



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
FACULDADE DE BIOMEDICINA

LETÍCIA CRISTINA DALZY CASTRO

**PRODUÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS DURANTE INTERAÇÃO DO  
PROTOZOÁRIO *Leishmania (Leishmania) amazonensis* E A CÉLULA HOSPEDEIRA  
APÓS TRATAMENTO COM A CROTOXINA.**

Orientadora: Edilene Oliveira da Silva

BELÉM - PARÁ

2017

**LETÍCIA CRISTINA DALZY CASTRO**

**PRODUÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS DURANTE INTERAÇÃO DO  
PROTOZOÁRIO *Leishmania (Leishmania) amazonensis* E A CÉLULA HOSPEDEIRA  
APÓS TRATAMENTO COM A CROTOXINA.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
à Faculdade de Biomedicina da Universidade  
Federal do Pará, como requisito parcial para  
obtenção do grau de Bacharel em  
Biomedicina.

Orientadora: Edilene Oliveira da Silva

**BELÉM - PARÁ**

2017

**LETÍCIA CRISTINA DALZY CASTRO**

**PRODUÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS DURANTE INTERAÇÃO DO  
PROTOZOÁRIO *Leishmania (Leishmania) amazonensis* E A CÉLULA HOSPEDEIRA  
APÓS TRATAMENTO COM A CROTOXINA.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
à Faculdade de Biomedicina da Universidade  
Federal do Pará, como requisito parcial para  
obtenção do grau de Bacharel em  
Biomedicina.

**BANCA EXAMINADORA**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Edilene Oliveira da Silva – ICB – UFPA.

Avaliador 1: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Francisco Acácio Alves – ICB – UFPA

Avaliador 2: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Barbarella Matos Macchi – ICB – UFPA

Avaliador 3: José Luiz Martins do Nascimento (Suplente) - ICB – UFPA

**BELÉM - PARÁ**

2017

*“Esforça-te, e tem bom ânimo; não temas, nem te  
espantes; porque o Senhor teu Deus é contigo,  
por onde quer que andares.”*

*Josué 1:9*

## AGRADECIMENTOS

Não sou de muitas palavras, mas quero que saibam que fico muito grata a todos. Mesmo que eu não diga muita coisa sobre cada um especificamente, saibam que todos vocês foram essenciais. Bom, agradeço primeiramente a Deus que me sustentou nesses quatro anos e principalmente no último, em seguida a toda minha família toda que de alguma forma me alegrou e me ajudou emocionalmente a finalizar este curso, principalmente meu pai, minha mãe e meu irmão que sempre estiveram comigo me acompanhando e ajudando em tudo, me sustentando e torcendo por mim.

Também quero deixar meu muito obrigada a meus amigos que fiz nesse curso, Nayara Santos e Maeeel Mendonça, por todas os risos, abraços, lanches, brincadeiras, e apoio nos momentos difíceis, porque sem vocês não teria nem chegado no TCC! Agradeço também ao luxuoso Jackson que esteve presente me fazendo rir e sempre me dando apoio durante o TCC. E a Brittany Wilson, quer dizer Vanessa Cardoso, que esteve nos dois momentos (curso e TCC) ...Obrigada por estar sempre comigo desde do momento em que a gente só sabia rir até o que a gente só sabia chorar mas sempre com uma esperança de que no final tudo ia dar certo. <3

Á todos do laboratório que me de alguma forma de ajudaram a concluir esse trabalho, e que estavam presentes durante as tardes de café, dentre eles o Bruno, a Celice, e o Jorge. E em especial agradeço ao Luís que me ensinou tudo logo que cheguei ao laboratório e sempre esteve disposto a ajudar; a Lienne que também sempre esteve disposta a me ajudar quando precisei; a minha orientadora professora Edilene, pela paciência e orientação; e por último, mas não menos importante, a Amanda que esteve me ajudando na reta final de tudo isso e que deve ter se estressado muito de tanto que atentei a vida dela (kkkk), muito obrigada! :D Vou sempre lembrar de tudo que fizeram por mim, obrigada!

## SÚMARIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. ASPECTOS GERAIS.....	1
1.2. GÊNERO <i>LEISHMANIA</i> .....	2
<b>1.2.1. Classificação taxonômica.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2.2. Morfologia.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2.3. Ciclo biológico.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2.4. Principais organelas e estruturas do parasito.....</b>	<b>5</b>
1.3. RELAÇÃO PARASITO X HOSPEDEIRO.....	6
<b>1.3.1 Corpos lipídicos e seu envolvimento no processo inflamatório.....</b>	<b>9</b>
1.4. TRATAMENTO.....	10
1.5. CROTOXINA.....	12
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	13
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
3.1. OBTENÇÃO E PREPARO DA CROTOXINA (CTX) .....	14
3.2. CULTIVO E MANUTENÇÃO DO PARASITO.....	14
3.3. OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS.....	14
3.4. INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS COM <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	15
3.5. DETECÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS EM <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	15
3.6. DETECÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO DE CORPOS LIPÍDICOS EM MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS E INFECTADOS POR <i>L.</i> <i>amazonensis</i> .....	16
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	16
3.8. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	16
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>17</b>

4.1. QUANTIFICAÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS EM <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> TRATADOS COM CTX.....	17
4.2. QUANTIFICAÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS EM MACRÓFAGOS TRATADOS COM CTX.....	18
4.3. QUANTIFICAÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS EM MACRÓFAGOS INFECTADOS E TRATADOS COM CTX.....	18
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>24</b>

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1:</b> Morfologia do Parasito <i>Leishmania</i> .....	3
<b>Figura 2:</b> Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> .....	4
<b>Figura3:</b> Resposta macrofágica M1 e M2.....	7
<b>Figura 4:</b> Porcentagem de parasitos tratados com crotoxina (CTX) na concentração de 2,4 µg/mL e com anfotericina B.....	17
<b>Figura 5:</b> Porcentagem de macrófagos não infectados tratados com crotoxina (CTX) nas concentrações 2,4 e 4,8 µg/mL e LPS.....	18
<b>Figura 6:</b> Porcentagem de macrófagos infectados tratados com crotoxina (CTX) na concentração de 2,4 µg/mL e anfotericina B.....	19

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS OU SÍMBOLOS

- AA - Ácido araquidônico
- ADRP - Proteína relacionada a diferenciação de adipócitos
- COX - Cicloxigenases
- CTX - Crotoxina
- DMEM - Dulbecco's modified Eagle's medium
- EROs - Espécies reativas do oxigênio
- GP63 – Glicoproteína 63
- INF- $\gamma$  - Interferon-  $\gamma$
- IL- Interleucina
- LCD - Leishmaniose cutânea difusa
- LCL - Leishmaniose cutânea localizada
- LMC - Leishmaniose mucocutânea
- LPG - Lipofosfoglicano
- LPS - Lipopolissacarídeo
- LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana
- LVA - Leishmaniose Visceral Americana
- NO - Óxido nítrico
- PGE2 - Prostaglandina E2
- PLA2 - Fosfolipase A2
- RPMI - Roswell Park Memorial Institute
- SBF - Soro Bovino Fetal
- TIP47 - Proteína de interação de cauda de 47 kDa
- TNF- $\alpha$  – Sigla inglesa para fator de necrose tumoral
- PBS - Tampão fosfato salina

## RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania* que possui alta incidência na região norte do Brasil. A *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório que se replica em células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente macrófagos. Durante o processo inflamatório os macrófagos normalmente aumentam a produção de corpos lipídicos, principal local de produção de prostaglandina, substância pró-inflamatória. O tratamento da LTA é baseado em quimioterapia, entretanto, as drogas disponíveis são tóxicas e com elevado custo. Assim, o desenvolvimento de drogas efetivas e sem efeitos colaterais para o tratamento da leishmaniose é prioridade. Toxinas animais apresentam extraordinária diversidade de atividades biológicas. Entretanto, as bases moleculares da ação destas toxinas ainda são pouco conhecidas. A crotoxina (CTX), o principal componente do veneno de serpente da espécie *Crotalus durissus terrificus*, é um composto bioativo com diversas propriedades, dentre elas podemos citar sua atividade no combate a cânceres e a microrganismos, e sua participação na modulação de citocinas (Barros *et al.* 2015; Brigatte *et al.*,2016; Samy *et al.*, 2016). Além disso, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a CTX 2,4µg/mL é capaz de ativar macrófagos em perfil inflamatório durante interação com o parasito, visto que foi observado aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- $\alpha$ , aumento dos níveis de substâncias microbidas como o óxido nítrico (NO) e de eicosanoides como a prostaglandina, além do acúmulo de corpos lipídicos no interior dos macrófagos após 24 horas de tratamento. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar se há diferença na produção de corpos lipídicos em formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e em macrófagos infectados e não infectados com o parasito após tratamento com CTX. Os resultados obtidos demonstraram que a CTX é capaz de induzir aumento de corpos lipídicos em promastigotas e em macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*, tratados com CTX. Entretanto não houve alteração no número de corpos lipídicos em macrófagos não infectados tratados com CTX. Com base nos resultados podemos concluir que a CTX possui capacidade de ativar macrófagos na presença do parasito, atuando na imunomodulação da célula hospedeira em resposta a infecção, podendo ser eficaz no tratamento contra leishmaniose.

Palavras chave: **crotoxina, *Leishmania*, corpos lipídicos, macrófagos**

## ABSTRACT

American cutaneous leishmaniasis (ACL) is a disease caused by different species of the genus *Leishmania* with high incidence in the northern region of Brazil. *Leishmania* is an obligate intracellular parasite that replicates in cells of the mononuclear phagocytic system, mainly macrophages. During the inflammatory process, macrophages usually increase the production of lipid bodies, the main site of prostaglandin production, a pro-inflammatory substance. The treatment of ACL is based on chemotherapy, however, the drugs available are toxic and high cost. Thus, the development of effective drugs from bioproducts for the treatment of leishmaniasis is a priority. Animal toxins have a great diversity of biological activities. However, the molecular bases of action of these toxins are still little known. Crotoxin (CTX), the main component of snake venom of the species *Crotalus durissus terrificus*, is a bioactive compound with several properties that protect against cancers and microorganisms, besides participating in the modulation of cytokines (Barros *et al.*, Brigatte *et al.*, 2016, Samy *et al.*, 2016). In addition, our research group demonstrated that CTX 2.4 µg / mL is able to activate macrophages in an inflammatory model during an interaction with the parasite, and increased production of pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF-α, elevated levels of microbicides such as nitric oxide (NO) and prostaglandin. It lead to the accumulation of lipid bodies inside the macrophages after 24 hours of treatment. In this way, the objective of this work was analyze the production of lipid bodies after the treatment with CTX. The results obtained demonstrate that CTX is able to induce increase of lipid bodies in promastigotes and in macrophages infected with *L. (L.) amazonensis* treated with CTX. However, there was no change in the number of lipid bodies in uninfected macrophages treated with CTX. Based on the results we can conclude that a CTX has the ability to activate macrophages in the presence of parasites and this way can aid these cells during an immune response against the parasite and may be effective in the treatment of leishmaniasis.

**Key words: crotoxin, *Leishmania*, lipid bodies, macrophage.**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. ASPECTOS GERAIS

As leishmanioses são um conjunto de doenças que estão distribuídas em 98 países no mundo. Acometem cerca de 12 milhões de pessoas e apresentam 0,7 a 1,2 milhões de novos casos (Izadi *et al.*, 2016). O agente causador desta antropozoonose são protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* que é transmitido através do repasto sanguíneo do inseto vetor conhecido como flebotomíneo (Yao & Wilson, 2016).

Dentre os países afetados por esta doença, a maior parte está localizado em zonas tropicais do globo, como nas regiões da África, Ásia, e América Latina, além dos países da Europa mediterrânea (Savoia *et al.*, 2015; Bates *et al.*, 2015). O Brasil é um dos principais países acometidos pela doença, sendo que a maior parte desses casos se localiza na região Amazônica (Pires *et al.*, 2015). Nas Américas, as leishmanioses podem ser classificadas, dependendo do quadro clínico, em leishmaniose visceral americana (LVA) e leishmaniose tegumentar americana (LTA), que incluem leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose cutânea localizada (LCL) e leishmaniose mucocutânea (LMC). As manifestações clínicas divergem de acordo com a espécie do protozoário e o sistema imunológico do paciente (Wilson & Pearson, 1990; Gonzáles *et al.*, 2015).

O tratamento de primeira escolha utilizado contra as leishmanioses são os antimoniais pentavalentes. As drogas de segunda escolha são anfotericina B e pentamidinas. Porém, estas drogas apresentam algumas limitações como: alto custo, elevada toxicidade, grande período de duração do tratamento, formas invasivas de administração e desenvolvimento de resistência de algumas espécies aos medicamentos (Srivastava *et al.*, 2016).

Além das limitações existentes no tratamento, não há uma vacina para combater as leishmanioses, dessa forma, torna-se importante a busca por tratamentos alternativos que sejam de baixo custo, com pouca toxicidade e menos invasivos. Os bioprodutos são o foco das pesquisas para a busca de novos tratamentos alternativos para as leishmanioses (Barros *et al.*, 2015; Duarte *et al.*, 2016). Estudos recentes mostraram o potencial leishmanicida *in vitro* e *in vivo* de vários compostos naturais, obtidos da flora e fauna, contra *Leishmania*, como exemplo podemos citar o extrato etanólico de *Artemisia absinthium*, uma espécie de planta, e subunidades do veneno de serpentes, como o veneno de *Bothrops jararacussu* (Azizi *et al.*, 2016; De Barros *et al.*, 2016).

## 1.2. GÊNERO *LEISHMANIA*

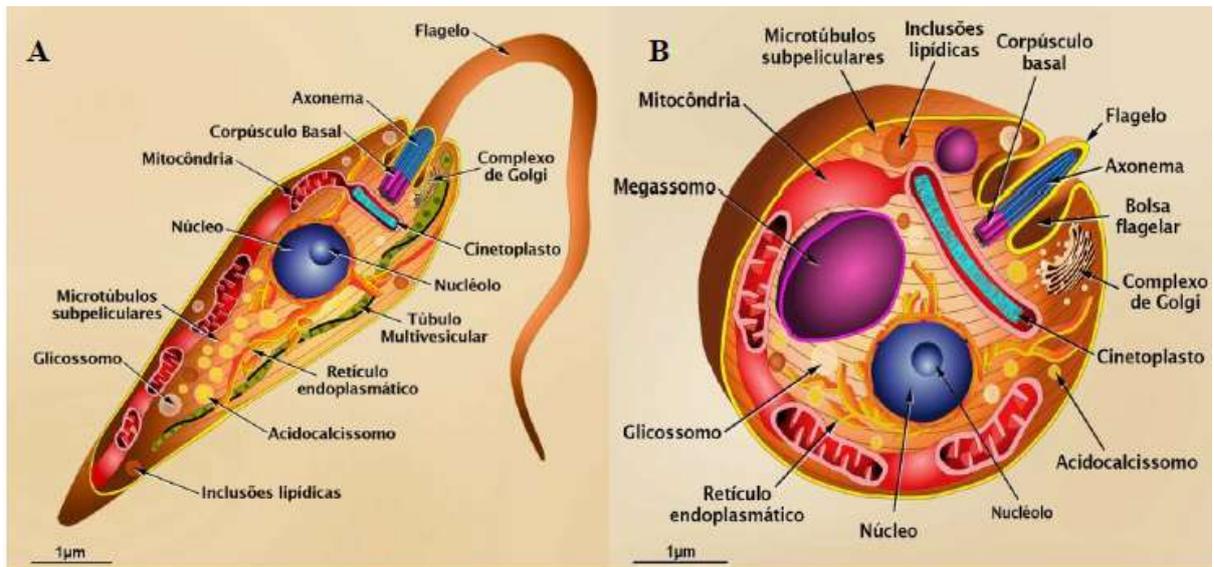
### 1.2.1. Classificação taxonômica

O protozoário causador das leishmanioses pertence ao gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastida e família Tripanossomatidae (Ross, 1903). Muitas classificações foram criadas para dividir o gênero, mas segundo Lainson e Shaw (1987), os protozoários podem ser subdivididos em dois subgêneros, baseado no local de desenvolvimento do parasito no trato digestivo do inseto vetor, os subgêneros *Viannia* e *Leishmania*. Atualmente são conhecidas aproximadamente 53 espécies de *Leishmania* spp. (Akihound *et al.*, 2016), porém apenas 20 espécies causam doença ao homem, das quais 8 foram identificadas no Brasil, sendo duas do subgênero *Leishmania* e seis do subgênero *Viania*. Dentre estas, as três principais espécies que causam as formas clínicas de Leishmaniose no país são *L. (V) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, e a *L. (L.) amazonensis*, que será o foco deste estudo (Brasil, 2010; Laison *et al.*, 2010).

### 1.2.2. Morfologia

A *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório, que tem como célula alvo as células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente, os macrófagos (Handman & Bullen, 2002). Estes protozoários possuem ciclo digenético, ou seja, durante seu ciclo há um hospedeiro invertebrado e um vertebrado. Além disso, estes protozoários apresentam duas formas evolutivas: a infectante, chamada promastigota metacíclica e a de resistência, conhecida como amastigota (McGuire *et al.*, 2013).

A forma promastigota tem corpo fusiforme apresentando um flagelo livre a partir da bolsa flagelar e são encontradas no hospedeiro invertebrado. Já as formas amastigotas são encontradas no interior dos macrófagos do hospedeiro vertebrado, possuem forma arredondada, com um pequeno flagelo internalizado (Figura 1). As organelas presentes no interior de ambas as formas são semelhantes, a saber: o núcleo, o complexo de Golgi, o retículo endoplasmático, ribossomos, vacúolos, corpos lipídicos, uma estrutura diferenciada conhecida como cinetoplasto, entre outras (Pessoa & Martins, 1982; Laison, 2010).



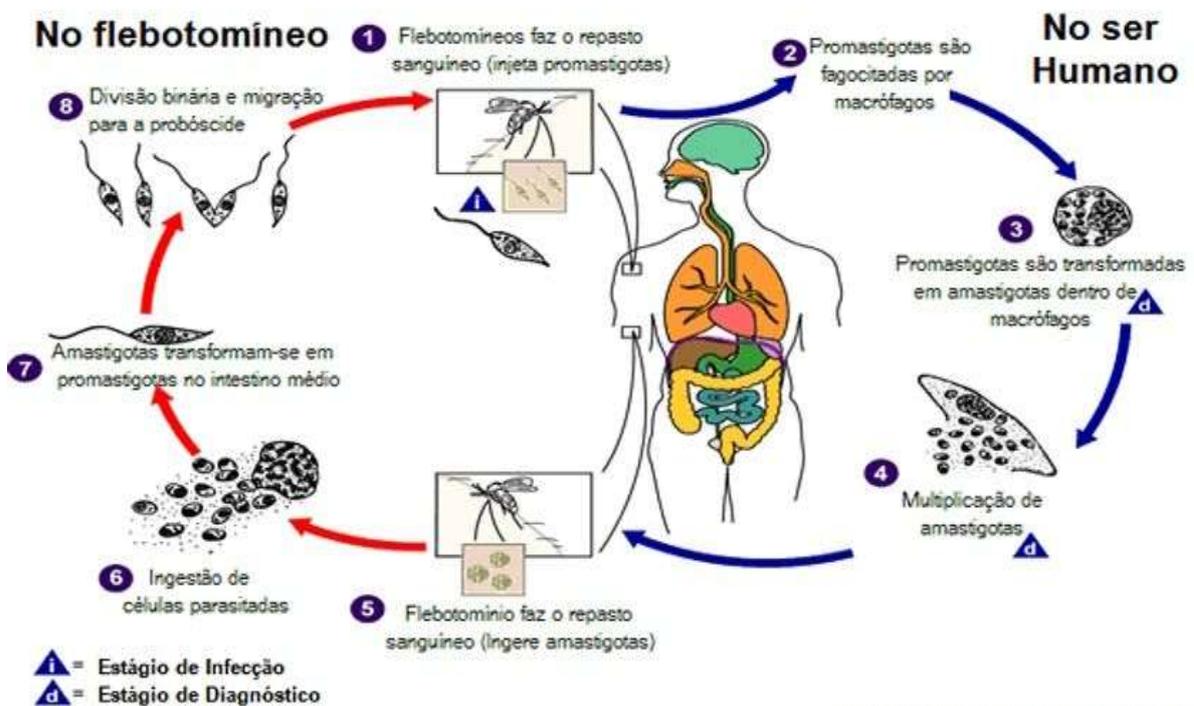
**Figura 1:** Morfologia do parasito *Leishmania*. Fonte: Teixeira et al., 2013. Em A observa-se a forma evolutiva infectante do parasito conhecida como promastigota e em B a forma evolutiva resistente, a amastigota.

### 1.2.3. Ciclo biológico

Para que o ciclo da *Leishmania* spp. se desenvolva, é necessário um hospedeiro intermediário (Figura 2) chamado flebotomíneo, que pertence ao gênero *Lutzomyia*, da subfamília *Phlebotominae* e família *Psychodidae*. Durante o repasto sanguíneo de um hospedeiro vertebrado infectado, as fêmeas do flebotomo ingerem formas amastigotas presentes no sangue ou dentro dos macrófagos. No intestino, se transformam em flagelados pequenos, ovoides, pouco móveis e após alguns dias dão origem a formas promastigotas delgadas e longas. As moléculas de superfície da *Leishmania*, LPG e GP63, protegem o parasito da ação digestória do inseto e através dos flagelos, os parasitos ficam ligados às microvilosidades intestinais evitando que sejam excretadas (Soares *et al.*, 2002; Neves *et al.*, 2005).

Em seguida, os parasitos migram para o estômago onde transformam-se em paramastígotas procíclicas, as quais permanecem no esôfago e na faringe, onde ocorre a metaciclogênese. Este processo que torna o parasito infectante através de várias reações bioquímicas, onde a mais importante é a variação dos tamanhos das porções glicídicas das moléculas de LPG. Esta forma é então chamada promastigota metacíclica, cujo corpo é pequeno e o flagelo alongado, sendo quase duas vezes o tamanho da promastigota procíclica (Grimald & Tesh, 1993).

Na sua nova forma evolutiva, a *Leishmania*, migra para a probóscida do vetor e durante um novo repasto sanguíneo são transmitidas para um novo hospedeiro (Bates *et al.*, 1994). A saliva do flebotomíneo ajuda no processo de transmissão já que possui neuropeptídios vasodilatadores que levam à imunossupressão do hospedeiro no local do repasto, inibindo citocinas inflamatórias, aumentando a efetividade de IL-4 e IL-10, citocinas anti-inflamatórias (Andrade *et al.*, 2005; Neves *et al.*, 2005).



**Figura 2:** Ciclo biológico da *Leishmania*. Fonte: Centers of Diseases Control and Preservation, 2013. O ciclo inicia-se através do repasto sanguíneo do flebotomíneo que injeta as formas promastigotas no hospedeiro vertebrado (1). Então as promastigotas são fagocitadas por macrófagos (2) e posteriormente transformadas em amastigotas (3), as quais multiplicam-se até o rompimento da célula hospedeira (4). Posteriormente o vetor ingere as amastigotas (5) ou células parasitadas (6) durante novo repasto sanguíneo. As amastigotas transformam-se em promastigotas no intestino médio do vetor (7) e após diversas divisões binárias migram para a probóscida do inseto (8) para que sejam injetadas em um novo hospedeiro e o ciclo se reinicie.

Uma vez no sangue, os parasitos são capazes de modular a ação do sistema complemento e ativar o fator C3 e seus derivados (C3b, C3bi e C3dg), os quais são reconhecidos pelos receptores CRI, CR2, CR3 e CR4 dos macrófagos que realizam o processo de fagocitose. Porém, a internalização dos parasitos ocorre de forma silenciosa onde o mecanismo microbicida, conhecido como “*burst oxidativo*”, não é ativado por ação inibitória das suas moléculas de superfície, GP63 e LPG (Isnard *et al.*, 2012; Franco *et al.*, 2012).

Após a fagocitose há a formação do vacúolo parasitóforo e as promastigotas tornam-se amastigotas. Neste cenário, a molécula de LPG continua a proteger o parasito contra as enzimas lisossomais, contra espécies reativas do oxigênio (EROs) e ainda pode modular a síntese de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias. (Franco *et al.*, 2012). As amastigotas se multiplicam por divisão binária até que o macrófago se rompa e liberem-nas na corrente sanguínea, onde infectam novas células ou são ingeridas por flebotomíneos, reiniciando o ciclo (WHO, 2010).

#### **1.2.4. Principais organelas e estruturas do parasito.**

O protozoário *Leishmania* possui várias organelas importantes para seu desenvolvimento no hospedeiro e para manutenção do seu próprio metabolismo, e estas podem ter algumas diferenças entre as suas formas evolutivas. Dentre as principais organelas está a membrana plasmática, que assim como em outros organismos funciona como uma barreira entre o citoplasma e o meio externo, selecionando o que entra e sai da célula. Porém, neste parasito ela é dividida em três partes com funções especializadas: a membrana plasmática do corpo flagelar que se liga aos microtúbulos subpeculiares e é nela que estão presentes as moléculas de superfície, LPG e GP63, que as protegem do sistema imune; a membrana flagelar, a qual envolve os microtúbulos do axonema; e por fim, a bolsa flagelar, responsável pelo metabolismo de nutrição através dos processos de endocitose e exocitose (Webster & Russell, 1993; De Souza *et al.*, 2009).

Nas amastigotas, todas as moléculas endocitadas pela bolsa flagelar vão para o megassomo, organela com atividade lisossomal e que produz cisteína proteinases, importantes para sua sobrevivência dentro dos macrófagos (De Souza *et al.*, 2009). Além de atuar no metabolismo, a bolsa flagelar comporta o corpo basal de onde surge o flagelo através do axonema, estrutura presente apenas em organismos da ordem Kinetoplastida (Gull, 1999; De Souza *et al.*, 2013). O flagelo tem função de movimento, de fixação do parasito ao intestino do hospedeiro invertebrado, é sensitivo e é formado pelo citoesqueleto flagelar. (Landfear & Ignatushchenko, 2001; Rotureau *et al.*, 2009). Também existem outros tipos de citoesqueleto: os microtúbulos subpeculiares que dão sustentação ao corpo do parasito; e o corpo basal, que participa da divisão celular e é constituído por centríolos (Gadelha *et al.*, 2013).

Além do axonema, a outra e principal organela que diferencia a ordem Kinetoplastida é a sua mitocôndria, uma organela única que se estende por todo o corpo do

parasito e termina em uma estrutura conhecida como cinetoplasto, presente apenas nestes organismos. O cinetoplasto é o local em que o DNA mitocondrial está presente e permanece paralelo ao corpo basal (Degraeve *et al.*, 1994; Pereira & Brandão, 2013). Já o DNA do parasito está presente no seu núcleo esférico, que pode ser central ou excêntrico, possuindo cromatina com disposição variável e um nucléolo (Michalick & Ribeiro, 2011).

Porém, a despeito das semelhanças com outros organismos, a *Leishmania* apresenta características que as diferenciam até dos outros Trypanossomatídeos. Um exemplo disto é a presença exclusiva do glicosomo, estrutura onde ocorrem os processos de metabolização de açúcares e lipídios, presentes principalmente nas formas amastigotas (Colasante *et al.*, 2013).

A *Leishmania* possui ainda organelas que regulam a homeostase, como os acidocalcissomos, organelas ácidas que armazenam cálcio e fósforo, regulam o pH, e realizam a osmoregulação, além de uma estrutura que regula o metabolismo lipídico conhecida como corpo lipídico (Miranda *et al.*, 2008). O retículo endoplasmático também auxilia na homeostase, além de dividir outras funções com o complexo de Golgi como: síntese de lipídios, proteínas e está envolvido nos processos de glicosilação e sulfatação (Teixeira *et al.*, 2013).

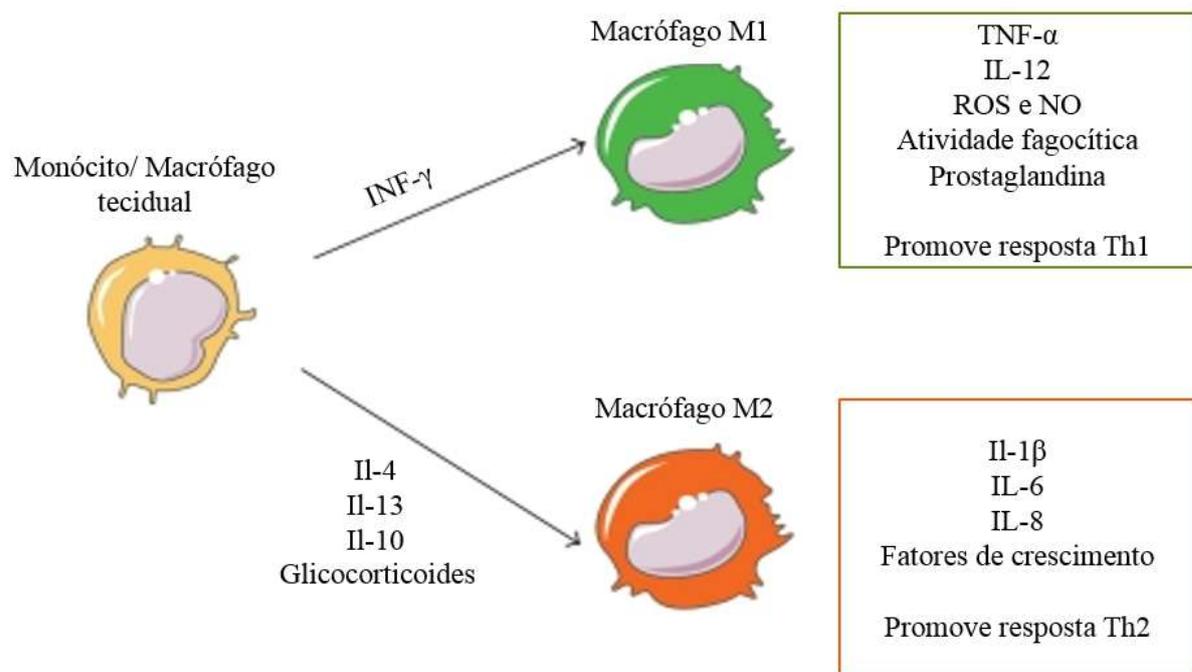
### 1.3. RELAÇÃO PARASITO X HOSPEDEIRO

A *Leishmania* tem tropismo por células do sistema imune, principalmente os macrófagos, um ambiente inóspito e potencialmente tóxico para o parasito. Estas células hospedeiras são capazes de produzir fatores pró e anti-inflamatórios. O protozoário depende grandemente da resposta dessa célula à infecção que poderá ajudar na manutenção da doença ou suprimi-la (Gibson-corley *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015). A escolha do perfil de ativação do macrófago se dá mediante sinalização por outras células como os linfócitos T CD4+, que liberam citocinas no local da infecção (Gibson-corley *et al.*, 2014).

Este primeiro perfil de macrófagos, os pró-inflamatórios, são ativados por meio de liberação de INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2, que os levam a uma resposta conhecida como Th1 (Figura 3), tornando-os ativados em M1, com liberação de mais citocinas como IL-12, IL-23, IL-6 e TNF- $\alpha$  no local da inflamação. Logo, há o recrutamento de outras células ao local da infecção e produção de substâncias que tem ação microbicida contra o patógeno, como o óxido nítrico (NO) e EROs, associados a alterações morfológicas como o espriamento, processo

importante para migração e diferenciação dessas células (Lasunskaja *et al.*, 2006; Baardman *et al.*, 2015; Xuan *et al.*, 2015).

Mas existe um segundo modo de ativação que é o induzido pela resposta imunológica do tipo Th2, onde macrófagos M2 são ativados, principalmente por IL-4 e passam a se comportar de forma anti-inflamatória, liberando citocinas como IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  (Baardman *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2016). Os macrófagos M2 atuam na cicatrização e promovem o reparo e remodelamento de tecidos. Entretanto, em infecções e no combate de tumores, macrófagos M2 tem baixa eficácia pois contribui para a angiogênese e tem baixa capacidade de apresentação de antígenos, além de ter pouca produção de NO e EROs (Liu, *et al.*, 2015; Bashir *et al.*, 2016). Porém, segundo alguns autores, não existem apenas estes dois perfis de ativação, sendo apenas os dois extremos do comportamento do macrófago (Jablonski *et al.*, 2015).



**Figura 3:** Resposta macrofágica M1 e M2. Fonte: Peferoen *et al.*, 2014.

A *L. (L.) amazonensis* parece ter capacidade de induzir resposta Th2 nos macrófagos, o que facilita sua proliferação e a permanência da infecção (Bashir *et al.*, 2016). Mas, segundo Teixeira *et al.* (2015), pode haver ainda um misto entre as respostas Th1 e Th2, com produção tanto de IL-4 quanto  $\text{INF-}\gamma$ , citocina que segundo Gilbson-Corley *et al.* (2014), apesar de ser pró-inflamatória, pode auxiliar na replicação desta espécie de *Leishmania* quando não combinada com outro fator pró-inflamatório. Além disso, o mesmo autor destaca

maior resistência da *L. (L.) amazonensis* ao NO quando comparado com outras espécies, como a *L. major*.

Além disso, o protozoário possui outros mecanismos que facilitam o seu escape frente a macrófagos M1. Isto torna os parasitos capazes de infectar, permanecer, e se reproduzir no interior da célula hospedeira, que posteriormente sofre ruptura e consequentemente libera as formas amastigotas no sangue para continuidade da infecção (Liu & Uzonna, 2012; Hassani *et al.*, 2014). Quando entra em contato com patógenos, incluindo o protozoário, a célula do hospedeiro começa a sofrer algumas modificações como o desenvolvimento do complexo de Golgi, retículo endoplasmático, aumento no número de lisossomos e rearranjo do citoesqueleto para o processo de fagocitose (Patel & Harrison, 2008; Smit *et al.*, 2008).

Durante a fagocitose ocorre a detecção do microrganismo pelos receptores CR1, CR3 e manose-frutose do fagócito (Liu & Uzonna, 2012) para sua destruição. Porém o parasito *Leishmania* utiliza suas principais moléculas de superfície, as glicoproteínas GP63 e os lipofosfoglicano (LPG), que constituem a maior parte da superfície de sua membrana na forma promastigota para evadir da resposta imune do macrófago (Gueirard *et al.*, 2008).

A glicoproteína GP63 é uma metaloprotease, enquanto que o LPG é um glicopeptídeo composto de várias unidades de dissacarídeos ligados a uma cauda de fosfatidilinositol através de um núcleo hexasacarídico fosforilado (Hassani *et al.*, 2014; Favila *et al.*, 2015). Ambos são capazes de bloquear a ação lítica do sistema complemento através da inibição da molécula C3b, clivando-a em C3bi, a qual não é capaz de dar continuidade a cascata e chegar a formação do complexo de ataque a membrana do sistema complemento (Oliver *et al.*, 2005; Paranaíba *et al.*, 2015; Shio *et al.*, 2015).

Além disso, estas duas moléculas ainda exercem outras funções após a fagocitose, já no interior da célula hospedeira. No meio intracelular, os parasitos permanecem dentro de vacúolos parasitóforos chamados fagolisossomos, pois são derivados da fusão entre os fagossomos e os lisossomos, os quais liberam enzimas capazes de atacar microrganismos (Matheoud *et al.*, 2013). Porém, a GP63 apresenta ótima atividade em meio ácido, por isso apresenta eficiência na degradação destas enzimas, o que permite a sobrevivência das formas amastigotas dentro do vacúolo (Oliver *et al.*, 2005; Hassani *et al.*, 2014).

Porém, logo que o parasito é fagocitado, ainda estão na forma promastigota, menos resistente, e neste momento quem atua é o LPG. Ele é capaz de retardar a fusão do fagossomo ao lisossomo, e consequentemente retardando o contato da *Leishmania* com as enzimas lisossomais, o que permite que ela tenha mais tempo para diferenciar para formas

amastigostas (Matheoud *et al.*, 2013; Paranaíba *et al.*, 2015). Estes processos demonstram que o parasito é capaz de manipular o ambiente inóspito, adequando-o às suas necessidades para sobrevivência e propagação da infecção, dessa forma, o estudo destes mecanismos é muito importante para o controle da doença (Shio *et al.*, 2015).

### **1.3.1. Corpos lipídicos e o processo inflamatório**

Os corpos lipídicos são organelas com função de estocagem e compartimentalização de lipídeos e estão presentes em vários seres vivos, inclusive nos mamíferos hospedeiros e no protozoário *Leishmania* spp. (De Sousa *et al.*, 2019; Arcanjo *et al.*, 2015). Inicialmente, achava-se que sua única função era a de reserva metabólica, sendo associados aos tecidos envolvidos no metabolismo de lipídios, como o fígado e tecido adiposo (Farese & Walter, 2009).

Sua estrutura é composta por uma monocamada de fosfolipídios, glicolipídios anfipáticos e/ou esteroides, com lipídios neutros no seu interior, como triglicerídeos e ésteres de esteróis (Arcanjo *et al.*, 2015). Na superfície da sua membrana estão ligadas várias proteínas como ADRP (Proteína relacionada a diferenciação de adipócitos), peripilina, adofilina e TIP47 (Proteína de interação de cauda de 47 kDa) que desempenham papéis como formação, montagem, degradação e mobilização dos corpos lipídicos (Shen *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2014).

Porém, outros estudos revelaram maior importância da organela, pois comprovou-se que em mamíferos é capaz de realizar tráfego celular, transmissão e regulação de sinalização (Bickel *et al.*, 2009). Parecem ainda participar da resposta imune, fato que foi observado durante o processo de fagocitose, havendo liberação de seu conteúdo no interior dos fagolisossomos, o que indica que há grandes chances de que os corpos lipídicos sejam essenciais nesse processo (Dvorak *et al.*, 1983; Araújo-Santos *et al.*, 2014).

Além disso, os corpos lipídicos possuem ácido araquidônico (AA), um precursor da formação de eicosanoides, importantes mediadores inflamatórios. Neles também são produzidas todas as enzimas necessárias para a produção destes mediadores, como as cicloxigenases (COX), que pode ser subdividida em COX-1, associada da ativação de plaquetas em lesões e a COX-2, inibe as plaquetas de provocando vasodilatação (Dennis & Norris, 2015).

Ambas as COX são responsáveis por oxidar o AA e assim formar a prostaglandina E2 (PGE2), um dos eicosanoides que tem função na resposta inflamatória a receptores *Toll-like* e citocinas pró-inflamatórias. Dessa forma, o aumento da produção de PGE2 por macrófagos é associado ao processo infeccioso, e consequentemente o aumento dos corpos lipídicos é usado como marcador inflamatório (Araújo-santos *et al.*, 2014).

Sobre a presença dos corpos lipídicos nos patógenos, ainda não existem muitos estudos, porém sabe-se que alguns deles tem capacidade de adaptar estas organelas no hospedeiro de acordo com a sua necessidade. O *Toxoplasma gondii*, por exemplo, é capaz de aumentar a quantidade de corpos lipídicos nos macrófagos infectados e ainda de uni-los ao seu vacúolo parasitóforo, utilizando-os como fonte de lipídios (Mota *et al.*, 2014). Outros, como o *Mycobacterium tuberculosis* e o *Trypanosoma cruzi* que podem utilizá-los durante mecanismo relacionados a continuidade da infecção (Rabhi *et al.*, 2016).

Porém, o parasito pode se beneficiar do aumento dos corpos lipídicos, que consequentemente aumentam produção de PGE2. Este eicosanoide pode estar ligado a outra via que induz a elevação da produção das citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF-beta e redução da produção de NO (Araújo-Santos *et al.*, 2014). Dessa forma, mais estudos devem ser realizados para que se tenha conhecimento sobre a indução do aumento de corpos lipídicos, que deve ocorrer por vias que auxiliem a defesa do hospedeiro, e não o favorecimento do patógeno.

#### 1.4. TRATAMENTO

Desde a década de 1940, as substâncias utilizadas como primeira escolha para o tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes, dentre eles estão o antimoniato N-metil glucamina, e estibogluconato de sódio (Gontijo *et al.*, 2004; Brasil, 2006). Entretanto, estas drogas geram vários efeitos colaterais, dentre eles: cefaléia, náuseas, vômitos, febre, mialgia e artralgia, além de efeitos tóxicos que comprometem órgãos importantes como o coração, os rins e o fígado (García-Almagro *et al.*, 2005). Além disso, estes compostos também possuem elevado custo e dificuldade de administração, visto que são aplicados apenas pela via parenteral diariamente. Isto faz com que o paciente necessite permanecer internados em hospitais. Outro problema recentemente descoberto é a resistência a estes medicamentos por algumas espécies, devido seu uso indiscriminado. Estas desvantagens fazem com que os antimoniais pentavalentes sejam substituídos por drogas de

segunda escolha, que incluem a anfotericina B e pentamidina (Gontijo *et al.*, 2003; Borborema *et al.*, 2016).

A anfotericina B é um antibiótico com alta afinidade ao ergosterol, uma molécula presente em grande quantidade na membrana da *Leishmania* e ausente na membrana de mamíferos. Dessa forma possui grande potencial leishmanicida tanto nas formas amastigotas quanto promastigotas, não apresentando, até então, resistência de nenhuma espécie (Polonio & Effertt, 2008). Porém seus efeitos colaterais se assemelham ao dos antimonialis incluindo náuseas, vômitos e febre, hipopotassemia, insuficiência renal, anemia e alterações cardíacas. Além de continuar tendo a mesma dificuldade de tratamento e causar efeitos tóxico, afetando o coração e os rins (Mudavith *et al.*, 2014).

A pentamidina é derivada da amidina e age por inibição de processos celulares não só na *Leishmania*, como também em outros protozoários. Mas assim como as outras substâncias citadas possui desvantagens consideráveis como a observação de resistência em algumas espécies, reações adversas que incluem dor, abscessos estéreis no local da aplicação, náuseas, vômitos, tontura, adinamia, mialgia, cefaleia, hipotensão, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia transitórias, e pode apresentar toxicidade pancreática (Neves *et al.*, 2011).

Vários fármacos vêm sendo estudados para obtenção de um melhor tratamento contra as leishmanioses, dentre eles o alopurinol, compostos azóis, paramomicina e miltefosina (Mitropoulos *et al.*, 2010). Sendo que a miltefosina atua na interferência da membrana do parasito modulando a composição lipídica e o metabolismo de fosfolipídios e possui grandes vantagens em relação à via de administração, pois o medicamento é ingerido (Costa Filho *et al.*, 2008).

Porém, a aquisição de novas drogas eficazes contra o parasito *Leishmania* ainda devem ser alvo de pesquisas para que todas estas graves desvantagens em relação a alta toxicidade, resistência, via de administração, e elevado custo sejam atenuadas e uma melhor qualidade de tratamento possa ser oferecido aos pacientes acometidas com a doença. Tendo em vista os dados epidemiológicos que indicam que a maior parte dos casos da doença no Brasil ocorrem na Amazônica, vários estudos com substâncias que possivelmente melhorariam o tratamento da leishmaniose com produtos naturais da região vêm surgindo. Estes são chamados bioprodutos e proveem tanto de origem vegetal, como extratos de plantas e compostos derivados, quanto animal, como venenos de serpentes (Mayer *et al.*, 2011; Azizi *et al.* 2016; De Barros *et al.*, 2016).

## 1.5. CROTOXINA

As serpentes são animais do grupo dos répteis das quais 10 a 14% são peçonhentas. Em seus venenos encontramos uma variedade de proteínas com diferentes atividades biológicas, que podem ser úteis à medicina de forma farmacológica, pois atuam de forma diferente quanto sua função, farmacocinética e farmacodinâmica em vários tecidos e órgãos do corpo humano e podem ser capazes de agir na terapêutica de doenças (Cunha & Martins, 2012).

Dentre essas moléculas estão presentes muitas enzimas, toxinas não enzimáticas e proteínas não tóxicas que incluem, por exemplo, metaloproteínases, serinoproteases, fosfolipases, desintegrinas, fosfolipases miotóxicas, crotamina, convulxina, girotóxina, e crotóxina (Caproni *et al.*, 2009). No Brasil existem apenas dois gêneros de serpentes capazes de produzir peçonha, a *Bothrops* spp., conhecida como Jararaca e a *Crotalus* spp., de nome popular Cascavel. Esta última compreende cerca de 6 espécies no país, das quais a *Crotalus durissus terrificus*, encontrada nas zonas altas e secas da região sul oriental e meridional é uma das mais importantes devido ao alto índice de óbitos por acidentes com seu veneno, um composto de miotoxinas e neurotoxinas que provocam coagulação sanguínea (Pinho *et al.*, 2001; Tokarnia *et al.*, 2006). Os pacientes desenvolvem insuficiência respiratória, insuficiência renal aguda e paralisias musculares (Araújo *et al.*, 2003).

A crotóxina (CTX) é uma das substâncias presentes no veneno da *Crotalus durissus terrificus* e é facilmente extraída. Está presente em 65% da composição total, e é considerada a principal responsável pela toxicidade da peçonha (Clissa, 1997). Ela possui duas subunidades: crotapotina, uma substância ácida com capacidade de potencializar a letalidade da segunda subunidade, chamada fosfolipase A2 (PLA2), a qual possui caráter básico e ação miotóxica e neurotóxica, visto que age inibindo a liberação de neurotransmissores, e bloqueando os receptores envolvidos na neurotransmissão na junção neuromuscular. Porém, a PLA2, perde sua capacidade tóxica quando dissociada da crotapotina (Cunha & Martins, 2012).

Além disso verificou-se que o veneno total tem capacidade de modular o efeito anti-inflamatório em macrófagos diminuindo seu potencial de espraçamento e fagocitose, apesar de manter elevada a produção de NO e EROs, sendo então capaz de influenciar várias vias dentro dessa célula (Sousa & Silva, *et al.*, 1996). Entretanto, a CTX é capaz de atuar de forma benéfica ao organismo humano ajudando no processo de cicatrização, através da imunomodulação de citocinas (Samy *et al.*, 2016).

Vários estudos realizados com a CTX demonstram seu papel como fármaco, melhorando quadros de doenças como fibrose cística (Faure *et al.*, 2016), doença inflamatória do intestino (Almeida *et al.*, 2015), distrofia muscular (Accornero *et al.*, 2014) e até cânceres (Brigatte *et al.*, 2016). Além disso, pode atuar contra patógenos, neste caso, mostrando atividade anti-viral contra o vírus da dengue e da febre amarela (Muller *et al.*, 2012).

Em protozoários ainda há poucas demonstrações com relação a ação da CTX. Passero, *et al.* (2007) mostrou que o veneno da *Crotalus durissus terrificus* possui atividade contra a *Leishmania* duas vezes maior do que outras serpentes sem causar danos ao hospedeiro e Barros *et al.* (2015) demonstrou a ação leishmanicida da porção PLA2 da substância na espécie *L. (L.) infantum chagasi*. Mais recentemente, Farias (2016) demonstrou que a CTX na concentração de 2,4µg/mL durante tratamento por 24h é capaz de ativar macrófagos em perfil M1 durante interação com a *L. L. amazonensis*, visto que observou aumento da produção de NO por estas células, maior espriamento celular, e estimulação da secreção de citocinas inflamatórias como IL-6 e TNF- $\alpha$ . Além disso, após 24 horas de tratamento com CTX 2,4µg/mL, observou acúmulo de corpos lipídicos no interior dos macrófagos infectados e após 48 horas de tratamento demonstrou que houve aumento da produção de PGE2.

Dessa forma, tendo como fundamento as diversas ações que a CTX vem apresentando, o estudo de sua influência sobre os corpos lipídicos em macrófagos durante a interação com a parasito pode auxiliar a entender principalmente a sua capacidade de imunomodular a célula hospedeira contra a *L. L. amazonensis*. Assim, estas informações podem coadjuvar com o estudo deste bioproduto, que pode viabilizar a descoberta de um novo fármaco, o qual melhore a qualidade de vida dos pacientes portadores das leishmanioses cutâneas, que possuem índices elevados do número de casos encontrados na Amazônia e, portanto, trata-se de um problema de saúde pública.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVOS GERAL**

Avaliar a ação *in vitro* da Crotoxina sobre corpos lipídicos durante interação de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e a célula hospedeira.

## 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Detectar presença de corpúsculos lipídicos no citoplasma do parasito *L. (L.) amazonensis* tratados com CTX.
2. Detectar presença de corpúsculos lipídicos no citoplasma de macrófagos tratados com CTX.
3. Detectar presença de corpúsculos lipídicos no citoplasma de macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com CTX.

## 3. MATERIAL E MÉTODO:

### 3.1. OBTENÇÃO E PREPARO DA CROTOXINA (CTX)

A CTX foi obtida, purificada e fornecida pelo Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan - São Paulo, SP.

A CTX foi diluída em meio de cultura na concentração de 1 mg/mL e utilizada nas concentrações 2,4 e 4,8 µg/mL. Estas concentrações foram utilizadas em trabalhos anteriores do Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal do Pará.

### 3.2. CULTIVO E MANUTENÇÃO DO PARASITO

As formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Cepa MHOM 26361 (recém-isolada de um caso humano da região Amazônica) foram obtidas em meio NNN, provenientes do Programa de Leishmanioses do Instituto Evandro Chagas, e mantidas em meio RPMI 1640, suplementadas com Soro Bovino Fetal (SBF) em estufa a 27°C.

### 3.3. OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Macrófagos peritoneais foram obtidos a partir de camundongos albinos (BALB/c). Os animais foram anestesiados e sacrificados para a coleta dos macrófagos, que foi feita através de lavagem da cavidade peritoneal com solução de Hank's estéril, utilizando seringa e

agulhas estéreis. O material aspirado foi concentrado por centrifugação a 1500 rpm durante 10 minutos a uma temperatura de 4°C. O sedimento foi ressuspensionado em meio de cultura DMEM sem soro. A contagem das células foi feita em Câmara de Neubauer e a densidade ajustada de acordo com o número de células utilizadas em cada experimento. Os macrófagos foram então transferidos para placas de cultura de 24 poços ou garrafas de cultura e incubados a 37° C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>, durante uma hora para adesão. Após esse período foi realizada uma lavagem com tampão fosfato salina (PBS) estéril pH 7.2, para remoção de células que não aderiram e, em seguida, adicionado meio DMEM suplementado com 10% de SBF. As células foram, então, mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram posteriormente tratadas por 24 horas com concentrações de 2,4 e 4,8 µg/mL de CTX.

#### 3.4. INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS COM *L. (L.) amazonensis*

Macrófagos peritoneais foram obtidos como descrito no item 3.3, para assim observar o efeito CTX sobre as formas amastigotas no interior das células infectadas. Os parasitos obtidos na fase estacionária de crescimento (sete dias), foram colocados em contato com os macrófagos peritoneais na densidade de  $5 \times 10^6$  células por poço e na proporção de 5 parasitos por célula, durante 3 horas à temperatura de 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As células infectadas foram posteriormente tratadas por 24 horas com concentrações de 2,4 µg/mL de CTX.

#### 3.5. DETECÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS EM PARASITOS *L. (L.) amazonensis*.

O Bodipy® 493/503 é um fluoróforo lipofílico utilizado para identificação de lipídeos neutros (lipídeos de reserva) presentes em grandes quantidades em corpos lipídicos intracelulares, sendo um bom marcador dessas estruturas por citometria de fluxo (GOCZE & FREEMAN, 1994). Para quantificação de corpos lipídicos de cada amostra, promastigotas foram obtidas e lavadas em PBS, pH 7.2 e posteriormente tratadas por 24 horas nas concentrações de 2,4 µg/mL de CTX.  $2 \times 10^6$  parasitos foram utilizados e incubados com Bodipy® 493/503 (Molecular Probes Invitrogen®) na concentração de 10 µg/mL em PBS, por 20 minutos protegidos da luz. Após a incubação foi realizada lavagem em PBS, seguida de leitura em citômetro de fluxo BD FACSCanto II.

### 3.6. DETECÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO DE CORPOS LIPÍDICOS EM MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS E INFECTADOS POR *L. amazonensis*

Macrófagos peritoneais foram cultivados como descrito no item 3.3., sendo que uma parte deles foi infectada com *L. (L.) amazonensis* com descrito no item 3.4. Para a identificação e quantificação dos corpos lipídicos as células foram incubadas com Bodipy® 493/503 (Molecular Probes Invitrogen®) na concentração de 10 µg/mL em PBS, por 20 minutos, protegido da luz. Após a incubação, foi realizada lavagem em PBS, seguida de leitura em citômetro de fluxo BD FACSCanto II.

### 3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram computados e submetidos a análise pelo programa GraphPad Prism® utilizando a análise de variância (ANOVA), seguida do Teste-t de Student, com nível de significância  $p < 0,05$ .

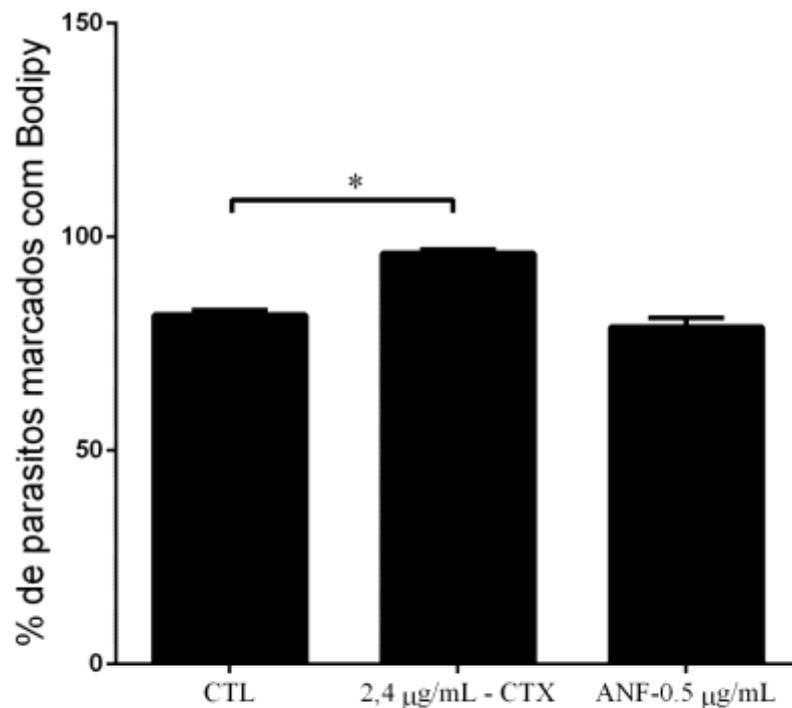
### 3.8. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O estudo obedeceu aos critérios do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE) e fez parte do projeto “Estudo de toxinas animais como modelo para o desenvolvimento de novos fármacos com potencial terapêutico contra leishmaniose cutânea”. O projeto teve aprovação do comitê de ética sob o processo nº bio053-12, em 2014.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. QUANTIFICAÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS EM PARASITOS *L. (L.) amazonensis* TRATADOS COM CTX.

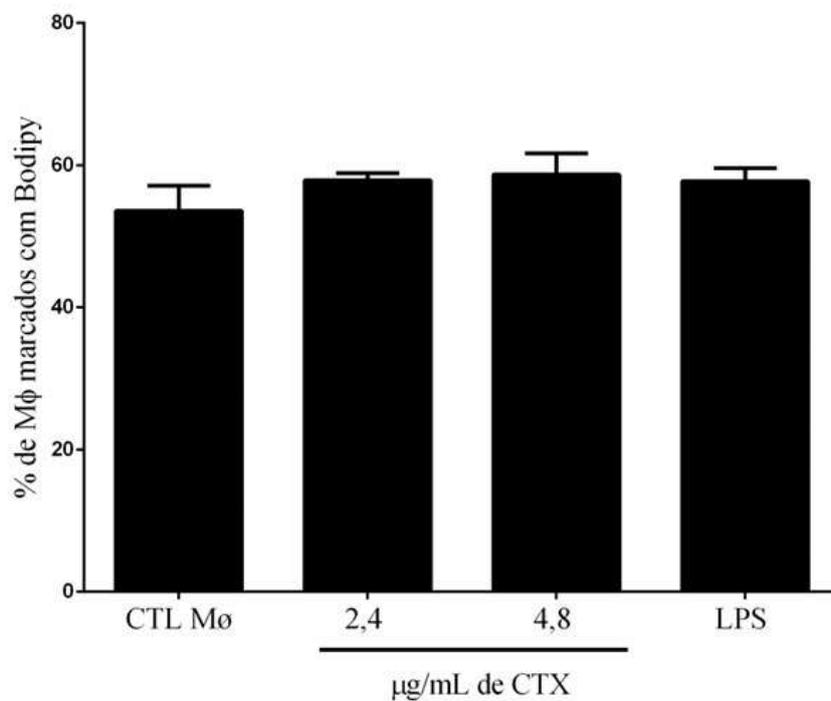
Pela marcação com Bodipy e análise por citometria de fluxo foi observado que o tratamento com CTX (2,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 24 horas nos parasitos *L. (L.) amazonensis*, induziu aumento na produção de corpos lipídicos quando comparado ao controle não tratado e ao controle positivo, com Anfotericina B, na concentração de 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 4).



**Figura 4:** Porcentagem de parasitos tratados com crotoxina (CTX) na concentração de 2,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e com anfotericina B. Foi realizado o teste Análise de variância (ANOVA), tendo como nível de significância  $p < 0,05$ .

#### 4.2. QUANTIFICAÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS EM MACRÓFAGOS TRATADOS COM CTX

Pela marcação com Bodipy e análise por citometria de fluxo foi observado que o tratamento com CTX (2,4 e 4,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 24 horas em macrófagos não infectados, não induziu aumento na produção de corpos lipídicos quando comparado às células controle sem tratamento (Figura 5).

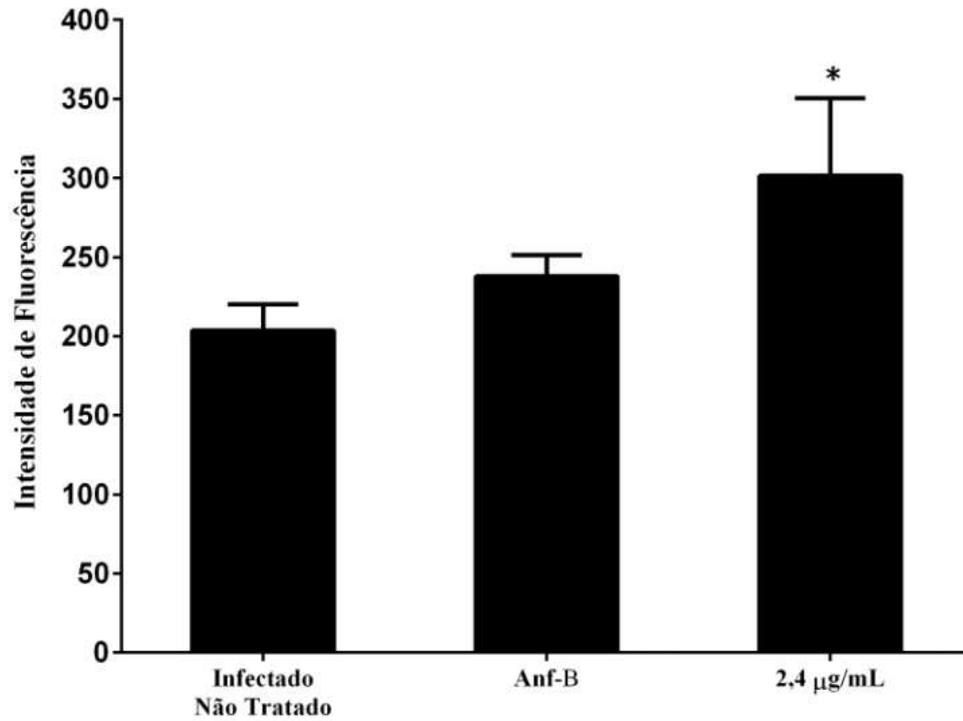


**Figura 5:** Porcentagem de macrófagos não infectados tratados com crotoxina (CTX) nas concentrações 2,4 e 4,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e LPS. Foi realizado o teste Análise de variância (ANOVA), tendo como nível de significância  $p < 0,05$ .

#### 4.3. QUANTIFICAÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS EM MACRÓFAGOS INFECTADOS E TRATADOS COM CTX

Através da marcação com Bodipy e posterior análise por citometria de fluxo foi observado que o tratamento com CTX (2,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 24 horas em macrófagos infectados,

induziu aumento na produção de corpos lipídicos quando comparado as células controle sem tratamento e com tratamento com a droga controle Anfotericina B (Figura 6).



**Figura 6:** Porcentagem de macrófagos infectados tratados com CTX na concentração de 2,4 µg/mL e anfotericina B. Foi realizado o teste Análise de variância (ANOVA), tendo como nível de significância  $p < 0,05$ .

## 5. DISCUSSÃO

As leishmanioses são doenças que apresentam alto grau de incidência na região amazônica. O tratamento dessa doença ainda é limitado, pois além de apresentar um alto custo, algumas cepas do protozoário adquiriram resistência devido as altas doses e tempo prolongado de uso dos medicamentos, gerando grande toxicidade aos pacientes, levando-os a internações (Mudavithet *al.*, 2014). Dessa forma, as leishmanioses podem ser caracterizadas como um problema de saúde pública que merecem maior atenção.

O macrófago, célula do sistema fagocítico mononuclear, é o segundo tipo celular a chegar ao local da infecção, onde o parasito *Leishmania* é capaz de se replicar no hospedeiro vertebrado. O estudo com essas células é de grande importância na busca por medicamentos contra a doença (Hassaniet *al.*, 2014). Nessas circunstâncias, o uso de baixas doses de bioprodutos, que apresentem baixo custo de produção, com potencial de promover a ativação da célula hospedeira sem causar danos e com ação leishmanicida, são o foco das pesquisas mais recentes realizadas (Aziziet *al.*, 2016; De Barros, *et al.*, 2016).

Podemos destacar como bioprodutos as toxinas animais que apresentam uma extraordinária diversidade de atividades biológicas. Dentre elas, a crotoxina (CTX), presente no veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, é descrita por apresentar grande potencial terapêutico (Faureet *al.*, 2016; Almeida *et al.*, 2015; Accorneroet *al.*, 2014). Existem poucos estudos relacionados a ação desse bioproduto contra o protozoário *Leishmania*. Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa procurou demonstrar a ação da CTX sobre a célula hospedeira e o protozoário *Leishmania (L.) amazonensis*.

A CTX é a subunidade do veneno bruto da serpente que apresenta efeito neurotóxico (Cunha & Martins, 2012), porém Farias (2016), utilizando-a em baixas concentrações, demonstrou que a droga não causou danos celulares em macrófagos peritoneais de camundongos após o tratamento. Além disso, também demonstrou que os macrófagos são ativados no seu perfil inflamatório M1, quando infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com CTX, com maior produção e liberação de substâncias microbicidas como o óxido nítrico, maior espraçamento celular, sugerindo aumento da capacidade fagocítica e estimulação da secreção de citocinas inflamatórias, como IL-6 e TNF- $\alpha$ , além do mediador inflamatório PGE2.

O presente estudo tem como objetivo analisar a presença de corpos lipídicos, sítio de produção de eicosanoides, no parasito e em macrófagos peritoneais de camundongos, antes e após a interação, tratados com o bioproduto. Inicialmente, foi analisada a produção dos

corpos lipídicos em promastigotas tratadas com a CTX na concentração de 2,4 µg/mL por 24 horas, visto que Farias (2016) observou que sob estas condições de tratamento os resultados foram mais significativos no que diz respeito à atividade inflamatória dos macrófagos.

Os resultados demonstraram que em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas houve um aumento na produção de corpos lipídicos, quando comparadas ao controle sem tratamento e ao tratado com a droga padrão. A rápida acumulação de corpos lipídicos citoplasmáticos pode caracterizar morte celular por apoptose (Boren & Brindle, 2012). Farias (2016) demonstrou que o tratamento de promastigotas na concentração de 2,4 µg/mL por 24 horas não provocou redução do número de parasitos, dessa forma o aumento do número de corpos lipídicos nesse período de tratamento pode não estar associado à morte celular por apoptose, mas sim por alguma outra via de ação da CTX. Entretanto, em um maior período de tratamento (96 horas), Farias (2016) observou redução significativa do número de parasitos, levantando a hipótese de que a morte celular poderia ocorrer após um tratamento mais prolongado. Porém, mais estudos devem ser realizados para esclarecer por qual via específica a CTX atua nas promastigota *deleishmania*.

Outro dado avaliado por este trabalho foi a presença de corpos lipídicos em macrófagos murinos não infectados. Observou-se que durante tratamento por 24 horas na concentração de 2,4 e 4,8 µg/mL estas estruturas se apresentaram em níveis basais semelhantes aos encontrados no controle não tratado. Porém, o tratamento com LPS, um lipofosfoglicano capaz de induzir resposta inflamatória no macrófago também não elevou o número de corpos lipídicos nessas células. Cardoso *et al.* (2001) demonstrou que *in vivo* a CTX aumenta produção de IL-6 e a ativação e recrutamento de fagócitos. Corroborando com isto, Farias (2016) observou aumento da produção de EROs em macrófagos tratados com CTX, além disso outros trabalhos demonstraram o aumento de NO (Sampaio *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2013), o que pode sugerir ativação do macrófago em perfil M1.

Além disso, outros autores como Ricard (2012) e Almeida (2014) observaram que o tratamento com CTX em macrófagos aumentou a liberação de PGE2. A PGE2 é um eicosanoide com função pró-inflamatória produzida em parte no interior dos corpos lipídicos, estruturas que possuem ácido araquidônico e enzimas cicloxigenases necessários para produção de eicosanoides (Dennis & Norris, 2015). Este eicosanoide também pode ser produzido nas membranas celulares, e no citoplasma, apesar dos corpos lipídicos serem o principal local de produção devido à grande concentração dos seus precursores (Carvalho *et al.*, 2003). Neste sentido, podemos concluir que mesmo sem o aumento dos corpos lipídicos

após o tratamento, ainda é possível de que a CTX ative os macrófagos em seu perfil pró-inflamatório por outras vias, estando apto a combater patógenos.

Durante a interação do patógeno com a célula hospedeira há um aumento do número de corpos lipídicos que pode estar relacionado ao aumento da resposta inflamatória dos macrófagos, levando à destruição dos parasitos. Entretanto, vale mencionar que alguns patógenos podem induzir a produção dessas estruturas, utilizando-as a seu favor e assim, conseguem sobreviver e evadir da ação das células de defesa, como o *Toxoplasma gondii* que o utiliza como fonte de energia, e o *Micobacterium tuberculosis*, quando necessita permanecer em estado de latência devido a hipóxia nos pulmões durante a tuberculose (Daniel *et al.*, 2011; Mota *et al.*, 2014).

O mesmo foi observado com o *Trypanosoma cruzi* que induz e utiliza corpos lipídicos derivados do hospedeiro para sua sobrevivência (D'Ávila *et al.*, 2011). Além dele, trabalhos com *L. majore* a célula hospedeira, demonstram que os corpos lipídicos podem ser encontrados dentro do vacúolo parasitóforo e no citoplasma do parasito (Rabdi *et al.*, 2016). Infecção pelo protozoário *L. (L.) amazonensis* induz aumento da produção de corpos lipídicos e PGE2 em macrófagos de camundongos. Macrófagos infectados tiveram redução da carga parasitária de *L. (L.) amazonensis* após inibição da COX com indometacina, sugerindo que o parasito necessita PGE2 e dos corpos lipídicos do hospedeiro (Pinheiro *et al.*, 2009).

Neste trabalho, o tratamento com CTX levou a um aumento da presença corpos lipídicos em células infectadas. Furtado *et al.* (2014) obteve dado semelhante com a PLA2 derivada de serpente *Bothrops atrox*, onde observaram que a CTX aumentou a produção de corpos lipídicos significativamente em relação as células sem tratamento. Farias (2016) demonstra que há ativação do perfil inflamatório do macrófago durante interação com parasito após tratamento com CTX 2,4 µg/mL por 24 horas e redução do número de amastigotas no interior dos macrófagos após 48 horas de tratamento. Estes dados sugerem que o aumento dos corpos lipídicos é um dos diversos mecanismos em que a CTX pode atuar, culminando no aumento da resposta inflamatória do macrófago e destruição do parasito intracelular, sem que haja utilização dos corpos lipídicos em benefício da *Leishmania*.

Nesse contexto, faz-se necessário a realização de estudos mais aprofundados acerca da via de atuação da CTX nas promastigotas e durante interação com a célula hospedeira. Todavia, é importante reafirmar o grande potencial que a CTX apresenta contra *L. (L.) amazonensis* sendo assim um bioproduto com grandes possibilidades de ser um adjuvante para o tratamento tópico de LTA, promovendo aumento da atividade inflamatória e redução da quantidade de parasitos na célula hospedeira.

## 6. CONCLUSÃO

- O tratamento com CTX aumentou a presença de corpúsculos lipídicos no citoplasma do parasito *L. (L.) amazonensis*.
- O tratamento com CTX não aumentou a presença de corpúsculos lipídicos no citoplasma de macrófagos não infectados.
- O tratamento com CTX aumentou a presença de corpúsculos lipídicos no citoplasma macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCORNERO, F.; KANISICAK, O.; TJONDROKOESOEMO, A.; ATTIA, A.C.; MCNALLY E.M.; MOLKENTIN, J.D. Myofiber-specific inhibition of TGF $\beta$  signaling protects skeletal muscle from injury and dystrophic disease in mice. **Hum Mol Genet**, **10** 2014.
- AKHOUNDI, M.; KATRIN KUHL, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; PIERRE MARTY,P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Negl Trop Dis.**, **10** (6): e0004770. 2016.
- ALMEIDA, C.D.E.S. ; ANDRADE-OLIVEIRA, V; CÂMARA N.O.; JACYSYN, J.F.; FAQUIM-MAURO, E.L. Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* is able to down-modulate the acute intestinal inflammation in mice. **PLoS One**, **10**. 2015.
- ALMEIDA, C.S. Estudo da imunomodulação induzida pela crotoxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em modelo experimental de doença inflamatória do intestino. **Dissertação de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo.** São Paulo. 2014. 119p.
- ANDRADE, B.B.; OLIVEIRA, C.I.; BRODSKYN, C.I.; BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M. Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: Current insights. **Scand J Immunol.** **66**: 122-127. 2005.
- ARAÚJO, F. A. A.; SANTALÚCIA, M.; CABRAL, R. . Epidemiologia dos Acidentes por Animais Peçonhentos. **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica dos acidentes** (2): 2003.
- ARAÚJO-SANTOS, T.A.; RODRÍGUEZ, N.E.; PONTES, S.M.; DIXT, U.G.; ABÁNADES, D.R.; BOZZA, P.T.; WILSON, M. E.; BORGES, V.M. Role of Prostaglandin F $_{2\alpha}$  Production in Lipid Bodies From *Leishmania infantum chagasi*: Insights on Virulence. **PLoS Negl Trop Dis.**, **210** (12): 1951-1961. 2014.
- ARCANJO, A. F.; LAROCQUE-DE-FREITAS, I. F.; ROCHA, J. D. B.; ZAMITH, D.; DA SILVA, A. C. C.; NUNES, M. P.; SANTOS, F. P. M.; MORROT, A.; FILARDY, A. A.; MARIANO, M.; MELO, C. B.; DOS REIS, G. A.; DECOTE-RICARDO, D.; LIMA, C. G. F. The PGE $_2$ /IL-10 Axis Determines Susceptibility of B-1 Cell-Derived Phagocytes (B-1CDP) to *Leishmania major* Infection. **PLoS One**, **10** (5): 2015.
- AZIZI K.; SHAHIDI-HAKAK F.; ASGARI Q.; HATAM G.R.; FAKOORZIBA M.R.; MIRI R.; MOEMENBELLAH-FARD M.D.; In vitro efficacy of ethanolic extract of Artemisia

- absinthium (Asteraceae) against *Leishmania major* L. using cell sensitivity and flow cytometry assays. **J Parasit Dis**, **40**. 2016.
- BAARDMAN, J.; LICHT, I.; DE WINTHER, M.P.J.; DEN BOSSCHE, J. V. Metabolic–epigenetic crosstalk in macrophage activation. **Future Medicine**, **7 (7)**: 1155-1164. 2015.
- BARROS, G.A.; PEREIRA, A.V.; BARROS, L.C.; JR, A.L.; CALVI, S.A.; SANTOS, L.D.; BARRAVIERA, B.; FERREIRA, R.S. JR. In vitro activity of phospholipase A2 and of peptides from *Crotalus durissus terrificus* venom against amastigote and promastigote forms of *Leishmania (L.) infantum chagasi*. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**. **24**; 21-48. 2015.
- BASHIR, S.; SHARMA, Y.; ELAHI, A.; KHAN, F. Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases. **Inflammation Research**, **65 (1)**: 1–11, 2016.
- BATES, P. A.; DEPAQUIT, J.; GALATI, E.A;B.; KAMHAWIS; MAROLI, M.; MCDOWELL, M.A.; PICADO, A.; READY, P.D.; SALOMÓN, D.; SHAW, J.J.;TRAUB-CSEKÖ;Y.M.; WARBURG,A. Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. **Parasites & Vectors**, **8**. 2015.
- BATES, P.A. The Developmental Biology of *Leishmania* promastigotes. **Exp Parasitol** **79**: 215-218, 1994.
- BICKEL, P. E.; TANSEY,J.T.; WELTE, M. A. PAT proteins, na ancient family of lipid droplet protins tha regulate cellular lipid stores. **Biochim Biophys Acta** **1791**: 419-140, 2009.
- BORBOREMA, S.E.; OSSO, J.A.J.; HEITOR FRANCO DE ANDRADE, H.F.J.; NASCIMENTO, N. Antimonial drugs entrapped into phosphatidylserine liposomes: physicochemical evaluation and antileishmanial activity. **Rev Soc Bras Med Trop**, **49**. 2016.
- BOREN, J ;BRINDLE, K.M; Apoptosis-induced mitochondrial dysfunction causes cytoplasmic lipid droplet formation. **Cell Death Differ** **19 (9)**: 1561-1570. 2012.
- BRASIL. **Manual Vigilancia Controle da Leishmaniose Visceral**. [s.l: s.n.]. 2010.
- BRIGATTE, P.; FAIAD, O.J.; FERREIRA, N.R.C.; LANDGRAF R.G.; PALMA M.S.; CURY, Y.; CURI, R.; SAMPAIO, S.C. Walker 256 Tumor Growth Suppression by Crotoxin Involves Formyl Peptide Receptors and Lipoxin A<sub>4</sub>. **Mediators of Inflammation**, **10**. 2016.

- CAPRONI, P.; Ação da Bothropstoxina-1 do veneno total de *Bothrops jararacussu* irradiados sobre o sistema imune. **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, 60**. 2009.
- CARDOSO, D.F.; FERREIRA, M. L.; MAURO, E. L. F.; MACEDO, M. S.; FARSKY; C.A. Role of crotoxin, a phospholipase A2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on inflammatory and immune reactions. **Mediators of Inflammation, 10**: 125–133. 2001.
- CARVALHO, W.A.; CARVALHO, R.D.S.; SANTOS, F. R.; Analgésicos inibidores específicos de la ciclooxigenase-2: avanços terapêuticos **Rev. Bras. Anesthesiol. 54 (3)**, 2003.
- CDC. Centers of Disease Control and Preservation.** [s.l: s.n.]. 2013.
- CLISSA, P.B.; Otimização da atenuação da toxicidade do veneno crotálico irradiado e estudo de suas propriedades imunológicas. **Instituto de pesquisas energéticas e nucleares, Universidade de São Paulo, 79**: 1997.
- COLASANTE, C.; VONCKEN, F.; MANFUL, F. Proteins and lipids of glycosomal membranes from *Leishmania* spp. and *Trypanosoma brucei*. **F1000Research, 1**: 2-27, 2013.
- COSTA FILHO, A.V.; LUCAS, I.C.; SAMPAIO, R.N. Comparative study between oral miltefosine and parenteral N-metil glucamine antimoniate for the treatment of experimental leishmaniasis caused *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Rev Soc Bras Med Trop, 41, (4)**: 424-427, 2008.
- COSTA, E.S.; FAIAD, O.J.; LANDGRAF, R.G.; FERREIRA, A.K.; BRIGATTE, P.; CURI, R.; CURY, Y.; SAMPAIO. S.C. Involvement of formyl peptide receptors in the stimulatory effect of crotoxin on macrophages co-cultivated with tumour cells. **Toxicon, 74**: 167-78. 2013.
- CUNHA, E. M. & MARTINS, O. A.; Principais compostos químicos presente nos venenos de cobras dos gêneros *Bothrops e Crotalus*. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência. 2 (2)**: 21-26. 2012.
- D'AVILA, H.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; ROQUE, N. R.; TEIXEIRA, L.; FIDALGO, C. B.; SILVA, A. R.; MELO, R.C.N.; DOS REIS, G. A.; FARIA-NETO, H. C.C.; BOZZA, P.T. Host cell lipid bodies triggered by *trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin e2 generation and increased parasite growth. **J Infect Dis, 61** ;204:951. 2011.

- DANIEL, J; MAAMAR, H; DEB, C; SIRAKOVA, T.D; KOLATTUKUDY, P.E. Mycobacterium tuberculosis uses host triacylglycerol to accumulate lipid droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages. **PLoS Pathog** **7** (6): 2011.
- DE BARROS, N.B.; MACEDO, S.R.; FERREIRA, A.S.; TAGLIARI, M.P.; ZANCHI, F.B.; KAYANO, A.M.; SOARES, A.M.; NICOLETE, R. Liposomes containing an ASP49-phospholipase A2 from Bothrops jararacussu snake venom as experimental therapy against cutaneous leishmaniasis. **Int Immunopharmacol** **36**: 225-231. 2016.
- DE SOUZA, W. *et al.* **Protozoologia Médica**. 1ªed. São Paulo: Rubio, 2013.
- DE SOUZA, W.; SANTANNA, C. & CUNHA-E-SILVA, N.L. Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. **Prog Histochem Cytochem** **44**: 67-124, 2009.
- DEGRAVE, W.; FERNANDES O.; CAMPBELL, D.; BOZZA, M.; LOPES; U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*-a minireview. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **89**: 463-469, 1994.
- DENNIS, E. A.; NORRIS, P. C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, **15**, (8): 511–523, 2015.
- DUARTE, M.C.; TAVARES, G.S.; VALADARES, D.G.; LAGE, D.P.; RIBEIRO, T.G.; LAGE, L.M.; RODRIGUES, M.R.; FARACO, A.A.; SOTO, M.; DA SILVA, E.S.; CHÁVEZ M.A.F.; TAVARES, C.A.; LEITE, J.P.; OLIVEIRA, J.S.; CASTILHO, R.O.; COELHO, E.A. Antileishmanial activity and mechanism of action from a purified fraction of *Zingiber officinalis* Roscoe against *Leishmania amazonensis*. **Exp Parasitol**, **8**. 2016.
- DVORAK, A.M.; DVORAK, H.F.; PETERS, S. P.; SHULMAN, E.S.; MACGLASHAN, D.W.JR.; PYNE, K.; HARVEY, V.S.; GALLI, S. J. & LICHTENSTEIN, L. M. Lipid bodies: cytoplasmic organelles importante to arachidonate metabolismo in macrophages and mast cells. **J Immunol** **131**: 2965-2976. 1983.
- FARESE, R. V. JR. & WALTHER, T.C. Lipid droplets finally get a little respect. **Cells** **139** (5): 855-60, 2009.
- FARIAS, H.L. **Estudo da ação de Crotoxina sobre o perfil de ativação de macrófagos peritoneais infectados com *L. (L.) amazonensis***. Dissertação de doutorado. Universidade Federal do Pará. Pará. 2016. 60p.

- FAURE, G.; BAKOUH, N.; LOURDEL, S.; ODOLCZYK, N.; PREMCHANDAR, A.; SERVEL, N.; HATTON, A.; OSTROWSKI, M.K.; XU, H.; SAUL, F.A.; MOQUEREAU, C.; BITAM, S.; PRANKE, I.; PLANELLES, G.; TEULON, J.; HERRMANN, H.; ROLDAN, A.; ZIELENKIEWICZ, P.; DADLEZ, M.; LUKACS, G.L.; ERMET-GAUDELUS, I.; OLLERO, M.; CORRINGER, P.J.; EDELMAN, A. Rattlesnake Phospholipase A2 Increases CFTR-Chloride Channel Current and Corrects  $\Delta F508$ CFTR Dysfunction: Impact in Cystic Fibrosis. **J Mol Bio** **17 (14)**:2898-915. 2016.
- FAVILA, M. A.; GERACI, N. S.; JAYAKUMAR, A.; HICKERSON, S.; MOSTROM, J.; TURCO, S. J.; BEVERLEY, S. M.; MCDOWELL, M. A. Differential Impact of LPG-and PG-Deficient *Leishmania major* Mutants on the Immune Response of Human Dendritic Cells. **Plos Neglect Trop Dis**, **9(12)**: 2015.
- FERNANDES, M.C.; LAURA, A. L.; DILLON, L.A.L.; ASHTON TREY BELEW, A.T.; HECTOR CORRADA BRAVO, C.H.; DAVID M. MOSSER, D.M.; EL-SAYED, N.M. Dual Transcriptome Profiling of *Leishmania*-Infected Human Macrophages Reveals Distinct Reprogramming Signatures. **American Society of Microbiology**, **7**. 2016.
- FRANCO, L.H.; BEVERLEY, S.M.; ZAMBONI, D.S. Innate Immune Activation and Subversion of Mammalian Functions by *Leishmania* Lipophosphoglycan. **J Parasitol Res**, 2012.
- FURTADO, J. L.; OLIVEIRA, G. A.; PONTES, A. S.; SETÚBAL, S. D. S.; XAVIER, C. V.; LACOUTH-SILVA, F.; LIMA, B. F.; ZAQUEO, K. D.; KAYANO, A. M.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M.; ZULIANI, J. P. Activation of J77A.1 macrophages by three phospholipases A2 isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Bio Med Res Int** **13**, 2014.
- GADELHA, A. P. R.; CUNHA-E-SILVA, N. L.; SOUZA, W. DE. Assembly of the *Leishmania amazonensis* flagellum during cell differentiation. **J Struct Bio**, **184**, (2): 280–92, 2013.
- GARCÍA-ALMAGRO, D. Leishmaniasis cutanea. **Revista Pediatría de Atención Primaria**, **96**, (1):1–24, 2005.
- GIBSON-CORLEY, K. N.; BOCKENSTEDT, M. M.; LI, H.; BOGGIATTO, P.M.; PHANSE, Y.; PETERSEN, C.A.; BELLAIRE, B.H.; JONES, D.E. An In Vitro Model of Antibody-Enhanced Killing of the Intracellular Parasite *Leishmania amazonenses* **PLoS One**, **9 (9)**. 2014.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana; American cutaneous leishmaniasis. **Rev Soc Bras Med Trop**. **36**. 2003.

- GONZÁLEZ, U.; PINART, M.; SINCLAIR, D.; FIROOZ, A.; ENK, C.; VÉLEZ, I.D.; ESTERHUIZEN, T.M.; TRISTAN, M.; ALVAR, J. Vector and reservoir control for preventing leishmaniasis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, **5**;(8). 2015.
- GRIMALDI JR, G. & TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Rev. Clin Microbiol** **6**: 230-250,1993.
- GUERRA J.A.O.; BARBOSA, M.G.V.; OUREIRO, A.C.S.P.; CANDISSE PINHEIRO COELHO, C.P.; GILMAR GARCIAS ROSA, G.G.; LEILA INÊS DE AGUIAR DA CÂMARA RAPOSO COELHO, L.I.A.R. Leishmaniose tegumentar americana em crianças: aspectos epidemiológicos de casos atendidos em Manaus, Amazonas, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, **23**. 2007.
- GUEIRARD, P.; LAPLANTE, A.; RONDEAU, C.; MILON, G.; DESJARDINS, M. trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartment in neutrophils enables subsequent transfer of parasites to macrophages. **Cell microbial** (**10**): 100-111, 2008.
- GULL, K. The Cytoskeleton of Trypanosomatid Parasites. **Annual Review of Microbiology**, **53**: 629-655. 1999.
- HAN, R.; XIAO, J.; ZHAI, H.; HAO, J. Dimethyl fumarate attenuates experimental autoimmune neuritis through the nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2/hemoxygenase-1 pathway by altering the balance of M1/M2 macrophages. **J Neuroinflammation**, **13**: 97. 2016.
- HANDMAN, E. & BULLEN, D.V.R.; Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends in Parasitology**, **18**: 332–334. 2002.
- HASSANI, K.; SHIO, M.T.; MARTEL, C.; FAUBERT, D.; OLIVIER, M.; Absence of Metalloprotease GP63 Alters the Protein Content of *Leishmania* Exosomes. **PLoS One** **9**(4): 2014.
- ISNARD, A.; SHIO, M.T.; OLIVIER, M. Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. **Cell Infect Microbiol.** , **2**: (72). 2012.
- IZADI, S.; MIRHENDI, H.; JALALIZAND, N.; KHODADADI, H.; MOHEBALI, M.; NEKOEIAN, S.; JAMSHIDI, A.; GHATEE, M.A. Molecular Epidemiological Survey of Cutaneous Leishmaniasis in Two Highly Endemic Metropolises of Iran, Application of FTA Cards for DNA Extraction From Giemsa-Stained Slides. **Jundishapur J Microbiology**, **9** (2). 2016.
- JABLONSKI, K. A.; AMICI, S. A.; WEBB, L. M.; RUIZ-ROSADO, J. DE D.; POPOVICH, P. G.; PARTIDA-SANCHEZ, S.; GUERAU-DE-ARELLANO, M. Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. **PloS one**, **10**, (12). 2015.

- LAISON, R. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their Discovery, ecology and taxonomy. **Revista pan-Amazônica de saúde**, **1**:213-232. 2010.
- LAISON, R. & SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: The Leishmaniases in Biology and Medicine, Biology and Epidemiology. W. Peters & R. Killick-kendrick (eds.). London, **Academic Press 1**: 1-120, 1987.
- LANDFEAR, S. M.; IGNATUSHCHENKO, M. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. **Molecular and biochemical parasitology**, **115**, (1):1–17, 2001.
- LASUNSKAIA, E.B.; CAMPOS, M.N.; DE ANDRADE, M.R.; DAMATTA, R.A.; KIPNIS, T.L.; EINICKER-LAMAS, M.; DA SILVA, W.D. Mycobacteria directly induce cytoskeletal rearrangements for macrophage spreading and polarization through TLR2-dependent PI3K signaling. **J Leukocyte Biol**, **80**(6): 1480-90. 2006.
- LIN, P.; XIAO CHEN, X.; MOKTAN, H.; ARRESE, E.L.; DUAN, L.; WANG, L.; SOULAGES, J.L.; ZHOU, D.H. Membrane attachment and structure models of lipid storage droplet protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1838**(3): 874–881. 2013.
- LIU, Q.; TIAN, Y.; ZHAO, X.; JING, H.; XIE, Q.; LI, P.; LI, D.; YAN, D.; ZHU, X. NMAAP1 Expressed in BCG-Activated Macrophage Promotes M1 Macrophage Polarization **Mol Cell Biochem**, **31** (10): 886–894. 2015.
- LIU, Y.-C.; ZOU, X.-B.; CHAI, Y.-F.; YAO, Y.-M. Macrophage Polarization in Inflammatory Diseases. **Int J Biol Sci**, **10** (5): 520–529, 2014.
- LIU, D.; UZONNA, J.E. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Front Cell Infect Microbiol**, **2** (83), 2012.
- MATHEOUD, D.; MORADIN, N.; BELLEMARE-PELLETIER, A.; SHIO, M.T.; HONG, W.J.; OLIVIER, M.; GAGNON, E.; DESJARDINS, M.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* Evades Host Immunity by Inhibiting Antigen Cross-Presentation through Direct Cleavage of the SNARE VAMP8. **Cell Host & Microbe**, **14**, (1):15–25. 2013.
- MAYER, A. M. S.; RODRIGUEZ, A. D.; BERLINCK, R. G. S.; HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2005-6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, **1790** (5): 283–308. 2011.

- MCGWIRE, B.S.; SATOSKAR, A.R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **Int J Med** **107**(1):7-14. 2013.
- MICHALICK; M.S.M.; RIBEIRO, R. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, F.P. *et al.* **Parasitologia Humana** 12° Ed. São Paulo. Editora Atheneu. Cap. 7, p. 41-47, 2011.
- MIRANDA, K.; DE SOUZA, W.; PLATTNER, H.; HENTSCHEL, J.; KAWAZOE, U.; FANG, J. & MORENO, S. N. J. Acidocalcisomes in Apicomplexan parasites. **Exp Parasitol**, **118** (2): 9. 2008.
- MITROPOULOS, P.; KONIDAS, P.; DURKIN-KONIDAS, M. New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **63** (2): 309–322. 2010.
- MOTA, L. A. M.; ROBERTO-NETO, J.; MONTEIRO, V.G.; LOBATO, C.S.S.; OLIVEIRA, M.A.O.; DA CUNHA, M.; D'ÁVILA, H.; SEABRA, A.H.; BOZZA, P.T.; RENATO AUGUSTO DAMATTA, R.A. Culture of mouse peritoneal macrophages with mouse serum induces lipid bodies that associate with the parasitophorous vacuole and decrease their microbicidal capacity against *Toxoplasma gondii* **Mem Inst Oswaldo Cruz** **109** (6): 767-774. 2014.
- MUDAVITH, S. L.; TALAT, M.; RAI, M.; SRIVASTAVA, O.N.; SUNDAR, S. Characterization and evaluation of amine-modified graphene amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis: in vivo and in vitro studies. **Drug Design, Development and Therapy**, **8**: 1235–1247. 2014.
- MULLER, V.D.M. RUSSO, R.R.; CINTRA, A.C.O.; SARTIM, M. A.; ALVES-PAIVA, R. M.; FIGUEIREDO, L. T. M; SAMPAIO, S. V.; AQUINO, V. H.; Crotoxin and phospholipases A<sub>2</sub> from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses. **Toxicon: From venoms to drugs**, **59**: 507–515. 2012.
- NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- NEVES, L. O.; TALHARI, A. C.; GADELHA, E. P. N.; JÚNIOR, R. M. S.; GUERRA, J. A. O.; FERREIRA, L.C.L.; TALHARI, S. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. **An Bras Dermatol**, **86**(6):1092-101. 2011.
- OLIVER, M.; GREGORY, D.J.; FORGET, G. subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clin Microbiol Ver**, **18** (2): 293-305. 2005.

- OUELLETTE, M., DRUMMELSMITH, J. & PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resist Update**; **7**:257- 266. 2004.
- PARANAÍBA, L.F.; DE ASSIS, R.R.; NOGUEIRA, P.M.; TORRECILHAS, A.C.; CAMPOS, J.H.; SILVEIRA, A.C.O.; MARTINS-FILHO, O.A.; PESSOA, N.L.; CAMPOS, M.A.; PARREIRAS, P.M.; MELO, M.N.; GONTIJO, N.F.; SOARES, R.P.P. *Leishmania enriettii*: biochemical characterisation of lipophosphoglycans (LPGs) and glycoinositolphospholipids (GIPLs) and infectivity to *Cavia porcellus*. **Parasitol Vectors**, **8**: 31. 2015.
- PASSERO, L. F. D.; TOMOKANE, T. Y.; CORBETT, C. E. P.; LAURENTI, M. D.; TOYAMA, M. H. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus* ssp. venoms. **Parasitol Res**, **101**, (5): 1365–1371, 2007.
- PATEL, P. C.; HARRISON, R. E. Membrane Ruffles Capture C3bi-opsonized Particles in Activated Macrophages. **Mol Biol Cell**, **19**: 4628–4639, 2008.
- PEFEROEN, L.A.; VOGEL, D.Y.; UMMENTHUM, K.; BREUR, M.; HEIJNEN, P.D.; GERRITSEN, W.H.; PEFEROEN-BAERT, R.M.; VANDERVALK. P.; DIJKSTRA, C.D.; AMOR, S. Activation Status of Human Microglia Is Dependent on Lesion Formation Stage and Remyelination in Multiple Sclerosis. **J Neuropathol Exp Neurol**. 2014.
- PEREIRA, L. O. R.; BRANDÃO, A. Analysis of trypomastix Kdna minicircle by absolute dinucleotide frequency. **Parasitology International**, **62** (4): 397-403. 2013.
- PESSÔA, S. B. & MARTINS, A. V. **Parasitol med**. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1982.
- PINHEIRO, R.O.; NUNES, M. P.; PINHEIRO, C.S.; D'AVILA, H.; BOZZA, P.T.; TAKIYA, C.M.; CÔRTE-REAL, S.; FREIRE-DE-LIMA, C.G. & DOS REIS, G. A. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. **Microbes Infect** **11** (2): 181-190, 2009.
- PINHO, F. M. O. & PEREIRA, I. D.; Ofidismo. **Rev Ass Med Bras**, **27** (1): 24-29. 2001.
- PIRES, A. S.; BORGES, A. F.; COELHO, A. C.; DORTA, M. L.; JUNIOR, R.S. L.; PEREIRA, L. I. A.; PINTO, S. A.; DE OLIVEIRA, M. A. P.; DE MATOS, G. G.; ABRAHAMSOHN, I. A.; ULIANA, S. R. B.; LIMA, G. M. C.A.; RIBEIRO-DIAS, F. Identification and Biological Characterization of *Leishmania (Viannia) guyanensis* Isolated from a Patient with Tegumentary Leishmaniasis in Goiás, a Nonendemic Area for This Species in Brazil. **Biomed Res Int**, 2015.

- POLONIO,T.; EFFERTH,T. Leishmaniasis: drug resistance and natural products (review). **Int J Mol Med**, **22 (3)**: 277-86, 2008.
- RABHI, S.; RABHI, I.; TRENTIN, B.; PIQUEMAL, D.; REGNAULT, B.; GOYARD, S.; LANG, T.; DESCOTEAUX, A.; ENNINGA, J.; GUIZANI-TABBANE, L. Lipid Droplet Formation, Their Localization and Dynamics during *Leishmania major* Macrophage Infection. **Plos One**, **11 (2)**. 2016.
- RAMOS, P. K.; DINIZ, J. A.; SILVA, E. O.; QUARESMA, J. A.; SARAIVA, E. M.; SEABRA, S.H.; ATELLA,G.C. & DE SOUZA, W. Characterization in vivo and in vitro of a strain of *Leishmania (Viannia) shawi* from the Amazon Region. **Parasitol Int**, **58**: 154-160. 2009.
- RICARD, R. **Estudo dos mecanismos de supressão da resposta imune induzida pela ctx da *Crotalus durissus terrificus***. Dissertação de Mestrado. Instituto de ciências biomédicas. Unversidade de São Paulo. São Paulo. 2010. 114p.
- ROSS,R.; Note on the bodies recntly described by Leishman and Donovan. **Br. Med. J. II**: 1261-1262,1903.
- ROTUREAU, B.; MORALES, M. A.; BASTIN, P.; SPATH, G. F. The flagellum-mitogenactivated protein kinase connection in trypanosomatids: a key sensory role in parasite singlling and development? **Cell Microbiol** **11 (5)**: 710-8. 2009.
- SAMPAIO, S. C.; BRIGATTE, P.; SOUSA-E-SILVA, M. C.; DOS-SANTOS, E. C.; RANGEL-SANTOS, A. C.; CURI, R.; CURY, Y. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. **Toxicon**, **41 (7)**: 899-907. 2003.
- SAMY, R. P.; SETHI, G.; LIM, L. H. K. A brief update on potential molecular mechanisms underlying antimicrobial and wound-healing potency of snake venom molecules. [s.l.] **Elsevier Inc.**, 2016.
- SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **J Infect Dev Ctries**, **9(6)**: 588-596. 2015.
- SHEN, G.; NING,N.; ZHAO,X.; LIU,X.; WANG, G.; WANG,T.; ZHAO, R.; YANG, C.; WANG, D.; GONG, P.; SHEN,Y.; SUN, Y.; ZHAO, X.; JIN,Y.; YANG,W.; HE,Y.; ZHANG,L.; JIN, X.; LI,X. Adipose differentiation-related protein is not involved in hypoxia inducible factor-1-induced lipid accumulation under hypoxia. **Mol Med Rep** **12(6)**: 8055–8061. 2015.
- SHIO, M.T; JAN GREGOR CHRISTIAN, J.G.; JUNG, J.Y.; CHANG, K.; MARTIN OLIVIER,M.; PKC/ROS-Mediated NLRP3 Inflammasome Activation Is Attenuated

- by *Leishmania* Zinc-Metalloprotease during Infection. **PLoS Neglected Tropical Disease**, **9 (6)**. 2015.
- SMIT, E.; PRETORIUS, E.; ANDERSON, R.; OOMMEN, J.; POTJO, M. Differentiation of human monocytes in vitro following exposure to Canova in the absence of cytokines. **Ultrastructural pathology**, **32,(4)**: 147–52, 2008.
- SOARES, R.P.P.; MACEDO, M.E.; ROPERT, C.; GONTIJO, N.F.; ALMEIDA, I.C.; GAZZINELLI, R.T.; PIMENTA, P.F.P.; TURCO, S.J. *Leishmania chagasi*: Lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Mol Biochem Parasitol** **24**; 121:213. 2002.
- SOUSA E SILVA, M. C. C.; GONÇALVES, L. R. C.; MARIANO, M. The venom of South. **Mediators of Inflammation**, **23**: 18–23, 1996.
- SRIVASTAVA, S.; SHANKAR, P.; MISHRA, J.; SINGH, S. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. **Parasitol Vectors**, **12 (1)**: 277. 2016.
- TEIXEIRA, D. E.; BECHIMOL, M.; RODRIGUES, J. C. F.; CREPALDI, P.HPARASITO.; PIMENTA, P. F. P., DE SOUZA, W. **Atlas didático: Ciclo de vida da *Leishmania***. Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, Rio de Janeiro, 1 ed., 2013.
- TEIXEIRA, P.C.; VELASQUEZ, L.G; LEPIQUE, A.P.; DE REZENDE, E.; BONATTO, J.M.C.; BARCINSKI, M.A.; CUNHA-NETO, E.; STOLF, B.S. Regulation of *Leishmania (L.) amazonensis* Protein Expression by Host T Cell Dependent Responses: Differential Expression of Oligopeptidase B, Tryparedoxin Peroxidase and HSP70 Isoforms in Amastigotes Isolated from BALB/c and BALB/c Nude Mice. **PLoS Neglected Tropical Disease**, **9(2)**. 2015.
- TOKARNIA, H. C. & PEIXOTO V.P.; A importância dos acidentes ofídicos como causa de mortes em bovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, **26 (2)**: 55-68. 2006.
- WEBSTER, P. & RUSSEL, D.G. The flagellar pocket of trypanosomatids. **Parasitol Today**, **9(6)**: 201-206. 1993.
- WHO, W. H. O. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Second WHO report on neglected tropical diseases. [s.l: s.n.].
- WILSON M.E.; PEARSON, R.D.; Immunology of leishmaniasis. **Modern parasite biology: cellular, immunological aspects**. p. 200-221. 1990.
- WILSON, M.E. & YAO, C. Dynamics of sterol synthesis during development of *Leishmania* spp. parasites to their virulent form. **Parasites & Vectors**, **9**:200. 2016.

XUAN, W.; QU, Q.; ZHENG, B.; XIONG, S.; FAN, G.-H. The chemotaxis of M1 and M2 macrophages is regulated by different chemokines. **J Leukocyte biol**, **97**,(1): 61–9, 2015.