UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO

ANA MARINA BARROSO DE FIGUEIREDO

Investigação dos efeitos do treinamento com β-glucana no controle da infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em camundongos C57BL/6 transgênicos para interleucina 32γ humana

Goiânia
2019

sistema de bibliotecas ufg

PRPG
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO

UFG

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **[x] Dissertação** **[ ] Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Ana Marina Barroso de Figueiredo

Título do trabalho: Investigação dos efeitos do treinamento com β-glucana no controle da infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em camundongos C57BL/6 transgênicos para interleucina 32γ humana.

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento [x] SIM [ ] NÃO[1]

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Ana Marina Barroso de Figueiredo
Assinatura do(a) autor(a)[2]

Ciente e de acordo:

Patrícia Ribeiro Dias.
Assinatura do(a) orientador(a)[2]

Data: 04/04/2019

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:
- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

[2] A assinatura deve ser escaneada.

Versão atualizada em maio de 2017.

SIBI
SISTEMA DE BIBLIOTECAS UFG

PRPG
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO

UFG

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o(a) autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico: **[X] Dissertação** **[ ] Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do(a) autor(a): Ana Marina Barroso de Figueiredo

Título do trabalho: Investigação dos efeitos do treinamento com β-glucana no controle da infecção por Leishmania (Viannia) braziliensis em camundongos C57BL/6 transgênicos para interleucina 32γ humana

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [ ] NÃO[1]

Independente da concordância com a disponibilização eletrônica, é imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Ana Marina Barroso de Figueiredo
Assinatura do(a) autor(a)[2]

Ciente e de acordo:

Fátima Ribeiro Dias.
Assinatura do(a) orientador(a)[2]

Data: 18 / 03 / 2021

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.
Casos de embargo:
- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

[2] As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento. Imagens coladas não serão aceitas.

ANA MARINA BARROSO DE FIGUEIREDO

Investigação dos efeitos do treinamento com β-glucana no controle da infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em camundongos C57BL/6 transgênicos para interleucina 32γ humana

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Dra. Fátima Ribeiro Dias

Goiânia
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Figueiredo, Ana Marina Barroso de
Investigação dos efeitos do treinamento com B-glucana no controle da infecção por Leishmania (Viannia) braziliensis em camundongos C57BL/6 transgênicos para interleucina 32y humana [manuscrito] / Ana Marina Barroso de Figueiredo. - 2019.
xv, 81 f.

Orientador: Profa. Dra. Fátima Ribeiro Dias.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2019.
Bibliografia. Anexos.
Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, lista de figuras.

1. Leishmania. 2. Interleucina-32. 3. Imunidade treinada. I. Dias, Fátima Ribeiro, orient. II. Título.

CDU 612.017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO
Rua 235, s/n – Setor Universitário - Goiânia/GO – CEP: 74.605-050
Fones: (62) 3209.6362 - 3209.6102 – Fax: (62) 3209.6363 – **e-mail : ppgbrph@gmail.com**

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE ANA MARINA BARROSO DE FIGUEIREDO - Aos oito dias do mês de março do ano de 2019 (08/03/2019), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. FÁTIMA RIBEIRO DIAS, CLAYSON MOURA GOMES e HÉLIO GALDINO JÚNIOR para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **"INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DO TREINAMENTO COM β-GLUCANA NO CONTROLE DA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS* EM CAMUNDONGOS C57BL/6 TRANSGÊNICOS PARA INTERLEUCINA 32 γ HUMANA"**, em nível de **MESTRADO**, de autoria de **ANA MARINA BARROSO DE FIGUEIREDO**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora, Profa. Dra. FÁTIMA RIBEIRO DIAS, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida à autora da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1492/2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

Banca Examinadora	**Aprovada / Reprovada**
Profa. Dra. Fátima Ribeiro Dias	APROVADA
Prof. Dr. Clayson Moura Gomes	Aprovado
Prof. Dr. Hélio Galdino Júnior	Aprovada

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata Habilitada, (**Habilitada ou não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16 h 00 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, POLLYANA REZENDE AQUINO, secretário do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.
A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

_____
_____
_____
_____

	Assinatura
Profa. Dra. Fátima Ribeiro Dias (IPTSP/UFG)	Fátima Ribeiro Dias.
Prof. Dr. Clayson Moura Gomes (PUC/GO)	Clayson Moura Gomes
Prof. Dr. Hélio Galdino Júnior (FEN/UFG)	Hélio Galdino Júnior
Secretário da Pós-Graduação:	Pollyana Rezende Aquino

I

Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Ana Marina Barroso de Figueiredo

Orientador (a): Fátima Ribeiro Dias

Membros:

1. Fátima Ribeiro Dias

2. Hélio Galdino Junior

3. Clayson Moura Gomes

Data: 08/03/2019

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as bençãos que derramou sobre mim, por ter colocado pessoas maravilhosa no meu caminho e por me dá forças durante os momentos difíceis e me permitir conquistar esse objetivo.

À minha mãe, ao meu pai e às minhas irmãs, por sempre estarem ao meu lado, por me apoiarem e me ajudarem a conquistar meus sonhos.

À minha orientadora, a Prof.ª Dra. Fatima Ribeiro Dias, pela orientação e pela amizade. Obrigada por todos os ensinamentos, pela paciência e dedicação. Você é um exemplo para mim. Te admiro muito. Muito obrigada Fátima!

À Prof.ª Dra. Miriam Dorta, minha orientadora de iniciação científica e amiga. Obrigada por ter me acolhido em seu laboratório, por ter confiado em mim e ter se tornado uma grande amiga. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Milton Oliveira, por ter disponibilizado seu laboratório, colaborando com este trabalho.

Ao Prof. Dr. Leo Joosten por contribuir para a realização do presente trabalho.

À Dra. Jéssica Cristina dos Santos pelos conhecimentos compartilhados e também pela amizade. Muito obrigada Jéssica!

À Grazzielle Guimarães, grande amiga e orientadora de iniciação científica. Obrigada por guiar meus primeiros passos no laboratório, pelos ensinamentos, pela ajuda neste trabalho e, principalmente, pela amizade que construímos ao longo desses quatro anos. Você é como uma irmã para mim e tem um lugar muito especial no meu coração! Muito obrigada Grazzi!

Ao Muriel Vilela, grande amigo e companheiro de trabalho. Obrigada pela ajuda para realização desse trabalho, pelos ensinamentos, pelos conselhos e companheirismo. Muito obrigada Muriel! Você mora no meu coração.

Aos demais membros do laboratório, Rodrigo, Iara, Valéria, Murilo, João, Pedro, Nathália e Matheus, pelos ensinamentos, apoio ou amizade de cada um. Obrigada a todos do laboratório! Vocês são minha segunda família.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pelos apoios financeiros que possibilitaram a realização do trabalho.

SUMÁRIO

FIGURAS E ANEXOS.....x
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS xii
RESUMO.....xiv
ABSTRAC.....xv
1. INTRODUÇÃO/ REVISÃO DA LITERATURA.....1
1.1. Leishmaniose Tegumentar Americana: Aspectos Gerais.....1
1.2. Leishmaniose Tegumentar: Aspectos imunológicos 3
1.2.1. Aspectos gerais das respostas imunes.....3
1.2.2. O modelo de infecção com *L. braziliensis* em camundongos.....8
1.3.Interleucina - 32 (IL-32) - Propriedades gerais e sua participação nas leishmanioses.....11
1.4. Imunidade treinada 15
1.5. β-glucana: seus efeitos no sistema imune e no treinamento inato 17
2. JUSTIFICATIVA 20
3. OBJETIVOS.....22
3.1. Objetivo Geral 22
3.2. Objetivos específicos 22
4. METODOLOGIA 23
4.1. Animais e considerações éticas 23
4.2. Cultura de parasitos.....23
4.3. Preparo de antígeno de *Leishmania*.....24
4.4. Tratamento dos animais com β-glucana.....24
4.5. Infecção dos camundongos e acompanhamento do curso da lesão.....24
4.6. Quantificação do parasitismo por diluição limitante 25
4.7. Análises histopatológicas das lesões.....25
4.8. Preparação dos tecidos para dosagem de citocinas 26
4.9. Cultura de células do linfonodo drenante da lesão 26
4.10. Avaliação da produção de citocinas por ELISA 27

4.11. Cultura de células da medula óssea dos animais tratados com β-glucana e avaliação da atividade leishmanicida de macrófagos derivados de precursores de células da medula óssea *in vitro*.....28
4.12. Análise Estatística 29
5. RESULTADOS.....30
5.1**.** Resultados com inóculo de 10^5 parasitos 30
5.1.1. Curso da lesão causada pela infecção por *Leishmania braziliensis* e carga parasitária nas lesões dos camundongos selvagens ou transgênicos para o gene da IL-32γ humana, após tratamento com β-glucana 30
5.1.2. Análise histopatológica das lesões causadas por *Leishmania braziliensis* em camundongos selvagens ou transgênicos para o gene da IL-32γ humana, tratados previamente com β-glucana.....34
5.1.3. Quantificação das citocinas IL-32γ e TNF-α presentes na lesão da pata e dos níveis de IFNγ produzido por células dos linfonodos drenantes das lesões dos camundongos selvagens ou transgênicos para o gene da IL-32γ humana infectados com *Leishmania braziliensis*, tratados previamente com β-glucana.....37
5.1.4. Avaliação do efeito da β-glucana no número de células da medula óssea e na produção das citocinas TNF-α e IL-1β produzidas por estas células após estimulação com antígenos de *Leishmania braziliensis*.....41
5.1.5 Avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida de macrófagos derivados de precursores da medula óssea dos camundongos selvagens ou transgênicos para IL-32γ humana uma semana após o tratamento com β-glucana 43
5.2. Resultados com inóculo de 10^6 parasitos 45
5.2.1. Curso da lesão causada pela infecção por *Leishmania braziliensis* e carga parasitária nas lesões dos camundongos selvagens ou transgênicos para o gene da IL-32γ humana, após tratamento com β-glucana 45
5.2.2. Quantificação das citocinas IL-32γ e TNF-α presentes na lesão da pata e dos níveis de IFNγ produzido por células dos linfonodos drenantes das lesões dos camundongos selvagens ou transgênicos para o gene da IL-32γ humana infectados com *Leishmania braziliensis*, tratados previamente com β-glucana. 47
6. DISCUSSÃO 49
7. CONCLUSÕES.....60
REFERÊNCIAS 62

ANEXOS.....72
Anexo 1- Parecer do Comitê de Ética, TCLE 72
Anexo 2 - Comprovante de Submissão do Artigo 75
Anexo 3- Respostas dos Revisores 78

FIGURAS E ANEXOS

Lista de Figuras:

Figura 1. Tratamento com β-glucana antes da infecção com *Leishmania braziliensis* induz mais rápido o desenvolvimento da lesão e diminui a carga parasitária após 8 semanas de infecção em animais transgênicos para IL-32γ humana.....32

Figura 2. No início da infecção por *Leishmania braziliensis* os camundongos transgênicos para IL-32γ humana apresentam um aumento da carga parasitária independentemente do tratamento prévio com β-glucana.....33

Figura 3. Tratamento com β-glucana aumenta o processo inflamatório na lesão causada por *Leishmania braziliensis*, após 3 semanas de infecção, nos animais transgênicos para IL-32γ humana.....35

Figura 4. Similar infiltrado inflamatório nas lesões de camundongos selvagens ou transgênicos para IL-32γ humana, tratados previamente com PBS ou β-glucana, infectados com *Leishmania braziliensis,* após 8 semanas de infecção.....36

Figura 5. Tratamento com β-glucana não altera a produção de IL-32γ ou TNF-α nas lesões, mas aumenta a produção de IFNγ pelas células do linfonodo drenante da lesão de camundongos transgênicos para IL-32γ humana, após 3 semanas de infecção com *Leishmania braziliensis*.....38

Figura 6. β-glucana induz um aumento persistente na produção de IFNγ em culturas de células do linfonodo drenante da lesão de camundongos transgênicos para IL-32γ humana após 8 semanas de infecção com *Leishmania braziliensis*.....40

Figura 7. β-glucana induz um aumento na produção de IL-1β por células de medula óssea de camundongos selvagens ou transgênicos para IL-32γ humana.....42

Figura 8. Tratamento *in vivo* com uma única dose de β-glucana não altera a capacidade leishmanicida dos macrófagos infectados com *Leishmania braziliensis in vitro*.....44

Figura 9. Tratamento com β-glucana antes da infecção com inóculo maior de *Leishmania braziliensis* também induz mais rápido o desenvolvimento da lesão e

diminui a carga parasitária após 8 semanas de infecção em animais transgênicos para IL-32γ
humana.....46
Figura 10. Tratamento com β-glucana não altera a produção de IL-32γ ou TNF-α nas lesões, nem a produção de IFNγ pelas células do linfonodo drenante da lesão dos camundongos selvagens ou transgênicos para IL-32γ humana, após 8 semanas de infecção com inóculo maior de *Leishmania braziliensis*.....48

Lista de Anexos:

Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética, TCLE.....72
Anexo 2. Comprovante de Submissão do Artigo 75
Anexo 3. Respostas dos Revisores.....78

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

BCG	Bacilo Calmette-Guérin
ConA	Conavalina A
DCs	Células Dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPM	Erro padrão da média
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HCV	Vírus da hepatite C
HIV1	Vírus da imunodeficiência humana 1
IFNγ	Interferon gama
IL	Interleucina
IL-32γTg	Camundongo transgênico para IL-32γ humana
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LD	Leishmaniose disseminada
LM	Leishmaniose mucosa
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
MHC II	Complexo de histocompatibilidade II
MR	Receptor para manose
mRNA	RNA mensageiro
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NF- κB	Fator nuclear *kappa B*
NK	Células Natural Killer

NLRs	Receptores semelhantes a NOD
NO	Óxido nítrico
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PMBCs	Células mononucleares do sangue periférico
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SFB	Soro fetal bovino
T.A	Temperatura ambiente
Th	linfócitos T auxiliares
Treg	linfócitos T reguladores
TLRs	Receptores semelhantes a *Toll*
TNF-α	Fator de necrose tumoral *alfa*
UFG	Universidade Federal de Goiás
WT	Camundongo Selvagem

RESUMO

A β-glucana induz imunidade treinada em monócitos/macrófagos. Estudos sugerem que a IL-32 esteja envolvida em mecanismos importantes para o controle da infecção por *L. braziliensis* e camundongos transgênicos para o gene da IL-32γ humana (IL-32γTg) são um modelo para avaliação das funções desta citocina. Desse modo, este estudo tem por objetivo avaliar o efeito do treinamento com β-glucana no controle da infecção por *Leishmania braziliensis* em camundongos IL-32γTg ou selvagens (WT). Os camundongos foram treinados com β-glucana e infectados com *L. braziliensis* na pata (10^5 ou 10^6). Foram avaliados: o tamanho da lesão, a carga parasitária, as características histopatológicas, as citocinas nos macerados das patas infectadas, nas culturas de células de linfonodo e da medula óssea. Macrófagos foram derivados de precursores da medula óssea de animais WT ou IL-32γTg treinados *in vivo* e infectados com *L. braziliensis*, sendo avaliada a fagocitose e a atividade leishmanicida. Nos camundongos IL-32γTg infectados com 10^5 parasitos, quando comparados aos animais WT, o treinamento com β-glucana levou a um aumento da lesão na 3ª semana de infecção, associado a um aumento do processo inflamatório e a uma maior produção de interferon gama (IFNγ); e menor carga parasitária e processo inflamatório menos intenso, após 8 semanas de infecção. Nas culturas de células da medula óssea dos animais IL-32γTg, 7 dias após a injeção de β-glucana, houve um aumento da produção de IL-1β, após estimulação com antígenos de *Leishmania*. A atividade fagocitária de macrófagos de animais IL-32γTg treinados com β-glucana foi mais elevada do que a dos animais WT treinados, mas a capacidade de controle da infeção foi similar. Os dados com inóculo de 10^5 parasitos sugerem que a IL-32γ intensifica os efeitos do treinamento com β-glucana, indicando estas moléculas como alvos terapêuticos para leishmaniose.

Palavras-chave: Imunidade treinada; Interleucina-32; *Leishmania*.

ABSTRACT

β-glucan induces trained innate immunity in monocytes/macrophages. Studies suggest that IL-32 is involved in mecanisms important for the control of *L. braziliensis* and transgenic mouse for the human IL-32γ gene (IL-32γ) is a model for evaluating the functions of this cytokine. Thus, this study aims to evaluate the effect of β-glucan training on the control of *Leishmania braziliensis* infection in IL-32γTg or wild-type (WT) mice. The mice were trained with β-glucan and infected with *L. braziliensis* in the paw (10^5 or 10^6 parasites). We evaluated: lesion size, parasite load, histopathological characteristics, cytokines in macerated of the infected paws, lymph node and bone marrow cell cultures. Macrophages were derived from bone marrow precursors from WT or IL-32γTg animals after training *in vivo* and infected with *L. braziliensis* to evaluate phagocytosis and leishmanicidal activity. In IL-32γTg mice infected with 10^5 parasites, when compared to WT animals, β-glucan training led to an increase in lesion size on week 3 of infection, associated with an increased inflammatory process and increased production of interferon gamma (IFNγ); and less parasitic load and less intense inflammatory process after 8 weeks of infection. In bone marrow cell cultures of IL-32γTg animals, 7 days after β-glucan injection, there was an increase in IL-1β production after stimulation with *Leishmania* antigens. The phagocytic activity of macrophages from IL-32γTg animals trained with β-glucan was higher than that of trained WT animals, but the ability to control infection was similar. Data with inoculum of 10^5 parasites suggest that IL-32γ enhances the effects of β-glucan training, indicating these molecules as therapeutic targets for leishmaniasis.

Keywords: Trained immunity; Interleukin-32; *Leishmania*.

1. INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Leishmaniose Tegumentar Americana: Aspectos Gerais

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Estes parasitos são transmitidos a animais vertebrados mamíferos durante o repasto sanguíneo de fêmeas do inseto vetor do gênero *Lutzomyia* (flebotomíneos). Durante a hematofagia, a fêmea do vetor regurgita, junto com a saliva, formas infectantes do parasito, denominadas promastigotas metacíclicas, as quais apresentam um flagelo evidente. Desencadeia-se, então, uma reposta imune inata no sítio de infecção e os parasitos são fagocitados por células do sistema fagocitário mononuclear, principalmente por macrófagos, onde se diferenciam em sua forma intracelular, denominada amastigota, que não apresenta flagelo evidente (Sacks & Perkins, 1984; Killick-Kendrick, 1986; Brasil, 2007). Dentro dos macrófagos, o parasito se multiplica por divisão binária, podendo romper estas células e infectar outras, expandindo a infecção. O ciclo continua quando outro flebotomíneo, não infectado, ingere sangue do vertebrado infectado contendo as formas amastigotas do parasito. Dentro do tubo digestório do flebotomíneo, as formas amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas que, em seguida, se diferenciam na forma infectante, a metacíclica, a qual migra para a probóscide do vetor, sendo inoculada em um vertebrado durante outro repasto sanguíneo (Brasil, 2007).

A LTA é, primariamente, uma zoonose, transmitida de animais silvestres, reservatórios do parasito, para o homem ou animais domésticos, os quais são hospedeiros acidentais do parasito. Devido ao acentuado desmatamento nos últimos anos, a transmissão da doença tem-se expandido para regiões urbanas e periurbanas (Gontijo & Carvalho, 2003; Brasil, 2013).

A leishmaniose tegumentar é um problema de saúde pública em 88 países, com registro anual de cerca de 1,5 milhão de casos. Essa doença é amplamente distribuída pelas Américas, se estendendo desde o Sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai (Gontijo & Carvalho, 2003; Brasil, 2013). Dez países,

incluindo o Brasil, são responsáveis por cerca de 75% dos casos de leishmaniose cutânea no mundo (Alvar et al. 2012). Em 2016, no Brasil, foram registrados 12.690 casos autóctones de LTA, sendo a região Norte a que apresentou o maior número de casos (5.075), seguida pela região Nordeste (3.166) e região Centro-oeste (1.974) (Brasil, 2017).

No Brasil, foram identificadas sete espécies de *Leishmania* responsáveis por causar LTA, as quais pertencem a dois subgêneros: *Viannia,* representado por *L. braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi*; *Leishmania*, representado por *L. (L.) amazonensis* (Basano & Camargo, 2004; Brasil, 2013). A espécie *L. braziliensis*, responsável pela maioria dos casos de LTA no país, pode causar um amplo espectro de manifestações clínicas, que abrange desde uma única lesão cutânea até invasões graves das mucosas oral e nasofaríngea (Silveira et al. 2009; Goto & Lindoso, 2012).

As manifestações clínicas da LTA são dependentes da relação parasito-hospedeiro, ou seja, de fatores do hospedeiro que determinam as respostas imunes ao parasito, de fatores do parasito, bem como de fatores relacionadas ao vetor, como os componentes da saliva (Gontijo & Carvalho, 2003; Scott & Novais, 2016). Em seguida, serão descritas, sucintamente, as principais formas clínicas da LTA no Brasil. A leishmaniose cutânea localizada (LCL), a forma clínica mais frequente da doença, caracteriza-se por uma única lesão ou poucas lesões cutâneas ulceradas, de aspecto arredondado e bordas elevadas, que tende à cura espontânea. Raramente, o quadro clínico pode evoluir para leishmaniose cutânea difusa (LCD), a qual não apresenta resposta imune celular específica contra os antígenos de *Leishmania* e se caracteriza por várias lesões nodulares que, geralmente, não ulceram. No Brasil, essa forma clínica é causada exclusivamente por *L. amazonensis*. A leishmaniose cutânea disseminada (LD), caracterizada pela presença de múltiplas lesões ulceradas em várias áreas do corpo, é causada por uma falha da resposta imune contra o parasito. Em 29% dos casos de LD ocorrem lesões em mucosas. A leishmaniose mucosa (LM), uma manifestação clínica em que há uma resposta imune celular exacerbada e uma baixa carga parasitária, acomete as mucosas oral e nasofaríngea. No Brasil, *L. braziliensis* é a principal espécie responsável por essa forma clínica. A LM também pode ocorrer simultaneamente com uma manifestação cutânea localizada, sendo denominada leishmaniose mucocutânea, no entanto, geralmente ocorre meses ou anos após a LCL (Brasil, 2007; Goto & Lindoso, 2010; Goto & Lindoso, 2012).

1.2. Leishmaniose tegumentar: Aspectos Imunológicos

1.2.1. Aspectos gerais das respostas imunes

Após os parasitos serem inoculados no hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas são reconhecidas pelas células imunes inatas, residentes no local da infecção, tais como macrófagos e células dendríticas (DCs), via receptores reconhecedores de padrões (PRRs), como os receptores semelhantes a *Toll* (TLRs) e os receptores semelhantes a NOD (NLRs) (Gurung & Kanneganti, 2015).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que as formas amastigotas de *L. braziliensis* induzem a produção de fator de necrose tumoral (TNF-α) e interleucina (IL)-10 em células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) tratadas com interferon gama (IFNγ) *in vitro* e, que essa produção é dependente de TLR4, uma vez que a neutralização desse receptor inibiu a produção dessas citocinas. Também foi demonstrado que as formas amastigotas de *L. braziliensis* diminuem a expressão de TLR4 na membrana celular de monócitos/macrófagos e os nossos dados sugerem que essa diminuição seja devido à sua internalização após infecção, ou seja, amastigotas interagem com TLR4 e este é internalizado juntamente com o parasito. Portanto, o TLR4 é um importante receptor para reconhecimento de *L. braziliensis* e sua ativação induz a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias importantes durante a infecção (Galdino Jr et al. 2016). Além do TLR4, os TLRs 1, 2, 6 e 9 estão envolvidos na resposta à infecção por *Leishmania* (Srivastava et al. 2013; Pandey et al. 2014). Srivastava et al. (2013) mostraram que a interação entre TLR2 e o lipofosfoglicano (LPG) de *L. major* resulta em suscetibilidade à infecção, uma vez que leva à diminuição da expressão de TLR9, o qual está envolvido em uma resposta imune protetora. Posteriormente, Pandey et al. (2014) mostraram que a sinalização através do heterodímero TLR2/6 resultou em diminuição do número de parasitos em macrófagos infectados, acompanhada de um aumento da expressão de TLR9, enquanto que a sinalização via heterodímero TLR2/1 levou ao aumento do número de parasitos em macrófagos e diminuição da expressão de TLR9.

Também foi avaliado por nosso grupo se variantes genéticas em NOD1 ou NOD2 influenciam a produção de citocinas por PBMCs humanas expostas a *Leishmania*. Demonstramos que polimorfismos no gene Nod2 diminuíram a produção de citocinas por linfócitos e monócitos após a estimulação com *L. amazonensis* ou *L.*

braziliensis, em comparação com os indivíduos que possuem um receptor NOD2 funcional. Além disso, mostramos que o reconhecimento de *Leishmania* por NOD2 é importante para o controle intracelular do parasito (dos Santos et al. 2017b).

A forma promastigota também pode ser opsonizada por anticorpos naturais e por proteínas do sistema complemento que ativam uma cascata proteolítica que causa a morte direta do parasito (Dominguez et al. 2003). Alguns estudos mostraram que o sistema complemento é importante para a eliminação do parasito no início da infecção, uma vez que animais deficientes para proteínas do complemento foram mais suscetíveis à infecção por *L. amazonensis* (Laurenti et al. 2004). A opsonização do parasito pelas proteínas do complemento, entretanto, pode servir como um mecanismo de evasão, facilitando a entrada de *Leishmania* nos fagócitos (Dominguez et al. 2003). Assim, os receptores para o complemento (CR1, CR3) reconhecem o parasito opsonizado e induzem sua fagocitose. O CR3, por ser uma integrina, também é usado para fagocitose direta de *Leishmania*, sem a necessidade de opsonização por complemento (Blackwell et al, 1985; Russel & Wright, 1988; Da Silva et al. 1989). Ueno et al. (2009) mostraram que o CR3, em macrófagos humanos, é importante para a fagocitose tanto de formas promastigotas em fase estacionária do crescimento como de promastigotas metacíclicas purificadas de *L. infantum*. E, em contraste, o receptor de manose (MR) foi importante apenas para fagocitose de formas promastigotas em fase estacionária. Além disso, mostraram que a forma metacíclica gerou formas amastigotas com replicação intracelular mais eficiente do que as derivadas de formas da fase estacionária do crescimento. Os dados, então, sugerem que formas promastigotas metacíclicas são internalizadas por uma via (CR3) que aumenta sua sobrevivência.

Além desses receptores, o reconhecimento de *Leishmania* pode ser mediado pelo receptor dectina-1, por receptores para a porção Fc de imunoglobulina G e pelos receptores de fibronectina (Ueno &Wilson, 2012). Lefèvre et al. (2013) demonstraram que dectina-1 e o MR reconhecem carboidratos na membrana do parasito e estão acoplados às vias de sinalização Syk-p47phox e ácido araquidônico (AA)-NADPH oxidase, respectivamente, necessárias para a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), contribuindo, assim, para a resposta de macrófagos a *L. infantum*. Também foi demonstrado que durante a fagocitose de *L. amazonensis* ocorre ativação de dectina-1 e produção de ROS, via sinalização Syk quinase, o que contribui para a ativação do inflamassoma NLRP3 (Lima-Junior et al. 2017).

No início da infecção, as células residentes, que são ativadas pelo parasito, secretam quimiocinas que atraem células inflamatórias para o local (Stebut, 2007). Os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas para o sítio da infecção e fagocitam os parasitos. No interior do fagolisossomo, *Leishmania* é exposta à enzimas, peptídeos antimicrobianos e ROS, efetores antimicrobianos que causam a morte do parasito (Ritter et al. 2009).

Em alguns modelos experimentais foi demonstrado que os neutrófilos são células importantes para o controle da carga parasitária. Porém, as informações sobre o envolvimento dessa célula na leishmaniose são controversas. Alguns estudos têm mostrado que o neutrófilo pode atuar como "Cavalo de Tróia", uma vez que corpos apoptóticos de neutrófilos infectados podem facilitar a entrada silenciosa de *Leishmania* nos macrófagos. Ou seja, ao remover esses resíduos celulares, os macrófagos ingerem parasitos viáveis, sem serem devidamente ativados, o que facilita a sobrevivência dos parasitos no ambiente intracelular (Laskay et al. 2003). Afonso et al. (2008) demonstraram que a interação de macrófagos com corpos apoptóticos, mas não com corpos necróticos de neutrófilos, aumenta a carga parasitária em macrófagos humanos infectados com *L. amazonensis*.

Ribeiro-Gomes et al. (2004) mostraram que em camundongos C57BL/6, os neutrófilos são importantes para eliminação de *L. major*, enquanto que em camundongos BALB/c, os neutrófilos favorecem o crescimento do parasito. Esse estudo também mostrou que a atividade leishmanicida dos macrófagos é dependente de TNF-α e elastase neutrofílica e que a diferença entre as duas linhagens de camundongos se deve a uma maior quantidade de elastase presente nos neutrófilos dos animais C57BL/6. Por outro lado, Novais et al. (2009) mostraram que em modelo de infecção em orelha de camundongos BALB/c com *L. braziliensis*, os neutrófilos desempenham um papel importante na eliminação do parasito. Neste estudo foi mostrado que a depleção *in vivo* de neutrófilos resultou em aumento significativo na carga parasitária e que camundongos coinoculados com parasitos e neutrófilos apresentaram menor carga parasitária no local da infecção e nos linfonodos drenantes. *In vitro*, observou-se que os neutrófilos vivos reduziram significativamente a carga parasitária em macrófagos murinos infectados por *L. braziliensis*. A eliminação de *L. braziliensis* foi dependente da interação entre neutrófilos e macrófagos e foi associada à produção de TNF e superóxido. Essa cooperação entre macrófagos e neutrófilos também foi observado em células humanas infectadas com *L. braziliensis* (Novais et al. 2009).

Além da morte mediada por mecanismos intracelulares após a fagocitose, os neutrófilos possuem um mecanismo extracelular para matar os parasitos denominado armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). As NETs consistem em estruturas extracelulares compostas por ácido desoxirribonucleico (DNA), histonas e enzimas citoplasmáticas, como a mieloperoxidase, que são liberadas para o meio extracelular (Nazaré-Morgado et al. 2015). Guimarães et al. (2009) mostraram que o LPG da superfície de *L. amazonensis* é capaz de induzir a liberação de NETs pelos neutrófilos. E a interrupção de NETs por tratamento com DNase, durante a interação do neutrófilo com a *Leishmania*, resultou em um aumento da sobrevivência dos parasitos, indicando que as NETs apresentam um papel leishmanicida.

Os neutrófilos não sustentam a infecção por *Leishmania*, assim, é nos macrófagos que o parasito irá se replicar e expandir a infecção. O macrófago é uma célula muito importante na leishmaniose, pois é a principal célula hospedeira do parasito e desempenha um papel efetor direto na sua eliminação. Para a eliminação eficiente de *Leishmania* é necessário que os macrófagos infectados sejam ativados adequadamente, o que ocorre via o reconhecimento do parasito pelos PRRs e por meio de citocinas, principalmente IFNγ, produzido durante a resposta imune inata, especialmente, por células Natural Killer (NK) (Bogdan et al. 2000a; Prajeeth et al. 2011). Esta ativação dos macrófagos aumenta a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), que a partir de L-arginina produz óxido nítrico (NO), um gás que possui atividade leishmanicida (Bogdan et al. 2000a; Mukbel et al. 2007). Além das espécies reativas de nitrogênio, tais como NO e peroxinitrito, os macrófagos podem eliminar os parasitos por meio da produção de ROS (Bogdan et al. 2000b) e peptídeos antimicrobianos (Abdossamadi et al. 2016).

A eliminação eficiente de *Leishmania* pelos macrófagos depende de uma resposta imune adaptativa apropriada, que é dependente da adequada ativação das DCs. As DCs presentes no sítio de infecção reconhecem e fagocitam o parasito. Ocorre, então, a maturação dessas células e o processamento de antígenos, enquanto elas migram para o linfonodo drenante da lesão, onde irão realizar a apresentação de antígenos para os linfócitos T virgens, modulando o perfil da resposta imune adquirida. A produção de IL-12 pelas DCs é crítica para a diferenciação de células T auxiliares (Th) em células Th1, importante para o controle do parasito, uma vez que são fontes de IFNγ (Woelbing et al. 2006; Liu & Uzonna, 2012). Se no momento da apresentação de

antígenos, o microambiente não possuir IFNγ e IL-12 e estiverem presentes outras citocinas, como a IL-4, os linfócitos Th se diferenciam em células Th2, perfil que favorece a sobrevivência do parasito (Mosmann & Coffman, 1989; Lazarski et al., 2013). Portanto, as DCs fazem uma conexão entre a imunidade inata e a adquirida e modula o perfil de resposta, o qual irá determinar o curso da infecção.

Na presença de citocinas de perfil Th1, como IFNγ, os macrófagos são ativados adequadamente e isso é fundamental para a eliminação do parasito, como descrito acima. Entretanto, na presença de citocinas anti-inflamatórias ou reguladoras, como a IL-4 e a IL-10, os macrófagos são ativados alternativamente ou regulados de maneira que ocorre um prejuízo na produção de moléculas microbicidas e facilitação do crescimento do parasito (Iniesta et al. 2002; Mukbel et al. 2007; Mathur et al. 2004). Citocinas de perfil Th2 induzem a expressão de arginase, uma enzima que metaboliza a L-arginina para gerar a produção de L-ornitina e ureia. Os metabólitos da L-ornitina, poliaminas e prolina, estão envolvidos com o reparo tecidual. Consequentemente, há uma diminuição da produção de NO, favorecendo a sobrevivência e crescimento do parasito. Além disto, as poliaminas são utilizadas pelos parasitos para o seu crescimento dentro dos macrófagos (Iniesta et al. 2002, Colotti & Ilari, 2011). Portanto, dependendo do perfil da resposta dos linfócitos Th, a regulação das atividades dos macrófagos pode favorecer o crescimento do parasito ou levar à sua eliminação.

A maioria das informações disponíveis sobre a resposta imune à infecção por *Leishmania* tem sido obtida em modelos experimentais murinos. A manifestação clínica da leishmaniose tegumentar, no modelo experimental, depende da linhagem do camundongo e da espécie do parasito. Para a leishmaniose tegumentar, o modelo experimental que tem sido mais utilizado é aquele com a infecção de camundongos com *L. major*. Este modelo permitiu elucidar vários mecanismos da resposta imune que estão relacionados à resistência ou suscetibilidade à infecção (Oliveira & Barral-Neto, 2005). Enquanto algumas linhagens de camundongos são resistentes (linhagem C57BL/6), outras são extremamente suscetíveis à infecção (linhagem BALB/c). A resistência ou suscetibilidade à infecção está relacionada ao perfil de citocinas produzidas, inicialmente, no sítio de infecção. Em linhagens de camundongos suscetíveis a *L. major* observa-se elevada produção de IL-4, IL-13 e IL-10, caracterizando um perfil de resposta de linfócitos T do tipo Th2 e de células T reguladoras (Treg), o que é favorável à sobrevivência do parasito. Já em camundongos resistentes observa-se uma resposta de

linfócitos T com perfil Th1. Nesta resposta, há elevada produção de IFNγ, que induz a produção de NO e ROS pelos macrófagos, favorecendo a eliminação do parasito (Mosmann & Coffman, 1989; Bogdan et al. 2000b).

Como outros patógenos, *Leishmania* possui vários mecanismos para evadir do sistema imune. Componentes do glicocálix, como o LPG, podem desempenhar um papel protetor dos parasitos, dificultando, por exemplo, a lise pela ação do sistema complemento. Já foi demonstrada a capacidade do parasito de inibir a fusão do fagossoma com o lisossoma, além da neutralização ou inibição da produção de moléculas microbicidas. *Leishmania* também é capaz de modular a resposta imune inibindo a expressão de moléculas classe II do complexo de histocompatibilidade principal (MHC-II) e moléculas co-estimuladoras nas DCs, bem como interferir no processamento de antígenos. O parasito também pode interferir na expressão e vias de sinalização dos TLRs, subvertendo a resposta pró-inflamatória e favorecendo o crescimento dos parasitos (Srivastava et al. 2013; revisto em Cecílio et al. 2014).

1.2.2. O modelo de infecção com *L. braziliensis* em camundongos

Os estudos com *L. braziliensis* em murinos são escassos e utilizam, principalmente, as linhagens BALB/c e C57BL/6. Em geral, mas dependendo do isolado ou cepa do parasito, os animais C57BL/6 são mais resistentes (de Souza-Neto et al. 2004; Maoli et al.2004) à infecção do que os BALB/c (Childs et al. 1984; Dekrey et al. 1998; Teixeira et al. 2005). Childs et al. (1984) mostraram que a maioria das linhagens de camundongos são resistentes à infecção por *L. braziliensis*, sendo que os camundongos BALB/c são os mais suscetíveis. As linhagens de camundongos AKR/J e CBA/J apresentaram apenas um ligeiro e transitório inchaço do focinho, quando se tentou desenvolver um modelo de LM após infecção com *L. braziliensis*. As linhagens SWR/J, C57L/J, A/J, A/HeJ e DBA/1J desenvolveram inchaços iniciais ou nódulos no focinho que se resolveram; enquanto as linhagens C3H/HeJ, C57BL/6J, CBA/J e CBA/CaJ não mostraram evidências de estabelecimento da infecção. Em contraste, os camundongos BALB/cl apresentaram lesões dérmicas progressivas e visceralização após infecção intradérmica no focinho com *L. braziliensis*.

Pereira et al. (2009) avaliaram as características histopatológicas do baço, fígado e linfonodo poplíteo de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com diferentes isolados de *L. braziliensis*. Os animais foram infectados na pata, o curso da lesão foi

avaliado por 10 semanas e após esse período os animais foram eutanasiados e os tecidos de interesse foram coletados para serem analisados por imunohistoquímica. Camundongos infectados com a cepa I apresentaram infiltrados inflamatórios constituídos principalmente por células mononucleares em todos os tecidos analisados e um grande número de megacariócitos, em comparação com outros isolados. A cepa II levou a um aumento da pata infectada não observado em outros isolados. Além disso, foram observados infiltrados mononucleares no fígado e hemosiderina no baço. Já os camundongos infectados com a cepa III, mostraram apenas um aumento no número de megacariócitos no baço. Esses resultados mostraram que diferentes isolados podem causar cursos de lesão e perfis histopatológicos distintos nos camundongos C57BL/6 e BALB/c (Pereira et al. 2009).

Maoli et al. (2004) mostraram que a pata de camundongos C57BL/6 infectada com *L. braziliensis* desenvolveu uma lesão, que apresentou maior espessura na terceira semana de infecção, mas que regrediu completamente após seis semanas. Além disso, mostraram que, ao contrário do que é observado na infecção por *L. amazonensis*, o controle da infecção causada por *L. braziliensis* nessa linhagem de camundongos está relacionada à uma resposta imune caracterizada por níveis aumentados de TNF-α e IFNγ. Rocha et al. (2007) mostraram que IL-12, STAT4, TNF e iNOS, mas não NADPH oxidase, são importantes para o controle de *L. braziliensis in vitro* e *in vivo.* Nesse trabalho, camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados na pata com a cepa MHOM/BR/94/H-3227 de *L. braziliensis* desenvolveram pequenas lesões cutâneas que cicatrizaram espontaneamente em algumas semanas. Em contraste, camundongos BALB/c e C57BL/6 deficientes em IL-12 e BALB/c deficientes em STAT4 infectados com *L. braziliensis* apresentaram lesões cutâneas exacerbadas, bem como uma maior carga parasitária na pata e no linfonodo drenante, visceralização e morte aproximadamente dois meses após infecção. Estes dados reforçam a importância da IL-12 para a resistência à infecção, uma vez que o STAT4 é um fator de transcrição ativado por esta citocina (Kaplan et al. 1996).

Em camundongos C57BL/6 deficientes em TNF, a infecção com *L. braziliensis* causou lesões cutâneas erosivas e ulcerações hemorrágicas. E em camundongos C57BL/6 deficientes em iNOS foram observadas lesões cutâneas ulcerativas e maior carga parasitária na pata e no linfonodo drenante, em comparação com os animais selvagens, mas não ocorreu visceralização e a infecção não causou a morte dos animais. O NO é, portanto, uma molécula microbicida importante para o controle da infecção por

L. braziliensis em murinos. Entretanto, Giudice et al. (2007) demonstraram que alguns isolados dessa espécie são resistentes à ação do NO. Já os camundongos C57BL/6 deficientes em NADPH oxidase apresentaram lesões e carga parasitária semelhantes aos animais C57BL/6 selvagens. Além disso, foi demonstrado que, após estimulação *in vitro*, células do linfonodo drenante de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* produziram quantidade significantemente menor de IL-4 e maior quantidade de IFNγ, em comparação aos camundongos infectados com *L. major*, mostrando que o controle de *L. braziliensis* por essa linhagem de camundongo é dependente dos níveis dessas citocinas (Rocha et al. 2007).

Souza-Neto et al. (2004) mostraram que camundongos C57BL/6 deficientes em IFNγ, infectados na pata com *L. braziliensis* (cepa MHOM/BR/75/M2903) desenvolveram lesões graves não controladas, havendo a necessidade de serem sacrificados com quatro semanas de infecção. Já os animais C57BL/6 deficientes em IL-12, em contraste com os resultados obtidos por Rocha et al. (2007), desenvolveram lesões crônicas que permaneceram sob controle até 12 semanas de infecção e apresentaram menor carga parasitária que os animais deficientes para IFNγ. As células do linfonodo dos animais deficientes em IL-12 produziram baixos níveis de IFNγ, provavelmente responsável pelo controle parcial da infecção.

Nosso grupo avaliou o perfil de infecção de camundongos C57BL/6 selvagens e C57BL/6 deficientes em IFNγ infectados na pata com dois isolados clínicos caracterizados (Zauli-Nascimento et al. 2010) como *L. braziliensis*, IMG3 (MHOM/BR/2003/IMG) e RPL5 (MHOM/BR//2005/RPL). Como observado por Souza-Neto et al. (2004), enquanto os camundongos selvagens apresentaram uma pequena lesão que cura espontaneamente até 12 semanas de infecção, os animais deficientes em IFNγ desenvolveram lesões graves não controladas, que ulceram após quatro semanas de infecção (Oliveira et al. 2010). Esses resultados confirmam que o controle de *L. braziliensis* é dependente de IFNγ. O uso de animais deficientes em IFNγ tem permitido o isolamento de parasitos *Leishmania* spp. de pacientes com LTA tanto para diagnóstico quanto para a identificação da espécie dos parasitos (Oliveira et al. 2010; Dorta et al. 2012).

Em conjunto, os dados desses trabalhos mostram que muitas características da resposta imune observadas nos modelos murinos com *L. major* não são descritas nos modelos de infecção com outras espécies de *Leishmania*, uma vez que há diversidade de

respostas dos hospedeiros às diferentes espécies de *Leishmania* e até mesmo à diferentes cepas ou isolados da mesma espécie (Childs et al. 1984; Teixeira et al. 2005; Giudice et al. 2007; Rocha et al. 2007; Pereira et al. 2009). Isso reforça a necessidade de estudar diferentes modelos, principalmente a *L. braziliensis*, espécie responsável pela maioria dos casos de LTA no Brasil.

1.3. Interleucina - 32 (IL-32) - Propriedades gerais e sua participação nas leishmanioses

A IL-32 é uma proteína que foi identificada em 1992 por Dahl et al., sendo nomeada como um transcrito de célula NK (NK4), mas cuja função permaneceu desconhecida até 2005. Naquele ano, foi renomeada como IL-32 e descrita como uma citocina pró-inflamatória, produzida não só por células NK e linfócitos T, mas também por outras células, como as células epiteliais, após estímulo com IL-12, IL-18 e IFNγ e, que apesar de não possuir homologia de sequência com as outras citocinas já descritas, possuía capacidade de induzir citocinas pró-inflamatórias, como o TNF-α (Kim et al. 2005), e sinalizar pelas vias clássicas de citocinas pró-inflamatórias (Ribeiro-Dias et al. 2017).

A IL-32 é uma citocina predominantemente intracelular, expressa por uma variedade de células imunes e não imunes de mamíferos, tais como fibroblastos, células epiteliais, células NK, linfócitos T, monócitos/macrófagos, células dendríticas e células endoteliais (Heinhuis et al. 2012; Kang et al., 2014). Vários estímulos podem levar à expressão de IL-32, tais como citocinas (por exemplo: IL-18, IL-12, TNF-α, IL-1β, IFNγ), mitógenos e produtos microbianos, como lipopolissacarídeo (LPS) (Kim et al. 2005; Shoda et al. 2006).

Foram identificadas nove isoformas da IL-32, até o momento, geradas por processamento alternativo do RNA mensageiro (mRNA) da IL-32, sendo a IL-32γ a isoforma biologicamente mais ativa (Choi et al. 2009; Kang et al. 2014). A interação entre as diferentes isoformas pode proporcionar maior diversidade funcional a esta citocina nos diferentes tipos de células (Kang et al., 2014). Kang et al. (2013), por exemplo, mostraram que a interação da IL-32δ com a IL-32β inibe a produção de IL-10, a qual é regulada positivamente por IL-32β.

A IL-32 induz a expressão de várias citocinas, principalmente pró-inflamatórias, tais como TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-8. Em macrófagos humanos e murinos, os efeitos da

IL-32α recombinante humana foi mediado por ativação de NF-κB e fosforilação de p38 (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK) (Kim et al. 2005; Shoda et al. 2006). Hong et al. (2010) mostraram que a supressão de IL-32 em monócitos prejudica a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF-α e IL-1β. Além da participação na produção de mediadores da inflamação, a IL-32 pode induzir apoptose em células T (Goda et al. 2006) e contribui para a diferenciação de monócitos em macrófagos (Netea et al. 2008) ou em células dendríticas (Shenck et al. 2012). Jung et al. (2011) mostraram que a IL-32γ também é importante no processo de maturação e ativação de DCs, modulando a diferenciação de linfócitos Th virgens para um perfil Th1 ou Th17, por meio do aumento da produção de IL-12 e IL-6 pelas DCs, respectivamente.

Devido ao perfil pró-inflamatório da IL-32, estudos têm buscado elucidar o possível envolvimento dessa citocina na imunopatogenia de doenças inflamatórias crônicas, tais como artrite reumatoide (AR), colite e doença de Crohn. Joosten et al. (2006) demonstraram que a IL-32 é altamente expressa em tecido sinovial de pacientes com AR e que a expressão desta citocina está intimamente correlacionada com a produção de TNF-α, sendo responsável pela exarcebação da inflamação nas articulações e, portanto, contribui para a patogênese da doença. A estreita relação entre TNF-α e IL-32 também foi demostrada por Heinhuis et al. (2010), que ao tratar pacientes com AR com anticorpos anti-TNF-α observou diminuição da expressão de IL-32 no tecido sinovial.

Embora se saiba que a IL-32 seja capaz de exercer atividades biológicas sobre linhagens celulares murinas e humanas, até o momento, não foi identificado nenhum receptor para essa citocina em humanos ou em camundongos e, apesar dos roedores não possuírem o gene da IL-32, as células murinas respondem a IL-32 recombinante humana (Kim et al. 2005; Shoda et al. 2006).

Choi et al. (2010) desenvolveram um camundongo transgênico para IL-32γ humana (IL-32γTg), usando camundongos C57BL/6, e investigaram o papel da IL-32 em um modelo de inflamação intestinal (colite). Nesse estudo, os animais IL-32γTg apresentaram uma inflamação aguda exacerbada inicial, mas após seis dias houve menor inflamação no cólon, associada a níveis menores de TNF-α e IL-6 e níveis elevados de IL-10, bem como uma maior taxa de sobrevivência, quando comparados aos animais selvagens (WT). Desse modo, ao contrário do que foi visto no modelo de AR, a IL-32 parece ter um papel protetor durante a inflamação no tecido intestinal e isso

provavelmente se deve ao processamento alternativo do mRNA da IL-32, o qual pode gerar uma isoforma com propriedades anti-inflamatórias, contribuindo para aumentar os níveis de IL-10 e diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias e, consequentemente, redução da inflamação.

O papel protetor da IL-32 tem sido investigado em doenças infecciosas causadas por bactérias, especialmente por micobactérias. Foi demonstrado por Netea et al. (2006) que *Mycobacterium tuberculosis* and *M. Bovis* induzem a expressão de IL-32 em monócitos e macrófagos humanos, a qual é mediada pela produção de INFγ dependente de caspase-1 e IL-18. Bai et al. (2010) mostraram que a IL-32 contribui para o controle de *M. tuberculosis* em macrófagos humanos em experimentos *in vitro*. Neste trabalho, foi demonstrado que a inibição de IL-32 endógena diminuiu significantemente a produção de IL-1β, TNF-α e IL-8 e aumentou o número de bactérias nos macrófagos infectados. Também foi observado que macrófagos infectados com *M. tuberculosis*, na presença de IL-32, apresentaram maior nível de apoptose em comparação aos macrófagos infectados na ausência de IL-32, sugerindo que a apoptose de macrófagos infectados é um mecanismo que contribui para a defesa contra *M. tuberculosis*. Em seguida, Montoya et al. (2014) demostraram que a IL-32 está associada à via antimicrobiana da vitamina D, sendo capaz de induzir a produção de peptídeos antimicrobianos, contribuindo, assim, para atividade anti-*M. tuberculosis* dos macrófagos. Além disso, ao analisar os genes expressos em pacientes com tuberculose latente ou ativa, esse estudo identificou a IL-32 como um dos genes marcadores de proteção contra tuberculose, uma vez que a expressão dessa citocina é maior em pacientes com tuberculose latente.

Para avaliar o papel *in vivo* da IL-32 na infecção por *M. tuberculosis*, Bai et al. (2015) desenvolveram camundongos transgênicos para IL-32γ humana, com expressão de IL-32γ sob o controle do promotor da proteína surfactante C, garantindo, assim, a expressão de IL-32 restritamente no pulmão. Estes animais foram infectados com uma cepa hipervirulenta de *M. tuberculosis* e apresentaram maior taxa de sobrevivência do que os animais selvagens, bem como uma menor carga bacteriana nos pulmões e no baço, acompanhada por uma maior quantidade de células imunes inatas e adaptativas no pulmão e nos linfonodos mediastinais. Além disso, os macrófagos alveolares dos camundongos transgênicos infectados *ex vivo* com *M. tuberculosis* foram mais

eficientes para reduzir a carga bacteriana. Os autores concluíram, então, que a IL-32γ possui um papel protetor contra a infecção por *M. tuberculosis* (Bai et al. 2015).

Schenk et al. (2012) mostraram que *M. leprae* também induz IL-32 e que há maior expressão dessa citocina na forma clínica mais branda da doença (tuberculóide), caracterizada por uma resposta imune de perfil Th1, em comparação com a forma clínica progressiva (lepromatosa), com um perfil de resposta imune Th2. Além disso, mostraram que a ativação de monócitos por *M. leprae* pela via do receptor NOD2, induziu a produção de IL-32, o que contribuiu para a diferenciação de monócitos em DCs, as quais aumentaram a ativação de células T citotóxicas, contribuindo para a defesa contra *M. leprae*.

Alguns estudos também demonstraram o envolvimento da IL-32 em infecções virais. Nold et al. (2008) demostraram que a diminuição da expressão do gene da IL-32 em células da linhagem mielomonocítica THP-1 e macrófagos U1 humanos infectados com o vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1) reduziu os níveis de citocinas pró-inflamatórias e aumentou a replicação viral. Os resultados indicaram, portanto, que a IL-32 é importante no controle da infecção pelo HIV. No entanto, a participação da IL-32 na imunopatogenia da infecção pelo HIV também tem sido demonstrada, podendo exacerbar a doença (Smith et al. 2011). Moschen et al. (2011) investigaram o papel da IL-32 na infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) em pacientes com infecção crônica e mostraram que há uma associação entre a expressão de IL-32 em hepatócitos e esteatose, inflamação e fibrose hepática, além dos níveis séricos de alanina e aminotransferases. Entretanto, a exacerbação ou a diminuição da expressão da IL-32 em células da linhagem hepática Hun 7.5 infectadas com HCV não causou alterações na replicação viral. Desta forma, a IL-32 pode contribuir para a inibição da replicação viral (Nold et al. 2008), mas também para o aumento da imunopatogenicidade em doenças virais (Smith et al. 2011; Moschen et al. 2011).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que a IL-32γ é expressa em lesões cutâneas e mucosas de pacientes com LTA causadas por *L.* (*Viannia*) sp. e que formas amastigotas de *L. braziliensis* induzem a expressão de IL-32γ em células mononucleares de indivíduos sadios. Nesse estudo, também foi demonstrada uma correlação positiva entre a expressão de IL-32 e de TNF em lesões mucosas, o que sugere que estas citocinas podem contribuir para a manutenção da inflamação crônica na LM (Galdino Jr et al. 2014). Posteriormente, em macrófagos THP-1 humanos, demonstramos que *L. braziliensis* induz, principalmente, IL-32γ e que esta citocina é importante para o

controle da infecção. A IL-32 regulou, positivamente, a produção de moléculas microbicidas, incluindo NO e peptídeos antimicrobianos. Ao contrário de *L. amazonensis*, além de TNF-α, *L. braziliensis* induziu IL-1β e níveis mais baixos de IL-1Ra e IL-10, sugerindo um perfil mais inflamatório quando esta espécie de *Leishmania* está infectando os macrófagos (dos Santos et al. 2017a).

Em um modelo murino, demonstramos que a infecção com *L. braziliensis*, intradermicamente na orelha, é mais bem controlada em camundongos C57BL/6 IL-32γTg do que nos animais selvagens (Gomes et al. 2017). Os resultados foram associados a uma maior produção de citocinas inflamatórias nos animais IL-32γTg. Esses resultados sugerem que a IL-32 está envolvida em mecanismos importantes para o controle da infecção por *L. braziliensis* e apontam esta citocina como alvo de investigação na LTA. Além de contribuir para o controle da infecção por *L. braziliensis*, a IL-32γ contribui para a contenção dos parasitos *L. amazonensis* no local da infecção, diminuindo a visceralização durante a infecção (Gomes et al. 2017). Recentemente, também usando os animais transgênicos, o nosso grupo demonstrou que a IL-32γ é importante para o controle da leishmaniose visceral causada por *L. infantum*. Neste trabalho, mostramos que a infecção de camundongos IL-32γTg com formas promastigotas de *L. infantum* aumentou a expressão de IL-32γ no baço e no fígado e que esses animais apresentaram menor parasitismo em ambos os órgãos, bem como um maior número de células Th1 e Th17 no baço, em comparação com os animais selvagens. Além disso, células esplênicas de camundongos IL-32γTg reestimuladas *ex vivo* com antígeno de *L. infantum* aumentaram a produção de NO, IFNγ, IL-17A e TNF-α. Desse modo, os dados indicam que a IL-32γ possui um papel na indução de uma reposta imune Th1/Th17, a qual contribui para o controle da infecção por *L. infantum* (Gomes et al. 2018). O modelo de camundongo IL-32γTg é uma ferramenta importante para elucidar os mecanismos de ação da IL-32 nas leishmanioses, uma vez que os murinos humanizados com o gene da IL-32 fornecem um modelo mais próximo do que acontece em seres humanos.

1.4. Imunidade treinada

Até pouco tempo, a capacidade de gerar memória imunológica não era uma característica da imunidade inata, mas sim da adquirida. Estudos recentes, no entanto,

têm mostrado que plantas e invertebrados, os quais não possuem imunidade adquirida, respondem melhor às reinfecções e, que em mamíferos, após uma infecção ou vacinação, células imunes inatas, tais como monócitos, macrófagos e células NK, exibem alterações de longo prazo em seus programas funcionais, que podem conferir proteção contra o mesmo patógeno ou proteção cruzada contra patógenos não relacionados (Netea et al. 2011). Garly et al. (2003) mostraram que a vacinação com o Bacilo Calmette-Guérin (BCG) em crianças na África Ocidental diminuiu a morbidade devido outras infecções, resultando em uma menor mortalidade, o que indica um papel protetor inespecífico da vacina BCG contra outras infecções. Vaugelad et al. (2004) mostraram que, assim como a vacina BCG, as vacinas contra tétano, difteria e coqueluche também estão associadas a uma melhor sobrevivência de crianças até os dois anos de idade. Desta forma, com base nestas informações, foi proposto que as células imunes inatas também apresentam uma capacidade de desenvolver memória imunológica e este tipo de resposta da imunidade inata foi denominado imunidade treinada, para diferenciar da memória, altamente específica, das células da imunidade adquirida (Netea et al. 2011).

Vários trabalhos têm buscado compreender os mecanismos responsáveis pela imunidade treinada. Foster et al. (2007) mostraram que modificações da cromatina, desencadeadas pelo reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) via TLR, leva a uma inibição da expressão de determinados genes e a um aumento da expressão de outros, principalmente dos genes de efetores antimicrobianos. Em seguida, Quintin et al. (2012) mostraram que uma infecção não letal com *Candida albicans* induz a proteção contra infecção letal secundária, via um mecanismo dependente de monócito e independente de linfócitos T/B, uma vez que a proteção à reinfecção foi observada em animais deficientes em células da imunidade adquirida, mas não em animais deficientes em monócitos. Kleinnijenhuis et al. (2012) mostraram que a vacinação com o BCG em voluntários sadios ou tratamento de monócitos *in vitro* com BCG resultou em um aumento da produção de IFNγ, TNF e IL-1β em resposta a patógenos bacterianos e fúngicos não relacionados. E esse estudo mostrou que os efeitos do treinamento foram induzidos via o receptor NOD2 e mediados pelo aumento da trimetilação da histona 3 (H3), mostrando, então, que o BCG induz imunidade treinada, fornecendo proteção não específica a outras infecções, via reprogramação epigenética de células imunes inatas. Posteriormente, Cheng et al. (2014) demonstraram que as mudanças epigenéticas envolvidas na imunidade treinada também estão relacionadas a

mudanças no metabolismo de glicose. Essa relação é explicada pelo fato de que o estímulo induz mudanças no metabolismo celular e alguns metabólitos funcionam como cofatores para enzimas epigenéticas, que por sua vez, induzem modificações na cromatina e no DNA, modulando, assim, a transcrição gênica e o programa funcional da célula (Cheng et al. 2014; Netea et al. 2016).

Os efeitos, em longo prazo, da imunidade treinada em monócitos circulantes, ainda são alvo de investigação, uma vez que essas células têm uma vida útil relativamente curta na circulação. Mitroulis et al. (2018) hipotetizaram que os efeitos induzidos pela imunidade treinada envolvem alterações nos progenitores do sistema hematopoético. De fato, estes autores demonstraram que a imunidade treinada não envolve apenas mudanças funcionais em células mieloides maduras na periferia, mas também está relacionada à modulação de progenitores mieloides da medula óssea. E essas informações podem nos auxiliar a compreender melhor os efeitos em longo prazo da imunidade treinada.

Nosso grupo mostrou que houve melhora clínica de um paciente com leishmaniose cutânea difusa após tratamento com vacina composta por antígenos de *Leishmania* e BCG. A melhoria na cicatrização das lesões foi acompanhada pelo aumento do número de células NK e de monócitos pró-inflamatório. Entretanto, apesar de o paciente ter obtido cura clínica aparente das lesões, não foi detectada uma resposta imune celular específica. Esses resultados mostram a relevância da ativação do sistema imune inato para o controle da *Leishmania,* principalmente quando a resposta imune adquirida não é ativada efetivamente (Pereira et al. 2009).

Muitos estudos ainda são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos na indução da imunidade treinada e os seus efeitos. E a melhor compreensão desses mecanismos pode auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias profiláticas ou terapêuticas, como a elaboração de vacinas contendo adjuvantes que alvem o desenvolvimento da memória imunológica clássica e da imunidade treinada (Topfer et al. 2015).

1.5. β-glucana: seus efeitos no sistema imune e treinamento inato

A β-glucana é um polissacarídeo presente em alimentos como aveia e cevada e é um componente da parede celular de fungos. Muitas β-glucanas são consideradas

carboidratos não digeríveis e são classificadas como PAMPs, que podem ser reconhecidos por PRRs presentes em macrófagos, DCs e neutrófilos, tais como dectina-1, TLR2, TLR4, TLR6, CR3, lactosilceramida e receptores de varredura (*scavenger receptors*). Estes receptores, ao serem estimulados, regulam a expressão de genes de citocinas e modulam a resposta imune (Thompson et al. 2010; Chanput et al. 2012).

As β-glucanas são polímeros de glicose formados por uma cadeia principal de moléculas de D-glicose unidas por ligações β(1,3) com cadeias laterais unidas por ligações β(1,4) e/ou β(1,6). A primeira função da β-glucana, a ser relatada, foi a sua atividade antitumoral (Chihara et al. 1970). Posteriormente, vários estudos, têm demonstrado que a β-glucana é uma importante molécula imunomoduladora, que pode aumentar a produção de ROS (Goodridge et al. 2011) e de citocinas pró-inflamatórias (Abel & Czob, 1992; Yatawara et al. 2009), exercendo atividade antifúngica e antibacteriana (Thompson et al. 2010; Batbayar et al. 2012). Entretanto, a heterogeneidade das β-glucanas (a solubilidade, o tamanho, estrutura e grau de ramificação) pode ter efeitos distintos sobre as células imunes (Chanput et al. 2012; Ishimoto et al. 2017). Foi relatado que as β-glucanas com maior grau de complexidade estrutural estão associadas a efeitos imunomoduladores e anticancerígenos mais potentes. Entretanto, as diferenças na potência das atividades biológicas da β-glucana solúvel comparada a insolúvel ainda são controversas (Batbayar et al. 2012).

Recentemente, estudos têm mostrado que a β-glucana é capaz de induzir imunidade treinada, via mudanças epigenéticas em monócitos, promovendo modificações que podem conferir proteção contra infecções por diferentes microrganismos. Quintin et al. (2012) demonstraram que a β-glucana induz reprogramação epigenética em monócitos pela via dectin-1/Raf-1, resultando em uma maior produção de citocinas. Nos monócitos tratados com β-glucana foram observadas mudanças estáveis na trimetilação da histona H3K4, o que indica o envolvimento de mecanismos epigenéticos nos fênomenos encontrados. Em seguida, Saeed et al. (2014) avaliaram as mudanças epigenéticas envolvidas no treinamento de monócitos humanos tratados com β-glucana e observaram que as modificações da histona 3 estão relacionadas a uma maior expressão de alguns genes e à inibição de outros.

Cheng et al. (2014), ao caracterizarem os perfis de modificação do transcriptoma e do genoma de monócitos humanos treinados com β-glucana, observaram um aumento da expressão de genes envolvidos no metabolismo da glicose. Os monócitos treinados

aumentaram o consumo de glicose e isso foi dependente da ativação do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) via ativação de dectin-1/Akt/HIF1α, indicando que a indução de glicólise aeróbica, dependente dessa via, representa a base metabólica da imunidade treinada. Isso foi confirmado pelo fato de que a inibição de mTOR nessas células resultou na inibição do efeito do treinamento pela β-glucana, o que sugere uma relação entre os efeitos metabólicos e as mudanças epigenéticas.

Recentemente, Mitroulis et al. (2018) mostraram, em um modelo murino, que a imunidade treinada induzida por β-glucana atua na medula óssea e induz uma expansão de progenitores da linhagem mieloide, a qual foi associada à sinalização elevada por mediadores imunes inatos, como IL-1β e o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), bem como às alterações no metabolismo da glicose e de lipídeos. Esse aumento da mielopoese relacionado à imunidade treinada resultou em uma melhor resposta secundária ao LPS e proteção contra mielossupressão induzida por quimioterapia em camundongos.

O receptor dectina-1 reconhece e leva à endocitose da β-glucana, além de transmitir sinais via seu domínio citoplasmático em macrófagos e DCs. A importância desse receptor é demonstrada por uma maior suscetibilidade a infecções fúngicas nos animais que apresentam dectina-1 não funcional (Batbayar et al. 2012). Lima-Junior et al. (2017) demonstraram, em modelo murino, que a ativação de dectina-1 durante a fagocitose de *L. amazonensis* induz a produção de ROS, via sinalização Syk quinase, o que contribui para a ativação do inflamassoma NLRP3. Esses mecanismos levam à restrição da replicação do parasito, bem como à redução das lesões cutâneas. Os dados de Lima-Junior et al. (2017) podem auxiliar a compreensão dos dados anteriores de Obaid et al. (1989) que mostraram que o uso de β1,3-glucana como adjuvante em imunização experimental com antígenos de *Leishmania*, conferiu uma maior proteção aos hamsters infectados como *L. donovani*. Houve uma menor carga parasitária no fígado e no baço dos animais, bem como um aumento dos títulos de anticorpos. Desse modo, os poucos estudos indicam que a β-glucana pode auxiliar nas respostas imunes anti-*Leishmania*, o que pode ser devido à sua capacidade de induzir imunidade treinada.

2. JUSTIFICATIVA

A LTA é uma doença infecciosa endêmica no Brasil e nos países vizinhos e a espécie *L. braziliensis*, responsável pela maioria dos casos da doença no país, está relacionada ao acometimento grave das mucosas oral e nasofaríngea (Goto & Lindoso, 2012; Brasil, 2013). Desse modo, estudos com essa espécie, que tenham o objetivo de desenvolver novas estratégias terapêuticas ou profiláticas para a doença são de extrema importância.

Foi demonstrado, pelo nosso grupo, que a IL-32γ é expressa em lesões de pacientes com LTA e que *L. braziliensis* induz a expressão de IL-32γ em células mononucleares de indivíduos sadios (Galdino Jr et al. 2014) e que, em macrófagos THP-1 humanos, esta citocina foi importante para o controle da infecção. Os mecanismos envolveram a produção de moléculas microbicidas, incluindo, o NO e os peptídeos antimicrobianos (dos Santos et al. 2017a). Além disso, em um modelo murino, demonstramos que a infecção por *L. braziliensis* é mais bem controlada em camundongos transgênicos para IL-32γ humana do que em animais selvagens (Gomes et al. 2017). Portanto, esses resultados sugerem que a IL-32 esteja envolvida em mecanismos importantes para o controle da infecção por *L. braziliensis* e apontam essa citocina como alvo de investigação na LTA. Para elucidar os mecanismos da IL-32 na leishmaniose, o modelo de camundongo transgênico para IL-32 humana consiste em uma ferramenta importante, pois, embora os roedores não possuam o gene para IL-32, eles são capazes de responder a essa citocina (Kim et al. 2005; Shoda et al. 2006), fornecendo, assim, um modelo experimental mais próximo do modelo de infecção humana.

Alguns estudos têm demonstrado que a β-glucana é capaz de induzir imunidade treinada, com alterações epigenéticas em monócitos/macrófagos, as quais podem conferir proteção não específica contra patógenos não relacionados (Quitin et al. 2012). Tal efeito da β-glucana pode ser dependente da ou potencializado pela IL-32γ. Não existem estudos mostrando se a IL-32 influencia os efeitos da β-glucana no treinamento imune e, como esta citocina é produzida por células da imunidade natural e células não

imunes envolvidas na resposta à infecção por *Leishmania*, faz-se necessário avaliar a imunoestimulação pela β-glucana em modelo murino contendo o gene da IL-32γ humana.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito do treinamento inato com β-glucana no controle da infecção por *L. braziliensis* em camundongos transgênicos para IL-32γ humana.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Avaliar o desenvolvimento da lesão em patas de camundongos selvagens ou IL-32γTg infectados com *L. braziliensis* (inóculo de 10^5 ou 10^6 parasitos), na ausência ou presença de tratamento prévio com β-glucana.

3.2.2. Avaliar a carga parasitária nas patas de camundongos selvagens ou IL-32γTg infectados com *L. braziliensis,* na ausência ou presença de tratamento prévio com β-glucana.

3.2.3. Avaliar os aspectos histopatológicos das lesões nas patas dos camundongos selvagens ou IL-32γTg infectados com *L. braziliensis,* na ausência ou presença de tratamento prévio com β-glucana.

3.2.4. Investigar o perfil da produção das citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-32 na lesão das patas e a produção de INFγ pelas células dos linfonodos drenantes da lesão em camundongos selvagens ou IL-32γTg infectados com *L. braziliensis,* na ausência ou presença de tratamento prévio com β-glucana.

3.2.5. Quantificar o número de células da medula óssea e avaliar a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-1β por estas células em camundongos selvagens ou IL-32γTg uma semana após o tratamento com β-glucana, bem como avaliar se esse tratamento exerce efeitos sobre a atividade leishmanicida dos macrófagos derivados de precursores dos monócitos/macrófagos da medula óssea *in vitro.*

4. METODOLOGIA

4.1. Animais e considerações éticas

Foram utilizados camundongos, fêmeas, da linhagem C57BL/6 selvagens (WT) ou transgênicos para IL-32 humana (IL-32γTg), com 6 a 8 semanas de idade. Os camundongos IL-32γTg foram desenvolvidos por Choi et al. (2010) e doados ao nosso grupo pelo Dr. Charles Dinarello (Universidade do Colorado, Denver, EUA). Os camundongos C57BL/6 WT (n = 76) e os IL-32γTg (n = 83) foram criados e mantidos no biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG), de acordo com as normas de conduta e ética recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O Projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais/CEUA/UFG, protocolo n. 042/16.

4.2. Cultura de parasitos

Foi utilizado neste trabalho um isolado de *L. braziliensis* (MHOM/BR/2003/ IMG, a cepa IMG3), o qual estava armazenado em nitrogênio líquido no *Leishbank* (Banco Imunobiológico das Leishmanioses da Região Centro-Oeste, Lab. Imunobiologia das Leishmanioses do IPTSP/UFG). Após descongelamento, os parasitos foram cultivados em placas de 24 poços (Corning-Costar, Kennebunk, ME, EUA), contendo 2 mL de meio de Grace completo (Grace's Insect Medium, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB-Cripion, Andradina, São Paulo, Brasil) inativado, 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 200 U/mL de penicilina (Sigma-Aldrich) e 200 μg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich). Este meio suplementado foi considerado meio de Grace completo. Os parasitos, na forma promastigota, foram repicados a cada três dias, sempre iniciando as culturas com 1 x 10^6 parasitos/mL. Para os experimentos, a cultura foi mantida a 26°C, por 6 dias. Os parasitos, em fase estacionária de crescimento, foram lavados duas vezes com solução salina (NaCl a 0,85%) e uma vez com salina tamponada com fosfatos pH 7,3 (PBS), centrifugadas a 10ºC, 15 minutos a 1.400 g. Os parasitos foram ressuspendidos em 1 mL de PBS e foi feita a quantificação em hematocitômetro, de

uma alíquota da cultura diluída em PBS-formaldeído a 1%. Em seguida, os parasitos foram utilizados para infecção dos camundongos, como descrito no item 4.5.

4.3. Preparo de antígeno de *Leishmania*

A cepa IMG3 de *L. braziliensis* foi cultivada em meio de Grace completo. Os parasitos foram diluídos em PBS para obter uma concentração de 5 x 10^8 parasitos/mL e o volume correspondente foi transferido para tubos de congelamento (Corning-NY), sendo adicionados de 10 μL de inibidor de protease (Protease Inhibitor CocktailI-Sigma-Aldrich). Posteriormente, esses parasitos foram submetidas a 10 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37 °C. Em seguida, 10 μL de suspensão foram observados ao microscópio de luz, para certificar que os parasitos estavam rompidos. A quantificação de proteínas foi realizada utilizando-se o Kit- BCA (Thermo Scientific, Rockford, EUA), conforme as instruções do fabricante. As alíquotas foram, então, identificadas e armazenadas a -20°C, para serem utilizadas, posteriormente, nos ensaios de ativação das células dos linfonodos, como descrito no item 4.9.

4.4. Tratamento dos animais com β-glucana

Os camundongos WT ou IL-32γTg foram divididos em dois grupos (cada um com 3 ou 4 animais), sendo que os animais de um grupo receberam, por via intraperitoneal (i.p.) (agulha de 0,45 x 13, BD-Curitiba, PR, ou agulha de 0,70 x 25, Embramac, Itajaí, SC), uma dose da solução de 200 ou 400 μL de PBS contendo 1 mg (Cheng et al. 2014) de β-glucana de cevada (Sigma-Aldrich) e os animais do outro grupo receberam PBS (grupo controle).

4.5. Infecção dos camundongos e acompanhamento do curso da lesão

Sete dias após o tratamento com β-glucana ou injeção de PBS, os animais foram infectados com 1 x 10^5 ou 1 x 10^6 formas promastigotas da cepa IMG3, em fase estacionária do crescimento, intradermicamente (i.d.), no coxim plantar da pata traseira esquerda. Após a infeção, o tamanho da lesão nas patas foi avaliado, semanalmente, durante 3 a 8 semanas. Com o auxílio de um paquímetro, o tamanho da lesão (mm) foi calculado pela medida da espessura da pata infectada (pata esquerda) menos a medida

da espessura da pata não infectada (pata direita). Em cada experimento independente foram avaliados animais controles, sem tratamento e sem infecção.

4.6. Quantificação do parasitismo por diluição limitante

Após 3 ou 8 semanas de infecção, os animais foram anestesiados com Xilazina 5 mg/Kg + 50 mg/Kg Quetamina, administradas por via intraperitoneal (i.p.), seguido de eutanasia por deslocamento cervical. A pata infectada foi removida para análise da carga parasitária por meio da técnica de diluição limitante, como descrito por Souza-Neto et al. (2004). Brevemente, a pata foi retirada e imergida em álcool 70% por dois minutos. Em seguida, a pata foi dividida ao meio e uma das metades foi macerada por 5 minutos em 2 mL de PBS. O macerado foi centrifugado, inicialmente, a 500 g, por 1 minuto a 4 °C, para remover os fragmentos teciduais. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e centrifugados novamente a 1.400 g, 15 minutos, a 4 ºC e o sedimento foi ressuspendido em 500 μL de meio de Grace completo. A suspensão foi diluída, seriadamente, usando fator 10, em meio de Grace completo, em placas de 96 poços de fundo chato (Corning-Costar), em triplicatas. Após a diluição seriada, as placas foram hermeticamente fechadas e incubadas a 26 ºC. A detecção de formas promastigotas foi realizada por avaliações dos poços, utilizando-se um microscópio de luz invertido. A leitura das placas foi realizada no 7º e no 14º dia após o início das culturas. A quantidade estimada de parasitos foi obtida pelo valor da última diluição em que foram detectados parasitos, sendo os resultados expressos como o logarítmico negativo do título de parasitos.

4.7. Análises Histopatológicas das lesões

As amostras de tecido das patas infectadas (baixo inóculo) foram fixadas em formalina e processadas de acordo com os procedimentos padrões para coloração Hematoxilina-Eosina (HE), como descrito por Michalany (1980). Foram analisadas as patas de animais com 3 ou 8 semanas de infecção. Os cortes (5 μm) foram analisados usando um microscópio digital VisionTek (Sakura, Japão), determinando a densidade celular no infiltrado inflamatório nos animais tratados com β-glucana, comparados com o grupo controle. Cem campos de microscópio por corte foram analisados. O escore semi-quantitativo foi realizado de acordo com o número de células por campo e classificado em 0: ausente; 1: leve; 2: moderado; 3: intenso.

4.8. Preparação dos tecidos para dosagem de citocinas

A pata infectada dos animais foi dividida ao meio e uma das partes foi pesada e depois macerada, com auxílio de um êmbolo, em 500 μL de solução de lise (500 μL de PBS contendo 1 μL de triton X-100 (Sigma-Aldrich) e 10 μL de inibidor de protease (Protease Inhibitor CocktailI- Sigma-Aldrich). O homogeneizado foi utilizado para dosar as citocinas IL-32γ e TNF-α (picogramas/grama de tecido), por ELISA, como descrito no item 4.10.

4.9. Cultura de células do linfonodo drenante da lesão

Após 3 ou 8 semanas de infecção, os animais foram eutanasiados e o linfonodo drenante foi retirado para avaliação da produção de citocinas. Também foram retirados os linfonodos de animais controles, sem tratamento e sem infecção. Os linfonodos foram retirados em condições assépticas e cada um foi colocado em um poço de placa de 24 poços (Corning-Costar - Kennebunk, ME, EUA), com 1 mL de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), contendo 10% de SFB (Cripion, Brasil), 50 μM de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich), 1 M de HEPES, 2 mM de glutamina (Sigma-Aldrich), 100 U/mL de penicilina (Sigma-Aldrich) e 100 μg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich). Este meio, assim suplementado, foi considerado meio RPMI completo. O linfonodo foi macerado com auxílio de um êmbolo de seringa e a suspensão celular foi centrifugada a 600 g, por 10 minutos, a 10 ºC. O sedimento celular foi ressuspendido em meio RMPI completo e as células foram quantificadas em hematocitômetro, após diluição de uma alíquota em solução de azul de tripano 0,1% em PBS, para exclusão de células mortas.

A concentração das células viáveis foi ajustada para 5 x 10^6 células/mL, sendo distribuídos 200 μL desta suspensão por poço de placas de cultura de 96 poços (Corning-Costar). As células foram estimuladas com concanavalina A (ConA; Sigma-Aldrich) a 5 μg/mL ou antígeno total de *L. braziliensis* (Ag), a 50 μg/mL. Para controle, alguns poços não receberam estímulos (Meio). A cultura de células foi incubada em estufa com atmosfera úmida, contendo 5% de CO_2, a 37º C. O procedimento foi realizado em triplicata para cada suspensão celular/tratamento. Após 48 h de incubação, o sobrenadante foi colhido e a quantidade de IFNγ, foi determinada por ensaio imunoenzimático (ELISA), como descrito no item 4.10.

4.10. Avaliação da produção de citocinas por ELISA

Para a dosagem de IFNγ, foram utilizadas microplacas de 96 poços para ELISA (Jet Biofil – NY, EUA) sensibilizadas com o anticorpo monoclonal de captura anti-IFNγ (hibridoma XMG1.2, 1 μg/mL, 18 h, 4 ºC). Para a dosagem de TNF-α, as placas foram sensibilizadas com o anticorpo monoclonal de captura anti-TNF-α (hibridoma XT22.11, 1 μg/mL, 18 horas, 4 ºC). Em seguida, as placas foram bloqueadas, por 1 hora, com PBS contendo 3% de SFB. Os sobrenadantes das culturas de células do linfonodo ou do homogeneizado da pata foram adicionados aos poços (80 μL/poço), em duplicata. Após incubação por 2 horas (à temperatura ambiente, T.A), as placas foram lavadas três vezes com PBS-Tween-20 a 0,04 %, e, em seguida, foram adicionados 80 μL/poço do segundo anticorpo (hibridoma MPG-XT3 para IFNγ e hibridoma XT22 para TNF-α, ambos conjugados com biotina e a 0,5 μg/mL). Após incubação por 1 hora, à T.A, as placas foram lavadas três vezes com PBS-Tween-20 a 0,04% e o conjugado estreptoavidina-peroxidase (1:2.000, Sigma-Aldrich) foi adicionado (80 μL/poço). Após 30 minutos, à T.A. e seis lavagens com PBS-Tween 20 a 0,04%, o substrato TMB (3,3',5,5,-tetrametilbenzidina, Life Technologies, São Paulo, Brasil) foi adicionado (50 μL/poço). Após o desenvolvimento de cor, a reação foi finalizada com ácido sulfúrico, (H_2SO_4) 2 N (20 μL/poço). A densidade óptica (D.O.) foi obtida em leitor de microplacas (Multskam, ThermoLabsystems, EUA), com filtros de 492/620 nm. As concentrações de IFNγ e TNF-α foram determinadas de acordo com as curvas padrões preparadas com as citocinas recombinantes (R&D System, Minneapolis, EUA). A quantidade de IL-1β e IL-32 foi determinada por kit de ELISA (R&D Systems, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O limite mínimo de detecção foi de 7,8 ou 31,25 pg/mL para TNF-α, 31,25 ou 62,5 para IL-32, 3,9 pg/mL para IL-1β e 156,25 pg/mL para IFNγ. A quantidade de citocinas no sobrenadante foi expressa em picogramas/mL e as citocinas dosadas na pata foram expressas em picogramas/grama de tecido.

4.11. Cultura de células da medula óssea dos animais tratados com β-glucana e avaliação da atividade leishmanicida de macrófagos derivados de precursores de células da medula óssea *in vitro*.

Sete dias após o tratamento com β-glucana ou injeção de PBS, camundongos WT e IL-32γTg, não infectados, foram eutanasiados e o fêmur foi retirado para obtenção de células da medula óssea, para avaliação da produção de citocinas. As células foram retiradas em condições assépticas por meio de lavagem da medula com injeção de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 50 μM de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich), 1 M de HEPES, 100 U/mL de penicilina (Sigma-Aldrich) e 100 μg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich). As células foram centrifugadas a 600 g, por 10 minutos, a 10 ºC. O sedimento celular foi ressuspendido em meio RMPI completo e as células foram quantificadas em hematocitômetro, após diluição de uma alíquota em solução de azul de tripano 0,1% em PBS, para exclusão de células mortas.

Foram adicionadas 1 x 10^6 células em 200 μL de RPMI completo em cada poço da placa de cultura de 96 poços (Corning-Costar). As células foram estimuladas com LPS (*E. coli* 011:B4, Sigma-Aldrich) a 10 ng/mL ou antígeno total de *L. braziliensis* (Ag), a 50 μg/mL. Para controle, alguns poços não receberam estímulos (Meio). A cultura de células foi incubada em estufa com atmosfera úmida, contendo 5% de CO_2, a 37º C. O procedimento foi realizado em duplicata para cada suspensão celular/tratamento. Após 24 h de incubação, o sobrenadante foi colhido e a quantidade de citocinas, TNF-α e IL-1β, foi determinada por ELISA, como descrito no item 4.10.

Para avaliar a atividade leishmanicida de macrófagos derivados de precursores de células da medula óssea, as células da medula foram plaqueadas (1 x 10^6 células/10 mL) em placa de cultura bacteriológica (Kasvi, Cotia, São Paulo), contendo 8 mL de meio RPMI completo e 2 mL de sobrenadante de fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF), produzido por células L929. A derivação dos precursores para macrófagos foi feita durante 8 dias, sendo as células incubadas em estufa com atmosfera úmida, contendo 5% de CO_2, a 37º C. A manutenção das células, com a retirada de todo meio de cultura e reposição de meio RPMI e sobrenadante na mesma proporção, foi realizada a cada três dias. Após a derivação, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas a 600 g, por 10 minutos, a 10 ºC. O sedimento celular foi ressuspendido em meio RMPI completo e as células foram quantificadas em hematocitômetro, após

diluição de uma alíquota em solução de azul de tripano 0,1% em PBS, para exclusão de células mortas. Os macrófagos foram plaqueados, sendo adicionandas 2 x 10^5 células por poço, em um volume de 500 μl de meio RPMI completo, em placas de 24 poços (Corning-Costar - Kennebunk, ME, EUA) com lamínula (Knittel Glass, SP, São Paulo). As células foram incubadas por 24 horas e depois infectadas com formas promastigotas de *L. braziliensis* (5 parasitos/célula), preparadas como descrito no item 4.3. Após 4 horas, os parasitas não internalizados foram lavados com PBS e parte das células foram incubadas durante 48 horas e após esse período, novamente o meio foi retirado e as células foram lavadas com PBS. As lamínulas foram colhidas após 4 e 48 horas de infecção, as células foram fixadas com metanol absoluto e coradas com Giemsa (Merck Millipore, Damstadt, Alemanha). Em seguida, as lamínulas foram fixadas sobre lâminas para microscopia, usando Entellan Novo (Merck KgaA, Damstadt, Alemanha). Trezentas células foram analisadas sob um microscópio de luz (1000x), para determinar a porcentagem de macrófagos infectados, o número de parasitas por células infectadas e a porcentagem de inibição de crescimento de parasitos (= 100 - (porcentagem de parasitos em 48 horas / porcentagem de parasitos em 4 horas) x 100).

4.12. Análise Estatística

Os dados são representados como média ± erro padrão da média (EPM) ou medianas. Os testes *t* de Student, Two-way ANOVA seguida de teste de Bonferroni ou One-way ANOVA seguida de teste de Bonferroni ou de Kruskal Wallis seguida de teste de Dunn, foram utilizados para as comparações dos resultados. Foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0 Software Inc. (San Diego, CA, EUA). O nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Resultados com inóculo de 10^5 parasitos

5.1.1. Curso da lesão causada pela infecção por *Leishmania braziliensis* e carga parasitária nas lesões dos camundongos selvagens ou transgênicos para o gene da IL-32γ humana, após tratamento com β-glucana.

Para investigar se os efeitos do tratamento com a β-glucana altera o desenvolvimento de lesão causada por *L. braziliensis* e a carga parasitária nas lesões, camundongos C57BL/6 WT e IL-32γTg foram tratados ou não com β-glucana e após sete dias foram infectados. Por este protocolo já foi comprovado o treinamento inato de monócitos/macrófagos em um modelo de infecção com *Candida albicans* (Quintin et al, 2012). O curso da lesão atingiu um pico na 5ª semana após a infecção nos animais WT (Fig. 1A). Os camundongos WT tratados com β-glucana apresentaram um menor tamanho da lesão, a partir da 5ª semana de infecção, ao serem comparados com os animais WT que receberam PBS (WT-PBS: 0,83 ± 0,09 mm *vs* WT-β-glucana: 0,55 ± 0,06 mm, 5 semanas, $p < 0,05$; Fig. 1A). Após 8 semanas de infecção, não foram observadas diferenças significantes entre as cargas parasitárias, detectadas nas lesões cutâneas, destes dois grupos (Fig. 1D).

Os camundongos IL-32γTg apresentaram um pico mais precoce da lesão, com 4 semanas, sendo este pico ainda mais rápido nos animais tratados com β-glucana, 3 semanas (Fig. 1B). O tamanho da lesão dos animais IL-32γTg foi maior do que aquele dos animais WT, com ou sem o tratamento com β-glucana, com duas semanas de infecção, (IL-32γTg-β-glucana: 0,58 ± 0,12 mm *vs* WT-β-glucana: 0,12 ± 0,03 mm, $p < 0,05$; Fig. 1C). Na terceira semana de infecção, os animais IL-32γTg tratados com β-glucana apresentaram um tamanho de lesão maior dos que os WT tratados ou não (IL-32γTg-β-glucana: 0,90 ± 0,16 mm *vs* WT-PBS: 0,33 ± 0,03 mm; e WT-β-glucana: 0,35 ± 0,04 mm, $p < 0,01$; Fig. 1C). Na oitava semana de infecção, no entanto, foi observado

um tamanho menor da lesão nos camundongos IL-32γTg e WT tratados com β-glucana (Fig.1C), embora de maneira não significante, e uma menor carga parasitária nos animais IL-32γTg tratados com β-glucana, em comparação aos demais grupos (IL-32γTg-β-glucana: 2,2 log_{10}, de 0 a 4,37 log_{10} *vs* IL-32γTg-PBS: 3,5 log_{10}, de 1,8 a 5,5 log_{10}, WT-PBS: 5,3 log_{10}, de 0 a 7,4 log_{10}; e WT-β-glucana:4 log_{10}, de 0 a 7,4 log_{10}, $p < 0,05$; Fig. 1D).

Como os camundongos IL-32γTg tratados com β-glucana apresentaram uma lesão maior do que a dos demais grupos de animais, na terceira semana de infecção, foi avaliada a carga parasitária nesta semana. Para isto, dois experimentos independentes foram realizados e não foram observadas diferenças significantes entre os cursos ou tamanho das lesões entre os quatro grupos de animais avaliados (Fig. 2A e 2B, 2C). Como na 8ª semana de infecção (Fig. 1D), na 3ª semana de infecção, os animais WT não apresentaram diferenças significantes entre suas cargas parasitárias quando tratados com PBS ou β-glucana (Fig. 2D). Da mesma forma, os animais IL-32γTg tratados ou não com β-glucana apresentaram uma carga parasitária similar entre si, mas significantemente maior do que a dos animais WT tratados com β-glucana (IL-32γTg-β-glucana: 8,2 log_{10}, de 3,3 a 10,4 log_{10} e IL-32γTg-PBS: 8,4 log_{10}, de 5,3 a 10,5 log_{10}, *vs* WT-β-glucana: 5,2 log_{10}, de 4 a 7,6 log_{10}, $p < 0,05$; Fig. 2D).

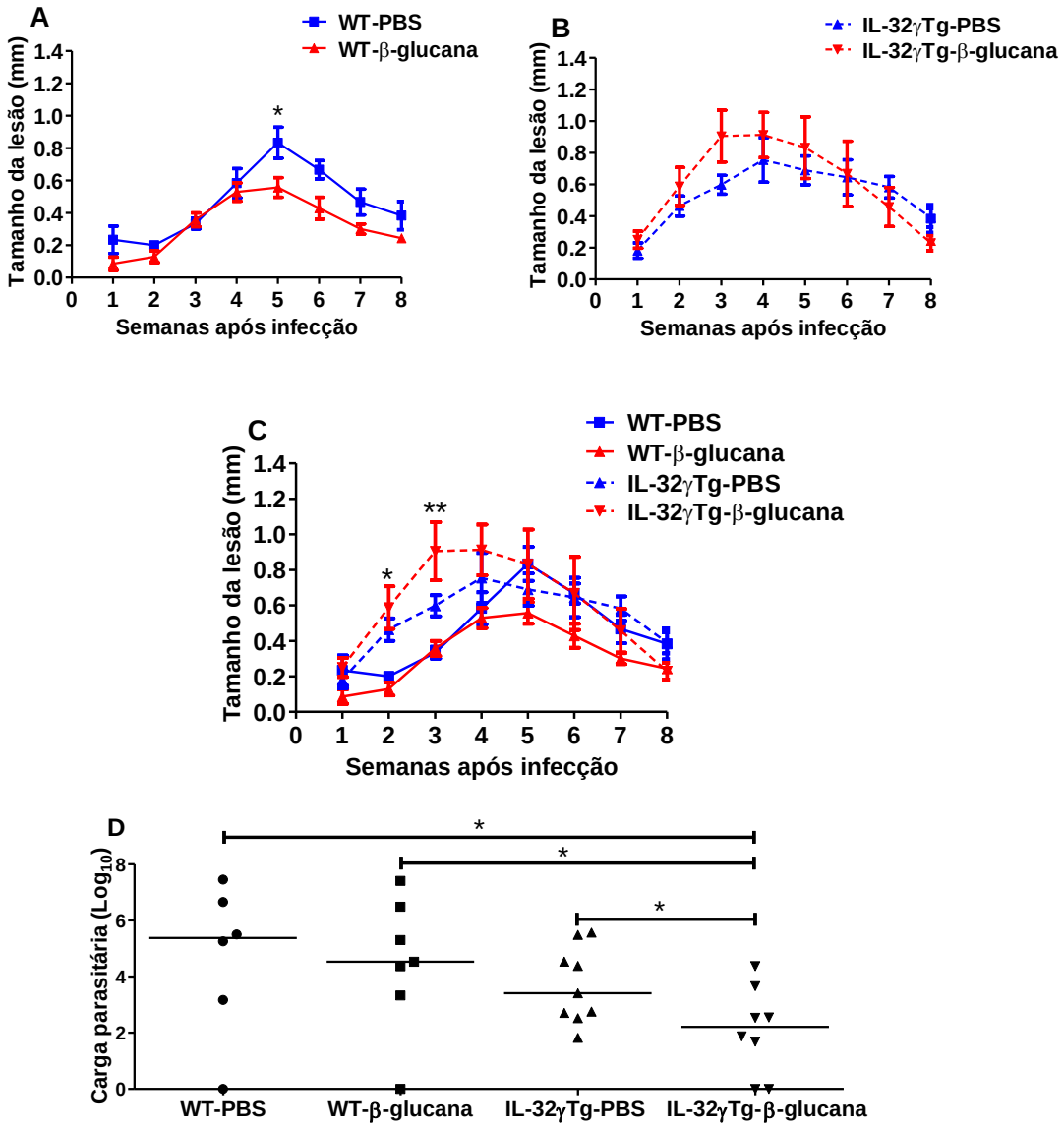


Figura 1. Tratamento com β-glucana antes da infecção com *Leishmania braziliensis* induz mais rápido o desenvolvimento da lesão e diminui a carga parasitária após 8 semanas de infecção em animais transgênicos para IL-32γ humana. Os camundongos selvagens (WT) e os transgênicos para IL-32γ (IL-32γTg) foram tratados com salina (PBS) ou β-glucana (1 mg; i.p.) e após 7 dias foram infectados com 1 x 10^5 formas promastigotas de *L. braziliensis*, i. d., na pata traseira. A (WT), B (IL-32γTg) e C (WT e IL-32γTg): O tamanho da lesão (mm) foi mensurado semanalmente, durante 8 semanas, sendo representado pela diferença entre a espessura da pata infectada e a espessura da pata não infectada (mm). Resultados representam a média ± EPM, de 6 a 11 animais por grupo (dois a três experimentos independentes). *p < 0,05 (WT-PBS *vs* WT-β-glucana, 5 semanas; IL-32γTg-β-glucana *vs* WT-β-glucana, 2 semanas); **p < 0,01 (IL-32γTg-β-glucana *vs* WT-PBS e WT-β-glucana, 3 semanas). D: A carga parasitária da pata infectada foi determinada pela técnica de diluição limitante, após 8 semanas de infecção. Os dados representam a mediana e os resultados individuais de 6 a 9 animais por grupo, em dois a três experimentos independentes. *p < 0,05 (IL-32γTg-β-glucana *vs* IL-32γTg-PBS, WT-β-glucana e WT-PBS).

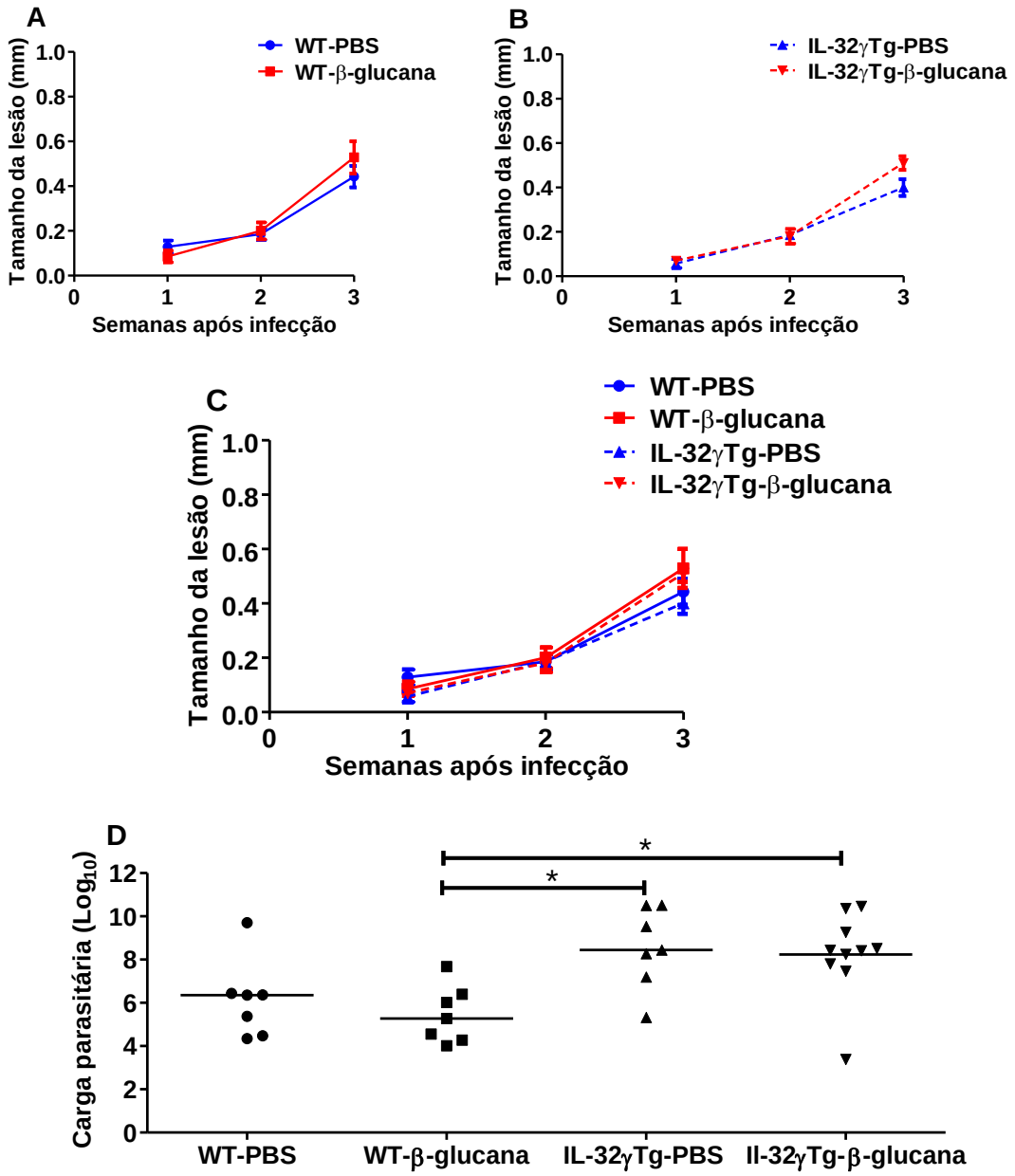
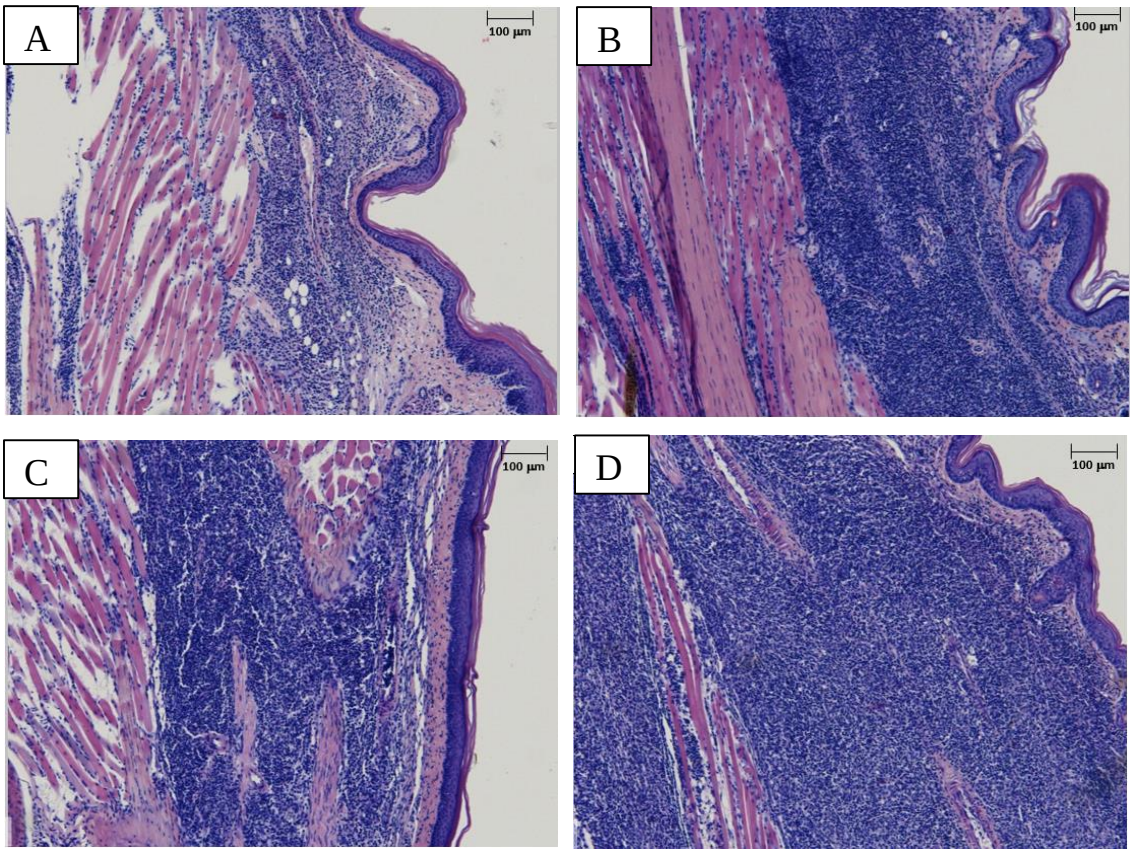


Figura 2. No início da infecção por *Leishmania braziliensis* os camundongos transgênicos para IL-32γ humana apresentam um aumento da carga parasitária independentemente do tratamento prévio com β-glucana. Os camundongos selvagens (WT) e os transgênicos para IL-32γ (IL-32γTg) foram tratados com PBS ou com β-glucana (1 mg; i.p.) e após 7 dias foram infectados com 1 x 10^5 formas promastigotas de *L. braziliensis*, i.d., na pata traseira. A (WT), B (IL-32γTg) e C (WT e IL-32γTg): O tamanho da lesão (mm) foi mensurado semanalmente, durante 3 semanas, sendo representado pela diferença entre a espessura da pata infectada e a espessura da pata não infectada (mm). Os resultados representam a média ± EPM, de 7 ou 10 animais por grupo, em dois experimentos independentes. D: A carga parasitária da pata infectada foi determinada pela técnica de diluição limitante, na 3ª semana de infecção. Os dados representam a mediana e os resultados individuais de 7 ou 10 animais por grupo, em dois experimentos independentes. *p < 0,05 (IL-32γTg-β-glucana e IL-32γTg-PBS *vs* WT-β-glucana).

5.1.2. Análise histopatológica das lesões causadas por *Leishmania braziliensis* em camundongos selvagens ou transgênicos para o gene da IL-32γ humana, tratados previamente com β-glucana.

Para avaliar os perfis histopatológicos das lesões dos camundongos WT e IL-32γTg, tratados ou não com β-glucana, cortes histológicos de pata de animais infectados por 3 ou 8 semanas (novo lote de animais), foram corados com hematoxilina e eosina e analisados sob microscopia de luz. Após 3 semanas de infecção, a maioria dos camundongos WT apresentou um aumento do infiltrado inflamatório, considerando-se a densidade celular, após tratamento com β-glucana (Fig. 3A, 3B). Os camundongos IL-32γTg tratados com β-glucana (Fig. 3D) apresentaram um maior infiltrado inflamatório comparados aos animais dos demais grupos (IL-32γTg-β-glucana: escore 3 *vs* IL-32γTg-PBS: escore 2, de 1 a 2, WT-PBS: escore 1, de 1 a 2, e WT-β-glucana: escore 2, de 1 a 2, $p < 0,05$; Fig. 3A-E).

Após 8 semanas de infecção, os camundongos WT não tratados ou tratados com β-glucana (Fig. 4A e 4B, respectivamente) apresentaram similar infiltrado inflamatório (Fig. 4E). Os camundongos IL-32γTg tratados com β-glucana (Fig. 4D) apresentaram um menor infiltrado inflamatório comparado aos animais IL-32γTg não tratados (Fig. 4C), mas sem alcançar significância estatística (Fig. 4E). O processo inflamatório reduziu significantemente no grupo dos animais IL-32γTg tratados com β-glucana da 3ª semana (escore 3) para a 8ª semana (escore 1,5, de 1 a 2) de infecção (Fig. 4F; $p < 0,05$).



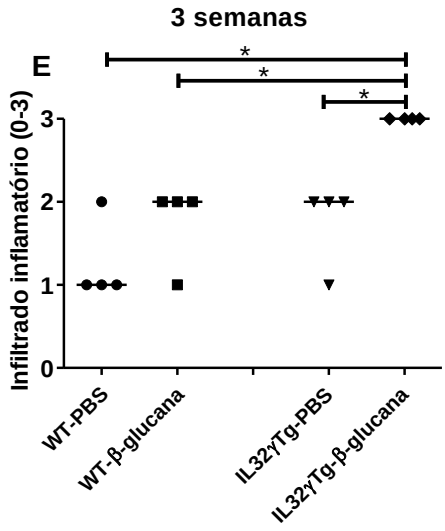


Figura 3. Tratamento com β-glucana aumenta o processo inflamatório na lesão causada por *Leishmania braziliensis,* após 3 semanas de infecção, nos animais transgênicos para IL-32γ humana. Os camundongos selvagens (WT) e os transgênicos para IL-32γ (IL-32γTg) foram tratados com PBS ou com β-glucana (1 mg; i.p.) e após 7 dias foram infectados com 1 x 10^5 formas promastigotas de *L. braziliensis*, i.d., na pata traseira. Após 3 semanas de infecção, as patas infectadas foram retiradas, fixadas, embebidas em parafina e processadas para coloração com hematoxilina e eosina. As fotomicrografias (10x) representam (A) camundongo WT que recebeu apenas PBS, (B) WT tratado com β-glucana, (C) camundongo IL-32γTg que recebeu PBS e (D) IL-32γTg tratado com β-glucana. E: Cem campos de microscópio por corte foram analisados baseados na densidade celular presente no infiltrado inflamatório. O escore semi-quantitativo foi realizado de acordo com o número de células por campo e classificado em 0: ausente; 1: leve; 2: moderado; 3: intenso. Os dados representam a mediana e resultados individuais de 4 animais por grupo. *p < 0,05 (IL-32γTg-β-glucana *vs* IL-32γTg-PBS, WT-PBS e WT-β-glucana).

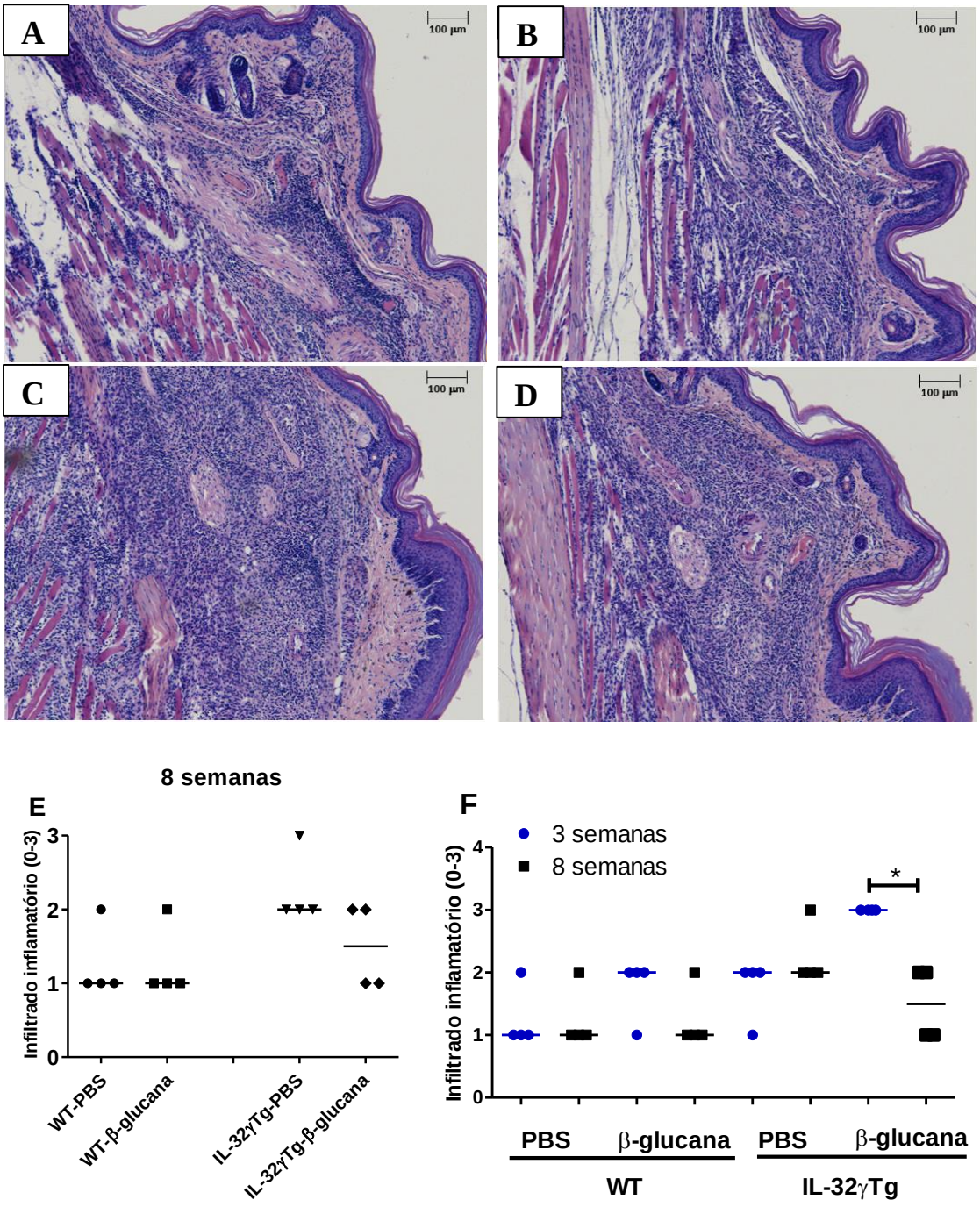


Figura 4. Similar infiltrado inflamatório nas lesões de camundongos selvagens ou transgênicos para IL-32γ humana, tratados previamente com PBS ou β-glucana, infectados com *Leishmania braziliensis*, após 8 semanas de infecção. Os camundongos selvagens (WT) e os transgênicos para IL-32γ (IL-32γTg) foram tratados com PBS ou com β-glucana (1 mg; i.p.) e após 7 dias foram infectados com 1 x 10^5 formas promastigotas de *L. braziliensis*, i.d., na pata traseira. Após 8 semanas de infecção, as patas infectadas foram retiradas, fixadas, embebidas em parafina e processadas para coloração com hematoxilina e eosina. As fotomicrografias (10x) representam (A) camundongo WT que recebeu apenas PBS, (B) WT tratado com β-glucana, (C) camundongo IL-32γTg que recebeu PBS e (D) IL-32γTg tratado com β-glucana. E e F: Cem campos de microscópio por corte foram analisados baseados na densidade celular presente no infiltrado inflamatório. O escore semi-quantitativo foi realizado de acordo com o número de células por campo e classificado em 0: ausente; 1: leve; 2: moderado; 3: intenso. E: infiltrado inflamatório após 8 semanas de infecção. F: infiltrado inflamatório após 3 e 8 semanas de infecção. Os dados representam a mediana e resultados individuais de 4 animais por grupo. *p < 0,05 (IL-32γTg-β-glucana 3 semanas *vs* IL-32γTg-β-glucana 8 semanas).

5.1.3. Quantificação das citocinas IL-32γ e TNF-α presentes na lesão da pata e dos níveis de IFNγ produzido por células dos linfonodos drenantes das lesões dos camundongos selvagens ou transgênicos para o gene da IL-32γ humana infectados com *Leishmania braziliensis,* tratados previamente com β-glucana.

A produção de IL-32 e TNF-α foi avaliada no homogeneizado das patas dos animais IL-32γTg, eutanasiados após 3 semanas de infecção, referentes aos dados mostrados na Figura 2. Não houve diferença significante entre a produção dessas citocinas nos animais tratados ou não tratados com β-glucana, como pode ser observado nas Fig. 5A e 5B.

A produção de IFNγ por células do linfonodo drenante da lesão dos camundongos WT e IL-32γTg, após 3 semanas de infecção, foi avaliada nos sobrenadantes das culturas celulares, após 48 h de incubação. Ambos os estímulos, ConA e Ag, induziram a produção de IFNγ pelas células do linfonodo drenante da lesão de animais WT (Fig. 5C; $p < 0,05$) ou IL-32γTg (Fig. 5D; $p < 0,05$), tratados com PBS ou com β-glucana. Entretanto, não foram observadas diferenças significantes entre a produção de IFNγ após 3 semanas de infecção, induzida por ConA ou por Ag, em camundongos WT tratados ou não com β-glucana (Fig. 5C). Por outro lado, após 3 semanas de infecção, foi observada uma maior produção de IFNγ induzida por Ag, pelas células do linfonodo de camundongos IL-32γTg tratados com β-glucana (3.281 ± 1093 pg/mL), em comparação com os animais IL-32γTg tratados com PBS (830 ± 180 pg/mL) (Fig. 5D; $p < 0,05$).

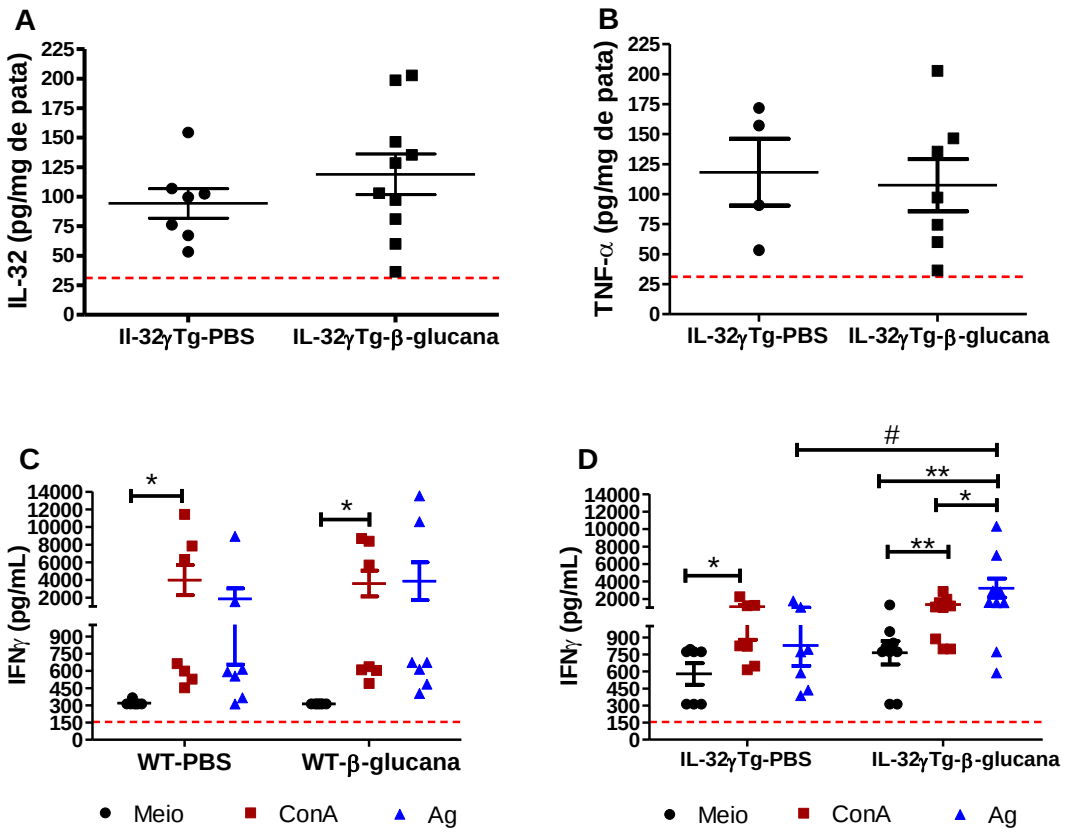


Figura 5. Tratamento com β-glucana não altera a produção de IL-32γ ou TNF-α nas lesões, mas aumenta a produção de IFNγ pelas células do linfonodo drenante da lesão de camundongos transgênicos para IL-32γ humana, após 3 semanas de infecção com *Leishmania braziliensis*. Os camundongos selvagens (WT) e os transgênicos para IL-32γ (IL-32γTg) foram tratados com PBS ou com β-glucana (1 mg; i.p.) e após 7 dias foram infectados com 1 x 10^5 formas promastigotas de *L. braziliensis*, i.d., na pata traseira. Após 3 semanas de infecção, as patas infectadas foram maceradas e o homogeneizado, usado para dosagem de citocinas pela técnica ELISA (A, B). A: quantidade de IL-32γ em picogramas/grama de tecido. B: quantidade de TNF-α em picogramas/miligrama de tecido. Os resultados representam a média ± EPM [n = 4 a 10 animais por grupo, em um experimento (TNF-α) ou dois experimentos independentes (IL-32)]. Nas patas de animais não infectados ou apenas injetados com β-glucana, não foi possível detectar a IL-32γ nem TNF-α (abaixo do limiar de detecção, que foi de 31,25 pg/mL para IL-32 e TNF-α). Em C e D: Após 3 semanas de infecção, o linfonodo drenante foi retirado e as células (5 x 10^6 células/mL) foram cultivadas, por 48 horas, na ausência de estímulo (Meio) ou na presença de antígenos de *L. braziliensis* (Ag) ou Concanavalina A (ConA). O sobrenadante foi usado para dosagem de IFNγ, por ELISA. Quantidade de IFNγ em picogramas/mL em camundongos WT (C) e IL-32γTg (D). Os resultados representam a média ± EPM (n = 7 a 9 animais por grupo, em dois experimentos independentes). Linha pontilhada vermelha: limite de detecção das citocinas (31,25 pg/mL para IL-32 e TNF-α e 156 pg/mL para IFNγ). Em animais não infectados, a produção de IFNγ, na ausência de estímulos foi abaixo do limite de detecção. *p < 0,05 (Meio *vs* ConA; ConA *vs* Ag); **p < 0,01 (Meio *vs* ConA e Ag); $^{\#}$ p < 0,05 (Ag IL-32γTg-PBS vs Ag de IL-32γTg-β-glucana).

A quantidade das citocinas IL-32 e TNF-α também foi mensurada, por ELISA, no homogeneizado da pata infectada, após 8 semanas de infecção, referente aos experimentos apresentados na Figura 1. Não foi observada diferença significante entre a produção de IL-32 de animais WT e IL-32γTg tratados ou não tratados com β-glucana (Fig. 6A). Similar resultado foi observado para a produção de TNF-α (Fig. 6B).

Após 8 semanas de infecção, apenas no grupo de animais IL-32γTg tratados com β-glucana houve um um aumento significante na produção de IFNγ nos sobrenadantes das culturas estimuladas com ConA (Fig. 6C, 6D; $p < 0,05$, IL-32γTg-β-glucana ConA *vs* Meio).

A fim de visualizar o que estava ocorrendo durante as semanas de infecção, em relação à produção de IFNγ, os dados de 3 e 8 semanas foram mostrados, conjuntamente, na Figura 6E (animais WT) e na 6F (animais IL-32γTg). Os dados mostram que enquanto nos animais WT houve uma queda na produção de IFNγ induzida por ConA (WT-PBS 3 semanas: 3979 ± 1710 pg/mL *vs* WT PBS 8 semanas: 330 ± 17 pg/mL; WT-β-glucana 3 semanas: 3592 ± 1463 pg/mL *vs* WT-β-glucana 8 semanas: 361 ± 32 pg/mL, $p < 0,05$; Fig. 6E) ou Ag (Fig. 6E) de 3 para 8 semanas, nos animais IL-32γTg houve um aumento persistente na produção de IFNγ, após estimulação com ConA ou Ag (Fig. 6F). Os níveis basais (Meio) de INFγ diminuíram, significantemente, nas culturas dos linfonodos dos animais IL-32γTg, independentemente do tratamento com β-glucana, de 3 para 8 semanas de infecção (IL-32γTg-PBS 3 semanas: 578 ± 94 pg/mL *vs* IL-32γTg-PBS 8 semanas: 312 ± 0,16 pg/mL; IL-32γTg- β-glucana 3 semanas: 764 ± 102 pg/mL *vs* IL-32γTg- β-glucana 8 semanas: 312 ± 0 pg/mL, $p < 0,05$; Fig. 6F).

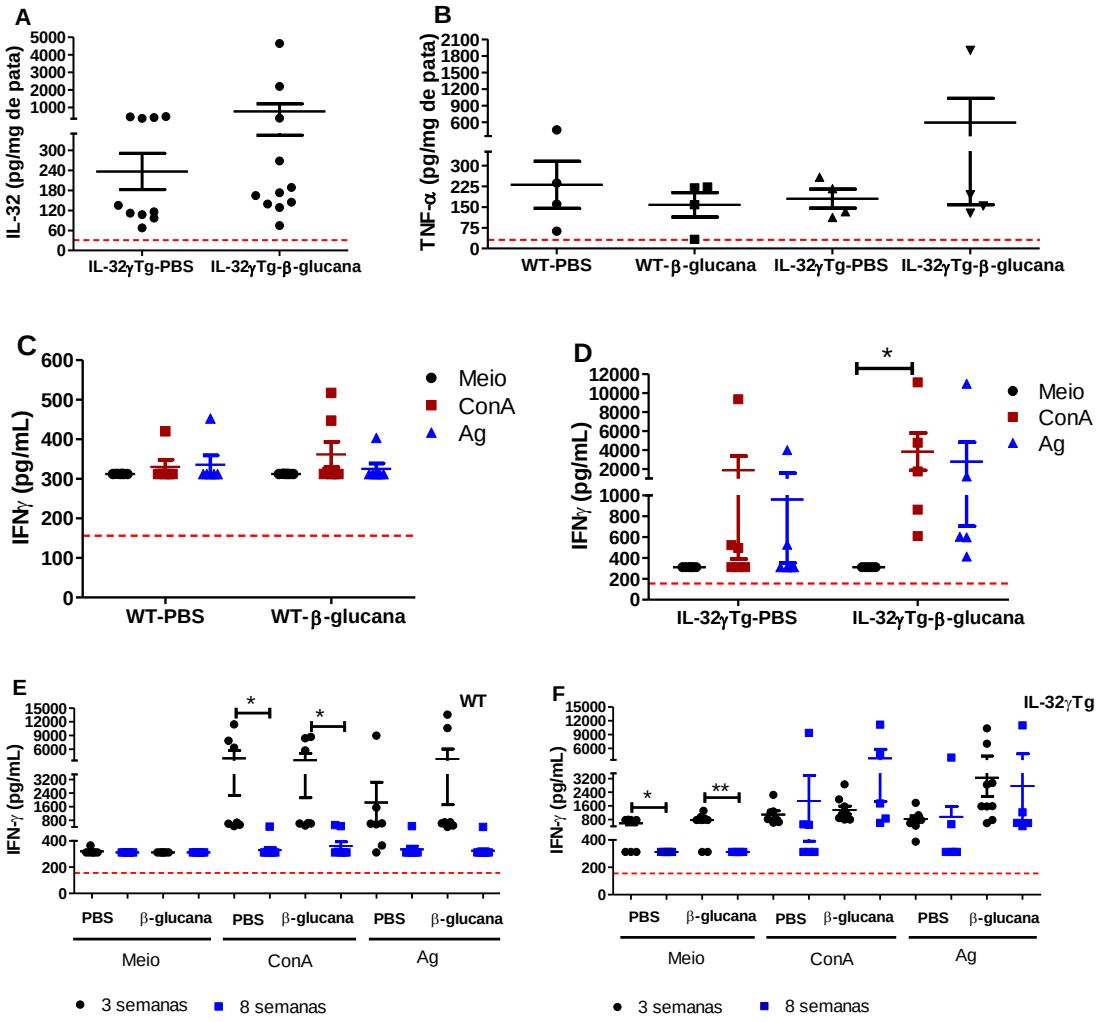


Figura 6. β-glucana induz um aumento persistente na produção de IFNγ em culturas de células do linfonodo drenante da lesão de camundongos transgênicos para IL-32γ humana após 8 semanas de infecção com *Leishmania braziliensis*. Os camundongos selvagens (WT) e os transgênicos para IL-32γ (IL-32γTg) foram tratados com PBS ou β-glucana (1 mg; i.p.) e após 7 dias foram infectados com 1 x 10^5 formas promastigotas de *L. braziliensis*, i.d., na pata traseira. Após 8 semanas de infecção, as patas infectadas foram maceradas e o homogeneizado, usado para dosagem de citocinas pela técnica ELISA. A: quantidade de IL-32γ em picogramas/miligrama de tecido; B: quantidade de TNF-α em picogramas/grama de tecido. Os resultados representam a média ± EPM (n = 4 a 11 animais por grupo, em um experimento para TNF-α e dois experimentos independentes para IL-32). Após 8 semanas de infecção, o linfonodo drenante foi retirado e as células (5 x 10^6 células/mL) foram cultivadas, por 48 horas, na ausência de estímulo (Meio) ou na presença de antígenos de *L. braziliensis* (Ag) ou Concanavalina A (ConA). O sobrenadante foi usado para dosagem de IFNγ, por ELISA. Quantidade de IFNγ em picogramas/mL em camundongos WT (C) ou IL-32γTg (D). Em (E) e (F) tem-se a quantidade de IFNγ em picogramas/mL após 3 e 8 semanas de infecção, em camundongos WT e IL-32γTg, respectivamente. Os resultados representam a média ± EPM (n = 5 a 7 animais por grupo, em dois experimentos independentes). Linha pontilhada vermelha: limite de detecção das citocinas (31,25 pg/mL para IL-32 e TNF-α e 156 pg/mL para IFNγ). Em animais não infectados, a produção de IFNγ, na ausência de estímulos foi abaixo do limite de detecção. *p < 0,05 (Meio *vs* ConA); (ConA de WT-PBS e WT-β-glucana 3 semanas *vs* 8 semanas).

5.1.4. Avaliação do efeito da β-glucana no número de células da medula óssea e na produção das citocinas TNF-α e IL-1β produzidas por estas células após estimulação com antígenos de *Leishmania braziliensis*.

Como o treinamento inato pode ocorrer nos precursores de monócitos/macrófagos da medula óssea, foi avaliado o efeito da β-glucana nestas células. Camundongos WT ou IL-32γTg foram tratados com β-glucana, após uma semana foram eutanasiados e as células da medula óssea foram retiradas, quantificadas e cultivadas, por 24 horas, com LPS ou antígeno de *L. braziliensis*. Não foram observadas diferenças significantes entre o número de células dos animais WT ou IL-32γTg, tratados ou não com β-glucana (Fig. 7A). Como a IL-1β é produzida por monócitos após estimulação com LPS, mas não por macrófagos (Netea et al. 2009), enquanto o TNF-α é produzido por ambas as células (Jang et al. 2006), estas citocinas foram incluídas nos experimentos.

Nos animais WT, o treinamento com β-glucana induziu um aumento significante na produção de TNF-α em resposta ao Ag (WT-PBS: 57 ± 16 pg/mL *vs* WT-β-glucana: 94 ± 10 pg/mL, $p < 0,05$; Fig. 7B) e de IL-1β em reposta ao LPS (WT-PBS: 14 ± 1,19 pg/mL *vs* WT-β-glucana: 20 ± 0,79 pg/mL, $p < 0,05$; Fig. 7D). Por outro lado, nos animais IL-32γTg, o treinamento com β-glucana não aumentou a resposta ao Ag e diminuiu a resposta ao LPS (IL-32γTg-PBS: 70 ± 4,35 pg/mL *vs* IL-32γTg-β-glucana: 34 ± 13 pg/mL, $p < 0,05$; Fig. 7C). Para IL-1β, o treinamento com β-glucana levou a um aumento significante de sua produção, tanto após estimulação com LPS (IL-32γTg-PBS: 9 ± 1,19 pg/mL *vs* IL-32γTg-β-glucana: 13 ± 1,25 pg/mL, $p < 0,05$; Fig. 7E) quanto com Ag (IL-32γTg-PBS: 7,4 ± 0,54 pg/mL *vs* IL-32γTg-β-glucana: 10 ± 0,39 pg/mL, $p < 0,05$; Fig. 7E). Pode-se ressaltar que a injeção de β-glucana aumentou a produção de IL-1β (Meio) nas culturas das células da medula óssea de ambos os grupos WT (Fig. 7D) ou IL-32γTg (IL-32γTg-PBS: 6,8 ± 0,14 pg/mL *vs* IL-32γTg-β-glucana: 10,8 ± 1,85 pg/mL, $p < 0,05$; Fig. 7E).

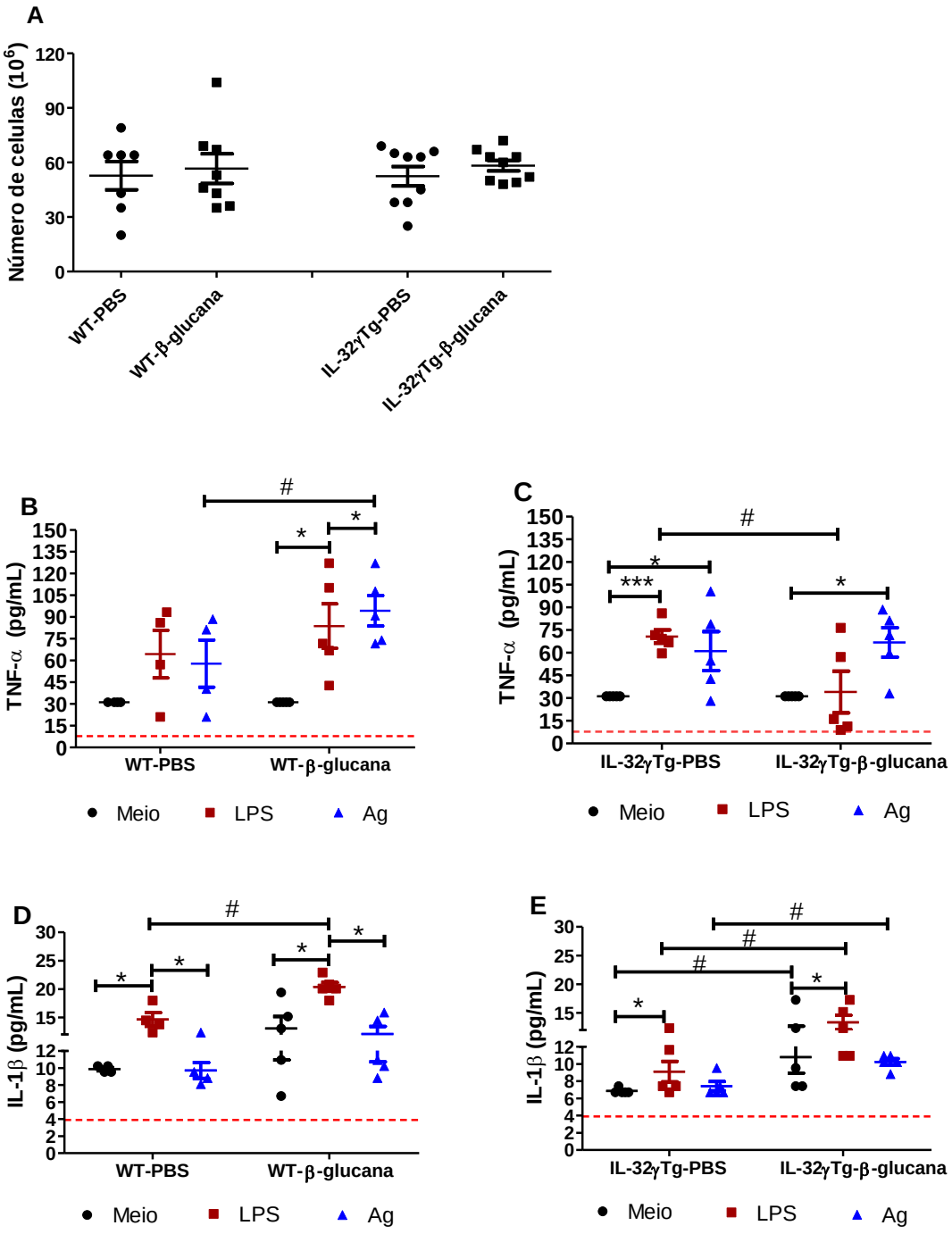


Figura 7. β-glucana induz um aumento na produção de IL-1β por células de medula óssea de camundongos selvagens ou transgênicos para IL-32γ humana. Os camundongos selvagens (WT) e os transgênicos para IL-32γ (IL-32γTg) foram tratados ou não com β-glucana (1 mg; i.p.). Após 7 dias, os animais foram eutanasiados e as células da medula óssea foram retiradas, quantificadas e cultivadas (1 x 10^6 células/mL), por 24 horas, na ausência de estímulo (Meio) ou na presença de antígenos de *L. braziliensis* (Ag) ou lipopolissacarídeo (LPS). O sobrenadante foi usado para dosagem de TNF-α e IL-1β, por ELISA. A: Número de células da medula óssea (10^6) dos camundongos WT e IL-32γTg, tratados ou não com β-glucana. Os resultados representam a média ± EPM, de 7 a 9 animais por grupo, em dois experimentos independentes. Quantidade de TNF-α (B e C) e IL-1β (D e E) em picogramas/mL em camundongos WT e IL-32γTg. Os resultados representam a média ± EPM, de 4 ou 5 animais por grupo, em um experimento. Linha pontilhada vermelha: limite de detecção das citocinas (7,8 pg/mL para TNF-α e 3,9 pg/mL para IL-1β). *p < 0,05 (Meio *vs* LPS, Meio *vs* Ag e LPS *vs* Ag); ***p < 0,001 (Meio *vs* LPS); # p < 0,05 (PBS vs β-glucana).

5.1.5 Avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida de macrófagos derivados de precursores da medula óssea dos camundongos selvagens ou transgênicos para IL-32γ humana uma semana após o tratamento com β-glucana.

Para avaliar se o tratamento com β-glucana exerce efeitos sobre a atividade fagocitária e/ou leishmanicida de macrófagos derivados de precursores de monócitos/macrófagos da medula óssea, camundongos WT ou IL-32γTg, uma semana após o tratamento com β-glucana foram eutanasiados e as células da medula óssea foram retiradas e os macrófagos, derivados por 8 dias. Posteriormente, essas células foram infectadas com *L. braziliensis* e após 4 horas e 48 horas de infecção foram avaliados o número de parasitos por células infectadas, a porcentagem de macrófagos infectados e a porcentagem de inibição do crescimento de parasitos (Fig. 8).

Ao avaliar a porcentagem de macrófagos infectados e o número de parasitos por célula após 4 horas de infecção, observa-se que os macrófagos de camundongos IL-32γTg apresentam maior capacidade fagocitária do que os macrófagos de camundongos WT, sendo esta atividade um pouco maior nos macrófagos dos camundongos IL-32γTg tratados com β-glucana (IL-32γTg-β-glucana: 53% de macrófagos infectados *vs* WT-β-glucana: 33,5% de macrófagos infectados; $p < 0,05$; Fig. 8A e 8B). Entretanto, os experimentos mostram que os macrófagos, independentemente de sua origem, controlam a infecção, havendo redução da porcentagem de células infectadas de 4 h para 48 h (Fig. 8C; $p < 0,05$) e do número de parasitos, embora não tenha atingido significância estatística (Fig. 8D). Este controle independe do treinamento *in vivo* com a β-glucana. Porque a presença de IL-32 e o treinamento com β-glucana aumentaram a fagocitose, foi calculado o índice de inibição do crescimento dos parasitos (ou morte dos parasitos) nos macrófagos de 48h/4h. Os dados mostrados nas Figuras 8E e 8F indicam que não há diferenças significantes entre os grupos de animais em relação ao controle da infecção, independentemente do treinamento com β-glucana *in vivo*.

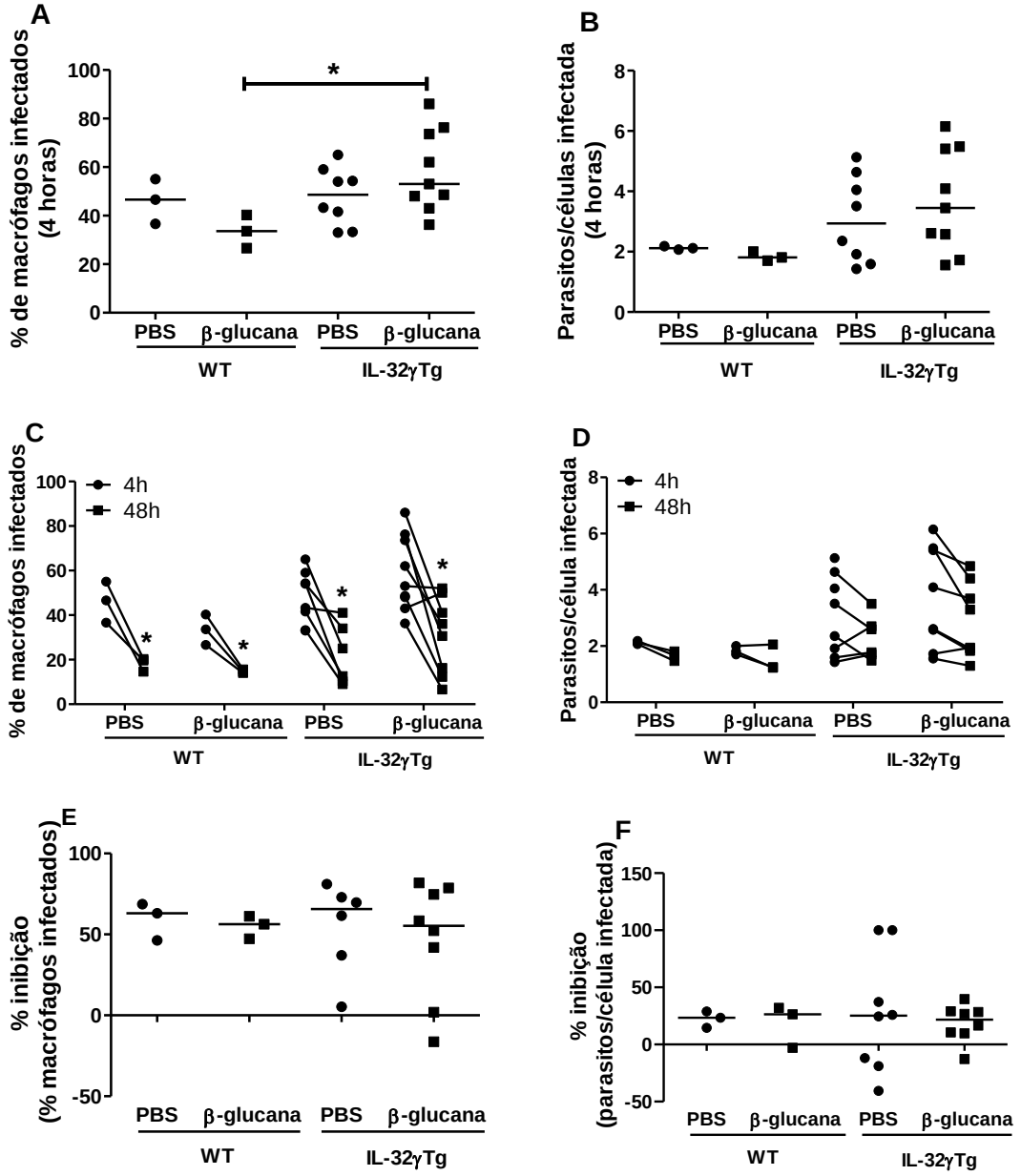


Figura 8. Tratamento *in vivo* com uma única dose de β-glucana não altera a capacidade leishmanicida dos macrófagos infectados com *Leishmania braziliensis in vitro*. Os camundongos selvagens (WT) e os transgênicos para IL-32γ (IL-32γTg) foram tratados ou não com β-glucana (1 mg). Após 7 dias, os animais foram eutanasiados e as células da medula óssea foram retiradas. Após 8 dias de cultura para diferenciação para macrófagos, as células foram lavadas com PBS 1x, centrifugadas, plaqueadas (2 x 10^5 células/poço) em placas de 24 poços e infectadas com promastigotas de *L. braziliensis* (5 parasitos/célula). Após 4 horas, os parasitas não internalizados foram lavados e as células foram incubadas durante 48 horas. Após 48 horas de infecção o meio foi retirado e as células foram lavadas. Células, após 4 e 48 horas de infecção, foram coradas e a porcentagem de macrófagos infectados, o número de parasitas por células infectadas e o índice de inibição foram avaliados. A: porcentagem de macrófagos infectados em 4 horas de infecção. B: número de parasitos por célula infectada em 4 horas de infeção. C: porcentagem de macrófagos infectadas de 4 para 48 horas. D: número de parasitos por célula infectada de 4 para 48 horas. E: porcentagem de inibição em porcentagem de macrófagos infectados (48h/4h). F: porcentagem de inibição em número de parasitos por célula infectada (48h/4h). Os resultados representam a mediana e os resultados individuais de 3, 8 ou 9 animais por grupo, em um experimento para WT e dois experimentos independentes para IL-32γTg. * p <0,05 (IL-32γTg-β-glucana *vs* WT-β-glucana; 4 horas vs 48 horas).

5.2. Resultados com inóculo de 10^6 parasitos

Para investigar se as discordâncias entre alguns dos resultados dos experimentos e a variação entre os mesmos poderiam ser devido ao inóculo de parasitos e/ou à preparação e injeção da β-glucana nos animais, novos experimentos foram realizados, utilizando uma maior quantidade de parasitos (1 x 10^6 parasitos /animal). Além disso, a β-glucana foi preparada em um volume maior de PBS (400 μL) e foi usada uma agulha de maior calibre, para facilitar a injeção no animal, já que a β-glucana não é totalmente solúvel e apresenta aspecto viscoso em solução aquosa. Foram avaliados apenas os aspectos mais relevantes para a definição dos efeitos do treinamento com β-glucana no curso da infecção.

5.2.1. Curso da lesão causada pela infecção por *Leishmania braziliensis* e carga parasitária nas lesões dos camundongos selvagens ou transgênicos para o gene da IL-32γ humana, após tratamento com β-glucana.

Os camundongos C57BL/6 WT e IL-32γTg foram tratados ou não com β-glucana e após sete dias foram infectados. O curso da lesão nos animais WT tratados com PBS atingiu um pico na 5ª semana após a infecção. Os animais, tratados com β-glucana, apresentaram um menor tamanho da lesão, a partir da 5ª semana de infecção, ao serem comparados com os animais que receberam PBS (WT-PBS: 1,55 ± 0,18 mm *vs* WT-β-glucana: 1,15 ± 0,11 mm, $p < 0,05$; Fig. 9A). Após 8 semanas de infecção, houve uma redução entre as cargas parasitárias detectadas nas lesões cutâneas destes dois grupos, embora sem significância estatística devido ao baixo número de animais avaliados (Fig. 9D).

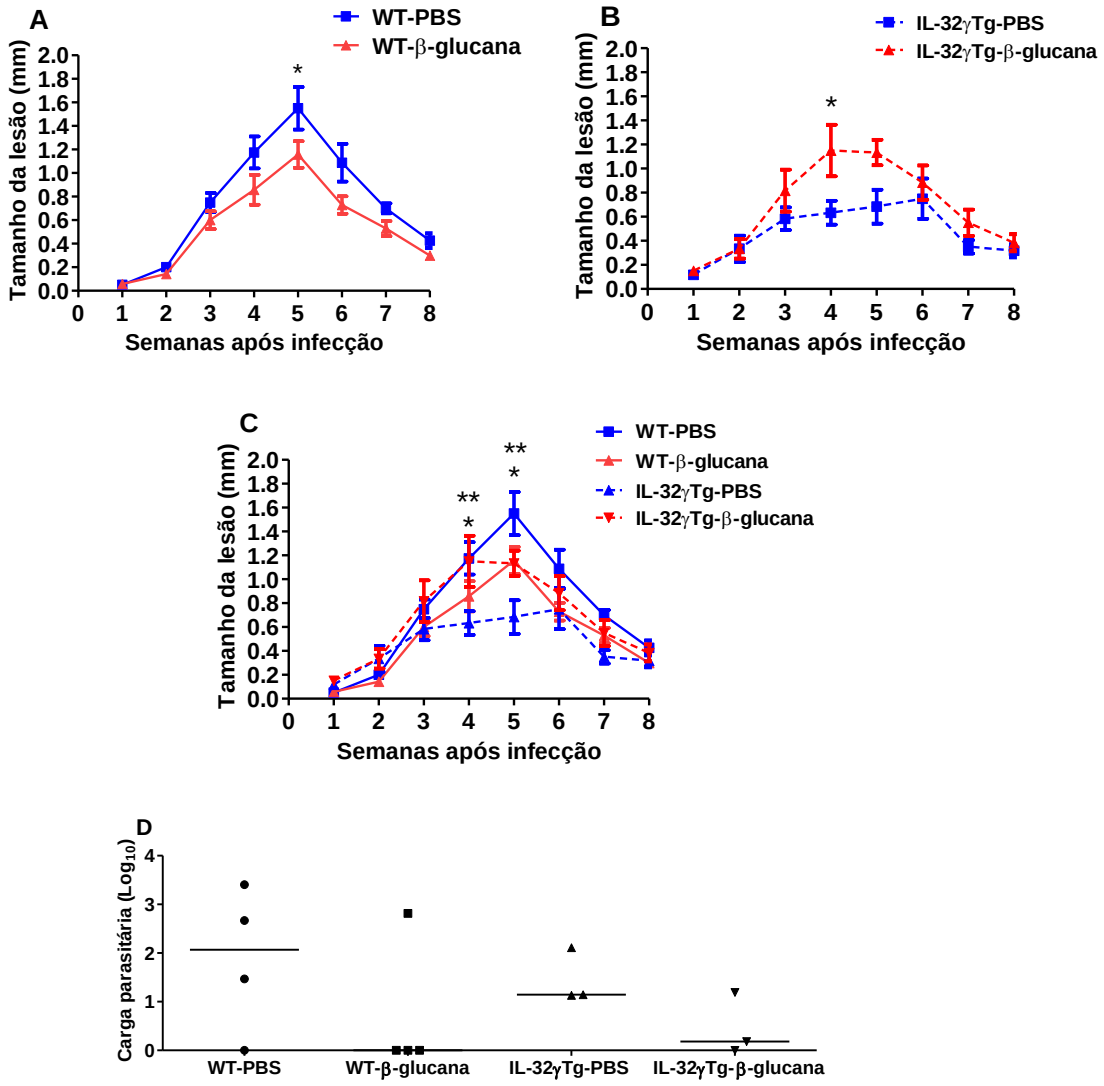


Figura 9. Tratamento com β-glucana antes da infecção com inóculo maior de *Leishmania braziliensis* também induz mais rápido o desenvolvimento da lesão e diminui a carga parasitária após 8 semanas de infecção em animais transgênicos para IL-32γ humana. Os camundongos selvagens (WT) e os transgênicos para IL-32γ (IL-32γTg) foram tratados com salina (PBS) ou β-glucana (1 mg; i.p.) e após 7 dias foram infectados com 1 x 10^6 formas promastigotas de *L. braziliensis*, i. d., na pata traseira. A (WT), B (IL-32γTg) e C (WT e IL-32γTg): O tamanho da lesão (mm) foi mensurado semanalmente, durante 8 semanas, sendo representado pela diferença entre a espessura da pata infectada e a espessura da pata não infectada (mm). Resultados representam a média ± EPM, de 6 a 8 animais por grupo (dois experimentos independentes). *p < 0,05 (WT-PBS *vs* WT-β-glucana e IL-32γTg-β-glucana, 5 semanas; IL-32γTg-β-glucana *vs* IL-32γTg-PBS, 4 semanas); **p < 0,01 (WT-PBS *vs* IL-32γTg-PBS, 4 e 5 semanas). D: A carga parasitária da pata infectada foi determinada pela técnica de diluição limitante, após 8 semanas de infecção. Os dados representam a mediana e os resultados individuais de 3 a 4 animais por grupo, em um experimento.

Os camundongos IL-32γTg apresentaram um pico de lesão entre a 4ª e 5º semana de infecção, sendo que na 4ª semana os animais IL-32γTg tratados com β-glucana apresentaram uma lesão significantemente maior do que a dos animais IL-32γTg não tratados (IL-32γTg-β-glucana: 1,15 ± 0,21 mm *vs* IL-32γTg-PBS: 0,63 ± 0,09 mm, $p < 0,05$; Fig. 9B). Após 4 e 5 semanas de infecção, os animais WT tratados com PBS apresentaram um tamanho de lesão significantemente maior que o dos animais IL-32γTg tratados com PBS ($p < 0,01$; Fig. 9C) e na 5ª semana, apresentaram tamanhos de lesão maiores do que os dos animais IL-32γTg tratados com (WT-PBS vs IL-32γTg-β-glucana, $p < 0,05$; Fig. 9C). A partir da 6ª semana de infecção todos os grupos iniciaram a regressão da lesão de modo similar (Fig. 9C). Após 8 semanas de infecção, os camundongos IL-32γTg tratados com β-glucana apresentaram uma menor carga parasitária em comparação aos animais que receberam somente PBS, entretanto, sem diferenças estatisticamente significantes (Fig. 9D).

5.2.2. Quantificação das citocinas IL-32γ e TNF-α presentes na lesão da pata e dos níveis de IFNγ produzido por células dos linfonodos drenantes das lesões dos camundongos selvagens ou transgênicos para o gene da IL-32γ humana infectados com *Leishmania braziliensis,* tratados previamente com β-glucana.

A quantidade de IL-32γ e TNF-α foi mensurada, por ELISA, no homogeneizado da pata infectada dos camundongos WT e IL-32γTg, após 8 semanas de infecção, referentes aos experimentos apresentados na Figura 9. Não foram observadas diferenças significantes entre a produção de IL-32γ de animais tratados ou não tratados com β-glucana (Fig. 10A). Resultados similares foram observados para a produção de TNF-α ao serem comparados animais WT ou IL-32γTg (Fig.10B).

A produção de IFNγ por células do linfonodo drenante da lesão dos camundongos WT e IL-32γTg, após 8 semanas de infecção, referentes aos dados mostrados na Fig. 9, foi avaliada no sobrenadante após 48 h de cultura celular. Não foram observadas diferenças significantes entre a produção de IFNγ induzida por ConA ou por Ag, nos grupos de camundongos WT (Fig. 10C) ou IL-32γTg (Fig. 10D), tratados ou não com β-glucana.

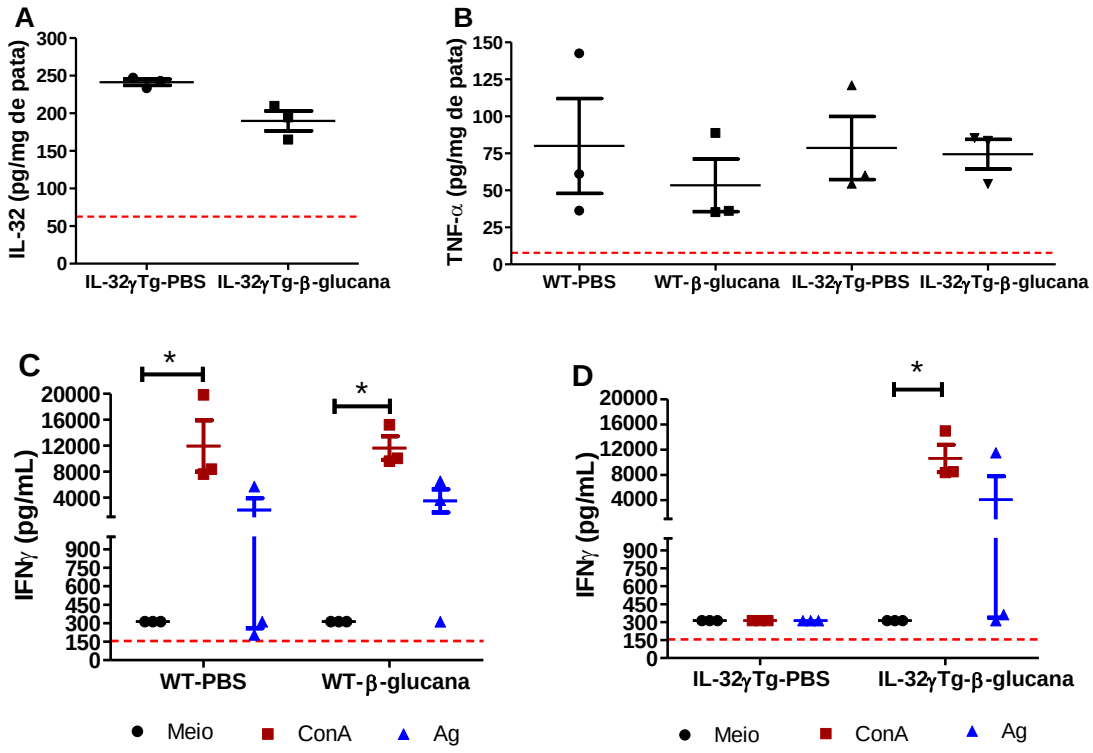


Figura 10. Tratamento com β-glucana não altera a produção de IL-32γ ou TNF-α nas lesões, nem a produção de IFNγ pelas células do linfonodo drenante da lesão dos camundongos selvagens ou transgênicos para IL-32γ humana, após 8 semanas de infecção com inóculo maior de *Leishmania braziliensis*. Os camundongos selvagens (WT) e os transgênicos para IL-32γ (IL-32γTg) foram tratados com PBS ou β-glucana (1 mg; i.p.) e após 7 dias foram infectados com 1 x 10^6 formas promastigotas de *L. braziliensis*, i.d., na pata traseira. Após 8 semanas de infecção, as patas infectadas foram maceradas e o homogeneizado, usado para dosagem de citocinas pela técnica ELISA. A: quantidade de IL-32γ em picogramas/miligrama de tecido; B: quantidade de TNF-α em picogramas/grama de tecido. Os resultados representam a média ± EPM (n = 3 animais por grupo, em um experimento). Após 8 semanas de infecção, o linfonodo drenante foi retirado e as células (5 x 10^6 células/mL) foram cultivadas, por 48 horas, na ausência de estímulo (Meio) ou na presença de antígenos de *L. braziliensis* (Ag) ou Concanavalina A (ConA). O sobrenadante foi usado para dosagem de IFNγ, por ELISA. Quantidade de IFNγ em picogramas/mL em camundongos WT (C) ou IL-32γTg (D). Os resultados representam a média ± EPM (n = 3 animais por grupo, em um experimento). Linha pontilhada vermelha: limite de detecção das citocinas (62,5 pg/mL para IL-32, 7,8 pg/mL para TNF-α e 156 pg/mL para IFNγ). *p < 0,05 (Meio *vs* LPS).

6. DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho mostraram que o tratamento, intraperitoneal, com β-glucana de parede de cevada pode aumentar a proteção contra a infecção murina por *L. braziliensis* em camundongos transgênicos para IL-32γ humana, especialmente em um modelo de baixo inóculo de parasitos. Os resultados sugerem que a β-glucana é capaz de induzir imunidade treinada, como descrito anteriormente, podendo causar alterações epigenéticas em monócitos/macrófagos (Quintin et al. 2012; Saeed et al. 2014), pois conferiu proteção não específica contra um patógeno após semanas de infecção.

Ao avaliar o curso da lesão, durante 8 semanas de infecção com baixo inóculo de parasitos, observou-se que os camundongos IL-32γTg apresentaram um pico mais precoce da lesão em comparação com os WT. Que a presença da IL-32γ nos animais causa um aumento da lesão nas semanas iniciais da infecção, foi demonstrado por Gomes et al. (2017), usando um modelo de infecção de camundongos IL-32γTg, intradermicamente infectados nas orelhas, com a mesma cepa de *L. braziliensis* e mesmo inóculo usados no presente estudo. Aqui, o pico da lesão foi ainda mais rápido nos animais IL-32γTg que foram tratados com β-glucana antes da infecção, sugerindo que este tratamento acentua os efeitos da IL-32γ no processo da infecção. Este aumento da lesão foi associado a um aumento na carga parasitária na 3ª semana de infecção, primariamente devido à presença da IL-32γ, não havendo alteração significante na presença do tratamento com β-glucana. Porém, o tratamento com β-glucana aumentou o processo inflamatório nos animais IL-32γTg, sugerindo que a β-glucana e a IL-32γ contribuem para o desenvolvimento do processo inflamatório que aumenta o tamanho da lesão no início da infecção.

A IL-32γ é uma citocina pro-inflamatória que tem sido descrita em processos inflamatórios em doenças autoimunes, como a artrite reumatoide (Joosten et al. 2006), bem como em doenças inflamatórias crônicas infecciosas, tais como a hanseníase (Schenk et al. 2012), tuberculose (Netea et al. 2006; Bai et al. 2010) e leishmaniose (Galdino Jr et al. 214; dos Santos et al. 2017a). Estudos têm mostrado que a β-glucana

possui propriedades imunomoduladoras, sendo capaz de induzir a produção de citocinas pro-inflamatórias, tais como IL-6, TNF-α (Li et al. 2007) e IL-1β (Abel & Czob, 1992; Elder et al. 2017), as quais podem contribuir para o processo inflamatório (Feghali et al. 1997). Os dados do presente estudo sugerem, portanto, que a β-glucana acelerou o desenvolvimento da lesão por aumentar o processo inflamatório que pode ser amplificado pela IL-32γ.

Apesar dos animais IL-32γTg tratados com β-glucana apresentarem uma maior lesão na 3ª semana de infecção, após 8 semanas de infecção foi observada uma menor lesão nesse grupo, associada a uma menor carga parasitária. O processo inflamatório regrediu um pouco nestes animais treinados, mas ainda foi similar ao de animais IL-32γTg não tratados com β-glucana, sugerindo um papel da IL-32γ na manutenção do processo inflamatório. Esta manutenção do processo inflamatório maior pode mascarar o controle da infecção avaliado pela mensuração do tamanho da lesão na 8ª semana de infecção nos animais IL-32γTg. Esses resultados sugerem que o maior tamanho da lesão na 3ª semana de infecção nos animais IL-32γTg tratados com β-glucana pode ser explicado por um processo inflamatório mais intenso na pata desses animais, que pode contribuir para iniciar o controle da infecção, reduzindo o número de parasitos na 8ª semana de infecção.

Moléculas pro-inflamatórias como a IL-32γ podem contribuir para o controle de agentes infecciosos induzindo a produção de moléculas microbicidas. É conhecido que a IL-32γ induz a via de ativação da vitamina D, levando à produção de peptídeos antimicrobianos (Montoya et al. 2014). Os peptídeos antimicrobianos detectados em seres humanos após a ativação da via da vitamina D são a β-defensina 2 e catelicidina (Montoya et al. 2014) e parecem importantes para o controle da infecção por *L. braziliensis* em macrófagos humanos (dos Santos et al., submetido, Anexo 2). Já foram identificados os peptídeos antimicrobianos β-defensina 2 (Morrison et al. 1999; Yang et al. 2007) e catelicidina (Pestonjamasp et al. 2001) homólogos aos de humanos em camundongos e, foi demonstrado a importância da catelicidina murina no controle da infecção por *L. major* e *L. amazonensis* (Kulkarni et al. 2011), no entanto, ainda não há informações sobre o papel da β-defensina 2 murina na leishmaniose. Além disso, a vitamina D não parece ser eficaz na proteção contra *Leishmania* (Ehrchen et al. 2007).

Outra forma da IL-32γ poder levar à produção de moléculas microbicidas é induzir a produção de TNF (Kim et al. 2005; Shoda et al. 2006; Galdino Jr et al. 2014),

o qual é capaz de induzir a produção de ROS e NO em roedores, importantes para o controle de *Leishmania* sp. (Liew et al. 1990; Fonseca et al. 2003). Anteriormente, nosso grupo demonstrou uma correlação positiva entre a expressão de IL-32 e de TNF em lesões mucosas de pacientes com LM (Galdino Jr *et al*. 2014). No presente estudo, no entanto, a presença de IL-32γ não aumentou a produção de TNF nas lesões de 8 semanas de infecção, entretanto, será necessário avaliar ainda a produção de TNF nas amostras de 3 semanas de infecção dos animais WT, as quais estão armazenadas para realizar a dosagem. Essa avaliação será importante para quantificar a produção dessa citocina na ausência e presença de IL-32 no início da infecção, pois podemos especular que a produção de TNF nas lesões dos animais IL-32γTg aumente com 3 semanas de infecção, comparado aos animais WT, mas que os níveis dessa citocina já tenha declinado de maneira similar em todos os grupos ao final de 8 semanas de infecção.

A β-glucana aumentou o processo inflamatório nos animais contendo IL-32γ, contribuindo para o melhor controle dos parasitos. Sabe-se que a estimulação de monócitos/macrófagos com β-glucana leva a um aumento de TNF-α (Li et al. 2007) e IL-1β (Abel & Czob, 1992). Li et al. (2007) demonstrou que a produção de citocinas pro-inflamatórias induzidas por β-glucana é dependente da via de sinalização SyK quinase e parcialmente dependente da via MyD88. Sabe-se que a β-glucana pode ser reconhecido por dectina-1 e tal reconhecimento pode levar a sua fagocitose e ativação da via de sinalização SyK quinase e, consequente produção de ROS e ativação do inflamassoma NLRP3, através do qual ocorre a liberação de IL-1β bioativa, citocina importante em um processo infamatório. O reconhecimento de β-glucana por TLR2/6, com subsequente ativação da via MyD88 também pode induzir a produção de algumas citocinas pro-inflamatória (Li et al. 2007; Batbayar et al. 2012; Elder et al. 2017). Lima-Junior et al. (2017) demonstraram que a ativação de dectina-1 durante a fagocitose de *L. amazonensis* induz a ativação do inflamassoma NLRP3 via sinalização SyK quinase e que isso é importante para o controle da replicação do parasito. Assim, é possível que a β-glucana seja capaz de auxiliar no controle da infeção por *Leishmania* através da ativação dessa via de sinalização.

O tratamento com β-glucana também é capaz de aumentar a ativação de células NK (Yatawara et al. 2009), as quais são a principal fonte de INFγ durante a resposta imune inata (Bogdan et al. 2000a). Assim, como o INFγ (Bogdan et al. 2000a; Bogdan et al. 2000b) e o TNF (Liew et al. 1990; Fonseca et al. 2003) são citocinas importantes

para induzir a produção de NO e ROS, pelos macrófagos, a β-glucana poderia auxiliar no controle do parasito através da indução desses mecanismos microbicidas. No modelo murino, o NO exerce um importante papel leishmanicida (MuKbel et al. 2007), desse modo, avaliamos a produção desse molécula no sobrenadante da cultura de células do linfonodo drenante da lesão. Entretanto, não foram observadas diferenças significantes entre a produção de NO pelas células dos animais WT e IL-32γTg, tratados ou não com β-glucana, após 8 semanas de infecção (dados não mostrado). Nosso grupo demonstrou, recentemente, que em monócitos humanos, o treinamento com β-glucana também não alterou a produção de NO (Dos Santos et al., submetido à publicação, Anexo 2). Estes resultados estão de acordo com os de Bekkering et al. (2016), os quais mostraram que não há diferenças entre a produção de ROS e NO pelas células treinadas com β-glucana e células não treinadas. Esses dados sugerem que os efeitos microbicidas mediados pela β-glucana tanto em murinos quanto em humanos provavelmente são independentes de NO. Mais estudos precisam ser realizados para elucidar as principais moléculas microbicidas envolvidas no controle do parasitismo nos camundongos IL-32γTg tratados com β-glucana.

O promotor de β-actina de galinha é usado para promover a expressão do gene da IL-32γ humana no modelo transgênico, para expressão da citocina em todos os tecidos (Choi et al. 2010). Não é conhecido como este promotor poderia ser regulado durante a infecção por *L. infantum*, mas foi mostrado que durante a infecção por este parasito, há um aumento na produção de IL-32 (Gomes et al. 2018). Assim, o tratamento com β-glucana nos animais IL-32γTg poderia aumentar a produção de IL-32γ durante a infecção por *L. braziliensis*, no entanto, isto não foi observado no presente estudo. Aqui, não houve diferença significante entre a produção de IL-32 nas lesões dos animais IL-32γTg tratados ou não com β-glucana. Assim, os dados sugerem que os efeitos da β-glucana são mediados em conjunto com os níveis basais de IL-32γ presente nos animais transgênicos, após infecção com *L. braziliensis*, tanto após 3 quanto 8 semanas de infecção. Em seres humanos, estamos demonstrando que a β-glucana induz a produção de IL-32γ em monócitos/macrófagos humanos e aumenta a atividade microbicida destas células (dos Santos et al., submetido, Anexo 2). Adicionalmente, não foi observada diferença significante entre a produção de TNF-α nos camundongos IL-32γTg tratados ou não tratados com β-glucana, após 3 ou 8 semanas de infecção.

Ressalta-se que após 3 semanas de infecção, as quantidades de IL-32γ detectadas no tecido foram mais baixas do que aquelas detectadas em alguns animais após 8 semanas de infeção. Foi especulado que pudesse haver uma diferença entre 3 e 8 semanas de infecção em relação à quantidade desta citocina no tecido conforme a idade dos animais transgênicos. Entretanto, foi realizado um experimento (dados não mostrados), no qual os animais foram infectados com 16 semanas de idade e não foi observada uma maior quantidade de IL-32 nas lesões ao final de 8 semanas de infecção, em comparação com as quantidades encontradas nos animais que haviam sido infectados com 8 semanas de idade. Desse modo, a idade dos animais parece não ser um fator determinante para explicar as diferenças na produção de IL-32 pelos animais IL-32γ nos diferentes tempos.

Para eliminação eficiente de *Leishmania* sp. é necessário que os macrófagos infectados sejam ativados adequadamente e a citocinas INFγ, produzida durante a resposta imune inata principalmente por células NK, e durante a resposta imune adaptativa por células Th1, é muito importante para essa ativação (Bogdan et al. 2000a; Woelbing et al. 2006). Desse modo, no presente estudo, foi avaliada a produção de INFγ pelas células do linfonodo drenante da lesão dos camundongos WT e IL-32γTg infectados, tratados ou não com β-glucana. Nos animais WT, após 3 semanas de infecção, ambos os estímulos, ConA e Ag, induziram a produção de IFNγ pelas células do linfonodo. Entretanto, não foram observadas diferenças significantes entre a produção de IFNγ em camundongos tratados ou não com β-glucana. Por outro lado, o tratamento com β-glucana aumentou a produção de IFNγ em resposta a Ag em células do linfonodo drenante da lesão dos camundongos IL-32γTg, após 3 semanas de infecção e, ao contrário do observado em animais WT, essa produção foi persistente até a 8ª semana de infecção em resposta aos estímulos ConA ou Ag. A resposta imune adquirida à *L. braziliensis* cai após algumas semanas de infecção, com a regressão da lesão, o que pode ser observado aqui nos camundongos WT e foi também demonstrado por Gomes et al. (2017). No entanto, no presente estudo, nos animais IL-32γTg não houve uma queda significante da resposta ao Ag (ou mesmo ao mitógeno ConA) entre 3 e 8 semanas de infecção, sendo mantidos os níveis de IFNγ durante o processo infeccioso. Os dados indicam que além da IL-32γ, a β-glucana parece auxiliar na manutenção desta resposta imune. Desse modo, os resultados sugerem que a β-glucana pode ter ativado macrófagos e células dendríticas, melhorando a apresentação de antígenos, induzindo

uma resposta imune de perfil Th1, que foi importante para o controle da infecção por *L. braziliensis*. Esses dados acrescentam ao papel da β-glucana no treinamento inato, um papel adjuvante, para melhorar a resposta imune adquirida.

O efeito adjuvante da β-glucana foi demonstrado por Obaid et al. (1989), ao realizarem imunização intraperitonal de hamsters com antígenos de *Leishmania* associados à β-glucana de fungo e subsequente desafio com *L. donovani*. Este esquema de imunização com β-glucana resultou em melhor controle da infeção, associado à diminuição da carga parasitária no fígado e no baço, diminuição das alterações histopatológicas nesses órgãos e aumento dos títulos de anticorpos, em comparação aos animais imunizados apenas com antígenos de *Leishmania.* Os autores desse trabalho chamaram atenção para o papel da β-glucana como adjuvante para melhorar a resposta imune adquirida e não há evidências de que a β-glucana tenha induzido imunidade treinada nas células desses animais, entretanto, podemos especular que o controle da infecção tenha sido resultado de um treinamento inato, seguido do desenvolvimento de uma melhor reposta imune adaptativa (Obaid et al. 1989). Além disso, Yatawara et al. (2009) mostraram o potencial da utilização de β-glucana como tratamento durante a infecção de camundongos C57BL/6 por *L. amazonensis*. Neste estudo, foi demonstrado que a suplementação via oral com β-glucana de fungo é capaz de melhorar a atividade de células NK, avaliada em porcentagem de citotoxicidade, diminuir o tamanho da lesão na pata dos animais infectados e aumentar os níveis séricos de INFγ, em comparação aos animais não tratados, (Yatawara et al. 2009). É possível, portanto, que a β-glucana exerça funções tanto em mecanimos que geram imunidade treinada, como na resposta imune adquirida, auxiliando no desenvolvimento de um contínuo de memória que garanta o controle da infecção por *L. braziliensis*.

Recentemente, Mitroulis et al. (2018) mostraram que, além de causar mudanças funcionais em células mieloides maduras na periferia, a imunidade treinada também está relacionada à modulação de progenitores mieloides da medula óssea. Foi mostrado que o tratamento com β-glucana leva a um aumento do número de progenitores mieloides e induz imunidade treinada nestas células. Esse treinamento foi associada às mudanças na transcrição de genes relacionados à vias metabólicas, tais como glicólise e metabolismo de colesterol (Mitroulis et al. 2018), às quais já haviam sido observadas durante o treinamento de células maduras da periferia (Cheng et al. 2014). Além disso, Mitroulis et al. (2018) mostrou que houve um aumentou nos níveis de IL-1β no fluido extracelular

da medula óssea dos camundongos, 24 após a injeção de β-glucana. Já foi demonstrado que a β-glucana é capaz de induzir a produção de IL-1β e TNF-α em monócitos humanos (Abel et al. 1992) e que IL-1β induz a produção de IL-32 (Nold-Petry et al. 2009). Desse modo, avaliamos o número de progenitores da medula óssea e a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-1β por essas células em camundongos WT e IL-32γTg, uma semana após o tratamento com β-glucana. Os animais WT não apresentaram o aumento de células da medula óssea, após tratamento com β-glucana, diferente do que foi demonstrado por Mitroulis et al. (2018) e resultados similares foram obtidos com os animais IL-32γTg.

Vários estudos têm mostrado que a heterogeneidade das β-glucanas (a solubilidade, o tamanho, estrutura e grau de ramificação) podem resultar em respostas imunes distintas (Li et al. 2007; Chanput et al. 2012; Elder et al. 2017; Ishimoto et al. 2017). Desse modo, uma vez que foi utilizada a mesma linhagem de camundongos selvagens e a mesma dose de β-glucana, injetada também por via intraperitoneal, as discordâncias entre os resultados podem ser devido ao uso de β-glucanas diferentes nos dois trabalhos, isto é, no presente trabalho foi utilizada uma β-glucana de cevada, enquanto Mitroulis et al. (2018) utilizaram uma derivada de fungo. As β-glucanas de aveia e cevada, são principalmente lineares, com grandes regiões de ligações β (1,4) separadas por trechos mais curtos de ligações β (1,3). Já as β-glucanas de fungo, geralmente têm ramificações curtas de ligações β (1,6) que saem da cadeia principal com ligações β (1,3) (Yan et al. 2005). Foi relatado que destas ligações, apenas a ligação β(1,3) estimula o sistema imune e apresenta atividade antitumoral (Batbayar et al. 2012) e que β-glucanas com um maior grau de complexidade estrutural induz efeitos imunomoduladores e anticancerígenos mais potentes (Batbayar et al. 2012). Goodridge et al. (2011) propuseram que a sinalização de dectina-1 é ativada apenas por β-glucanas não solúveis. Entretanto, existem controvérsias e há estudos que mostram a atividade imunomoduladora de β-glucanas solúveis (Batbayar et al. 2012).

Em camundongos WT, o tratamento com β-glucana induziu um aumento significante na produção de TNF-α em resposta a Ag e de IL-1β, em reposta ao LPS. Entretanto, nos animais IL-32γTg, o treinamento com β-glucana não alterou significantemente a produção de TNF-α em resposta ao Ag e diminuiu esta produção em resposta ao LPS. Para IL-1β, o treinamento com β-glucana levou a um aumento

significante de sua produção nos animais IL-32γTg, tanto após estimulação com LPS quanto com Ag. Desse modo, os dados sugerem que a injeção de β-glucana aumenta a produção de IL-1β em precursores da medula óssea de ambos os grupos de animais WT ou IL-32γTg. Christ et al. (2018) sugeriram que IL-1β é, provavelmente, um mediador endógeno importante dos mecanismos envolvidos na indução de imunidade treinada mediada por β-glucana em camundongos. Além disso, nosso grupo demonstrou, recentemente, que em monócitos humanos, o treinamento com β-glucana induz aumento da expressão de IL-32 de maneira dependente de IL-1β (dos Santos et al., submetido à publicação, Anexo 2). Portanto, pode ser sugerida uma associação entre IL-1β e IL-32 mediando os efeitos da β-glucana nos animais IL-32γTg do presente estudo. Entretanto, mais experimentos precisam ser realizados para melhor elucidação da associação entre essas duas citocinas durante a indução de imunidade treinada, no contexto da leishmaniose, uma vez que estudos têm demonstrado que ambas as citocinas são importantes para o controle da infecção por *Leishmania* (Lima-Junior et al. 2013; dos Santos et al. 2017a; Gomes et al. 2017). Os dados do presente estudo mostram que a β-glucana é capaz de provocar alterações nas respostas dos precursores a estímulos não relacionados, como o LPS e Ag de *L. braziliensis*, uma semana após o tratamento, sugerindo um provável treinamento inato.

No presente estudo, os precursores da medula óssea foram treinados com β-glucana *in vivo* e após uma semana foram derivados *in vitro* para macrófagos. Foi avaliado se o tratamento com β-glucana seria capaz de exercer efeitos sobre a atividade fagocitária e/ou leishmanicida destes macrófagos de camundongos WT ou IL-32γTg. Observou-se que os macrófagos de camundongos IL-32γTg apresentaram maior capacidade fagocitária do que os macrófagos de camundongos WT, sendo esta atividade um pouco maior nos macrófagos dos camundongos IL-32γTg tratados com β-glucana. Entretanto, independentemente de sua origem, os macrófagos controlaram a infecção, havendo redução da porcentagem de células infectadas de 4 h para 48 h e do número de parasitos.

Como a presença de IL-32 e o treinamento com β-glucana aumentaram a fagocitose, calculou-se o índice de inibição de crescimento dos parasitos nos macrófagos de 48h/4h. Mais uma vez, não houve diferenças significantes entre os grupos de animais em relação ao controle da infecção, indicando que apesar de haver mais células infectadas e com mais parasitos nos animais IL-32γTg tratados com β-

glucana, a capacidade de controlar estes parasitos é similar entre camundongos WT ou IL-32γTg independentemente do tratamento com β-glucana. O aumento da fagocitose foi associado à presença da IL-32. De fato, já foi demonstrado que a IL-32 é capaz de aumentar a capacidade fagocitária de macrófagos THP-1 humanos em um modelo de infecção por bactéria *in vitro* (Netea et al. 2008). No entanto, recentemente, nosso grupo (dos Santos et al. 2017a) demonstrou que a IL-32 diminui a capacidade fagocitária de macrófagos THP-1 humanos durante a infecção por *Leishmania in vitro*. As diferenças observadas entre os trabalhos que utilizaram macrófagos THP-1 humanos podem ser resultantes do uso de patógenos diferentes e, é possível que as discordâncias entre o trabalho publicado por nosso grupo anteriormente e o presente estudo, seja devido às diferença entre os modelos utilizados. Desse modo, os dados sugerem que o tratamento in vivo com β-glucana, em uma única dose i.p., não é capaz de melhorar o controle da infecção por *L. braziliensis* em macrófagos murinos derivados de precursores da medula óssea.

Embora a β-glucana tenha induzido alterações nas respostas dos precursores a estímulos não relacionados uma semana após o tratamento, esta não foi capaz de aumentar a capacidade microbicida dos macrófagos derivados dos precursores da medula óssea. Assim, podemos especular que talvez durante o processo de diferenciação, os macrófagos tenham perdido as alterações epigenéticas induzidas pela β-glucana nos precursores mieloides e que as quantidades de TNF-α e IL-1β produzidas após a infecção não tenham sido suficientes para induzir um aumento do mecanismos microbicidas. Além disso, é preciso ressaltar que na cultura de células da medula óssea tem uma mistura de precursores e células maduras e isso poderia também resultar em diferenças na produção de citocinas. Desse modo, será necessário avaliar a produção de TNF-α e IL-1β no sobrenadante da cultura de macrófagos após infecção por *L. braziliensis* (amostras amarzenadas) para elucidar tais questões.

Devido às variações presentes entre alguns resultados experimentais, os quais poderiam ser atribuídos ao inóculo de parasitos e/ou à preparação e injeção de β-glucana, novos experimentos foram realizados, utilizando um inóculo maior de parasitos e a β-glucana foi diluída em um maior volume de PBS (400 μl) e injetada nos camundongos com uma agulha de maior calibre. O curso da lesão dos camundongos WT e IL-32γTg, tratados ou não com β-glucana, infectados com 1 x 10^6 parasitos, foi avaliado até a 8ª semana de infecção. Os resultados obtidos após 8 semanas de infecção

foram similares aos observados no primeiro experimento com inóculo de 1 x 10^5 parasitos, isto é, os animais WT apresentaram um pico de lesão na 5ª semana de infecção e os animais IL-32γTg tratados com β-glucana apresentaram um pico de lesão na 4ª semana de infecção. Também foi observada uma menor carga parasitária nos animais IL-32γTg tratados com β-glucana, porém, sem significância estatística. Vale ressaltar que, ao comparar as cargas parasitárias das lesões dos animais, ao final de 8 semanas, com menor ou maior inóculo de parasitos, observa-se uma menor carga parasitaria nos animais infectados com maior inóculo de parasitos, sugerindo que a quantidade de parasitos pode modular diferentemente o curso da infecção, gerando uma maior ativação das respostas dos animais, tanto WT quanto IL-32γTg. De fato, os níveis de IFNγ estavam elevados nos animais WT, após 8 semanas de infecção e estes animais controlaram os parasitos de maneira similar aos IL-32γTg tratados com β-glucana. Similarmente aos dados obtidos nos experimentos de baixo inóculo, as quantidades de IL-32γ e TNF-α mensuradas no homogeneizado da pata dos camundongos WT e IL-32γTg infectados com 1 x 10^6, após 8 semanas de infecção não foram significantemente diferente entre os grupos.

Os camundongos C57BL/6 são resistentes à infecção por *L. braziliensis* IMG3 e apresentam cura da lesão após 12 semanas de infecção (Oliveira et al. 2010). Portanto, após 12 semanas de infecção, é esperado que tanto os animais WT como os IL-32γTg apresentassem regressão completa da lesão. Foi realizado um experimento para esta avaliação (dados não mostrados) e, após 12 semanas de infecção, observou-se regressão total da lesão em todos os grupos e foram detectados parasitos apenas no ensaio de diluição limitante de um dos camundongos WT não tratados com β-glucana. Estes experimentos com maior inóculo de parasitos contaram com um baixo número de animais por grupos, mas indicam uma concordância em relação ao papel da β-glucana em melhorar a resposta imune a *L. braziliensis*.

Como os efeitos do treinamento com β-glucana, no presente estudo, parecem estar mais presentes nas três primeiras semanas de infecção, podemos especular que o efeito da β-glucana pode não ser tão duradouro quanto se espera para melhorar o controle de infecções tempos depois do treinamento. Garcia-Valtanen et al. (2017) mostraram em camundongos C57BL/6, que o efeito do treinamento intraperitoneal com β-glucana de fungo (1mg) sobre a produção de citocinas, declina após 3 semanas, exercendo, portanto, um efeito a curto prazo. Já Mitroulis et al. (2018) mostraram que o

efeito da β-glucana sobre a expansão de progenitores da linhagem mieloide de camundongos C57BL/6 pode ser observado até 4 semanas após o tratamento. Portanto, mais estudos são necessários para elucidar o tempo de duração dos efeitos da imunidade treinada induzida por β-glucana em progenitores mieloides, monócitos circulantes e/ou macrófagos. Contudo, os resultados do presente estudo sugerem que a β-glucana pode ter um potencial em treinar células mieloides para uma posterior resposta aumentada à infecção por *L. braziliensis in vivo*.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os dados dos experimentos indicam que o tratamento de camundongos IL-32γTg com β-glucana melhora a resposta imune contra a infecção por *L. braziliensis*, sugerindo que a IL-32γ intensifica os efeitos do treinamento com a β-glucana. Portanto, pode haver um sinergismo entre as vias de ativação da β-glucana e da IL-32γ para aumentar o treinamento inato. Desta forma, a IL-32γ e a β-glucana podem ser alvos terapêuticos para uma melhor ativação do sistema imune, visando o controle da leishmaniose. Contudo, mais estudos devem ser realizados para elucidar essa possível associação, bem como a duração dos efeitos da β-glucana sobre as células da imunidade inata. Mais experimentos serão conduzidos para aumentar o número de algumas amostras e melhorar as análises estatísticas, para que sejam concluídas algumas partes do presente estudo de maneira mais adequada.

Conclusões específicas:

- O tratamento com β-glucana antes da infecção com *L. braziliensis* induz mais rápido o desenvolvimento da lesão e diminui a carga parasitária após 8 semanas de infecção em animais transgênicos para IL-32γ humana, sugerindo que este tratamento acentua os efeitos da IL-32γ no processo da infecção.
- Foi observada uma menor carga parasitaria nos animais infectados com maior inóculo de parasitos, sugerindo que a quantidade de parasitos pode modular diferentemente o curso da infecção, gerando uma maior ativação das respostas dos animais, tanto WT quanto IL-32γTg.
- A análise histopatológica demonstrou que o tratamento com β-glucana aumenta o processo inflamatório na lesão causada por *L. braziliensis*, após 3 semanas de infecção, nos animais transgênicos para IL-32γ humana, sugerindo um sinergismo entre β-glucana e IL-32γ, o qual induz um processo inflamatório mais intenso que contribui para o controle da infecção.

- O tratamento com β-glucana não alterou a produção de IL-32γ ou TNF-α nas lesões, mas aumentou a produção de IFNγ pelas células do linfonodo drenante da lesão de camundongos transgênicos para IL-32γ humana, após 3 semanas de infecção com *L. braziliensis* e parece auxiliar na manutenção dessa resposta até a 8ª semana de infecção em resposta aos estímulos ConA ou Ag, sugerindo que a β-glucana exerce funções tanto na imunidade treinada, como na resposta imune adquirida.
- Embora o tratamento *in vivo* com β-glucana não tenha alterado o número de células da medula óssea e a capacidade leishmanicida dos macrófagos infectados com *L. braziliensis in vitro*, a β-glucana foi capaz de provocar alterações nas respostas dos precursores a estímulos não relacionados, como o LPS e Ag de *L. braziliensis*, uma semana após o tratamento, sugerindo um provável treinamento inato.

REFERÊNCIAS

Abel G e Czop JK. Stimulation of human monocyte β-glucan receptors by glucan particles induces production of TNFα and IL-1β. *Int. J. Immunopharmc.* 14: 1363-1373, 1992.

Abdossamadi Z, Seyed N, Rafati S. Mammalian host defense peptides and their implication on combating *Leishmania* infection. *Cell Immunol* 309: 23–31, 2016.

Afonso L, Borges VM, Cruz H, Ribeiro-Gomes FL, Dos Reis GA, Dutra AN, Clarêncio J, de Oliveira CI, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn CI. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis. J Leukoc Biol* 84: 389- 396, 2008.

Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One* 7: e35671, 2012.

Bai X, Kim SH, Azam T, McGibney MT, Huang H, Dinarello CA, Chan ED. IL-32 is a host protective cytokine against *Mycobacterium tuberculosis* in differentiated THP-1 human macrophages. *J Immunol.* 184: 3830-40, 2010.

Bai X, Shang S, Henao-Tamayo M, Basaraba JR, Ovrutsky AR, Matsuda JL, Takeda K, Chan MM, Dakhama A et al. Human IL-32 expression protects mice against a hypervirulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *PNAS* 112: 5111-5116, 2015.

Batbayar S, Lee DH**,** Kim HW**.** Immunomodulation of fungal β-glucan in host defense signaling by dectin-1. *Biomol Ther* 20: 433-445, 2012.

Bekkering S, Blok BA, Joosten LA, Riksen NP, van Crevel R, Netea MG. In vitro experimental model of trained innate immunity in human primary monocytes. *Clin Vaccine Immunol* 23: 926-33, 2016.

Brasil. *Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Ministério da Saúde, Brasília, 2007.

Brasil. *Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana.* Ministério da Saúde. Brasília, 2013.

Brasil. Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas de 1990 a 2013. Disponível em: http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LT-Casos.pdf Acesso em 12/01/2018.

Basano SA, Camargo LMA. Leishmaniose Tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev Bras Epidemiol* 7: 328-337, 2004.

Blackwell, J.M. et al. Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. *J. Exp. Med.* 162: 324–331, 1985.

Bogdan C, Röllinghoff M & Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev* 173: 17–26, 2000a.

Bogdan C, Röllinghoff M & Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 173: 17–26, 2000b.

Cecílio P et al. Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite. *Front Immunol* 5: 1-16, 2014.

Chihara G, Hamuro J, Maeda Y, Arai Y, Fukuoka F. Antitumour polysaccharide derived chemically from natural glucan (Pachyman). *Nature* 225: 943-944, 1970.

Childs GE, Lightner LK, McKinney L, Groves MG, Price EE, Hendricks LD. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiopica*. *Ann Trop Med Parasitol* 78: 25-34, 1984.

Chanput W, Reitsma M, Kleinjans L et al. β-Glucans are involved in immune-modulation of THP-1 macrophages. *Mol. Nutr. Food Res.* 56: 822–833, 2012.

Cheng SC, Quintin J, Cramer RA et al. mTOR- and HIF-1α–mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science* 345: 1250684, 2014.

Choi JD, Bae SY, Hong JW, Azam T, Dinarello CA, Her E, Choi WS et al. Identification of the most active interleukin-32 isoform. *Immunology* 126: 535–542, 2009.

Choi, E., Bae, S., Hong, J. et al. Paradoxical effects of constitutive human IL-32γ in transgenic mice during experimental colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 21082-21086, 2010.

Colotti e Ilari, Colotti G, Llari A. Polyamine metabolism in *Leishmania*: from arginine to trypanothione. *Amino Acids* 40: 269–285, 2011.

Dahl CA, Schall RP, He HL, Cairns JS. Identification of a novel gene expressed in activated natural killer cells and T cells. *J. Immunol.* 148: 597–603, 1992**.**

Dekrey GK, Lima HC, Titus RG. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun* 66: 827-829, 1998.

Dominguez et al. Early mechanisms of *Leishmania* infection in human blood. *Microbes Infect* 5: 507-513, 2003.

Dorta, M. L. *et al*. Improvements in obtaining New World Leishmania sp from mucosal lesions: Notes on isolating and stocking parasites. *Exp. Parasitol.* 132: 300–303, 2012.

Ehrchen J, Helming L, Varga G, Pasche B, Loser K, Gunzer M, Sunderko¨tter C, Sorg C, Roth J, and Lengeling A. Vitamin D receptor signaling contributes to susceptibility to infection with *Leishmania major*. *FASEB J* 21: 3208–3218, 2007.

Elder MJ, Webster SJ, Chee R, Williams DL, Gaston JSH, Goodall JC. β-glucan size controls Dectin-1- Mediated immune responses in human dendritic cells by regulating IL-1β production. *Front. Immunol.* 8: 1-10, 2017

Feghali CA e Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* 2: 12-26, 1997.

Fonseca SG, Romão PRT, Figueiredo F, Morais RH, Lima HC, Ferreira SH, Cunha FQ. TNF-α mediates the induction of nitric oxide synthase in macrophages but not in neutrophils in experimental cutaneous leishmaniasis. *Eur. J. Immunol.* 33: 2297-2306, 2003.

Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* 447: 972-978, 2007.

Galdino-Junior H, Maldaner AE, Pessoni LL et al. Interleukin 32γ (IL-32γ) is highly expressed in cutaneous and mucosal lesions of American Tegumentary Leishmaniasis patients: association with tumor necrosis factor (TNF) and IL-10. *BMC Infect Dis* 14: 249, 2014.

Galdino-Junior H, Gomes RS, dos Santos JC *et al*. *Leishmania (Viannia) braziliensis* amastigotes induces the expression of TNFα and IL-10 by human peripheral blood mononuclear cells *in vitro* in a TLR4-dependent manner. *Cytokine* 88: 184–192, 2016.

Garcia-Valtanen P, Guzman-Genuino RM, Williams DL, Hayball JD, Diener KR. Evaluation of trained immunity by β-1, 3 (D)-glucan on murine monocytes in vitro and duration of response in vivo. *Immunol Cell Biol* 95: 601–610, 2017.

Garly ML, Martins CL, Bale C, Balde MA, Hedegaard KL, Gustafson P, Lisse IM, Whittle HC, Aaby P. BCG scar and positive tuberculin reaction associated with reduced child mortality in West Africa. A non-specific beneficial effect of BCG? *Vaccine* 21: 2782–2790, 2003.

Giudice A, Camada I, Leopoldo PTG, Pereira JMB, Riley LW, Wilson ME, Ho JL, Jesus AR, Carvalho EM, Almeida RP. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in tegumentary leishmaniasis. *BMC Infect Dis* 7: 1-12, 2007.

Goda C, Kanaji T, Kanaji S, Tanaka G, Arima K, Ohno S, Izuhara K. Involvement of IL-32 in activation-induced cell death in T cells. *Int Immunol* 18: 233-240, 2006.

Gomes RS et al. IL-32γ promotes the healing of murine cutaneous lesions caused by *Leishmania braziliensis* infection in contrast to *Leishmania amazonensis*. *Parasit Vectors* 10: 1-7, 2017.

Gomes RS et al. Human IL-32γ plays a protective role in an experimental model of visceral leishmaniasis in mice. *Infect Immun* 86: e00796-17 , 2018.

Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 36: 71-80, 2003.

Goodridge HS, Reyes CN, Becker CA, Katsumoto TR, Ma J, Wolf AJ et al. Activation of the innate immune receptor dectin-1 upon formation of a 'phago-cytic synapse'. *Nature* 472: 471–475, 2011.

Goto H e Lindoso JAL. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Rev. *Expert* 8: 419-433, 2010.

Goto H e Lindoso JAL. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Infect Dis Clin* 26: 293-307, 2012.

Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, Froment GS et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *PNAS* 106: 6748-6753, 2009.

Gurung P e Kanneganti TD. Innate immunity against *Leishmania* infections. *Cell Microbiol* 17: 1286–1294, 2015.

Heinhuis B, Koenders MI, van Riel PL, van de Loo FA, Dinarello CA, Netea MG, van den Berg WB, Joosten LA. Tumour necrosis factor alpha-driven IL-32 expression in rheumatoid arthritis synovial tissue amplifies an inflammatory cascade. Ann Rheum Dis. 70:660-7, 2010.

Heinhuis B, Netea MG, van den Berg WB, Dinarello CA, Joosten LA. Interleukin-32: a predominantly intracellular proinflammatory mediator that controls cell activation and cell death. *Cytokine* 60: 321-7, 2012.

Hong J, Bae S, Kang Y, Yoon D, Bai X, Chan ED, Azam T, Dinarello CA, Lee S, Her E, Rho G, Kim S. Suppressing IL-32 in monocytes impairs the induction of the proinflammatory cytokines TNFalpha and IL-1beta. *Cytokine* 49: 171-6, 2010.

Indiani de Oliveira C, Teixeira MJ, Teixeira CR, Jesus JR, Rosato AB, Silva JS, Brodskyn C, Barral-Netto M, Barral A. *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. *Microbes Infect* 6: 977-984, 2004.

Iniesta V et al. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite immunology* 24: 113-118, 2002.

Ishimoto Y, Ishibashi K, Yamanaka D et al. Modulation of an innate immune response by soluble yeast β-glucan prepared by a heat degradation method. *Int J Biol Macromol*. 104: 367–376, 2017.

Jang CH, Choi JH, Byun MS, Jue DM. Chloroquine inhibits production of TNF-α, IL-1β and IL-6 from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes/macrophages by different modes. *Rheumatology* 45: 703–710, 2006.

Joosten LAB, Netea MG, Kim SH et al. IL-32, a proinflammatory cytokine in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 3298–3303, 2006.

Jung MY, Son MH, Kim SH, Cho D, Kim TS. IL-32g induces the maturation of dendritic cells with Th1- and Th17-polarizing ability through enhanced IL-12 and IL-6 production. *J. Immunol* 186: 6848–6859, 2011

Kang JW, Park YS, Lee DH, Kim MS, Bak Y, Park SH, Ham SY, Yang Y, Hong JT, Yoon DY. Interleukin-32δ interacts with IL-32β and inhibits IL-32β-mediated IL-10 production. *FEBS Lett* 587: 3776–3781, 2013.

Kang JW, Park YS, Lee DH, Kim MS, Bak Y, Ham SY, Park SH, Kim H, Ahn JH, Hong JT et al. Interaction network mapping among IL-32 isoforms. *Biochimie* 101: 248–251, 2014.

Kaplan MH, Sun YL, Hoey T, Grusby MJ. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 382: 174-177, 1996.

Killick-Kendrick R. The transmission of leishmaniasis by the bite of the sandfly. *J. Roy. Army Med. Corps*, 132: 134-140, 1986.

Kim SH, Han SY, Azam T, Yoon DY, Dinarello CA. Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNFalpha. *Immunity* 22: 131-142, 2005.

Kleinnijenhuis J, Quintin J et al. Bacille Calmette-Guérin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *PNAS* 109: 17537-17542, 2012.

Kulkarni MM, Barbi J, McMaster WR, Gallo RL, Satoskar AR and McGwire BS. Mammalian antimicrobial peptide influences control of cutaneous *Leishmania* infection. *Cell Microbiol* 13: 913–923, 2011.

Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes–Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol* 11: 210–214, 2003.

Laurenti MD, Örn A, Sinhorini IL, Corbett CEP. The role of complement in the early phase of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in BALB/c mice. *Braz J Med Biol Res* 37: 427-434, 2004.

Lazarski CA et al. IL-4 attenuates Th1-associated chemokine expression and Th1 trafficking to inflamed tissues and limits pathogen clearance. *PlosOne* 8: 1-8, 2013.

Lefèvre L et al. The C-type lectin receptors dectin-1, MR, and SIGNR3 contribute both positively and negatively to the macrophage response to *Leishmania infantum*. *Immunity* 38: 1038–1049. 2013.

Li B, Cramer D, Wagner S, Hansen R, King C, Kakar S, Ding C, Yan J. Yeast Glucan particles activate murine resident macrophages to secrete proinflammatory cytokines via MyD88- and Syk Kinase-dependent pathways. *Clin Immunol* 124: 170–181, 2007.

Liew FY, Li Y, Millott S.Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of Leishmania major through the induction of nitric oxide. *J Immunol* 145: 4306-4310, 1990.

Lima-Junior DS, Costa DL, Carregaro V, Cunha LD, Silva AL, Mineo TW et al. Inflammasome-derived IL-1beta production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. *Nat Med.* 19: 909-915, 2013.

Lima-Junior DS, Mineo TWP, Calich VLG, Zamboni DS. Dectin-1 Activation during *Leishmania amazonensis* phagocytosis prompts Syk-dependent reactive oxygen species production to trigger inflammasome assembly and restriction of parasite replication. *J Immunol* 199: 2055-2068, 2017.

Liu D e Uzonna JE. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front Cell Infect Microbiol* 2:1-8, 2012.

Maioli TU, Takane E, Arantes RM, Fietto JL, Afonso LC. Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice. *Parasitol. Res.* 94: 207–212, 2004.

Mathur RK et al. Reciprocal CD40 signals through p38MAPK and ERK-1/2 induce counteracting immune responses. *Nat. Med* 10: 540-546, 2004.

Michalany J. *Técnicas histológicas em Anatomia Patológica*. EPU. São Paulo, 1980.

Mitroulis I, Ruppova K, Wang B et al. Modulation of myelopoiesis progenitors is an integral component of trained immunity. *Cell* 172: 147–161, 2018.

Montoya D, Inkeles MS, Liu PT, Realegeno S, Teles RM, Vaidya P, Munoz MA, Schenk M, Swindell WR, Chun R, Zavala K, Hewison M, Adams JS, Horvath S, Pellegrini M, Bloom BR, Modlin RL.IL-32 is a molecular marker of a host defense network in human tuberculosis. *Sci. Transl. Med* 6: 250ra114, 2014.

Morrison GM, Davidson DJ, Dorin JR. A novel mouse beta defensin, Defb2, which is upregulated in the airways by lipopolysaccharide. *FEBS Lett* 442: 112-116, 1999.

Moschen AR, Fritz T, Clouston AD, Rebhan I, Bauhofer O et al. Interleukin-32: a new proinflammatory cytokine involved in hepatitis C virus-related liver inflammation and fibrosis. *Hepatology* 53: 1819–1829, 2011.

Mosmann TR & Coffman RL. THI and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol* 7: 145-73, 1989.

Mukbel MR, Junior CP, Ghosh KGM, Petersen C, Jones DEG. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *Trop. Med.*, 76: 669–675, 2007.

Nazaré-Morgado F et al. Are Neutrophil extracellular traps playing a role in the parasite control in active American Tegumentary Leishmaniasis lesions? *PLOS One*. 10: 1-15, 2015.

Netea MG, Azam T, Lewis EC, Joosten LA, Wang M, Langenberg D, Meng X, Chan ED, Yoon DY, Ottenhoff T, Kim SH, Dinarello CA. *Mycobacterium tuberculosis* induces interleukin-32 production through a caspase- 1/IL-18/interferon-gamma-dependent mechanism. *PLoS Med* 3: 1310-1319, 2006.

Netea, MG, Lewis EC, Azam T, Joosten LA et al. Interleukin-32 induces the differentiation of monocytes into macrophage-like cells. Proc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3515–3520, 2008.

Netea, MG, Nold-Petry, CA, Nold, MF, Joosten LA et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1β in monocytes and macrophages. *Blood* 113: 2324-2335, 2009.

Netea MG, Quintin J, Van Der Meer JWM. Trained Immunity: A memory for innate host defense. *Cell Host Microbe* 9: 355- 342, 2011.

Netea MG, Joosten LAB, Latz E, Mills KHG, Natoli G, Stunnenberg HG, O'Neill LAJ, Xavier RJ. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science* 352: aaf1098-1-9, 2016.

Nold MF, Nold-Petry CA, Pott GB, Zepp JA, Saavedra MT, Kim SH, Dinarello CA. Endogenous IL-32 controls cytokine and HIV-1 production. *J. Immunol.* 181: 557–565, 2008.

Nold-Petry CA, Nold MF, Zepp JA, Kim SH, Voelkel NF, Charles A. Dinarello IL-32–dependent effects of IL-1β on endothelial cell functions *PNAS* 106: 3883-3888, 2009.

Novais FO, Santiago RC, Báfica A et al. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. *J Immunol* 183: 8088-8098, 2009.

Obaid KA, Ahmad S, Khan HM, Mahdi AA, Khanna R. Protective effect of L. donovani antigens using glucan as an adjuvant. *Int. J. Immunopharmacol* 11: 229–235, 1989

Oliveira CI, Barral-Neto M. O Modelo Experimental nas Infecções Causadas por *L. amazonensis* e *L. braziliensis. Gaz. méd. Bahia* 75: 35-45, 2005.

de Oliveira MAP, Pires AS, de Bastos RP, Lima GMCA, Pinto SA, Pereira LIA, Pereira AJCS , Abrahamsonh IA, Dorta ML, Ribeiro-Dias F. *Leishmania spp.* parasite isolation through inoculation of patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 52: 83-88, 2010.

Pandey SP et al. Pegylated bisacycloxypropylcysteine, a diacylated lipopeptide ligand of TLR6, plays a host-protective role against experimental *Leishmania* major infection. *J Immunol* 193: 3632-3643, 2014.

Pereira CG, Silva AL, de Castilhos P, Mastrantonio EC, Souza RA, Romão RP, Rezende RJ, Pena JD, Beletti ME, Souza MA. Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection. *Vet Parasitol* 165: 231-40, 2009.

Pereira LIA et al. Case Report: Increase of NK cells and proinflammatory monocytes are associated with the clinical improvement of Diffuse Cutaneous Leishmaniasis after immunochemotherapy with BCG/ *Leishmania* antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81: 378–383, 2009.

Pestonjamasp VK, Huttner KH, Gallo RL. Processing site and gene structure for the murine antimicrobial peptide CRAMP. *Peptides* 22: 1643–1650, 2001.

Prajeeth CK et al. *Leishmania*-infected macrophages are targets of NK cell-derived cytokines but not of NK cell cytotoxicity. *Infect. Immun* 79: 2699–2708, 2011.

Quintin J, Saeed S, Martens JHA et al. *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes. *Cell Host & Microbe* 12: 223-232, 2012.

Ribeiro-Dias F, Gomes RS, Silva LL, dos Santos JC, Joosten LAB. Interleukin 32: a novel player in the control of infectious diseases. *J Leukoc Biol* 101: 39–52, 2017.

Ribeiro-Gomes FL, Otero AC, Gomes NA, Moniz-De-Souza MC, Cysne-Finkelstein L, Arnholdt AC, Calich VL, Coutinho SG, Lopes MF, Dos Reis GA. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J. Immunol* 172: 4454–4462, 2004.

Ritter U, Frischknecht F, van Zandbergen G. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? *Trends Parasitol* 25: 505-510, 2009.

Rocha FJS, Schleicher U, Mattner J, Alber G, Bogdan C. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in Mice. *Infect. Immun*. 75: 3823–3832, 2007.

Russell DG e Wrighti SD. Complement receptor type 3 (CR3) binds to an Arg-Gly-Asp-containing regions of the major surface glycoprotein, gp63, of *Leishmania* promastigotes. *J. EXP. MED*. 168: 279-292, 1988.

Sacks DL, Perkins PV. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science* 223: 1417-1419, 1984.

Saeed S, Quintin J et al. Epigenetic programming during monocyte to macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science* 345:1-26, 2014.

dos Santos JC et al. Cytokines and microbicidal molecules regulated by IL-32 in THP-1-derived human macrophages infected with New World *Leishmania* species. *PLoS Negl Trop Dis* 11: 1-21, 2017a.

dos Santos JC, Damen MSMA, Oosting M et al. The NOD2 receptor is crucial for immune responses towards New World *Leishmania* species. *Sci Rep* 7: 1-10, 2017b.

Schenk M, Krutzik SR, Sieling PA, Lee DJ, Teles RM, Ochoa MT, Komisopoulou E, Sarno EN, Rea TH, Graeber TG, Kim S, Cheng G, Modlin RL. NOD2 triggers an interleukin-32-dependent human dendritic cell program in leprosy. *Nat Med* 18: 555-63, 2012.

Scott P e Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol* 16: 581-592, 2016.

Shoda H, Fujio K, Yamaguchi Y, Okamoto A, Sawada T, Kochi Y, Yamamoto K. Interactions between IL-32 and tumor necrosis factor alpha contribute to the exacerbation of immune-inflammatory diseases. *Arthritis Res Ther* 8: R166, 2006.

da Silva RP et al. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. *J. Immunol.* 143: 617–622, 1989.

Silveira FT, Lainson R, De Castro Gomes CM, Laurenti, MD, Corbett CEP. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 31: 423-31, 2009.

de Souza-Neto SM, Carneiro CM, Vieira LQ, Afonso LC. *Leishmania braziliensis*: partial control of experimental infection by interleukin-12 p40 deficient mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 289-94, 2004.

Smith AJ, Toledo CM, Wietgrefe SW, Duan L, Schacker TW, Reilly CS, Haase AT. The immunosuppressive role of IL-32 in lymphatic Tissue during HIV-1 Infection. *J Immunol* 186: 6576-6584, 2011.

Srivastava S, Pandey SP, Jha MK, Chandel HS, Saha B. Leishmania expressed lipophosphoglycan interacts with Toll like receptor (TLR)-2 to decrease TLR-9 expression and reduce anti-leishmanial responses. *Clin Exp Immunol* 172: 403-409, 2013.

Stebut E. Cutaneous Leishmania infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. *Exp Dermatol* 16: 340-346, 2007.

Teixeira MJ, Fernandes JD, Teixeira CR, Andrade BB, Pompeu ML, Silva JS, Brodskyn CI, Barral-Netto M, Barral A. Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different paces of chemokine expression patterns. *Infect Immun* 73: 1191-1195, 2005.

Topfer E, Boraschi D, Italiani P. Innate immune memory: The latest frontier of adjuvanticity. *J Immunol Res* 1:1-7, 2015.

Thompson IJ, Oyston PCF, Williamson DE. Potential of the β-glucans to enhance innate resistance to biological agents. *Expert Rev. Anti Infect. Ther* 8: 339–352, 2010.

Ueno N, Bratt CL, Rodriguez NE, Wilson ME. Differences in human macrophage receptor usage, lysosomal fusion kinetics and survival between logarithmic and metacyclic *Leishmania infantum chagasi* promastigotes. Cell. Microbiol. 11: 1827–1841, 2009.

Ueno N e Wilson ME. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends Parasitol*. 28: 335-344, 2012.

Vaugelade J, Pinchinat S, Guiella G, et al. Non-specific effects of vaccination on child survival: prospective cohort study in Burkina Faso. *BMJ* 329: 1-5, 2004.

Woelbing F et al. Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J. Exp. Med*. 203: 177-188, 2006.

Yan J, Allendorf DJ, Brandley B. Yeast whole glucan particle (WGP) β-glucan in conjunction with antitumor monoclonal antibodies to treat cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* 5: 691-702, 2005.

Yang D, Liu Z, Tewary P, Chen Q, de la Rosa G, Oppenheim JJ. Defensin participation in innate and adaptive immunity. *Curr Pharm Des*. 13: 3131-3139, 2007.

Yatawara L, Wickramasinghe S, Nagataki M, Takamoto M, Nomura H, Ikeue Y, Watanabe Y, Agatsuma T. *Aureobasidium*-derived soluble branched (1,3-1,6) β-glucan (*Sophy* β-*glucan*) enhances natural killer activity in *Leishmania amazonensis*-infected mice. *Korean J Parasitol.* 47: 345-351, 2009.

Zauli-Nascimento RC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JKU, Pereira LIA, de Oliveira MAP, Ribeiro-Dias F, Dorta ML, Uliana SRB. In vitro sensitivity of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Trop Med Int Health* 15: 68-76, 2010.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética, TCLE

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA

UFG

Nome completo	Muriel Vilela Teodoro Silva
Instituição	IPTSP/UFG
Nível acadêmico	Mestrando
Experiência prévia com a área da pesquisa (anos)	2 anos
Currículo *lattes* (endereço)	http://lattes.cnpq.br/2226827574258565
Telefone	
E-mail	vilela-13@hotmail.com
Função na Pesquisa	Delineamento e execução dos experimentos.

Nome completo	Juliana Reis Machado e Silva
Instituição	IPTSP/UFG
Nível acadêmico	Doutora
Experiência prévia com a área da pesquisa (anos)	12 anos
Currículo *lattes* (endereço)	http://lattes.cnpq.br/5289363102869037
Telefone	
E-mail	juliana.patologiageral@gmail.com
Função na Pesquisa	Delineamento e execução dos experimentos.

Nome completo	Célia Maria de Almeida Soares
Instituição	IPTSP/UFG
Nível acadêmico	Doutora
Experiência prévia com a área da pesquisa (anos)	25 anos
Currículo *lattes* (endereço)	http://lattes.cnpq.br/8539946335852637
Telefone	
E-mail	cmasoares@gmail.com
Função na Pesquisa	Delineamento dos experimentos.

Nome completo	Clayton Luiz Borges
Instituição	IPTSP/UFG
Nível acadêmico	Doutor
Experiência prévia com a área da pesquisa (anos)	15 anos
Currículo *lattes* (endereço)	http://lattes.cnpq.br/8867708267053410
Telefone	
E-mail	clbluiz2@gmail.com
Função na Pesquisa	Delineamento e execução dos experimentos.

- **Médico Veterinário Responsável:**

Nome completo	Milton A. P. de Oliveira
Número do CRMV	CRMV/GO 04520
Telefone	3209 6126
E-mail	mapoliv@usp.br

- **Unidade onde será realizado: DMIPP – IPTSP/UFG**

III - Objetivos e justificativa do projeto:

IV - Sumário do projeto:

- **Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:** "O estudo *in vivo* é fundamental para o entendimento dos processos imunopatológicos envolvidos em infecções." Pg 6 pp.
- **Prevê Projeto Piloto:** Não
- **Espécie animal utilizada/ número total de animais/ Número de animais por tratamento ou grupo experimental:**
- **Descrição do animal utilizado (Explicitar: espécie/ linhagem/ sexo (informar número por sexo)/ peso e/ou idade etc):** *Mus musculus* (camundongo)/ C57BL/6/n=384
- **Fonte de obtenção do animal:** Biotério do IPTSP
- **Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação**: Caixas em polissulfona, nas medidas de 31 cm de comprimento x 20 cm da largura x 13 cm de altura contendo 3-5 animais por gaiola. Agua e ração comercial a vontade. Estantes ventiladas, maravalha comercial e sala climatizada a 22ºC com ciclos de claro e escuro de 12 horas.
- **Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:** *Leishmania sp.(via i.p ou i.d), Trypanosoma cruzi (via i.d), Paracoccidioides brasiliensis(via i.d).*

  "De maneira geral, o projeto apresenta risco mínimo para os pesquisadores.

  Todos os pesquisadores terão à disposição e deverão utilizar os EPIs como gorro, óculos, mascara, jalecos e luvas de procedimentos. Todos serão devidamente treinados para o correto manuseio dos materiais cirúrgicos, seringas e cuidados para o trabalho no fluxo laminar. Caso algum pesquisador se sinta incomodado com a manipulação e sacrifício dos animais, estes serão convidados a se retirarem do recinto para evitar riscos psicológicos. A manipulação dos agentes infecciosos será feita em cabine de fluxo laminar com os devidos EPIs sem a presença de materiais perfuro-cortantes."
- **Procedimentos experimentais do projeto de pesquisa:**
- **Métodos utilizados para minimizar o sofrimento e aumentar o bem-estar dos animais antes, durante e após a pesquisa. Pontos Finais Humanitários: "**Todos os pesquisadores serão devidamente treinados para o correto manuscio de animais para não causar estresse nos animais. Os animais serão anestesiados com xilazina e cetamina antes da coleta de sangue e também antes da eutanásia que será feita por decapitação."
- **Grau de invasividade: GI2**
- **Material utilizado em outros projetos: Não**
- **Método de eutanásia:** decaptação
- **Destino do animal:** incineração na escola de veterinária da UFG.

V – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

- **Quanto aos documentos exigidos pela CEUA/UFG: Todos os documentos necessários inclusive de autorização da biossegurança para trabalhar com material infecto contagioso.**
- **Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores: Foram adequadamente observados.**

VI - Parecer da CEUA:
De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto **APROVADO**.

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que a pesquisadora responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, a qual está prevista para finalizar suas ações até julho **de 2021**.

VII - Data da reunião: 22/08/2016.

Dra. Marina Pacheco Miguel
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

Anexo 2 – Comprovante de Submissão do Artigo

Cell Reports

b-glucan-induced trained immunity protects against Leishmania braziliensis infection: a crucial role for IL-32

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	CELL-REPORTS-D-18-03102
Full Title:	b-glucan-induced trained immunity protects against Leishmania braziliensis infection: a crucial role for IL-32
Article Type:	Research Article
Keywords:	Leishmaniasis, Trained Immunity, Interleukin-32, Host defense, Epigenetic modifications, Therapy
Corresponding Author:	Leo AB Joosten Radboudumc Nijmegen, NETHERLANDS
First Author:	Jessica Cristina dos Santos
Order of Authors:	Jessica Cristina dos Santos
	Ana Marina Barroso de Figueiredo
	Muriel Vilela Teodoro Silva
	Michelle SMA Damen
	Rodrigo S Gomes
	Moniue M Helsen
	Marije Oosting
	Samuel T Keating
	Mihai G Netea
	Fatima Ribeiro-Dias
	Leo AB Joosten
Abstract:	American Tegumentary Leishmaniasis is a vector-borne parasitic disease caused by Leishmania protozoans. Innate immune cells undergo long-term functional reprogramming in response to infection or vaccination via a process called trained immunity, conferring non-specific protection from secondary infections. Here we demonstrate for the first time that monocytes trained with the fungal cell wall component b-glucan confer enhanced protection against infections caused by Leishmania braziliensis through the enhanced production of proinflammatory cytokines. Mechanistically, this augmented immunological response was dependent on increased expression of interleukin 32 (IL-32), which was maintained via an epigenetic program. Studies performed using a humanized IL-32 transgenic mouse highlight the clinical implications of these findings in vivo. This study represents the first definitive characterization of the role of IL-32 in the trained phenotype induced by b-glucan, the results of which improve our understanding of the molecular mechanisms governing trained immunity and Leishmania infection control.
Suggested Reviewers:	Thirumala Devi Kanneganti, PhD St Jude Childerns Research Hospital Thirumala-Devi.Kanneganti@STJUDE.ORG Expert in Host Pathogen recognition
	Giorgio Trinchieri, PhD NHI trinchig@mail.nih.gov Expert Immunology
	Alberto Mantovani, PhD Alberto.Mantovani@humanitasresearch.it

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

	Expert on Monocytes and Macrophage reprogramming
Opposed Reviewers:	

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

To the *Editor in Chief*
Cell Reports Editorial Office

Dear Editor in Chief,

Please find enclosed our manuscript for consideration for publication in Cell Host & Microbe entitled ***β-glucan-induced trained immunity protects against Leishmania braziliensis infection: a crucial role for IL-32.***

Leishmaniases are among of the most neglected infectious diseases with endemicity in 88 countries and affecting 12 million people worldwide. Successful treatment of leishmaniasis is limited in the most parts of the world due to the toxicity and costs of effective medication and functional vaccine against the *Leishmania* spp. infections in human is still under development.

In monocytes/macrophages, vaccines and microbial products induce non-specific protection to secondary infections by long-term functional reprogramming via a process called trained immunity, which is dependent on metabolic and epigenetic rewiring. Our novel findings demonstrate that monocytes trained with the fungal cell wall component β-glucan confer enhanced protection against infections caused by *Leishmania braziliensis* through the enhanced production of proinflammatory cytokines *in vitro* and *in vivo*. Moreover, we show that trained immunity induced by β-glucan modulates IL-32-mediated control of *Leishmania* infection via IL-1 signaling and epigenetic changes.

These findings improve our understanding of the mechanism of trained immunity induced by β-glucan, and point toward novel avenues for therapy for improved treatment of leishmaniasis.

This manuscript has not been simultaneously submitted elsewhere for either print or electronic publication. There is neither financial support from commercial sources nor conflict of interest with regard to this work.

On behalf of all authors,

Yours sincerely,
Prof. Leo A. B. Joosten

Anexo 3 – Respostas dos revisores

Dr. Joosten,
Radboudumc
Internal Medicine
Geert grootplein zuid 8
Nijmegen
NETHERLANDS

Oct 02, 2018

Manuscript Number: CELL-REPORTS-D-18-03102
"b-glucan-induced trained immunity protects against Leishmania braziliensis infection: a crucial role for IL-32"
Dear Dr. Joosten,

Thank you for your interest in Cell Reports and I sincerely apologize for the longer than usual initial review time. However, I am now including the reviewer comments, which I hope you will find useful and constructive. As you will see, they express interest in the study, but they also have several criticisms and suggestions. If it is possible to address the concerns raised with additional data, we would be interested in considering a revised version of the manuscript.

To promote an efficient revision and resubmission process, we are happy to discuss the reviews and your revision plan. If this would be helpful, we suggest sending a revision plan that we can review and discuss with you via email (shamilton@cell.com.). We find that these discussions are more productive when initiated early in the revision process.

We ask that you return the revised paper within two months. If more time is needed, we are usually able to accommodate, but we do ask that you contact our editorial office (reports@cell.com) to discuss your anticipated timing for resubmission. Please note that papers are generally considered through only one round of revision and that we will consider the published literature up to the day we make our final decision.

IMPORTANT: STAR Methods formatting
Please keep in mind that, should we publish your paper, it will need to comply with our publication guidelines. This includes the STAR Methods format, which Cell Press introduced to improve the rigor in reporting methods and resources for reproducibility. At this stage, we strongly encourage you to use the STAR Methods format so that both the editors and the reviewers can review the details of the experimental procedures and consider a version of the manuscript that closely reflects what would be published. This section replaces the Experimental Procedures and Supplemental Experimental Procedures sections and does not count toward the main-text character limits. For detailed instructions on STAR Methods and a template for the Key Resources Table, see our STAR Methods webpage. You may also create the Key Resources Table using this interactive webform. Please contact me (shamilton@cell.com.) if you have any questions about restructuring your manuscript using the STAR Methods format.

Publication Guidelines:

Please be sure to accommodate our corresponding author guidelines. These guidelines outline the policies regarding authorship and the responsibilities of corresponding author(s) and require designation of one corresponding author as Lead Contact.

To facilitate consideration of your revised manuscript, please look at our publication guidelines. The length restriction for a Research Article is 60,000 characters (including spaces, figure legends, and references), and no more than 7 figures and/or tables. There is some flexibility here, so please contact us to discuss this further.

Please check our Supplemental Information Guidelines for details on how to format your supplemental items.

Optional Features:
Should your manuscript be accepted for publication in the future, we'll encourage you to contribute any of these optional features:

- **Mendeley Data**: Publish your original, unprocessed data through Mendeley Data. We will link your published paper and the dataset to each other. For more information, please click here.
- **Figure360:** Create a narrated, animated version of one of your figures that helps the reader understand the most important take-home message in a matter of minutes. The video should contain data and panels from only one figure and include minimal introduction. For guidelines and examples, please click here.
- **Methods Videos**: We encourage you to make a Methods Video for your paper if you report any methods that are challenging or nuanced or if you have an experimental setup that is difficult to describe. These videos are short (≤1 min) and are intended to improve reproducibility and transparency. For examples and guidelines, go here.

Please submit your revised paper online at: https://cell-reports.editorialmanager.com/ and include a point-by-point list of the revisions made to address the reviewers' comments.

Thanks again for submitting your work to Cell Reports. I look forward to reading your revised manuscript.

Sincerely,
Sara Hamilton, Ph.D.
Senior Editor, Cell Reports
shamilton@cell.com

Administrative correspondence:
Andrew Ferrell, Journal Associate
617-386-2190
email: aferrell@cell.com

Reviewers' comments:
Reviewer #1: (Comments for the author)
In this manuscript entitled "b-glucan-induced trained immunity protects against Leishmania braziliensis infection: a crucial role for IL-32" Santos et al have investigated the potential impact of beta glucan on trained immunity for controlling

infection to intracellular parasite L. braziliensis. They have observed that b-glucan trained human macrophages to effectively control the parasite load. The improved resistance to Leishmania in b-glucan trained macrophages was regulated by expression of IL-32γ and was dependent on IL-1. They further extended these in vitro observations to in vivo using human IL-32γ transgenic mice and showed that administration of b-glucan enhances protection against Leishmania braziliensis, which was associated with transcriptional changes in the bone marrow metabolism. The manuscript is well written and offers interesting findings. However, the current presented data do not fully support the premises of this study.

Major Concerns:

Human study: The central hypothesis of the current study is that b-glucan induces trained immunity in macrophages via IL-1 signaling that then induces IL-32g that ultimately confers protection against L. braziliensis. However, in Figure 1 there is no data showing that b-glucan increased either IL-1 or IL-32 that led to better protection in infected macrophages. Thus, there is no direct evidence to demonstrate that the reduction in parasite in beta glucan trained macrophages was dependent on IL-1/IL32 axis. Furthermore, while in Figure 2C-E, the authors have assessed the levels of IL-6 and TNF-alpha from the beta glucan trained macrophages from CC, CT and TT genotype (IL32 promoter SNPs), all these measurements were after LPS stimulation and not L. braziliensis infection. Similarly, all the cytokine measurements in b-glucan induced trained macrophages of IL-1 promoter SNPs (Figure 3B-D) were also performed following LPS stimulation. Thus, the effects of SNPs in IL32/IL-1 promoter and macrophages trained immunity to L. braziliensis has not been addressed. Additionally, the investigator should evaluate the level of parasite in some of these macrophages.

Mouse study: Next the investigators aim to translate these in vitro human macrophages data to in vivo using a human transgenic IL-32g mice. Considering, it has been shown that HSCs are the main target for generating trained immunity via b-glucan (Mitroulis et al, 2018) or BCG (Kaufmann et al, 2018), these papers need to be discussed in more details in the discussion, the authors evaluate the impact of b-glucan on these transgenic mice (Figure 4). However, it is extremely difficult to understand these data without comparing these differences to wild type mice with/without b-glucan. Moreover, the investigators need to provide more granularity about the cellular sources of these cytokines or genes involved in metabolism as these measurements are form the total BM cells which includes HSCs and immune cells. The investigators may want to consider generating BM derived macrophages and then assess the expression of these genes as well as the control of parasite. The experiments from BM derived macrophages will be also excellent complementary to the human macrophages. In addition, the data presented in Figure 5 also missing wild type with/without b-glucan controls. The authors also should consider assessing protection (parasite load in paw), and IL-32g measurement at 4-weeks post-infection when the pathology (lesion) is similar between PBS and b-glucan treated mice.

Minor Concern

1) As only IL-32g isoform appears to contain hydrophobic signaling peptide in its N-terminus, which allows to be secreted, the authors should consider measuring the protein levels of IL-32g in supernatant of in vitro macrophages. Since the receptor for

IL-32 is still unknown, the authors need to discuss how do they envision that IL-32 works in their model system.
2) Please provide data regarding viability of macrophages after L. braziliensis especially after 24h infection.
3) Figure 3E-F, IL1-beta induces the mRNA expression of IL-32. This is a very important figure for the current manuscript and the authors should provide data for the protein level. These experiments also require control macrophages (no b-glucan).

Reviewer #2: The manuscript by Dos Santos et al. investigates the effect of a single beta-glucan treatment on the course of Leishmania braziliensis infection in vitro and in vivo. The authors report that the parasite is cleared more rapidly following priming with beta-glucan. IL-32 appears to play a central role in parasite clearance in vitro and in vivo.
Although the topic is very interesting and novel, the authors fail to demonstrate the role of trained immunity during Leishmaniasis. The major problem with this study is the definition of training versus priming. Waiting 5 days after treatment of monocytes with beta-glucan seems more like priming than training. It is well known that macrophages that are primed prior to infection are much more efficient in eliminating the parasite.

Major points:

This study fails to build an organic story

No mechanisms are proposed. For instance, the authors suggest that lack of killing of the parasite following IL1Ra blockade occurs because of decreased IL-32 expression, but do not formerly prove this assertion. IL1 regulates many pathways that could be essential for parasite elimination. Moreover, the role of IL-32 in vivo following beta-glucan injection
is also not explored.

This study also lacks detailed analysis: e.g. bone marrow cells populations are not detailed. Which population is increasing? Which population was chosen to perform qPCRs? Inflammatory infiltrates are also not characterized.

Fig. 4 B, F, G: it is unclear why these particular targets were chosen.

What is the meaning of using "humanized" TG mice?

Metacyclic promastigotes should be used for all infections; in vitro infection should be monitored for at least 48h.