72 horas. Experimento representativo de 3 experimentos realizados. Os resultados representam a mediana e desvio interquartil de 5 lamínulas examinadas. Asterisco indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (* , $p < 0,05$) (***, $p < 0,001$).

Também foi avaliado o efeito de PAF na infecção de macrófagos $PAFR^{-/-}$ analisando o número de promastigotas móveis proliferativos durante uma semana após infecção, em comparação aos macrófagos selvagens. PAF $1\mu\text{M}$ diminuiu o número de parasitas viáveis, após a infecção de macrófagos *knockouts*, em todos os dias avaliados e de forma semelhante a observada com os as células de camundongos selvagens (Figura 6).

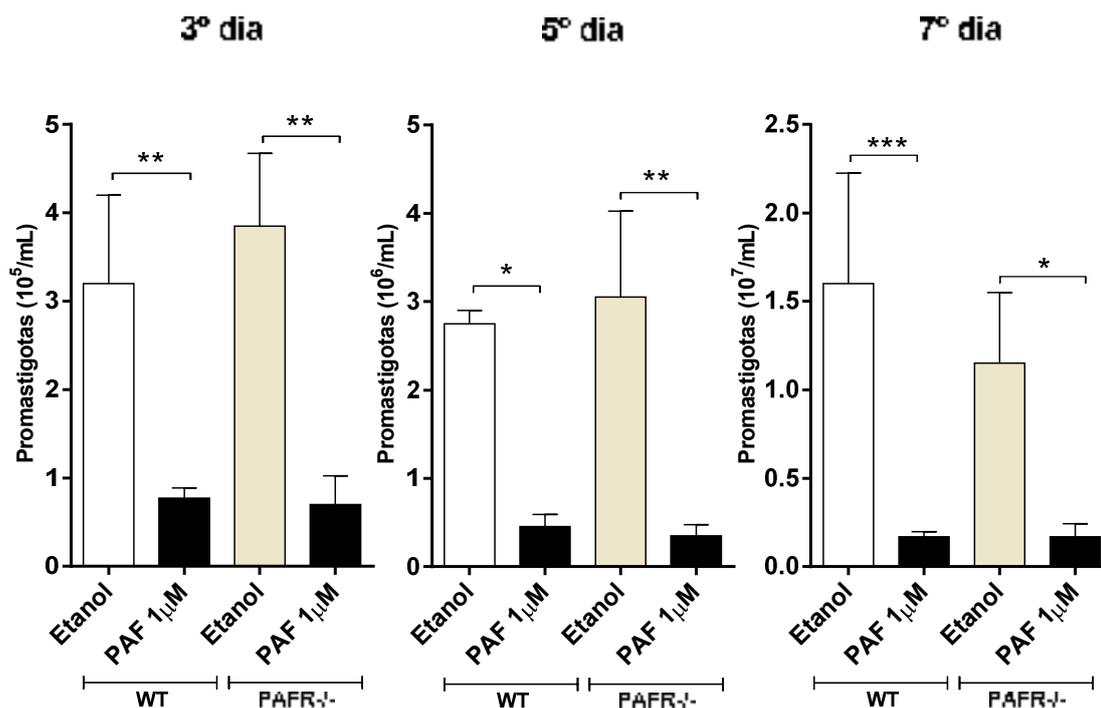


Figura 6. Efeito de PAF na carga parasitária de macrófagos $PAFR^{-/-}$ infectados por *L. infantum*. Macrófagos selvagens (WT) e *knockouts* para o receptor de PAF ($PAFR^{-/-}$) foram incubados com *L. infantum* na presença de PAF $1\mu\text{M}$ durante 4 horas, em meio RPMI. As células foram lavadas, o meio e aditivos foram repostos. Após 72 horas o RPMI foi trocado por meio Schneider e incubado a $24\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após 3, 5 e 7 dias as formas promastigotas móveis proliferativas de *L. infantum* foram quantificadas. Os resultados representam a mediana e desvio interquartil de 5 poços examinados. Asterisco indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (**, $p < 0,05$) (**, $p < 0,01$) e (***, $p < 0,001$).

6.4 EFEITO DE ANTAGONISTAS DE PAF SOBRE A INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR *L. INFANTUM*

Ainda avaliando o papel do receptor de PAF, foi verificado qual seria o efeito de WEB2086 e BN52021, conhecidos antagonistas do receptor (LACHACHI et al., 1985; CASALS-STENZEL et al., 1987), na ação leishmanicida de PAF.

Foi observado que PAF é capaz de reduzir tanto a taxa de infecção (Figura 7A), assim como o número de amastigotas por 100 células (Figura 7B), mesmo na presença dos antagonistas. Quando o BN52021 foi adicionado à cultura, PAF causou uma pequena diminuição na taxa de infecção, mas sem significância estatística. A presença de ambos os antagonistas, por si só, não causou nenhum efeito na infecção, quando comparado com os grupos controle, avaliado na presença dos veículos DMSO e etanol. Esses resultados, juntamente com os obtidos com macrófagos PAFR^{-/-}, sugerem que a ação leishmanicida de PAF observada possivelmente não ocorre através do receptor clássico, PAFR.

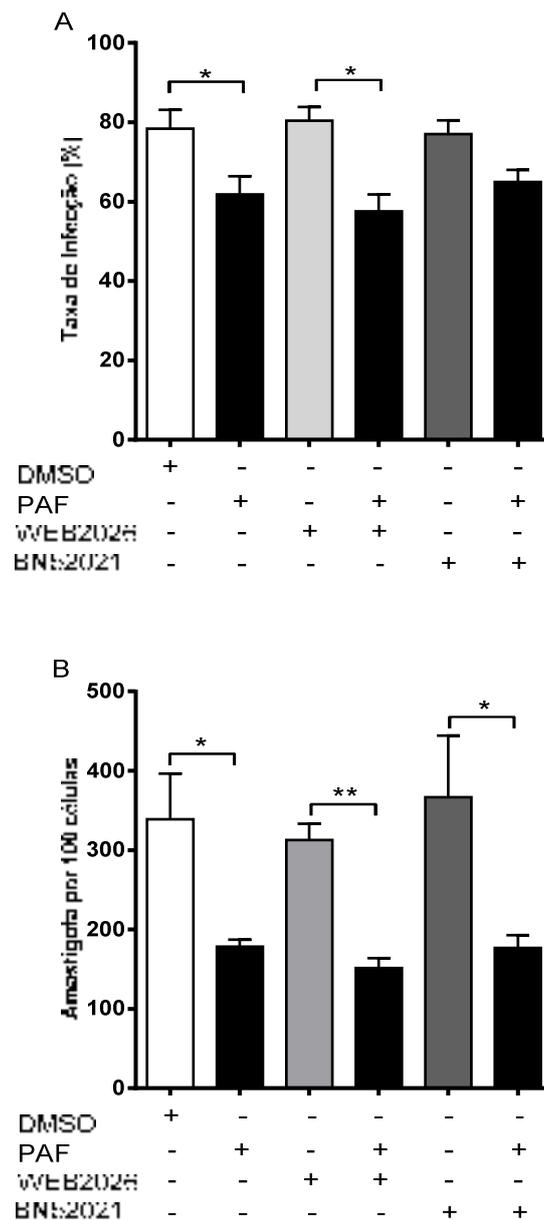


Figura 7. Efeito dos antagonistas de PAF sobre a infecção de macrófagos por *L. infantum*. Macrófagos foram pré-incubados por 1 hora com 10 μ M de WEB2086, BN52021 ou seus veículos, DMSO e, em seguida, infectados com *L. infantum* na presença de PAF 1 μ M e antagonistas por 4 horas. A taxa de infecção (A) e a quantidade de amastigotas por 100 células (B) foram avaliadas após 72 horas. Os resultados representam a mediana e desvio interquartil de 5 lamínulas examinadas. Asterisco indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (*, $p < 0,05$) (**, $p < 0,01$).

6.5 EFEITO DE PAF NA VIABILIDADE DOS MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS SELVAGENS E PAFR^{-/-}

Uma das possibilidades levantadas para o efeito de PAF observado seria que esta molécula teria efeitos citotóxicos sobre as células dos camundongos utilizados, causando a morte não só dos parasitas, mas também dos macrófagos. Para verificar esta possibilidade, a viabilidade celular dos macrófagos provenientes das medulas tanto dos camundongos selvagens, quanto dos *knockout* foi avaliada na presença de diferentes concentrações de PAF – 0,01; 0,1 e 1 μ M – ou metanol, molécula que tem efeito citotóxico conhecido, através do teste colorimétrico do MTT (Figura 8). As concentrações de PAF testadas, as mesmas utilizadas em outros experimentos, não apresentaram efeito citotóxico sobre os macrófagos, sejam eles selvagens (Figura 8A) ou *knockouts* (Figura 8B).

A citotoxicidade de PAF sobre os macrófagos também foi avaliada através do método de exclusão de Azul de Trypan, não sendo verificado efeito citotóxico (não mostrado), indicando que o efeito leishmanicida observado não se deve a citotoxicidade do PAF sobre os macrófagos.

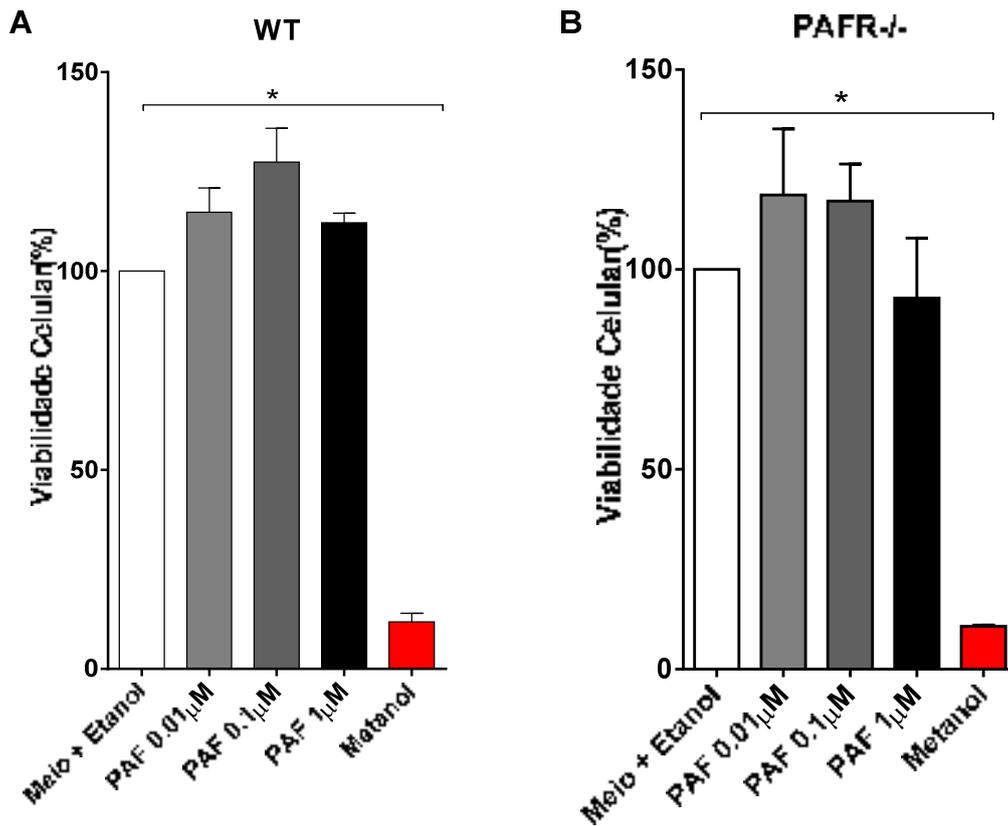


Figura 8. Efeito de PAF sobre a viabilidade de macrófagos. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos selvagens (WT) (A) ou *knockouts* para o receptor de PAF (PAFR^{-/-}) (B) foram incubados com diferentes concentrações de PAF ou metanol (0,01%). A viabilidade dos macrófagos foi avaliada após 72 horas pelo ensaio de MTT e expressa em relação incubação na presença do veículo de PAF, etanol. Os resultados representam a mediana e desvio interquartil de 5 poços examinados. Asterisco indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (* , $p < 0,05$) .

6.6 EFEITO DE PAF NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

Um dos mecanismos microbicidas utilizado por macrófagos é a produção de óxido nítrico (VAZQUEZ-TORRES et al., 2008). A fim de avaliar se esse mecanismo estaria relacionado à diminuição da infecção por *L. infantum* causada por PAF, a produção dessa molécula foi dosada. Macrófagos murinos foram infectados com promastigotas de *L. infantum* na presença de PAF 1 μ M e etanol e a produção de NO foi avaliada após 24 e 48 horas. Níveis significantes de NO só foram detectados na presença de IFN γ e LPS. Os resultados mostraram que PAF não foi capaz de induzir um aumento na produção de NO, em relação ao controle, tanto em células não infectadas, quanto nas células infectadas com *L. infantum* (Figura 9).

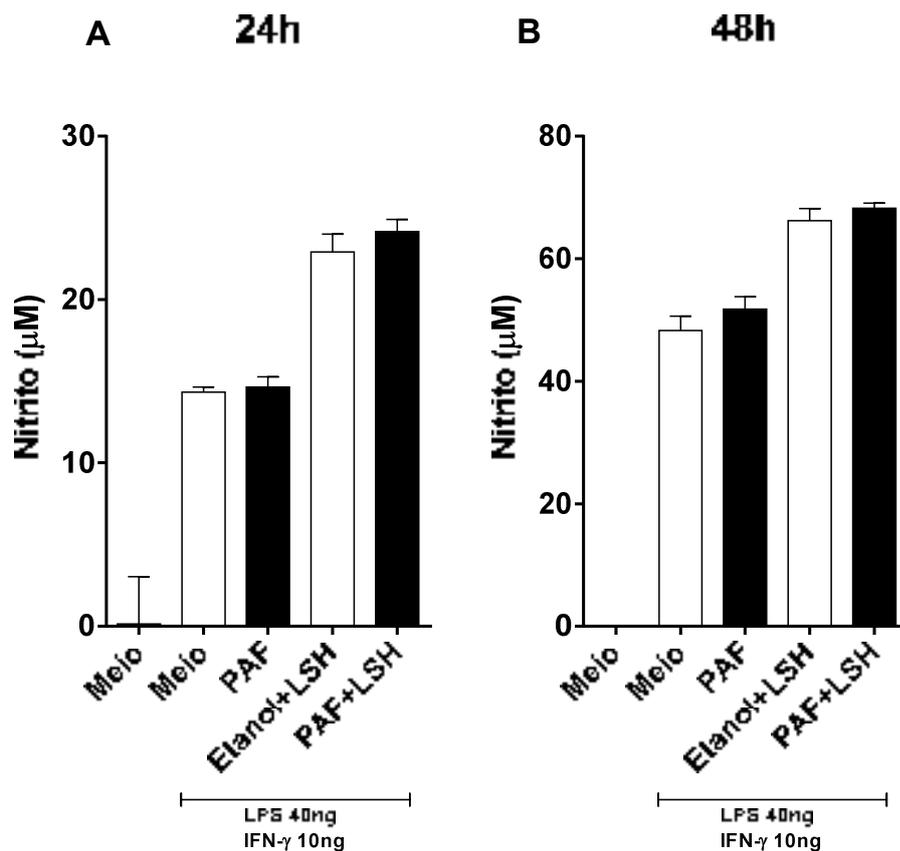


Figura 9. Efeito de PAF sobre a produção de Óxido Nítrico. Macrófagos foram incubados com 1µM de PAF ou infectados com *L. infantum* na presença de PAF e estimulados com LPS e IFN – γ. Em seguida, a produção de óxido nítrico foi avaliada após 24(A) e 48 horas(B) pelo método de Griess. O gráfico é representativo de dois experimentos e corresponde à média e desvio padrão de 6 poços examinados. Asterisco indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

6.7 EFEITO DE PAF SOBRE O CRESCIMENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. INFANTUM* EM CULTURA

Os resultados obtidos sugerem que a ação de PAF que leva a diminuição da infecção *in vitro* de macrófagos por *L. infantum*, a princípio ocorre por mecanismos distintos daqueles observados sobre *L. amazonensis* (LONARDONI et al., 1994, 2000; SANTIAGO et al., 2006). Assim, para avaliarmos se PAF tem efeito direto sobre os parasitas foi avaliado o efeito de PAF sobre o crescimento de cultura axênica de promastigotas de *L. infantum*. Parasitas foram cultivados na presença de PAF a 1 e 10 μM , ou etanol e o crescimento foi acompanhado durante 7 dias. Não foi observada diferença entre as culturas tratadas com PAF 1 μM e etanol. Entretanto PAF 10 μM foi capaz de inibir a proliferação das formas promastigotas durante o período observado (Figura 10). Esse resultado indica que PAF pode ter algum efeito direto sobre os parasitas em sua forma promastigota.

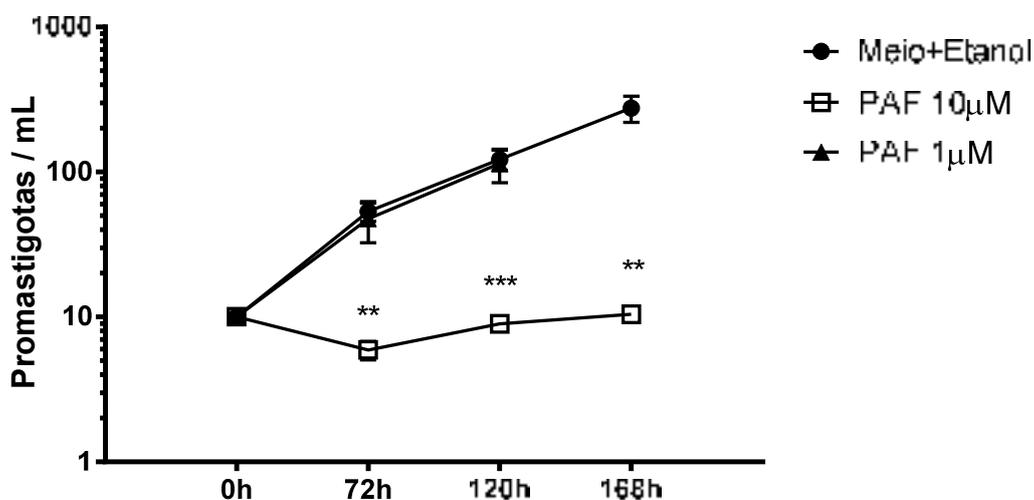


Figura 10. Efeito de PAF sobre o crescimento de formas promastigotas de *L. infantum* em cultura. Promastigotas de *L. infantum*, na concentração inicial de $10^5/\text{mL}$, foram cultivados com PAF 1 μM e 10 μM por 7 dias. As formas promastigotas móveis proliferativas foram quantificadas nos dias 0, 3, 5 e 7 de cultivo. Os resultados representam a média e desvio padrão de 5 poços examinados. Asterisco indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (**, $p < 0,01$) (***, $p < 0,001$).

PARTE II

Sabendo que PAF tem efeito leishmanicida sobre espécies como *L. amazonensis* (LONARDONI et al., 1994, 2000; ROSA et al., 2001; SANTIAGO et al., 2006) e *L. infantum*, (Figuras 2 e 3), e ainda assim a infecção por esses parasitas em condições naturais consegue se desenvolver, levando à patologia, é plausível imaginar que os parasitas possuam mecanismos de escape à ação de PAF.

Uma das possibilidades é a expressão de uma fosfolipase A₂ pelos parasitas, com atividade PAF-acetilhidrolase, como a já identificada em organismos como a bactéria *Streptococcus* (LIU et al., 2012) e até mesmo em outra espécie de leishmania, a *L. major* (PAWLOWIC; ZHANG, 2012).

A análise *in silico* revelou a presença de uma fase de leitura aberta (ORF), denominada LinJ.35.3070, que codificaria uma proteína com possível atividade fosfolipásica e identidade com fosfolipases A₂ de outros tripanosomatídeos e similaridade com fosfolipases de vertebrados.

6.8 IDENTIFICAÇÃO E CLONAGEM E DE UMA POSSÍVEL FOSFOLIPASE A₂ DE *L. INFANTUM*

A clonagem, seguida de sequenciamento mostrou que o plasmídeo apresenta um fragmento de 1362 pares de base, com 100% de homologia com a sequência “LinJ35_3070”, localizada no cromossomo Lin.chr35, identificada como uma possível fosfolipase A₂ em *L. infantum* (Figura 11).

```

>LinJ35_V3.3070 |||phospholipase A2-like protein, putative|Leishmania
infantum|chr 35|||
  ATGCACCCGA TCTTCGACTA CATCTTGICT ATTCACTACC TGCCGGCCGG GTCGTCGGTG
  CTGCTGTCAI GCCTTGCAGC GCGGTGGGGG GTGGATTGGA AGACGTGCCT CATGATGACC
  TGTGTGGGCT CACTTGTGAC GTGCGCCGCC TTCTACGTTT AGCCCTTGCA GTGCTTTTCC
  CCGCTCGGGG GAAAGTTCAA CGTGGGCACG CGTGAGGTGT GTGGTGAGCG CGGTGCCATG
  AAGCCCCCTG TCACCATCGT CTACCCGACC ACCAGCGGCA CGCCGCGGAG CGGAATCCAG
  TACATTCCGT TTGGCGAGCG CGGTTACCTG GTTGGCATGG CCAGCTACAG TAAAGTCCC
  TACGCACTGG TGAAAGACCT TTGCCTTCTG CGCAGGAAGA TCGACCCGA CGCGGAGCCG
  GCGCCGCTCT TCCAGCACGA TGGCATCCCA CGCCCGATGA TCGTGTTTCC CCACGGTCTT
  GCCGGATTTC CGCACTTGTA CAGCACACTG CTGATGGACC TCGCTGCGCG CGGTGCCGTC
  GTGTTTGCCG TGTCGCACAT GGACGGCAGC GCTGCTTCTT GCCGCGACGC CGGGAGGGAG
  ATTGCATTI CGCTGAACAC CCAGGTAGGC TGGACCACGG AGGATCGCGC TCCGCAGCTA
  GAGGTTTCGA TCCGAGAGAC CCTCAACACA ATCAAGCGCA TCCGACGCGG CGAGTACTG
  CTCGCGCTCG GGTACGACAA GGAGACGGTG GACACGTACA TCGCAAGGGA GCCGCGCTT
  CACCTCGTTG GGCATTGTTT TGGCGGCGCG ACATGCCTGG CGGCTGCCCT GAATGACACG
  CAAGACGCGA GTGAAAGGGG CGGCGTGAGC AGCGTCGCCA GCACTGTCGT CTACGACCCG
  TGGATGATCC CGCTGCGGAA GACGATGTTT TACGACAAGC TCACGGACAG GAAGCAACCG
  GTCCACTTCA CCACACCAAC GCTGCAGATC TTCTCTGAGG AGTGGGTGCG GAGCAAGGAG
  CAGCACGCGT TCTTTGAGGA GGTCAAGGCC ATCGTCGATG CGCAGCCGCG CTCGACTGAG
  GAGAGCGCTC TTGTGGCAGC AGTCGACGCC AAGCTGAAGG TAATGAAGAC GTCATGGTAC
  ACGATAAAGG ACTACGCGG CACTGGGCAC TTGACGTGCA CGGACGTCTC ATTGTTCACT
  CCGGTGCTGT ACCGCGCCGC TTACATGACG GCGTCACCGA GAGGCTGCAT TGTAGCGTTC
  GCAGCAGACA CAATGCGGTT CATTGAAAAG GTCTCCGGCC CGTTGCCCTT CGACACCAAA
  CTCTCAACG ACTCGGCGCT CGCCGCTGCG CTGAGGGGGT AA

```

Figura 11. Sequência gênica da PLA₂/PAF-AH de *L. infantum*.

A ontologia gênica fornecida pela base de dados GeneDB mostrou que a sequência clonada estaria relacionada com o catabolismo de lipídios, com possível atividade 1-alcil-2-acetilglicerofosfolina esterase, isto é PAF-acetilhidrolase. Além disso, possui elevado grau de homologia com sequências preditas como fosfolipase A₂ de outras espécies de leishmania como *L. major* e *L. braziliensis*, e grande identidade com fosfolipase A₂ de *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi* e com o grupo VII de fosfolipases de vertebrados, correspondentes as PAF-acetilhidrolases.

O alinhamento da sequência de aminoácidos preditos para a enzima (Figura 12) mostrou 99,6% de identidade e similaridade a uma possível PLA₂ de *L. donovani*; 93,4% de identidade e 96,7% de similaridade à PLA₂/PAF-acetilhidrolase de *L. major*; demonstrando que ela é altamente conservada entre espécies de leishmania. Além disso, a sequência apresentou 33,3% de identidade e 53,8% de similaridade com uma PLA₂ de *T. cruzi* e 30,1% de identidade e 41,7% de similaridade a PAF-AH citoplasmática de humanos. Assim como nas outras espécies de leishmania, a porção N-terminal possui uma sequência de possível peptídeo sinal seguida de uma possível hélice transmembrana (quadro na figura 12). Verificou-se também a presença da

6.9 EXPRESSÃO DA POSSÍVEL PAF-ACETILHIDROLASE DE *L. INFANTUM*

A sequência predita para fosfolipase A₂/PAF-acetilhidrolase foi clonada no vetor de expressão em eucarioto pLESXY-2 e transfectado em parasitas de *Leishmania tarentolae*, uma plataforma de expressão de proteínas (Jena Bioscience). Neste sistema comercial a proteína alvo é expressa e secretada para o meio de cultura. Um clone foi obtido, expandido e o sobrenadante de cultivo desse clone foi analisado através de uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida, mostrando uma banda proeminente na altura de 69kDa, não presente no sobrenadante nos parasitas *wild type* (Figura 13). Curiosamente a proteína expressa apresentou um tamanho maior que o previsto pela sequência gênica, cerca de 49kDa. Tentativas de obter a enzima de forma purificada estão sendo realizadas.

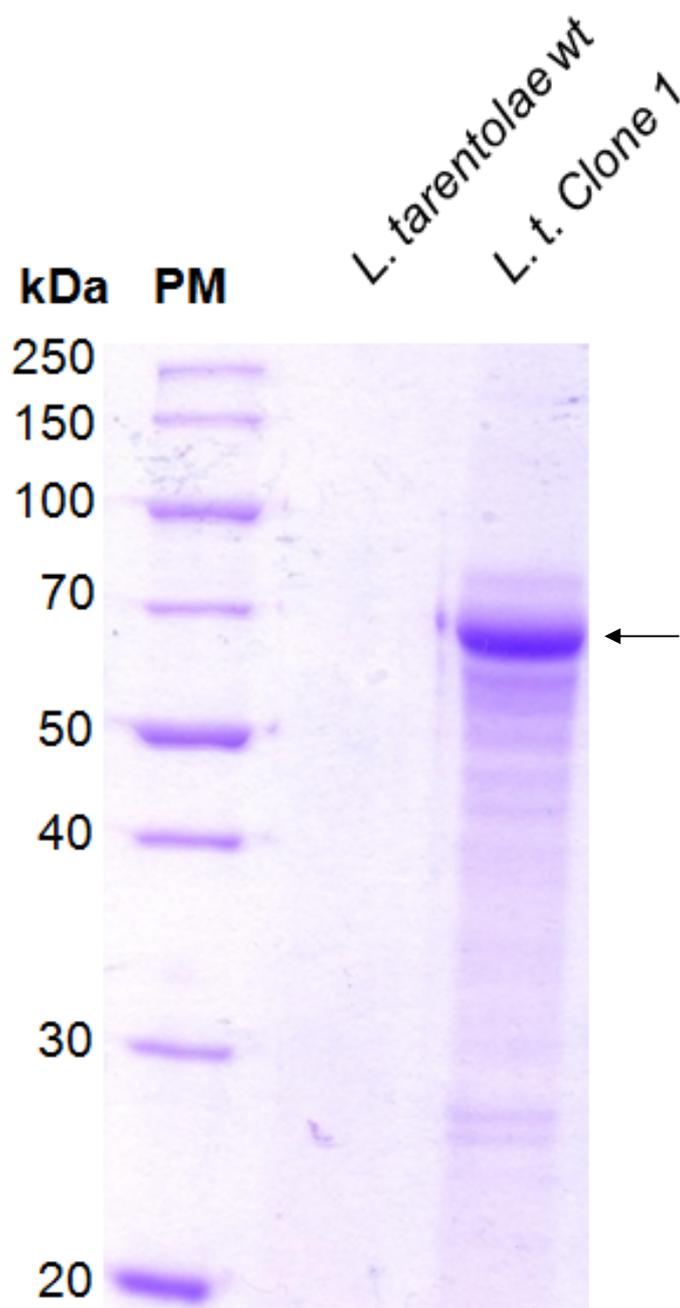


Figura 13. Expressão de uma possível PAF-acetilhidrolase de *Leishmania infantum*. Promastigotas de *L. tarentolae* foram transfectadas com o vetor pLESXY-2 contendo o gene de uma PLA₂ de *L. infantum* e selecionadas com neomicina. Os clones resistentes foram expandidos em cultura e os sobrenadantes avaliados quanto a presença de proteínas através de um SDS-PAGE. Legenda: PM: padrão de peso molecular. wt: wild type. L.t: *L.tarentolae*.

6.10 ATIVIDADE PAF-ACETILHIDROLASE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE *LEISHMANIA INFANTUM*.

Para confirmar se a proteína superexpressa e secretada pelo clone transfectado com o gene da PLA₂/PAF-AH de *L. infantum* era de fato a enzima, avaliamos a atividade fosfolipásica/PAF-AH no sobrenadante do clone. O 6-NBD PC é um fosfolipídio que contém uma pequena cadeia polar na posição sn-2. Além disso, esse fosfolipídio possui propriedades fluorescentes e tem sido usado em estudos relacionados a biologia celular de membranas (CONNOR; SCHROIT, 1987). PAF-AH são enzimas com capacidade de hidrolisar fosfolipídios com uma cadeia curta na posição sn-2 (PRESCOTT et al., 2000). O 6-NBD PC pode ser usado como ferramenta para dosar atividade PAF-AH, pois estas são capazes de hidrolisar esse substrato (STEINBRECHER; PRITCHARD, 1989). Sabendo que a enzima que estudamos possui identidade com PAF-AH de outros organismos, submetemos o sobrenadante de cultivo ao ensaio de atividade fosfolipásica PAF-AH. O clone 1 mostrou atividade PAF-AH quando comparado com o controle não transfectado, ao branco que recebeu somente os reagentes sem o 6-NBD PC e ao controle 6-NDB PC que não recebeu nenhuma amostra (Figura 14).

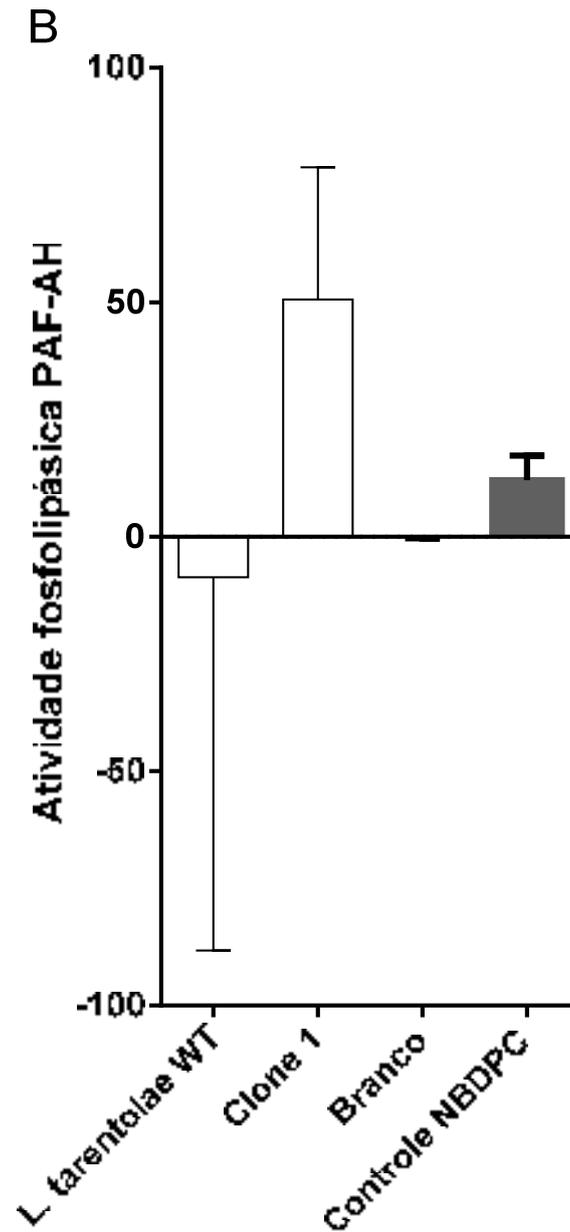


Figura 14. Atividades PAF- AH da proteína recombinante de *Leishmania infantum*. O sobrenadante de cultura dos clones transfectados com o vetor de expressão contendo o gene da PAF – AH de *L. infantum* foi incubado com o substrato 6-NBD PC e a emissão de fluorescência avaliada continuamente durante 1 hora. O controle branco não recebeu amostra e o controle NBDPC não recebeu o substrato 6-NBD PC. Os resultados representam a mediana e desvio interquartil dos valores de inclinação da reta de 3 poços obtida a partir da emissão de fluorescência dada pela equação $[b = \frac{\sum(x-x_{\text{barra}})(y-y_{\text{barra}})}{\sum(x-x_{\text{barra}})^2}]$.

6.11 ATIVIDADE PAF - ACETILHIDROLASE EM FRAÇÕES CELULARES DE *LEISHMANIA INFANTUM*

Sabendo que *L. infantum* possui um gene de uma fosfolipase com atividade PAF-acetilhidrolase, foi avaliada a atividade PAF acetilhidrolase em diferentes frações celulares do parasita. Os resultados mostraram atividade fosfolipásica PAF-acetilhidrolase, principalmente, nas frações enriquecidas em núcleo, organelas e membranas, enquanto que uma baixa atividade nos sobrenadantes de cultivo e nenhuma ou muito pouca atividade na fração solúvel (Figura 15). Outros experimentos precisam ser realizados para termos mais precisão na localização celular da enzima. Juntos esses dados sugerem que *L. infantum* expressa uma fosfolipase com atividade PAF-acetilhidrolase.

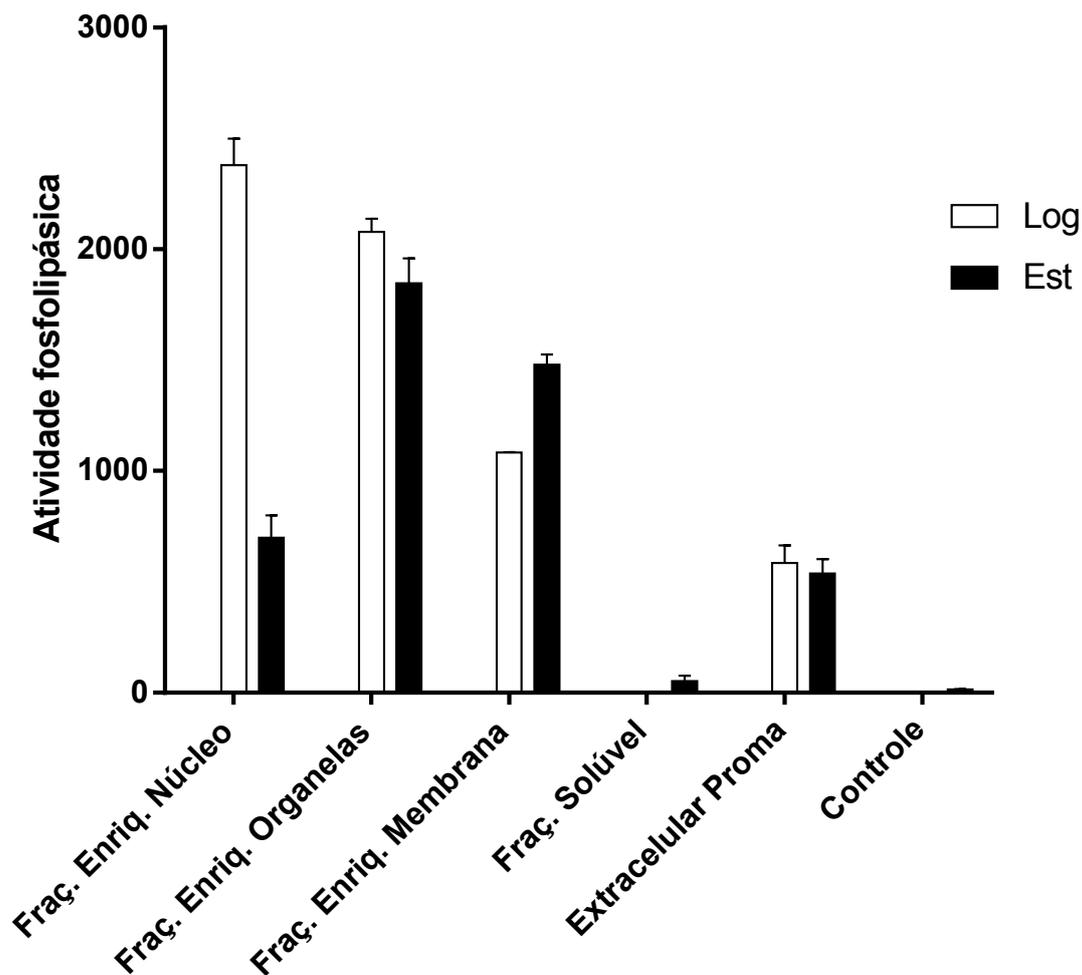


Figura 15. Atividade PAF – AH em frações celulares de *L. infantum*. Promastigotas de *L. infantum* foram submetidos a fracionamento celular por centrifugação diferencial e as frações obtidas foram incubadas com o substrato 6-NBD PC durante 1 hora e a emissão de fluorescência avaliada. O grupo controle não recebeu a amostra. Os resultados representam a mediana e desvio dos valores de inclinação da reta de 2 pontos obtida a partir da emissão de fluorescência dada pela equação $[b = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum(x - \bar{x})^2}]$.

7 DISCUSSÃO

Neste estudo foi observado que 1 μ M de PAF foi capaz de diminuir a infecção de macrófagos por *L. infantum* (Figura 2) e que a viabilidade das formas amastigotas dentro dos macrófagos foi diminuída (Figura 3). Esses resultados estão de acordo com trabalhos que mostraram que PAF é capaz de diminuir a infecção em modelos de doença causados por patógenos como *Candida albicans*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis* (LONARDONI et al., 1994, 2000; ALIBERTI et al., 1999; SANTIAGO et al., 2006; KIM et al., 2008). Por outro lado, diferente desses trabalhos, não foi observada a diminuição da infecção em tempos inferiores a 72 horas após a infecção e em concentrações de PAF menores que 1 μ M.

Sobre essas diferenças podemos citar como provável explicação as diferenças intrínsecas entre os parasitas em estudo. Neste estudo foi utilizada a *L. infantum*, espécie com distintas características, como a expressão diferenciada de proteínas e moléculas de superfície (ASSIS et al., 2012; LYNN et al., 2013), e responsável por uma doença de desfecho clínico diferente, com visceralização do parasita (GONTIJO; MELO, 2004).

Além disso, pode-se ressaltar diferenças no tipo de PAF utilizado nos diferentes estudos. Há diferentes isoformas da molécula, com diferenças nas cadeias carbônicas de seus ácidos graxos, contendo, por exemplo, na posição sn-1, hexadecil (PAF C-16; 2-O-methyl PAF C-16; 2-O-ethyl PAF C-16; Methylcarbamyl PAF C-16) ou o octadecil (PAF C-18; 2-O-methyl PAF C-18) entre outros. Neste estudo utilizou-se o 2-O-methyl PAF C-18. Os trabalhos com *C. albicans*, *T. cruzi* e *L. amazonensis* não descrevem a isoforma de PAF que utilizaram. De fato, sabe-se que distintas isoformas de PAF podem levar a diferentes respostas, como diferentes níveis de agregação plaquetária e produção de superóxido em plaquetas e macrófagos (STEWART; GRIGORIADIS, 1991). Ou ainda que, isotipos de PAF são capazes de induzir apoptose através de distintas vias de sinalização (RYAN et al., 2008). Sendo assim, as diferenças observadas entre os trabalhos poderiam ser decorrentes do tipo de PAF.

Há que se considerar também que os tipos macrófagos utilizados foram diferentes. Macrófagos peritoneais recrutados por tioglicolato podem ter fenótipos diferentes de macrófagos derivados de medula óssea e por consequência, diferentes padrões de resposta (GHOSN et al., 2010; WANG et al., 2013; LINEHAN et al., 2014).

Foi observado que PAF só foi capaz de diminuir a infecção quando colocado durante e repostado após a infecção (Figura 4). Rosa e colaboradores (2001) mostraram que a pré-incubação de macrófagos com PAF durante 60 minutos foi capaz de diminuir a quantidade de *L. amazonensis* dentro dos macrófagos. Já nos estudos de Lonardoní e colaboradores (1994; 2000), também com *L. amazonensis*, a co-incubação com PAF reduziu a infecção após 24 e 48 horas. Aqui, observamos uma diminuição da infecção quando PAF foi co-incubado, que não foi estatisticamente significativa (Figura 4), requerendo assim um maior tempo de contato de PAF com as células para que haja diminuição da infecção. Estas diferenças observadas podem estar relacionadas com as peculiaridades da *L. infantum*, com o tipo de PAF utilizado ou com o tipo de macrófago.

PAF é produzido por diversos tipos de células atuando de forma autócrina, parácrina e justácrina (PRESCOTT et al., 2000). No contexto da infecção por *L. infantum*, células endoteliais, neutrófilos e macrófagos poderiam produzir PAF em resposta a estímulos inflamatórios como a picada do flebótomo, sua saliva e a presença do parasita. De acordo com boa parte dos trabalhos presentes na literatura, o efeito de PAF é mediado via um receptor de membrana o PAFR (ISHII; SHIMIZU, 2000; PRESCOTT et al., 2000). Interessantemente, ao adicionarmos PAF, observamos que a infecção por *L. infantum* nos macrófagos oriundos dos animais *knockout* para o receptor de PAF diminuiu de forma semelhante que os oriundos de camundongos selvagens (Figura 5). Da mesma forma, houve também diminuição dos promastigotas viáveis no sobrenadante das culturas (Figura 6). Talvani e colaboradores (2003) mostraram em um modelo de infecção com *T. cruzi* que animais PAFR^{-/-} apresentaram maior parasitemia e letalidade quando comparados com selvagens. Nesse mesmo trabalho verificaram que macrófagos de animais PAFR^{-/-} não fagocitam as formas tripomastigotas quando estimulados com PAF. Da mesma forma, animais PAFR^{-/-} foram mais susceptíveis à infecção por

L. amazonensis com lesões maiores e maior parasitemia. Por outro lado, esses mesmos animais não foram mais susceptíveis à infecção por *L. major* (SANTIAGO et al., 2006).

Verificamos que PAF foi capaz de diminuir a infecção independente da presença dos antagonistas WEB2086 e BN52021, que por si só também não alteraram a infecção (Figura 7). Em outros modelos foi observado que antagonistas de PAF possuem a habilidade inversa do PAF, aumentando a infecção por *T. cruzi* e *L. amazonensis* e quando adicionados juntamente com PAF são capazes de diminuir o seu efeito microbicida mesmo que parcialmente (LONARDONI et al., 1994, 2000; ROSA et al., 2001). Além disso, animais quando tratados diariamente com WEB2170 e BN52021 desenvolveram maiores lesões na pata e maior carga parasitária no linfonodo e baço (LONARDONI et al., 2000).

Os dados com os animais PAFR^{-/-} e com os antagonistas sugerem que talvez PAF esteja atuando sobre a infecção de uma maneira independente do seu principal receptor descrito, o PAFR. Entretanto a literatura não tem registrado nenhum outro receptor para PAF. Por outro lado, alguns trabalhos têm mostrado que PAF pode agir por uma via independente do receptor PAFR. Brewer e colaboradores (2002) demonstraram que PAF é capaz de induzir apoptose em células com origem embriológica da crista neural, por uma via independente do PAFR e que a expressão do PAFR foi capaz de proteger as células da apoptose. O mesmo grupo mostrou que PAF extracelular é internalizado por essas células de maneira independente do PAFR, desencadeando a apoptose e que uma PAF-AH I α foi capaz de inibir o esse efeito apoptótico (BONIN et al., 2004). Ryan e colaboradores (2007) mostraram que PAF também induz a apoptose de neurônios primários por uma via que independe da ativação de PAFR. A internalização de PAF pela célula ocorre via ligação ao seu receptor e endocitose do complexo PAF-receptor (OHSHIMA et al., 2002). Entretanto alguns trabalhos demonstraram a habilidade de PAF atravessar a membrana plasmática de neutrófilos por movimento “flip flop” (BRATTON et al., 1992) ou através de uma transglutaminase (BRATTON, 1993). Sendo assim, PAF poderia estar sendo internalizado nos macrófagos PAFR^{-/-} atravessando a membrana plasmática e ativando mecanismos intracelulares que levariam a diminuição da infecção.

Mesmo PAF podendo causar morte celular (BREWER et al., 2002), a diminuição da infecção observada não está relacionada a morte dos macrófagos, visto que ensaios de MTT e Azul de Trypan mostraram que PAF na concentração de 1 μ M não afetou a viabilidade dos macrófagos selvagens e PAFR^{-/-} (Figura 8).

A redução da infecção em modelos experimentais tem sido associada a um aumento na produção de NO induzido por PAF (ALIBERTI et al., 1999; LONARDONI et al., 2000; KIM et al., 2008). Além disso, alguns trabalhos têm mostrado que PAF induz maior produção de NO em células estimuladas com LPS e IFN- γ (HOWARD; ERICKSON, 1995; MUSTAFA et al., 1996). Entretanto, em nosso estudo, PAF sozinho não induziu maior liberação de NO e durante a infecção por *L. infantum* não houve diferença entre a produção de NO entre os grupos tratados e não tratados com PAF, mas ainda assim PAF diminuiu a infecção (Figura 9). Rayan e colaboradores (2007) observaram que a morte celular induzida por PAF independente do PAFR não estava relacionada com a produção de NO. Lonardoni e colaboradores (2000) discutem em seu trabalho com *L. amazonensis* que PAF pode exercer seu efeito leishmanicida independente da produção de NO, visto que foi observado que PAF não induziu níveis detectáveis de NO em macrófagos residentes do peritônio, mas mesmo assim foi capaz de diminuir a infecção. Além disso, PGE₂ induz a produção de NO, entretanto é responsável por aumentar a infecção e a indometacina, um inibidor da produção de prostaglandinas, quando adicionado não induziu maior produção de NO, mas diminuiu a infecção (LONARDONI et al., 2000). Em nossos ensaios só foi possível detectar quantidades significantes de NO quando os macrófagos foram estimulados com LPS e IFN- γ . Tais evidências acumuladas nos levam a crer que NO não é a molécula responsável pelo efeito observado de PAF em nossos experimentos.

Foi observado que PAF foi capaz de inibir o crescimento de *L. infantum* na concentração de 10 μ M, mas não na concentração de 1 μ M, utilizada em nossos ensaios (Figura 10). Steel e colaboradores (2002) mostraram que PAF pode atuar como um mecanismo de defesa independente da produção de espécies reativas de oxigênio. Nesse trabalho eles verificaram que PAF em 4,53 μ M, foi capaz de inibir o crescimento de bactérias gram-positivas. O uso de

α -tocoferol, um agente capaz de proteger células eucarióticas contra a ação de lisofosfolipídeos, reverteu o efeito de PAF sugerindo que PAF talvez estivesse desestabilizando a membrana celular dessas bactérias (ANDERSON et al., 1996; STEEL et al., 2002). Outros trabalhos mostraram que 1 μ M de PAF é capaz de ativar proteínas cinases em protozoários como *Herpetomonas muscarum muscarum* e *Leishmania tropica* sugerindo que talvez esses microorganismos possuam receptores para PAF (SILVA-NETO et al., 2002; DUTRA et al., 2009). Sendo assim é possível considerar que PAF poderia estar agindo na infecção de macrófagos por *L. infantum* em um mecanismo independente do seu receptor descrito, incluindo a possibilidade de existir outro receptor de PAF. Ou ainda, que estaria atuando diretamente sobre a leishmania em sua forma amastigota, que possui características diferentes da forma promastigota (BOZDECH et al., 2003; SAXENA et al., 2007), desestabilizando sua membrana celular dentro do vacúolo parasitóforo, que é um ambiente hostil. Outra possibilidade seria que PAF estaria de alguma maneira regulando o ciclo celular do parasita, inibindo seu crescimento.

Parasitas de *L. infantum* podem apresentar mecanismos de escape ao efeito de PAF. Identificamos no genoma de *L. infantum* a sequência de uma possível PLA₂ com atividade PAF-AH e peso molecular estimado em 49kDa. Essa sequência apresentou elevada identidade com PLA₂/PAF-AH de outros tripanossomatídeos, e até mesmo humanos, com o motivo de lipase altamente conservado (Figura 12). Estas semelhanças sugerem que essa enzima pode ser comum a diferentes tripanossomatídeos, inclusive às espécies de leishmania.

A literatura tem mostrado a presença de PAF-AH em alguns microorganismos como bactéria e até mesmo tripanossomatídeos. Liu e colaboradores (2012) identificaram uma esterase em bactérias *Streptococcus* do Grupo A com atividade PAF-AH. A atividade da enzima estava relacionada à evasão do sistema imune e maior virulência da cepa em estudo. Em outro estudo foi identificado no genoma de *L. major* uma PLA₂/PAF-AH. A deleção do gene mostrou que essa enzima era a única responsável pela atividade PAF-AH do parasita e, além disso, as cepas *knockout* para a enzima exibiram uma virulência atenuada mostrando um importante papel para infectividade de leishmania (PAWLOWIC; ZHANG, 2012). Vale salientar que a PAF-AH de *L.*

major tem 93% de identidade com a que estamos estudando, o que pode significar que elas tenham propriedades e papéis semelhantes.

Para confirmarmos que o gene que identificamos realmente codifica uma enzima com atividade PAF-AH, expressamos a proteína de forma recombinante em *Leishmania tarentolae* como tentativa de obtê-la a semelhança da que é naturalmente expressa em *L. infantum*. Embora a proteína tenha o peso molecular predito em 49kDa, o clone transgênico que obtivemos expressou em grande quantidade uma proteína recombinante com cerca de 69kDa (Figura 13). Acreditamos que neste sistema de expressão alterações pós-traducionais, como glicosilações, podem ter alterado o peso molecular da enzima. De fato, além da habilidade de formar pontes dissulfeto nativas, *L. tarentolae* também promove a N-glicosilação de proteínas (SOLEIMANI et al., 2007; PHAN et al., 2009).

Embora ainda não termos conseguido purificar a proteína recombinante de maneira eficiente, o fato desta estar predominante no sobrenadante (Figura 13) nos possibilitou avaliar a atividade PAF-AH em sobrenadantes das leishmanias transgênicas. O sobrenadante do clone 1 apresentou atividade PAF-AH confirmando a análise de bioinformática (Figura 14). Ainda assim, é necessário obter a proteína de forma pura, para melhor estudarmos sua atuação, inclusive confirmarmos se possui a capacidade de hidrolisar PAF.

Atividade PAF-AH em frações de *L. infantum* mostrou-se maior nas frações contendo estruturas membranosas (Figura 15). Pawlowic e Zhang (2012) mostraram através da fusão da enzima com a proteína GFP que a PAF-AH de *L. major* está localizada no retículo endoplasmático, principalmente na região perinuclear e não é secretada. Estudos de biologia celular têm mostrado que a membrana do envelope nuclear é contínua com a membrana do retículo endoplasmático (ALBERTS et al., 2007). Dessa forma, a atividade observada no núcleo pode estar relacionada com partes do retículo endoplasmático que ficaram presas no núcleo durante o fracionamento. Ou ainda, a fração enriquecida em membranas pode conter membranas de organelas, e não só a membrana celular, justificando a atividade nessas frações. Observamos uma pequena atividade nas frações extracelulares. Parasitas que morreram durante o crescimento podem ter liberado seus conteúdos intracelulares na cultura ou durante a centrifugação nem todos os

parasitas foram para o pellet, justificando atividade, mesmo que pequena, nessas frações. Mas mesmo assim a liberação no meio extracelular da enzima não pode ser descartada. Outros experimentos, como imunolocalização, podem ser feitos para sabermos com precisão onde se encontra a PAF-AH de *L. infantum*.

Não foi observada diferença significativa nas frações em diferentes estágios de crescimento. Um estudo de análise de expressão gênica mostrou que uma PLA₂ de *L. donovani*, com 99% de identidade com a PLA₂/PAF-AH de *L. infantum*, estava 2 vezes mais expressa em parasitas na forma amastigota que na forma promastigota (ROSENZWEIG et al., 2008). Outros trabalhos têm mostrado que o perfil de proteínas varia conforme a leishmania muda de sua forma procíclica para metacíclica (NUGENT et al., 2004; MOJTAHEDI et al., 2008), entretanto nós não observamos diferença na atividade PAF-AH nas formas promastigotas em seu estado procíclico e metacíclico.

Diante dos nossos resultados e outros estudos que mostram o efeito leishmanicida de PAF, a presença de uma PAF-AH funcional no parasita poderia contribuir para hidrólise de PAF e evasão do sistema imunológico. Nós observamos que a atividade da enzima foi basicamente intracelular. Resultado muito semelhante ao observado em *L. major* (PAWLOWIC; ZHANG, 2012). Isto levanta o questionamento de como uma enzima intracelular poderia ter acesso ao PAF produzido pelo hospedeiro vertebrado. Uma possibilidade seria que a PLA₂/PAF-AH liberada de parasitas lisados poderia facilitar a sobrevivência de parasitas viáveis nos mamíferos. Ou ainda, que lipídeos e seus derivados, como PAF, provenientes do hospedeiro poderiam interagir com a PLA₂/PAF-AH via o sistema endocítico do parasita ou então após outros mecanismos de internalização de PAF (MCCONVILLE et al., 2002).

No contexto da infecção por *L. infantum*, PAF poderia atuar independente do receptor, sendo internalizado e agir no interior das células no combate ao parasita. Possibilidade que é corroborada pela observação que PAF só teve efeito leishmanicida contra *L. infantum*, em longo prazo, nas incubações de 72h (Figuras 2, 3 e 4), período que os parasitas internalizados já se transformaram em amastigotas (HERWALDT, 1999). Interessantemente, em *L. donovani* a PLA₂ homóloga à de *L. infantum* tem sua expressão aumentada na forma amastigota do parasita (ROSENZWEIG et al., 2008).

É importante considerar que a PLA₂/PAF-AH possa estar envolvida em outras funções celulares, como por exemplo, o metabolismo de glicerofosfolípidos do parasita ou mesmo do hospedeiro. Em *L. major* a PLA₂/PAF-AH homóloga não se mostrou essencial ou relacionada ao metabolismo lipídico, mas apenas à hidrólise de PAF (PAWLOWIC; ZHANG, 2012). Ainda assim, não podemos descartar esta função em *L. infantum*. Outros experimentos têm de ser realizados para confirmarmos essa possibilidade.

Estratégias como a obtenção de cepas de *L. infantum* knockouts ou que superexpressem a PLA₂/PAF-AH estão sendo tentadas para melhor entendermos a atuação dessa enzima na biologia e infectividade do parasita.

8 CONCLUSÕES

- PAF 1 μ M é capaz de diminuir a infecção de macrófagos por *L. infantum* por um mecanismo independente do seu receptor canônico e independente da produção de óxido nítrico.
- *L. infantum* expressa uma PLA₂/PAF-AH, conservada em espécies de leishmania, com atividade intracelular.

9 REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; et al. **Biologia molecular da célula**. New York: Garland Science, 2007. v. 5, p. 723.

ALIBERTI, J. C.; MACHADO, F. S.; GAZZINELLI, R. T.; TEIXEIRA, M. M.; SILVA, J. S. Platelet-activating factor induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages and mediates resistance to parasite infection in mice. **Infection and immunity**, v. 67, n. 6, p. 2810–2814, 1999.

ALLEWELT, M. et al. Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. **Infection and immunity**, v. 68, n. 7, p. 3998–4004, 2000.

ALMEIDA, M. C. DE; VILHENA, V.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 7, p. 861–870, 2003.

ANDERSON, R.; FELDMAN, C.; THERON, A. J.; et al. Anti-inflammatory, membrane-stabilizing interactions of salmeterol with human neutrophils in vitro. **British Journal of pharmacology**, v. 117, n. 7, p. 1387–1394, 1996.

ARAÚJO-SANTOS, T.; PRATES, D. B.; ANDRADE, B. B.; et al. *Lutzomyia longipalpis* saliva triggers lipid body formation and prostaglandin E₂ production in murine macrophages. **PLoS neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 11, p. e873, 2010.

ARAÚJO-SANTOS, T.; RODRÍGUEZ, N. E.; MOURA PONTES, S. DE; et al. Role of prostaglandin F₂α production in lipid bodies from *Leishmania infantum* chagasi: insights on virulence. **The Journal of Infectious Diseases**, 2014.

ASSIS, R. R.; IBRAIM, I. C.; NORONHA, F. S.; TURCO, S. J.; SOARES, R. P. Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, p. e1543, 2012.

BELAUNZARÁN, M. L.; LAMMEL, E. M.; ISOLA, E. L. D. DE. Phospholipases a in trypanosomatids. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 392082, 2011.

BENAIM, G.; LOPEZ-ESTRAÑO, C.; DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. A calmodulin-stimulated Ca²⁺ pump in plasma-membrane vesicles from *Trypanosoma brucei*; selective inhibition by pentamidine. **The Biochemical Journal**, v. 296 pt 3, p. 759–763, 1993.

BENVENISTE, J.; HENSON, P. M.; COCHRANE, C. G. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 136, n. 6, p. 1356–1377, 1972.

BERENS, R. L.; BRUN, R.; KRASSNER, S. M. A simple monophasic medium for axenic culture of hemoflagellates. **The Journal of Parasitology**, v. 62, n. 3, p. 360–365, 1976.

BHATTACHARYA, P.; ALI, N. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 2, p. 128–134, 2013.

BLANK, M. L.; LEE, T.; FITZGERALD, V.; SNYDER, F. A specific acetylhydrolase for 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (a hypotensive and platelet-activating lipid). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 1, p. 175–178, 1981.

BOGDAN, C.; DONHAUSER, N.; DÖRING, R.; et al. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 191, n. 12, p. 2121–230, 2000.

BONIN, F.; RYAN, S. D.; MIGAHED, L.; et al. Anti-apoptotic actions of the platelet-activating factor acetylhydrolase I alpha2 catalytic subunit. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 50, p. 52425–52436, 2004.

BOZDECH, Z.; LLINÁS, M.; PULLIAM, B. L.; et al. The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. **PLoS Biology**, v. 1, n. 1, p. e5, 2003.

BRATTON, D. L. Release of platelet activation factor from activated neutrophils. Transglutaminase-dependent enhancement of transbilayer movement across the plasma membrane. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 5, p. 3364–3373, 1993.

BRATTON, D. L.; DREYER, E.; KAILEY, J. M.; et al. The mechanism of internalization of platelet-activating factor in activated human neutrophils. Enhanced transbilayer movement across the plasma membrane. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 148, n. 2, p. 514–523, 1992.

BREITLING, R.; KLINGNER, S.; CALLEWAERT, N.; et al. Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. **Protein Expression and Purification**, v. 25, n. 2, p. 209–218, 2002.

BREWER, C.; BONIN, F.; BULLOCK, P.; et al. Platelet activating factor-induced apoptosis is inhibited by ectopic expression of the platelet activating factor G-protein coupled receptor. **Journal of Neurochemistry**, v. 82, n. 6, p. 1502–1511, 2002.

CASALS-STENZEL, J.; MUACEVIC, G.; WEBER, K. H. Pharmacological actions of WEB 2086, a new specific antagonist of platelet activating factor. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 241, n. 3, p. 974–981, 1987.

- CASTRO FARIA NETO, H. C.; STAFFORINI, D. M.; PRESCOTT, S. M.; ZIMMERMAN, G. A. Regulating inflammation through the anti-inflammatory enzyme platelet-activating factor-acetylhydrolase. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100 Suppl , n. December 2004, p. 83–91, 2005.
- CHAVES, M. M.; MARQUES-DA-SILVA, C.; MONTEIRO, A. P. T.; CANETTI, C.; COUTINHO-SILVA, R. Leukotriene B4 modulates P2X7 receptor-mediated *Leishmania amazonensis* elimination in murine macrophages. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 192, n. 10, p. 4765–4773, 2014.
- CONNELLY, M. C.; KIERSZENBAUM, F. Modulation of macrophage interaction with *Trypanosoma cruzi* by phospholipase A2-sensitive components of the parasite membrane. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 121, n. 3, p. 931–939, 1984.
- CONNOR, J.; SCHROIT, A. J. Determination of lipid asymmetry in human red cells by resonance energy transfer. **Biochemistry**, v. 26, n. 16, p. 5099–5105, 1987.
- COUGHLAN, A. F.; HAU, H.; DUNLOP, L. C.; BERNDT, M. C.; HANCOCK, W. W. P-selectin and platelet-activating factor mediate initial endotoxin-induced neutropenia. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. 1, p. 329–334, 1994.
- CZARNETZKI, B. Increased monocyte chemotaxis towards leukotriene B4 and platelet activating factor in patients with inflammatory dermatoses. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 54, n. 2, p. 486–492, 1983.
- DEMOPOULOS, C. A.; PINCKARD, R. N.; HANAHAN, D. J. Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glyceryl-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 19, p. 9355–9358, 1979.
- DENNIS, E. A.; CAO, J.; HSU, Y.; MAGRIOTI, V.; KOKOTOS, G. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 6130–6185, 2011.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.
- DUTRA, P. M. et al. Stimulation of *Leishmania tropica* protein kinase CK2 activities by platelet-activating factor (PAF). **Acta Tropica**, v. 111, n. 3, p. 247–254, 2009.
- GHOSN, E. E. B.; CASSADO, A. A.; GOVONI, G. R.; et al. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 6, p. 2568–2573, 2010.

GOMES, R. N.; BOZZA, F. A.; AMÂNCIO, R. T.; et al. Exogenous platelet-activating factor acetylhydrolase reduces mortality in mice with systemic inflammatory response syndrome and sepsis. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 26, n. 1, p. 41–49, 2006.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338–349, 2004.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; et al. Analysis of Nitrate , Nitrite , and [¹⁵N] Nitrate in Biological Fluids Automated NO ; and NO ? Analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131–138, 1982.

GUIMARÃES, E. T.; SANTOS, L. A.; RIBEIRO DOS SANTOS, R.; et al. Role of interleukin-4 and prostaglandin E2 in Leishmania amazonensis infection of BALB/c mice. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, v. 8, n. 5, p. 1219–1226, 2006.

HANAHAN, D. J. Platelet activating factor: a biologically active phosphoglyceride. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, p. 483–509, 1986.

HEERY, J. M.; KOZAK, M.; STAFFORINI, D. M.; et al. Oxidatively modified LDL contains phospholipids with platelet-activating factor-like activity and stimulates the growth of smooth muscle cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 96, n. 5, p. 2322–2330, 1995.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191–1199, 1999.

HIRAMOTO, M.; YOSHIDA, H.; IMAIZUMI, T.; YOSHIMIZU, N.; SATOH, K. A mutation in plasma platelet-activating factor acetylhydrolase (Val279-->Phe) is a genetic risk factor for stroke. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 28, n. 12, p. 2417–2420, 1997.

HOWARD, A. D.; ERICKSON, K. L. The induction and augmentation of macrophage tumoricidal responses by platelet-activating factor. **Cellular immunology**, v. 164, n. 1, p. 105–112, 1995.

IMAIZUMI, T. A.; STAFFORINI, D. M.; YAMADA, Y.; et al. Platelet-activating factor: a mediator for clinicians. **Journal of Internal Medicine**, v. 238, n. 1, p. 5–20, 1995.

ISHII, S.; KUWAKI, T.; NAGASE, T.; et al. Impaired anaphylactic responses with intact sensitivity to endotoxin in mice lacking a platelet-activating factor receptor. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 187, n. 11, p. 1779–1788, 1998.

ISHII, S.; NAGASE, T.; TASHIRO, F.; et al. Bronchial hyperreactivity, increased endotoxin lethality and melanocytic tumorigenesis in transgenic mice

overexpressing platelet-activating factor receptor. **The EMBO Journal**, v. 16, n. 1, p. 133–142, 1997.

ISHII, S.; SHIMIZU, T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. **Progress in Lipid Research**, v. 39, n. 1, p. 41–82, 2000.

JANG, Y.; WATERWORTH, D.; LEE, J.-E.; et al. Carriage of the V279F null allele within the gene encoding Lp-PLA₂ is protective from coronary artery disease in South Korean males. **PloS One**, v. 6, n. 4, p. e18208, 2011.

KIM, H.-A.; KIM, S.-H.; KO, H.-M.; et al. Nitric oxide plays a key role in the platelet-activating factor-induced enhancement of resistance against systemic candidiasis. **Immunology**, v. 124, n. 3, p. 428–435, 2008.

KITSIOULI, E. I.; NAKOS, G.; LEKKA, M. E. Differential determination of phospholipase A(2) and PAF-acetylhydrolase in biological fluids using fluorescent substrates. **Journal of Lipid Research**, v. 40, n. 12, p. 2346–2356, 1999.

LACHACHI, H.; PLANTAVID, M.; SIMON, M. F.; et al. Inhibition of transmembrane movement and metabolism of platelet activating factor (PAF-acether) by a specific antagonist, BN 52021. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 132, n. 2, p. 460–466, 1985.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811–827, 2005.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 10, p. 787–795, 2002.

LINDEMANN, S.; TOLLEY, N. D.; DIXON, D. A.; et al. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. **The Journal of Cell Biology**, v. 154, n. 3, p. 485–490, 2001.

LINEHAN, E.; DOMBROWSKI, Y.; SNODDY, R.; et al. Aging impairs peritoneal but not bone marrow-derived macrophage phagocytosis. **Aging cell**, 2014.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 83, 2012.

LIU, G.; LIU, M.; XIE, G.; LEI, B. Characterization of streptococcal platelet-activating factor acetylhydrolase variants that are involved in innate immune evasion. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 9, p. 3128–3138, 2013.

LIU, M.; ZHU, H.; LI, J.; et al. Group A streptococcus secreted esterase hydrolyzes platelet-activating factor to impede neutrophil recruitment and

facilitate innate immune evasion. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, p. e1002624, 2012.

LONARDONI, M. V; BARBIERI, C. L.; RUSSO, M.; JANCAR, S. Modulation of *Leishmania (L.) amazonensis* Growth in Cultured Mouse Macrophages by Prostaglandins and Platelet Activating Factor. **Mediators of Inflammation**, v. 3, n. 2, p. 137–141, 1994.

LONARDONI, M. V; RUSSO, M.; JANCAR, S. Essential role of platelet-activating factor in control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 11, p. 6355–6361, 2000.

LORANT, D. E.; ZIMMERMAN, G. A.; MCINTYRE, T. M.; PRESCOTT, S. M. Platelet-activating factor mediates procoagulant activity on the surface of endothelial cells by promoting leukocyte adhesion. **Seminars in Cell Biology**, v. 6, n. 5, p. 295–303, 1995.

LYNN, M. A.; MARR, A. K.; MCMASTER, W. R. Differential quantitative proteomic profiling of *Leishmania infantum* and *Leishmania mexicana* density gradient separated membranous fractions. **Journal of Proteomics**, v. 82, p. 179–192, 2013.

MARIM FM LIMA DS, ZAMBONI DS., S. T. N. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15263, 2010.

MATTE, C.; MAION, G.; MOURAD, W.; OLIVIER, M. *Leishmania donovani*-induced macrophages cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 synthesis. **Parasite Immunology**, v. 23, n. 4, p. 177–184, 2001.

MCCONVILLE, M. J.; MULLIN, K. A.; ILGOUTZ, S. C.; TEASDALE, R. D. Secretory pathway of trypanosomatid parasites. **Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR**, v. 66, n. 1, p. 122–154, 2002.

MCINTYRE, T. M.; ZIMMERMAN, G. A.; SATOH, K.; PRESCOTT, S. M. Cultured endothelial cells synthesize both platelet-activating factor and prostacyclin in response to histamine, bradykinin, and adenosine triphosphate. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 76, n. 1, p. 271–280, 1985.

MELO, E. C. DE; FORTALEZA, C. M. C. B. Challenges in the therapy of Visceral Leishmaniasis in Brazil: A public health perspective. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2013, 2013.

MILLER, S. B. Prostaglandins in health and disease: an overview. **Seminars in arthritis and rheumatism**, v. 36, n. 1, p. 37–49, 2006.

MOJTAHEDI, Z.; CLOS, J.; KAMALI-SARVESTANI, E. *Leishmania major*: identification of developmentally regulated proteins in procyclic and metacyclic promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 119, n. 3, p. 422–429, 2008.

MÜLLER, K.; ZANDBERGEN, G. VAN; HANSEN, B.; et al. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 190, n. 1-2, p. 73–76, 2001.

MURAKAMI, M. Lipid mediators in life science. **Experimental Animals**, v. 60, n. 1, p. 7–20, 2011.

MURAKAMI, M. et al. Emerging roles of secreted phospholipase A2 enzymes: Lessons from transgenic and knockout mice. **Biochimie**, v. 92, n. 6, p. 561–582, 2010.

MUSTAFA, S. B.; HOWARD, K. M.; OLSON, M. S. Platelet-activating factor augments lipopolysaccharide-induced nitric oxide formation by rat Kupffer cells. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 23, n. 6, p. 1622–1630, 1996.

NOK, A. J. et al. Phospholipase A2 from *Trypanosoma congolense*: characterization and haematological properties. **Cell Biochemistry and Function**, v. 11, n. 2, p. 125–130, 1993.

NORSWORTHY, N. B. et al. Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 3, p. 1240–1247, 2004.

NUGENT, P. G. et al. Proteomic analysis of *Leishmania mexicana* differentiation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 136, n. 1, p. 51–62, 2004.

OHSHIMA, N.; ISHII, S.; IZUMI, T.; SHIMIZU, T. Receptor-dependent metabolism of platelet-activating factor in murine macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 12, p. 9722–9727, 2002.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. **Vaccine**, v. 26, n. 14, p. 1709–1724, 2008.

PASSERO, L. F. D. et al. The effect of phospholipase A2 from *Crotalus durissus collilineatus* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Parasitology Research**, v. 102, n. 5, p. 1025–1033, 2008.

PAWLOWIC, M. C.; ZHANG, K. *Leishmania* parasites possess a platelet-activating factor acetylhydrolase important for virulence. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 186, n. 1, p. 11–20, 2012.

PEI, Y.; BARBER, L. A.; MURPHY, R. C.; et al. Activation of the epidermal platelet-activating factor receptor results in cytokine and cyclooxygenase-2 biosynthesis. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 161, n. 4, p. 1954–1961, 1998.

PELISSARI, D. M. et al. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, 2011.

PENKE, L. R.; SUDAN, R.; SATHISHKUMAR, S.; SAHA, B. Prostaglandin E₂ receptors have differential effects on *Leishmania major* infection. **Parasite Immunology**, v. 35, n. 1, p. 51–54, 2013.

PHAN, H.-P.; SUGINO, M.; NIIMI, T. The production of recombinant human laminin-332 in a *Leishmania tarentolae* expression system. **Protein Expression and Purification**, v. 68, n. 1, p. 79–84, 2009.

POUBELLE, P. E.; GINGRAS, D.; DEMERS, C.; et al. Platelet-activating factor (PAF-acether) enhances the concomitant production of tumour necrosis factor- α and interleukin-1 by subsets of human monocytes. **Immunology**, v. 72, n. 2, p. 181–187, 1991.

PRATES, D. B.; ARAÚJO-SANTOS, T.; LUZ, N. F.; et al. *Lutzomyia longipalpis* saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. **Journal of leukocyte biology**, v. 90, n. 3, p. 575–582, 2011.

PRESCOTT, S. M.; ZIMMERMAN, G. A.; MCINTYRE, T. M. Human endothelial cells in culture produce platelet-activating factor (1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) when stimulated with thrombin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 11, p. 3534–3538, 1984.

PRESCOTT, S. M.; ZIMMERMAN, G. A.; STAFFORINI, D. M.; MCINTYRE, T. M. Platelet-activating factor and related lipid mediators. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, p. 419–445, 2000.

RAMÍREZ, M. M.; QUARDT, S. M.; KIM, D.; et al. Platelet activating factor modulates microvascular permeability through nitric oxide synthesis. **Microvascular Research**, v. 50, n. 2, p. 223–234, 1995.

REINER, N. E.; MALEMUD, C. J. Arachidonic acid metabolism in murine leishmaniasis (*Donovani*): ex-vivo evidence for increased cyclooxygenase and 5-lipoxygenase activity in spleen cells. **Cellular Immunology**, v. 88, n. 2, p. 501–510, 1984.

REINER, N. E.; MALEMUD, C. J. Arachidonic acid metabolism by murine peritoneal macrophages infected with *Leishmania donovani*: in vitro evidence for parasite-induced alterations in cyclooxygenase and lipoxygenase pathways. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 134, n. 1, p. 556–563, 1985.

RIBEIRO, J. M. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annual Review of Entomology**, v. 32, n. 92, p. 463–478, 1987.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; OTERO, A. C.; GOMES, N. A.; et al. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 172, n. 7, p. 4454–4462, 2004.

RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitology Today (Personal ed.)**, v. 16, n. 7, p. 292–297, 2000.

ROSA, M. S. et al. Platelet-activating factor (PAF) modulates peritoneal mouse macrophage infection by *Leishmania amazonensis*. **Current Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 33–37, 2001.

ROSENZWEIG, D.; et al. Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. **FASEB Journal**, v. 22, n. 2, p. 590–602, 2008.

RYAN, S. D.; et al. Heterogeneity in the sn-1 carbon chain of platelet-activating factor glycerophospholipids determines pro- or anti-apoptotic signaling in primary neurons. **Journal of Lipid Research**, v. 49, n. 10, p. 2250–2258, 2008.

RYAN, S. D. et al. Platelet activating factor-induced neuronal apoptosis is initiated independently of its G-protein coupled PAF receptor and is inhibited by the benzoate orsellinic acid. **Journal of Neurochemistry**, v. 103, n. 1, p. 88–97, 2007.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845–858, 2002.

SANTIAGO, H. C. et al. Platelet activating factor receptor-deficient mice present delayed interferon upregulation and high susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 11, p. 2569–2577, 2006.

SAXENA, A. et al. Analysis of the *Leishmania donovani* transcriptome reveals an ordered progression of transient and permanent changes in gene expression during differentiation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 152, n. 1, p. 53–65, 2007.

SEREZANI, C. H. et al. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 177, n. 5, p. 3201–3208, 2006.

SHAVER, C. M.; HAUSER, A. R. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 12, p. 6969–6977, 2004.

SHIMIZU, T. Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 49, p. 123–150, 2009.

SILVA-NETO, M. A C.; CARNEIRO, A. B.; VIEIRA, D. P.; MESQUITA, R. D.; LOPES, A. H. C. S. Platelet-activating factor (PAF) activates casein kinase 2 in

the protozoan parasite *Herpetomonas muscarum muscarum*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 293, n. 5, p. 1358–1363, 2002.

SITKIEWICZ, I.; STOCKBAUER, K. E.; MUSSER, J. M. Secreted bacterial phospholipase A2 enzymes: better living through phospholipolysis. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 63–69, 2007.

SOLEIMANI, M.; MAHBOUDI, F.; DAVOUDI, N.; et al. Expression of human tissue plasminogen activator in the trypanosomatid protozoan *Leishmania tarentolae*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 48, n. Pt 1, p. 55–61, 2007.

SOUZA CARMO, E. V. DE; KATZ, S.; BARBIÉRI, C. L. Neutrophils reduce the parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected macrophages. **PloS One**, v. 5, n. 11, p. e13815, 2010.

STAFFORINI, D. M. PAF acetylhydrolase gene polymorphisms and asthma severity. **Pharmacogenomics**, v. 2, n. 3, p. 163–175, 2001.

STAFFORINI, D. M.; SATOH, K.; ATKINSON, D. L.; et al. Platelet-activating factor acetylhydrolase deficiency. A missense mutation near the active site of an anti-inflammatory phospholipase. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 97, n. 12, p. 2784–2791, 1996.

STEEL, H. C.; COCKERAN, R.; ANDERSON, R. Platelet-activating factor and lyso-PAF possess direct antimicrobial properties in vitro. **APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 110, n. 2, p. 158–164, 2002.

STEINBRECHER, U. P.; PRITCHARD, P. H. Hydrolysis of phosphatidylcholine during LDL oxidation is mediated by platelet-activating factor acetylhydrolase. **Journal of Lipid Research**, v. 30, n. 3, p. 305–315, 1989.

STEWART, A. G.; GRIGORIADIS, G. Structure-activity relationships for platelet-activating factor (PAF) and analogues reveal differences between PAF receptors on platelets and macrophages. **Journal of Lipid Mediators**, v. 4, n. 3, p. 299–308, 1991.

SUBRAMANIAN, V. S.; GOYAL, J.; MIWA, M.; et al. Role of lecithin-cholesterol acyltransferase in the metabolism of oxidized phospholipids in plasma: studies with platelet-activating factor-acetyl hydrolase-deficient plasma. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1439, n. 1, p. 95–109, 1999.

TALVANI, A. et al. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in platelet-activating factor receptor-deficient mice. **Microbes Infection**, v. 5, n. 9, p. 789–796, 2003.

TAVARES, N. M. et al. Understanding the mechanisms controlling *Leishmania amazonensis* infection in vitro: the role of LTB4 derived from human neutrophils. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 4, p. 656–666, 2014.

TEIXEIRA, M. J. et al. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 1, p. 32–40, 2006.

TITUS, R. G.; RIBEIRO, J. M. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 239, n. 4845, p. 1306–1308, 1988.

VADAS, P. et al. Platelet-activating factor, PAF acetylhydrolase, and severe anaphylaxis. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 1, p. 28–35, 2008.

VAZQUEZ-TORRES, A. et al. Analysis of nitric oxide-dependent antimicrobial actions in macrophages and mice. **Methods in enzymology**, v. 437, p. 521–38, 2008.

VENABLE, M. E.; ZIMMERMAN, G. A.; MCINTYRE, T. M.; PRESCOTT, S. M. Platelet-activating factor: a phospholipid autacoid with diverse actions. **Journal of Lipid Research**, v. 34, n. 5, p. 691–702, 1993.

WANG, C.; YU, X.; CAO, Q.; et al. Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. **BMC Immunology**, v. 14, p. 6, 2013.

WHO, S. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. , 2013.

WINSTEAD, M. V; BALSINDE, J.; DENNIS, E. A. Calcium-independent phospholipase A(2): structure and function. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1488, n. 1-2, p. 28–39, 2000.

YOST, C. C. et al. Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates. **Blood**, v. 113, n. 25, p. 6419–6427, 2009.

YOST, C. C.; WEYRICH, A. S.; ZIMMERMAN, G. A. The platelet activating factor (PAF) signaling cascade in systemic inflammatory responses. **Biochimie**, v. 92, n. 6, p. 692–697, 2010.