



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA (IPTSP)
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-
HOSPEDEIRO (PPGBRPH)**

DANIELLA CRISTINA SILVA POLONSKI

**Avaliação do papel da opsonização na suscetibilidade de macrófagos
murinos à infecção pelas diferentes espécies de *Leishmania*.**

GOIÂNIA

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) 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 9.610/98](#), 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 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

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

DANIELLA CRISTINA SILVA POLONSKI

3. Título do trabalho

Avaliação do papel da opsonização na suscetibilidade de macrófagos murinos à infecção pelas diferentes espécies de *Leishmania*

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[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.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Milton Adriano Pelli De Oliveira**, Professor do Magistério Superior, em 05/02/2024, às 15:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniella Cristina Silva Polonski**, Discente, em 05/02/2024, às 16:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3648125** e o código CRC **F75EC76F**.

DANIELLA CRISTINA SILVA POLONSKI

Avaliação do papel da opsonização na suscetibilidade de macrófagos murinos à infecção pelas diferentes espécies de *Leishmania*.

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, da Universidade Federal de Goiás (UFG), como requisito para obtenção do Título de Mestre em 2023. Área de concentração: biologia da relação parasito-hospedeiro

Orientador: Milton Adriano Pelli de Oliveira

Goiânia

2024

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

Polonski, Daniella Cristina Silva

Avaliação do papel da opsonização na suscetibilidade de macrófagos murinos à infecção pelas diferentes espécies de Leishmania.

[manuscrito] / Daniella Cristina Silva Polonski. - 2023.

63 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira.

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, 2023.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.

Inclui siglas, fotografias, lista de figuras.

1. Leishmania. 2. opsonização. 3. macrófagos. 4. amastigotas. I. de Oliveira, Milton Adriano Pelli, orient. II. Título.

CDU 612.017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE DANIELLA CRISTINA SILVA POLONSKI - Aos trinta e um dias do mês de março do ano de 2023 (31/03/2023), às 14h00min, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. **MILTON ADRIANO PELLI DE OLIVEIRA** (IPTSP/UFG), **RODRIGO SAAR GOMES** (IPTSP/UFG) e **ARISSA FELIPE BORGES** (Estácio) para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada na Sala de Leitura, no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, da UFG, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: “**Avaliação do papel da opsonização na suscetibilidade de macrófagos murinos à infecção pelas diferentes espécies de *Leishmania***”, em nível de MESTRADO, área de concentração em **BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, de autoria de **DANIELLA CRISTINA SILVA POLONSKI**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo Orientador, Prof. Dr. **MILTON ADRIANO PELLI DE OLIVEIRA**, 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	Aprovado / Reprovado
Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira	Aprovada
Prof. Dr. Rodrigo Saars Gomes	Aprovada
Prof. Dra. AriSSa Felipe Borges	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 **MESTRA EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, na área de concentração em **BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 15h e 36 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, **HELOÍSA DE SOUSA VIEIRA**, secretária 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.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Milton Adriano Pelli De Oliveira**, Professor do Magistério Superior, em 31/03/2023, às 15:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Saar Gomes, Professor do Magistério Superior**, em 31/03/2023, às 15:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Arisa Felipe Borges, Usuário Externo**, em 31/03/2023, às 15:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3615889** e o código CRC **4D0DE543**.

Referência: Processo nº 23070.015561/2023-80

SEI nº 3615889

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

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Daniella Cristina Silva Polonski

Orientador (a): Milton Adriano Pelli de Oliveira

Membros:

1. Milton Adriano Pelli de Oliveira

2. Rodrigo Saar Gomes

3. Arissa Felipe Borges

Data: 31/03/2023

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, Elenice, e à minha irmã, Eduarda, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando em todos os momentos da minha vida. E ao meu filho, Rafael, que está prestes a vir ao mundo e me deu forças sempre que precisei.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Elenice e Abram, por terem me ensinado o valor do conhecimento e sempre me incentivado a ir atrás dos meus sonhos. Agradeço por todo apoio e dedicação para que eu pudesse estudar e correr atrás dos meus objetivos.

Agradeço a minha irmã, Eduarda, por sempre buscar me ajudar e dar apoio em tudo que precisei e estar ao meu lado com mensagens positivas, sempre que eu pensava que não seria capaz.

Agradeço meu companheiro, Murillo, por estar comigo nesses dois anos, me apoiando e incentivando, além da compressão de que a distância era necessária para que eu pudesse concluir esta etapa tão importante para minha vida profissional.

Agradeço imensamente ao meu orientador, doutor Milton, por tudo que me ensinou e por toda paciência e compreensão comigo, enriquecendo minha vida profissional e acadêmica.

Agradeço a todos meus professores da pós-graduação por tudo que me ensinaram. Em especial, agradeço a professora Simone, que me orientou durante o estágio, sempre disposta a me ajudar nas dificuldades encontradas.

Agradeço também aos meus colegas de laboratório, André Murilo e Santiago Espellet, por me acompanharem em toda essa caminhada e me ajudarem sempre que precisei.

Agradeço também a minha segunda família, meus colegas de graduação, Adrielly, Angélica, Davi, Gabriel, Izabela, Lucas Martins, Lucas Guimarães, Cesar e Lucas Cavasin, por toda caminhada até aqui e por tornarem minha vida mais leve e feliz.

Agradeço a CAPES, CNPq e a Universidade Federal de Goiás, por ultrapassarem as inúmeras barreiras e dificuldades que sofrem a ciência e a educação, buscando sempre um futuro melhor para nós, estudantes e para o Brasil.

Por fim, agradeço a Deus, por ter me dado forças e ter colocado em minha vida todas essas pessoas maravilhosas que, cada uma do seu jeito, contribuíram para que eu fosse capaz de passar por mais essa etapa na minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	10
RESUMO.....	1
2	
ABSTRACT.....	1
3	
1.	
INTRODUÇÃO.....	14
1.1	
Leishmanioses.....	14
1.1.1	
Definição.....	14
1.1.2 Agente etiológico – Leishmânia.....	16
1.1.3 Ciclo de vida.....	17
1.1.4	
Vetor.....	19
1.2 Resposta Imune à infecção por <i>Leishmania</i> spp.....	20
1.3 Modulação do sistema imunológico do hospedeiro por <i>Leishmanias</i>	22
1.4	
Macrófagos.....	23
1.4.1 Subtipos macrófagos M2.....	24
1.4.2 Macrófagos M2b em infecções por <i>Leishmanias</i>	25
2.	
JUSTIFICATIVA.....	27

3.	OBJETIVOS.....	29
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1	PARASITOS.....	30
4.2	CAMUNDONGOS.....	30
4.3	OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS.....	30
4.4	INFECÇÃO DOS MACRÓFAGOS MURINOS E AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE.....	3

4.5 RECUPERAÇÃO DE FORMAS PROMASTIGOTAS.....	31
4.6 OBTENÇÃO DOS ANTICORPOS.....	31
4.7 OBTENÇÃO DE PROMASTIGOTAS OPSONIZADAS.....	31
4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	32
5. RESULTADOS.....	33
5.1 AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE OU RESISTÊNCIA DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS BALB/c OU C57BL/6 INFECTADOS COM <i>L. (V.) braziliensis</i>	33
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FAGOCITÁRIA DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS BALB/c OU C57BL/6 INFECTADOS COM <i>L. (V.) braziliensis</i> E CAPACIDADE DE SOBREVIVÊNCIA DOS PARASITOS OPSONIZADOS COM ANTICORPO anti- <i>Leishmania</i>	35
5.3 AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE OU RESISTÊNCIA DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS BALB/c OU C57BL/6 INFECTADOS COM <i>L. (L.) amazonensis</i>	37
5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FAGOCITÁRIA DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS BALB/c OU C57BL/6 INFECTADOS COM <i>L. (V.) amazonensis</i> E CAPACIDADE DE SOBREVIVÊNCIA DOS PARASITOS OPSONIZADOS COM ANTICORPO anti- <i>Leishmania</i>	39
5.5 AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE OU RESISTÊNCIA DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS BALB/c OU C57BL/6 INFECTADOS COM <i>L. (L.) infantum</i>	41
5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FAGOCITÁRIA DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS BALB/c OU C57BL/6 INFECTADOS COM <i>L. (L.) infantum</i> E CAPACIDADE DE SOBREVIVÊNCIA DOS PARASITOS OPSONIZADOS COM ANTICORPO anti- <i>Leishmania</i>	43
5.7 AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE OU RESISTÊNCIA DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS BALB/c OU C57BL/6 INFECTADOS COM <i>L. (L.) major</i>	45
5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FAGOCITÁRIA DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS BALB/c OU C57BL/6 INFECTADOS COM <i>L. (L.) major</i> E CAPACIDADE DE SOBREVIVÊNCIA DOS PARASITOS OPSONIZADOS COM ANTICORPO anti- <i>Leishmania</i>	47
6. DISCUSSÃO.....	49
7. CONCLUSÕES.....	54

8. REFERÊNCIAS.....55
ANEXOS.....60

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Aspectos morfológicos dos parasitos de *Leishmania* spp.....17
- Figura 2.** Representação esquemática do ciclo de vida de *Leishmania* spp.....19
- Figura 3.** Representação da polarização de macrófagos durante infecção por *Leishmania*.....25
- Figura 4.** Avaliação da suscetibilidade ou resistência de macrófagos murinos, BALB/c ou C57BL/6, durante infecção *in vitro* por *Leishmania braziliensis*.....35
- Figura 5.** Avaliação da atividade fagocitária de macrófagos murinos, BALB/c ou C57BL/6, durante infecção *in vitro* por *Leishmania braziliensis* e da capacidade de sobrevivência dos parasitos opsonizados com anticorpo anti-*Leishmania*.....37
- Figura 6.** Avaliação da suscetibilidade ou resistência de macrófagos murinos, BALB/c ou C57BL/6, durante infecção *in vitro* por *Leishmania amazonensis*.....39
- Figura 7.** Avaliação da atividade fagocitária de macrófagos murinos, BALB/c ou C57BL/6, durante infecção *in vitro* por *Leishmania amazonensis* e da capacidade de sobrevivência dos parasitos opsonizados com anticorpo anti-*Leishmania*.....41
- Figura 8.** Avaliação da suscetibilidade ou resistência de macrófagos murinos, BALB/c ou C57BL/6, durante infecção *in vitro* por *Leishmania infantum*.....43
- Figura 9.** Avaliação da atividade fagocitária de macrófagos murinos, BALB/c ou C57BL/6, durante infecção *in vitro* por *Leishmania infantum* e da capacidade de sobrevivência dos parasitos opsonizados com anticorpo anti-*Leishmania*.....45
- Figura 10.** Avaliação da suscetibilidade ou resistência de macrófagos murinos, BALB/c ou C57BL/6, durante infecção *in vitro* por *Leishmania major*.....47

Figura 11. Avaliação da atividade fagocitária de macrófagos murinos, BALB/c ou C57BL/6, durante infecção *in vitro* por *Leishmania major* e da capacidade de sobrevivência dos parasitos opsonizados com anticorpo anti-*Leishmania*.....49

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

Gp63	Glicoproteína gp63
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
IgG	Imunoglobulina-G
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-13	Interleucina-13
INF- γ	Interferon-gama
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
LC	Leishmaniose cutânea
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeo
LV	Leishmaniose visceral
M0	Macrófagos não polarizados
M1	Macrófagos classicamente ativados
M2	Macrófagos alternativamente ativados
M-CSF	Fator de estimulação de colônia de macrófagos
PBS	Tampão fosfato-salino
PKDL	Leishmaniose dérmica pós-calazar
PSG	Gel secretor de promastigota
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	Meio de Cultura Roswell Park Memorial Institute
SC	Sistema Complemento
SFB	Soro fetal bovino

TGB- β	Fator de transformação e crescimento-beta
Th1	Linfócitos T auxiliares do tipo 1
Th2	Linfócitos T auxiliares do tipo 2
TLR4	Receptor do tipo Toll-4
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa

RESUMO

Leishmanioses são um conjunto de parasitoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. As manifestações clínicas irão variar de acordo com a espécie de *Leishmania* e a resposta imune do hospedeiro. Dentre os possíveis quadros clínicos de leishmanioses, de acordo com a sintomatologia, destacam-se três: leishmaniose visceral, cutânea e mucosa. Os macrófagos são as células-chave no prognóstico da infecção por leishmânia. Macrófagos M1 estimulam a resposta Th1 e estão associados à atividade leishmanicida; já os macrófagos M2 são ativados principalmente por linfócitos Th2 e estão associados ao crescimento e sobrevivência dos parasitos. O subtipo M2b regula a resposta imune e a reação inflamatória contra parasitos intracelulares e está relacionado à resposta humoral. O presente trabalho avaliou a suscetibilidade das diferentes espécies de *Leishmania*: *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (L.) major*, *Leishmania (L.) infantum* e *Leishmania (L.) amazonensis* em infecções *in vitro*, utilizando macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6. Os macrófagos murinos foram cultivados e infectados com promastigotas das diferentes espécies de *Leishmania*, opsonizadas ou não com anticorpo anti-leishmania. A infecção foi avaliada pelo método de recuperação de promastigotas nos pontos: 3H, 24H, 72H e 120H. Observamos que macrófagos de C57BL/6 são resistentes à infecção por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. Camundongos BALB/c apresentam suscetibilidade à *L. (L.) infantum*. Tanto C57BL/6 e BALB/c infectados com parasitos *L. (L.) major* apresentam suscetibilidade ao parasito. Tanto nas infecções com *L. major* quanto com *L. infantum*, observou-se que a associação com anticorpos está mais relacionada à reprodução dos parasitos e sobrevivência dentro dos macrófagos do que à morte dos parasitos. Concluímos então, que a opsonização com anti-leishmania pode modular o macrófago para um perfil característico de M2b, favorecendo a infecção.

Palavras-chave: Leishmania, opsonização, macrófagos, amastigotas

ABSTRACT

Leishmaniasis are a set of parasitic diseases caused by a protozoa of the *Leishmania* genus. Clinical manifestations vary according to the *Leishmania* species and host immune response. Among of the possible clinical manifestation of leishmaniasis, according to the symptomatology, three stand out: visceral, cutaneous and mucosal leishmaniasis. Macrophages are key cells in the prognosis of *Leishmania* infection. M1 macrophages stimulate the Th1 response are associated with leishmanicidal activity; the M2 macrophages are activated mainly by Th2 lymphocytes are associated with the growth and survival of the parasites. The M2b subtype regulates the immune response and the inflammatory reaction against intracellular parasites and is related to the humoral response. The present work evaluated the susceptibility of different species of *Leishmania*: *Leishmania* (V.) *braziliensis*, *Leishmania* (L.) *major*, *Leishmania* (L.) *infantum* and *Leishmania* (L.) *amazonensis* to *in vitro* infections, using macrophages from BALB/c and C57BL/6. Murine macrophages were cultured and infected with promastigotes from different *Leishmania* species, opsonized or not with anti-leishmania antibody. The infection was evaluated by the promastigotes retrieval method at the points: 3 h, 24 h, 72h and 120h. We found that C57BL/6 macrophages are resistant to infection by *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis*. BALB/c mice show susceptibility to *L. (L.) infantum*. Both C57BL/6 and BALB/c infected with *L. (L.) major* parasites show susceptibility to the parasite. Both in infections with *L. major* and *L. infantum*, it was observed that the association with antibodies is more related to the reproduction of the parasites and survival inside the macrophages than to the killing of parasites We therefore conclude that opsonization with anti-leishmania can modulate the macrophage to a characteristic M2b profile, favoring infection.

Keywords: Leishmania, opsonization, macrophages, amastigotes

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

1.1.1 Definição

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas pelo protozoário *Leishmania* sp., um parasito intracelular obrigatório, que é transmitido ao homem, naturalmente, por insetos flebotomíneos fêmeas durante repasto sanguíneo. Os vetores são, normalmente, integrantes dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (TORRES-GUERRERO et al., 2017). Em raros casos, além da forma natural, as leishmânias também podem ser transmitidas através do compartilhamento de seringas contaminadas, por transfusões de sangue, por infecções venéreas e de forma congênita (ELMAHALLAWY et al., 2014).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2023), a leishmaniose está entre as sete doenças tropicais negligenciadas mais importantes e trata-se de um grave problema de saúde global apresentando um amplo espectro de manifestações clínicas, podendo ser fatal (ANDRADE-NARVÁEZ, 2001; REITHINGER, 2007). Em 2021, dos 200 países e territórios que associados à OMS, 99 (49%) foram considerados endêmicos e 6 tinham casos previamente notificados de leishmaniose (OMS, 2023).

O desenvolvimento da infecção e as manifestações clínicas da doença dependem da interação entre as características de virulência da espécie de *Leishmania* envolvida e das respostas imunes de seus hospedeiros. Com isso, há um espectro de sintomas que vai desde lesões cutâneas localizadas a lesões difusas no tecido (OMS, 2023).

De acordo com a sintomatologia observada em humanos, as leishmanioses podem ser divididas em pelo menos três principais síndromes clínicas: leishmaniose visceral (LV), leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucocutânea (LMC) (PEARSON; DE QUEIROZ SOUSA, 1996). Dentre as leishmanioses, a LV destaca-se como a forma mais fatal, enquanto a LC é a forma mais comum.

Ao serem inoculados nos hospedeiros, os parasitos infectam macrófagos residentes na pele e multiplicam-se. Quando a célula hospedeira está cheia de

parasitas, ela se rompe e as amastigotas liberadas infectam os macrófagos vizinhos. Esse tipo de infecção dará origem a leishmanioses cutâneas. Por outro lado, quando as amastigotas liberadas alcançam a circulação sanguínea e infectam as células do sistema fagocitário mononuclear do fígado, baço, medula óssea, linfonodos e intestino, há o desenvolvimento da LV (STEVERDING, 2017).

As leishmanioses cutâneas podem ainda ser subdivididas em: leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose disseminada, leishmaniose mucocutânea e a leishmaniose cutânea anérgica difusa (PASTORINO et al., 2002; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

A leishmaniose cutânea localizada é a forma mais comum de leishmaniose cutânea e caracteriza-se por lesões na pele próximas ao local da picada do vetor, principalmente úlceras, que deixam cicatrizes na pele ao longo da vida (OMS, 2023). No geral, este quadro clínico evolui com um prognóstico benigno, entretanto, as cicatrizes podem causar deformações em regiões expostas do corpo dos indivíduos, provocando constrangimento social (KUBBA et al., 1987).

Em alguns casos, o parasito pode se espalhar pelas vias linfática e sanguínea para diferentes regiões da pele, como face, tórax e membros superiores, onde o parasito se reproduz amplamente e causa leishmaniose disseminada (VÉLEZ et al., 2015)

A leishmaniose mucocutânea é caracterizada por lesões nas camadas mucosas, como nariz, boca e garganta, provocando nessas regiões, destruição parcial ou total (LEITE et al., 2015). Já na leishmaniose cutânea anérgica, ocorrem lesões caracterizadas por infiltrações de amastigotas que podem se espalhar pelo corpo. Pode configurar-se uma forte imunossupressão celular, causando um prognóstico maligno e impedindo o controle da infecção (MACHADO; PRATES; MACHADO, 2019).

A leishmaniose visceral, também chamada de calazar, é a forma mais grave da doença e, se não tratada, é fatal em mais de 95% dos casos. Caracteriza-se por crises irregulares de febre, perda de peso, aumento do baço e do fígado e anemia (OMS, 2023). A leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL) é uma complicação da

LV, caracterizada por uma erupção macular, maculopapular ou nodular na face, tronco ou outra parte do corpo (ELMAHALLAWY et al., 2014).

O diagnóstico de leishmaniose visceral é feito por meio da combinação de sintomas clínicos com testes parasitológicos ou sorológicos. Já na leishmaniose cutânea e mucocutânea os testes sorológicos têm valor limitado e a manifestação clínica com exames parasitológicos é o que confirma o diagnóstico (OMS, 2023).

Atualmente, as opções disponíveis de tratamento para a leishmaniose enfrentam várias limitações, incluindo efeitos adversos, alto custo, baixa eficácia e necessidade de múltiplas reaplicações; além da resistência adquirida pelo paciente aos medicamentos. Mais recentemente, devido a uma compreensão mais profunda da patogênese da doença, novas terapias vêm surgido, como a imunoterapia e imunomodulação. Outro caminho que vem sendo explorado é o uso de vários alvos terapêuticos nas vias metabólicas das leishmânias (PRADHAN et al., 2021).

No Brasil, o tratamento de primeira linha utilizado para todas as formas de leishmaniose, é feito por meio do medicamento antimoniato de meglumina (Glucantime). Também são utilizadas como alternativa, a anfotericina B e a pentamidina. Porém, todos esses medicamentos apresentam toxicidade considerável (FIOCRUZ, 2023).

1.1.2 Agente etiológico - Leishmânia

As leishmânias são protozoários flagelados do gênero *Leishmania* e foram descritas pela primeira vez no ano de 1900, por um patologista escocês chamado William Boog Leishman. Ao observar um baço de um soldado morto, Leishman encontrou pequenos corpos com duas cromatinas regularmente padronizadas. Hoje, reconhecemos tais cromatinas como o núcleo e o cinetoplasto dos parasitos. No ano de 1903, o médico Ronald Ross, ao investigar o calazar na Índia, descreveu e reconheceu a primeira espécie de leishmânia, a *Leishmania donovani* (ROSS 1903a; b). Desde então, várias outras espécies do gênero *Leishmania* foram relatadas. Atualmente, encontram-se descritas 53 espécies de leishmânias, entretanto, apenas 20 são capazes de infectar e causar leishmaniose em humanos (SASIDHARAN; SAUDAGAR, 2021).

Os agentes etiológicos das leishmanioses estão inseridos no Reino Protista, família Trypanosomatidae, subfamília Leishmaniinae e gênero *Leishmania* (AKHOUNDI et al., 2016). Há ainda, classificação em dois subgêneros *Viannia* ou *Leishmania*, de acordo com as áreas anatômicas nas quais os parasitos se desenvolvem no intestino do vetor. As espécies que se desenvolvem no intestino anterior e médio pertencem ao subgênero *Leishmania*, enquanto as que se desenvolvem no intestino anterior, médio e grosso do vetor, são classificadas como subgênero *Viannia* (LAINSON; SHAW, 1987).

Os parasitos do gênero *Leishmania* são heteroxenos, ou seja, capazes de colonizar mais de um hospedeiro durante o seu ciclo de vida. Eles vivem nos fagócitos do sistema imunitário de mamíferos e no trato intestinal de flebotomíneos (AKHOUNDI et al., 2016). Durante o ciclo de vida do parasito, destacam-se duas morfologias bem características, dependendo do hospedeiro no qual se encontra. No hospedeiro invertebrado, encontra-se na forma de promastigota, caracterizando-se por um longo flagelo em uma extremidade do corpo, com núcleo central e cinetoplasto terminal (Figura 1A). Quando encontrados no interior das células mononucleares do hospedeiro vertebrado, têm sua morfologia alterada e passa a apresentar um flagelo rudimentar, arredondado com núcleo evidente e cinetoplasto próximo ao núcleo, denominada amastigota (PAHO, 2019) (Figura 1B).

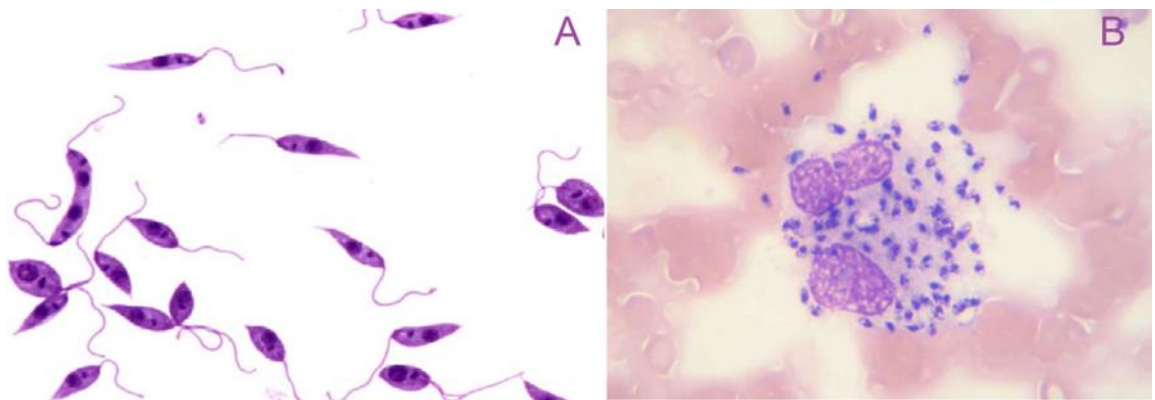


Figura 1: Aspectos morfológicos dos parasitos de *Leishmania* spp.

(A) formas promastigotas, (B) formas amastigotas. Microscopia óptica. Disponível em: http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/T_107.pdf

A forma promastigota é revestida por um glicocálice espesso composto de proteínas ancoradas em glicosilfosfatidilinositol (GPI), o fosfoglicano ancorado em

GPI, lipofosfoglicano (LPG) e uma família de glicolípídios GPI livres denominados glicoinositolfosfolípídios (GIPLs) (NADERER et al., 2004).

Uma única espécie de leishmânia pode gerar mais de um tipo de leishmaniose e cada tipo de leishmaniose pode ser causada por mais de uma espécie do gênero *Leishmania* (PEARSON; DE QUEIROZ SOUSA, 1996). Porém, a leishmaniose visceral costuma ser provocada principalmente por parasitos das espécies *Leishmania (L.) donovani* e *Leishmania (L.) infantum*. Já a leishmaniose cutânea pode ser provocada por um grande número de espécies, como: *Leishmania (L.) major*, *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (L.) amazonenses*, *Leishmania (V.) panamensis*, *Leishmania (V.) guyanensis* e *Leishmania (L.) mexicana* (REITHINGER et al., 2007).

Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem uma distribuição global, encontrando-se em áreas tropicais e subtropicais, incluindo América do Norte, Central e do Sul, além da bacia do Mediterrâneo, sudeste da Europa, Oriente Médio, centro e sudeste da Ásia, subcontinente indiano, África e relatórios recentes também demonstram sua presença na Austrália. No América Latina, a *Leishmania (V.) braziliensis* é a espécie de maior ocorrência (PEARSON; DE QUEIROZ SOUSA, 1996). Enquanto na Eurásia e na África, a espécie de maior prevalência é a *Leishmania (L.) major* (PRATLONG et al., 2009).

1.1.3 - Ciclo de vida

O ciclo de vida das espécies do gênero *Leishmania* inicia-se com a picada de um flebotomíneo, que transfere as promastigotas metacíclicas, estágio infeccioso, juntamente com sua saliva para o hospedeiro (Figura 2, item 1). Ao serem inoculadas, as promastigotas aderem à membrana plasmática dos fagócitos locais, principalmente macrófagos residentes e neutrófilos, e desencadeiam o processo de fagocitose (Figura 2, item 2) (LODGE; DESCOTEAUX 2008). Dentro do vacúolo parasitóforo, as promastigotas diferenciam-se em amastigotas, as quais se proliferam até romperem os macrófagos e serem liberadas (Figura 2, item 3 e 4). As amastigotas liberadas iniciam cadeias de infecções adicionais, levando ao desenvolvimento de leishmanioses (CDC, 2020).

Quando realizam um novo repasto sanguíneo em um indivíduo infectado, os flebotomíneos ingerem macrófagos infectados por amastigotas (Figura , item 5 e 6). Dentro do vetor, as amastigotas (Figura 1B) transformam-se em promastigotas (Figura 1 A) e passam por um processo chamado metacicloênese. Durante esse processo ocorrem tanto alterações morfológicas quanto bioquímicas, como, por exemplo, síntese de moléculas de LPG e a glicoproteína gp63 (Figura 2, item 7). Ao todo são descritas pelo menos cinco formas durante a metacicloênese: promastigotas procíclicas, nectomonas, haptomonas, paramastigotas e, finalmente, promastigotas metacíclicas, que migram para a probóscide do flebotomíneo (Figura 2, item 8) (MUSKUS & MARÍN, 2002).

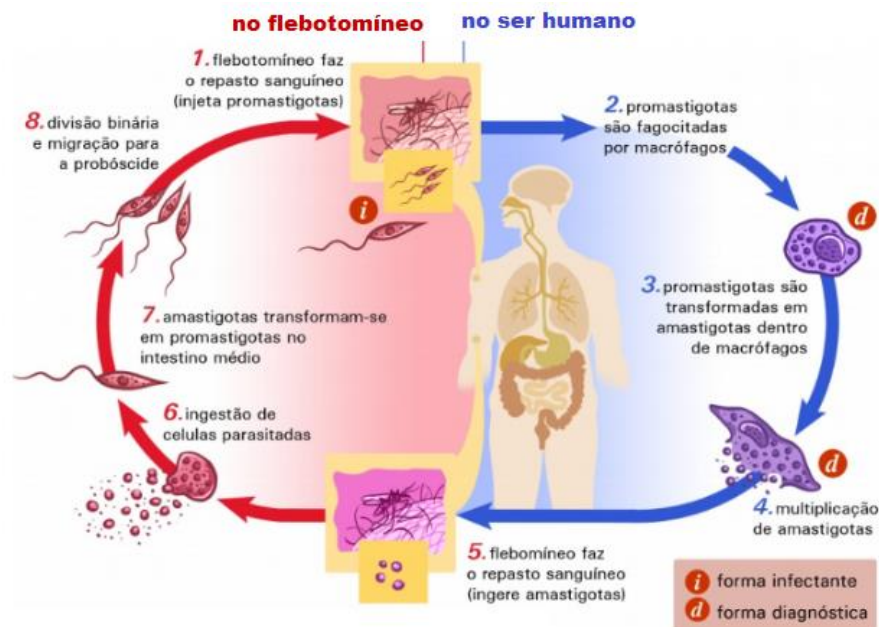


Figura 2: Representação esquemática do ciclo de vida de *Leishmania* spp.

1. Durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo são inoculadas, juntamente com sua saliva, formas promastigotas do parasito. 2. As formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos residentes. 3. No interior dos macrófagos, as promastigotas passam por transformações, assumindo as formas amastigotas. 4. As amastigotas multiplicam-se até romperem as células, sendo liberadas e infectando outros macrófagos próximos e/ou caindo na circulação do hospedeiro. 5/6. Ao realizar repasto sanguíneo, o flebotomíneo ingere células parasitadas com amastigotas. 7. No intestino médio do vetor, as amastigotas sofrem transformações morfológicas e bioquímicas assumindo as formas promastigotas. 8. Após se multiplicarem por divisão binária e passarem pelo processo de metacicloênese, transformando-se em promastigotas metacíclicas, os parasitos migram para a probóscida dos vetores. Fonte: adaptado de CDC.

1.1.4 - Vetor

Os flebotomíneos pertencem à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. As leishmanias são transmitidas principalmente por espécies do gênero *Phlebotomus* na Europa, Ásia e África e por espécies do gênero *Lutzomyia* nas Américas. Podem ser encontradas espécies de flebotomíneos em florestas, regiões de deserto e algumas são peridomésticas, sendo encontrados em escombros ou perto de casas ou edifícios agrícolas (PEARSON; DE QUEIROZ SOUSA, 1996).

Conhecido popularmente como mosquito palha, o vetor possui cerca de 2mm de comprimento e asas lanceoladas. Apenas flebotomíneos fêmeas praticam hematofagia em mamíferos para o desenvolvimento do ovo. Alguns flebotomíneos têm uma ampla gama de hospedeiros, incluindo canídeos, roedores, marsupiais e hyraxes, enquanto outros se alimentam principalmente de humanos. Dessa forma, a leishmaniose humana pode ter padrões de transmissão zoonótica ou antroponótica (STEVERDING, 2017).

1.2 Resposta Imune à infecção por *Leishmania* sp.

Como dito anteriormente, ao fazer o repasto sanguíneo no hospedeiro, o flebotomíneo inocula, além do parasito, sua saliva. A saliva inoculada possui componentes farmacológicos ativos com propriedades anti-hemostáticas, quimiotáticas e imunomoduladoras. Essas propriedades têm capacidade de influenciar diretamente o processo infeccioso, modulando a resposta imune local (SCORZA et al., 2017). A princípio, logo após a inoculação, no local da picada, os macrófagos residentes fagocitam parte dos parasitos. Em seguida, ocorre uma infiltração de neutrófilos rápida e intensa, seguida do aparecimento de monócitos que se diferenciam em macrófagos no tecido (PETERS et al.2008 , HURRELL et al. 2015).

Os neutrófilos fagocitam de 80-90% dos parasitas e produzem citocinas que recrutam e ativam outros tipos celulares para regular o desenvolvimento da resposta imune adaptativa durante infecções por leishmânias (PETERS et al.2008). Porém, embora a participação efetiva de neutrófilos na eliminação do parasita tenha sido relatada para *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. donovani*, quando analisados coletivamente, a maioria dos estudos relata a insuficiência da ação leishmanicida dos neutrófilos para controlar a infecção e o desenvolvimento da doença (TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018).

Depois disso, as leishmânias acabam sendo fagocitadas por macrófagos, estabelecendo a infecção intracelular. Os macrófagos são, então, as células chave na progressão da leishmaniose, sendo o sucesso ou fracasso da infecção dependente da interação entre as espécies de leishmânia e o tipo e intensidade da resposta imune do hospedeiro. Essas células podem ser responsáveis tanto pela destruição de parasitas internalizados, quanto podem fornecer um local seguro para a reprodução desses parasitos (SCOTT; NOVAIS, 2016).

Os eventos que ocorrem nos locais de infecção acabam levando à apresentação do antígeno de leishmânia aos linfócitos T para iniciar a resposta imune adaptativa. É a polarização da resposta imune adaptativa, por meio de dos sinais iniciais dos tecidos subjacentes ao local de inoculação, que orienta o curso da doença subsequente (SCORZA et al., 2017).

O desenvolvimento da leishmaniose depende do desequilíbrio de células T auxiliares, Th1 *versus* Th2. Quando há prevalência da resposta Th1 há uma tendência ao controle parasitário, com prognóstico de baixo número de parasitas na corrente sanguínea dos pacientes. Aqueles com uma resposta Th2 possuem altas cargas parasitárias, pois a neutralização de anticorpos é ineficaz contra o parasita intracelular (SCORZA et al., 2017). Logo, no caso da leishmaniose cutânea, hospedeiros cujas respostas Th2 são prevalentes, inclinam-se ao desenvolvimento de uma doença mais disseminada, o que pode ocasionar leishmaniose visceral e, no Novo Mundo, resulta em leishmaniose cutânea disseminada (MANN et al., 2021).

Como a leishmânia é um protozoário intracelular, o papel do sistema imune inato e das células T na patogênese da doença têm sido o foco dos estudos. Porém, recentemente aspectos importantes relacionados à imunidade humoral foram levantados durante a infecção por parasitos do gênero *Leishmania*.

Durante a resposta imune, os anticorpos são capazes de promover a neutralização, a opsonização e a ativação do sistema complemento (SC). Na leishmaniose, o sistema complemento poderia ser de grande importância contra os parasitos, uma vez que é a primeira barreira enfrentada pela leishmânia no hospedeiro vertebrado. Entretanto, graças à presença do LPG e gp63, o parasito consegue evadir a lise mediada pelo SC (GURUNG e KANNEGANTI, 2015).

Entretanto, a presença de níveis consideráveis de anticorpos produzidos por células B, tem sido relacionada a um mau prognóstico de leishmanioses, com alta carga parasitária (CONDE et al., 2022). Já foi demonstrado que a opsonização de formas amastigotas de *L. major* revestidas com IgG, são internalizadas de forma mais eficiente por macrófagos murinos, induzindo a produção de IL-10 (KANE e MOSSER, 2001), citocina associada a um perfil anti-inflamatório.

1.3 Modulação do sistema imunológico do hospedeiro por *Leishmanias*.

A alta prevalência das leishmanioses é diretamente influenciada pelo sucesso do longo processo de coevolução hospedeiro-parasita em que os parasitos leishmânia têm a capacidade de manipular o sistema imunológico dos vertebrados a seu favor, por meio da síntese de moléculas do parasita (FRATERNALE, 2015).

Ainda no hospedeiro invertebrado, o parasito pode formar um tampão gelatinoso contendo proteofosfoglicano filamentosos, que tem sido chamado de gel secretor de promastigota (PSG). O PSG também está incluída no inóculo do flebotomíneo e modula as respostas imunes locais na pele (SCORZA, 2017)

Ao adentrar no hospedeiro vertebrado, o LPG, presente principalmente no glicocálice das formas promastigotas, desempenha um papel crítico na infecção de macrófagos (MCCONVILLE et al., 2007), protegendo as promastigotas de espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas durante a fagocitose (SPATH et al., 2003).

Além disso, os parasitos são capazes de produzir moléculas inibidoras de serina protease que impedem a liberação de elastase dos neutrófilos e dificultam a ativação do receptor do tipo Toll 4 (TLR4) de macrófagos favorecendo a sobrevivência das leishmânias (ESCHENLAUER et al., 2009).

1.4 Macrófagos

Como citado no item anterior, o desenvolvimento da leishmaniose está associado ao tipo de resposta dos linfócitos T específicos para leishmânia (SCORZA et al., 2017). A produção de citocinas pró-inflamatórias, ativa os macrófagos infectados para produzir efetores microbicidas, promovendo o controle de parasitas. Já a produção de moléculas que antagonizam os efeitos dessas citocinas, estão associados a um perfil mais permissivo para os parasitos (BARRAL et al., 1995).

Quando estão em repouso, os macrófagos se encontram indiferenciados e conforme recebem diferentes sinais do microambiente em que essas células se encontram, elas se tornam ativadas e desenvolvem os fenótipos de macrófagos funcionalmente distintos. Uma das classificações de macrófagos ativados é classicamente ativados (M1) ou alternativamente ativados (M2), os quais desenvolvem diferentes desfechos em uma doença (ARANGO, 2014).

Os macrófagos M1 são a primeira linha de defesa contra parasitos intracelulares e estimulam o desenvolvimento da resposta Th1 via secreção de IL-12 (WANG et al., 2014). A polarização de macrófagos M1 se dá principalmente pela presença de lipopolissacarídeo (LPS), interferon gama (IFN- γ) e/ou fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Simultaneamente, a ativação de macrófagos M1 é feita pela subpopulação de linfócitos Th1, por meio da produção de IFN- γ e TNF- α e é essencial para a eliminação de patógenos intracelulares, através do desencadeamento de uma explosão oxidativa e produção de óxido nítrico (SCOTT; NOVAIS, 2016).

Já o perfil M2 é ativado principalmente por linfócitos Th2, que produzem as citocinas IL-4 e IL-13, e é um perfil caracterizado pela biossíntese de poliaminas via ativação da enzima arginase (arg) e produção de ureia e L-ornitina, produtos benéficos para o crescimento da *Leishmania* dentro do macrófago. Logo, esse fenótipo favorece a progressão da doença (MUXEL et al., 2017). Diferentes estímulos, como IL-4/IL-13, IL-10, TGF- β , M-CSF, vitamina D3 e imunocomplexos, estimulam a polarização de macrófagos M2 (SCOTT; NOVAIS, 2016). A relação entre as citocinas produzidas pelas subpopulações de linfócitos T e a resposta nos macrófagos está resumida na Figura 3.

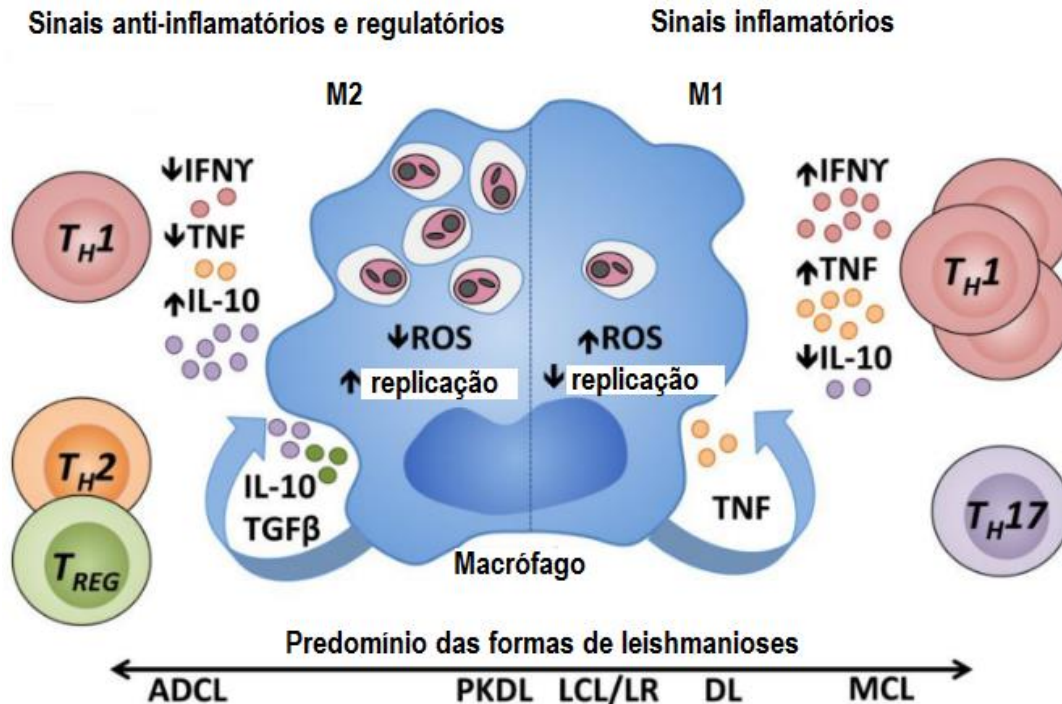


Figura 3: Representação da polarização de macrófagos durante infecção por *Leishmania*

Representação da polarização de macrófagos contribuindo para diferentes estados patológicos durante a infecção por *Leishmania*. As citocinas inflamatórias tipo 1, IFN γ e TNF, podem induzir a produção de ROS por macrófagos, inibindo assim a replicação de *Leishmania* dentro do fagolisossomo. Células T_H17 e células T reguladoras estão aumentadas em lesões inflamatórias na leishmaniose mucocutânea. Citocinas associadas à ativação de M1 foram medidas em lesões inflamatórias de leishmaniose cutânea localizada (LCL). Em um ambiente regulatório (esquerda), há baixos níveis de citocinas tipo 1 com falta de fatores leishmanicidas. Células Th2 ou citocinas derivadas de macrófagos M2, incluindo citocinas tipo 2, IL-10 e TGF β antagonizam os efeitos de IFN γ e TNF e poliaminas aumentadas podem resultar na proliferação de parasitas. ADCL: Leishmaniose cutânea difusa anérgica; PKDL: leishmaniose dérmica pós-calazar; LCL: Leishmaniose cutânea localizada; DL: Leishmaniose disseminada; MCL: leishmaniose mucocutânea. Fonte: adaptada de SCORZA et al., 2017

1.4.1 – Subtipos macrófagos M2

Os macrófagos M2 podem ainda ser subdivididos em quatro subtipos diferentes de acordo com estímulo de ativação e função: M2a, M2b, M2c e M2d. Os macrófagos M2a são polarizados pelo fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e IL-4 ou IL-13. Este subtipo tem como função o recrutamento de eosinófilos, basófilos e células Th2 e está associado a reações alérgicas, fagocitose e morte de parasitas, promoção da fibrogênese, reparo tecidual e proliferação celular (LU et al., 2013; FRATERNALE, 2015).

O subtipo M2b é polarizado por imunocomplexos, células apoptóticas ou LPS. Caracterizam-se por secretam grande quantidade de IL-10 e mediadores inflamatórios, como TNF- α e IL-6, e expressam iNOS (ANDERSON; MOSSER, 2002). Os macrófagos M2b atuam como imunorreguladores e desencadeiam a resposta Th2 (FRATERNALE, 2015).

O fenótipo M2c resulta do estímulo por IL-10, fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e glicocorticoides (WOLFS, 2011). Este subtipo está relacionado à produção de IL-10 e TGF- β , que irão atuar na regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias e no recrutamento de eosinófilos e células T virgens. Está envolvido na regeneração tecidual e angiogênese (FRATERNALE, 2015).

O macrófago M2d está envolvido na inibição da resposta imune e na promoção da angiogênese. Tem sua polarização induzida por IL-6, ligantes do receptor do tipo toll (TLR) e agonistas do receptor de adenosina A 2A (WANG et al., 2010).

1.4.2 Macrófagos M2b em infecções por Leishmaniose

Os macrófagos com fenótipo M2b regulam a amplitude e a capacidade da resposta imune e da reação inflamatória. Esse fenótipo pode promover o desenvolvimento de tumores e infecções parasitárias, bacterianas e fúngicas ao diminuir a resposta imune e inflamatória (MOSSER, 2008). Quando ocorrem infecções parasitárias, o número de macrófagos M2b na cavidade peritoneal aumenta e a infecção tende a persistir (WANG, 2019).

A IL-10 foi relatada por Mosser et al. como o marcador primário de M2b para distinguir M2b de M1 e M2a (MOSSER, 2008). O LPS associado à imunocomplexos é o indutor clássico da polarização do macrófago M2b (WANG, 2019). Em um estudo in vitro com camundongos BALB/c, Kane e colaboradores, mostraram que IgG associada a superfície de amastigotas ligam-se a macrófagos inflamatórios e induzem a produção de grande quantidade de IL-10 (KANE, 2001).

Pressupõe-se, então, que ao utilizarmos *Leishmania* opsonizada com IgG, criamos um imunocomplexo, que tendem a polarizar macrófagos M0 para

macrófagos com fenótipo M2b, favorecendo a infecção e a proliferação de parasitos durante infecções *in vitro*.

2. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são um grupo de doenças tropicais e subtropicais negligenciadas de extensa distribuição pelo mundo. São relatadas em todos os continentes, com exceção da Oceania. O nordeste da África, o sul da Europa, o Oriente Médio, sudeste do México e Américas Central e do Sul, são áreas endêmicas de leishmanioses (TORRES-GUERRERO et al., 2017).

Dados da OMS de 2020 revelam que há mais um bilhão de pessoas vivendo em áreas endêmicas para leishmaniose e estão sujeitas à infecção por esses parasitos. Estimam também que a taxa anual de novos contágios é de 30 mil para leishmaniose visceral e mais de um milhão para leishmaniose cutânea (OMS, 2020).

Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), o Brasil registrou, no ano de 2021, cerca de 15000 casos de leishmaniose tegumentar e cerca de 1500 casos de leishmaniose visceral. E, embora o número de casos tenha diminuído em comparação aos anos anteriores, a prevalência de casos devido a dificuldade de prevenção e a toxicidade dos medicamentos utilizados para o tratamento, ainda preocupam as autoridades de saúde.

De acordo com dados apresentados por pesquisadores da Faculdade Unipar, durante o período de 2011 a 2020, no Estado de Goiás foram relatados um total de 388 casos confirmados de leishmaniose visceral (OLIVEIRA et al., 2023). Além disso, Tavares et al., relataram em seu trabalho, que durante o ano de 2019, cerca de 550 casos de leishmaniose tegumentar foram notificados no estado de Goiás. Sendo os municípios com mais casos relatados: Niquelândia, Alto Paraíso de Goiás, Baliza, Bom Jardim de Goiás, Goiânia e Uruaçu (TAVARES et al., 2022).

As espécies de leishmânia interagem de maneiras diferentes com o organismo, provocando diferentes formas clínicas das leishmanioses. Logo, o presente estudo avalia a suscetibilidade de macrófagos às diferentes espécies de *Leishmania*: *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (L.) major*, *Leishmania (L.) infantum*, e *Leishmania (L.) amazonensis in vitro*, sendo utilizando os macrófagos de duas linhagens de camundongos BALB/c e C57BL/6. Essas duas linhagens de

camundongo representam linhagens de camundongos suscetíveis (BALB/c) ou resistentes (C57BL/6) à infecção por *L. major*.

Além disso, o papel dos anticorpos no desenvolvimento da infecção por *Leishmania* sp. tem sido cada vez mais estudado, pois, a resposta humoral pronunciada vem sendo mais relacionada com um mau prognóstico da doença do que com sua resolução (CONDE et al., 2022). Amastigotas de *L. major* revestidas com IgG podem aumentar a capacidade fagocítica de macrófagos murinos, além de modulá-los, de modo a induzir a produção de IL-10 (KANE E MOSSER, 2001).

Ademais, não há dados na literatura avaliando o papel dos anticorpos em infecções de macrófagos por leishmânias durante longos períodos *in vitro*. Entender o papel da resposta humoral durante infecções por espécies de *Leishmania* é fundamental para o desenvolvimento de novas formas de prevenção e tratamento.

Tendo isto em vista, o presente trabalho irá investigar o papel de anticorpos anti-*Leishmania* em infecções de macrófagos murinos BALB/c e C57BL/6 com as diferentes espécies de leishmanias.

3.OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar a suscetibilidade de macrófagos murinos à infecção pelas diferentes espécies de *Leishmania*: *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (L.) major*, *Leishmania (L.) infantum*, e *Leishmania (L.) amazonensis*.
- Avaliar o papel dos anticorpos em infecções de macrófagos murinos à infecção pelas diferentes espécies de *Leishmania*: *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (L.) major*, *Leishmania (L.) infantum*, e *Leishmania (L.) amazonensis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar e comparar a suscetibilidade de macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 à infecção pelos diferentes tipos de leishmania por 5 dias em cultura.
- Investigar o papel da opsonização com anticorpos nas infecções de macrófagos por 5 dias por *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (L.) major*, *Leishmania (L.) infantum*, e *Leishmania (L.) amazonensis*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. PARASITOS

Foram utilizados isolados de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/2008/JCJ8c), *Leishmania (Leishmania) major* (MHOM/IL/80/Friedlin), *Leishmania (Leishmania) infantum* (MWHOB74/PP75), e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) pertencente ao Leishbank/UFG. Após degelo, as leishmânias foram mantidas em cultura com meio de Grace (Sigma, St Louis, MD, EUA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB, Cripion, Andradina, SP, Brasil) inativado, 2mM de L-glutamina (Sigma), 100 U/mL de penicilina (Sigma) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma), em estufa BOD a 26°C. Realizaram-se repiques dos parasitos a cada três dias, na quantidade de 1×10^6 parasitos de *L. braziliensis* e 2×10^5 para as demais espécies de leishmânia. Os parasitos foram utilizados durante a fase estacionária do crescimento, no quinto dia de cultura para infecção dos macrófagos.

4.2. CAMUNDONGOS

Utilizou-se camundongos isogênicos fêmeas C57BL/ 6 e BALB/c com 6 a 12 semanas de idade. As matrizes foram mantidas no Biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. Os animais foram mantidos em estantes ventiladas (ALESCO, SP) com alimentação e água *ad libitum*, e a maravalha das gaiolas trocadas a cada sete dias. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética No Uso de Animais/ CEUA Nº 102/19 (Anexo 1)

4.3. OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Após eutanásia dos murinos, os macrófagos peritoneais foram obtidos por meio de lavagem peritoneal com PBS gelado (4°C) cinco dias após a inoculação de 2mL de tioglicolato a 5% (DIFco Laboratories, Detroit, MI, USA). Coletada a suspensão de células, lavou-se a mesma uma vez com PBS estéril e cultivou-se 1×10^5 células em um volume de 300 μ L em meio RPMI suplementado, como descrito no item 4.4, em poços de placas de 24 poços (Costar, Cambridge, MA, EUA).

4.4. INFECÇÃO DOS MACRÓFAGOS MURINOS E AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE.

As células peritoneais foram cultivados na quantidade de 1×10^5 células/300 μ L em placas de 24 poços (Costar, cidade Pais) em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10 % de soro bovino fetal inativado (Cripion, Andradina, Brasil), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 10 mM Hepes (Sigma-Aldrich), 50 μ M de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich), 100 U/mL penicilina (Sigma-Aldrich), e 100 μ g/mL estreptomomicina (Sigma-Aldrich) por 24 h a 35°C em estufa contendo CO₂. Após este tempo, as células foram lavadas com PBS para retirar células não aderentes e ressuspensas em 300 μ L de RPMI suplementado. As células foram incubadas com 1×10^6 parasitos durante 3 h a 35°C em estufa contendo CO₂. Passado esse período, os poços foram lavados dez vezes com PBS em agitação, para remover os parasitos que não foram internalizados pelos macrófagos.

4.5. RECUPERAÇÃO DE FORMAS PROMASTIGOTAS

Após o cultivo dos macrófagos infectados atingirem 3 horas, 24 horas, 72 horas e 120 horas, houve a substituição do meio RPMI suplementado pelo meio de Grace suplementado e as células foram incubadas por 3 dias a 25 °C. Após esse

período, realizou-se a contagem das formas promastigotas recuperadas com auxílio da câmara de Neubauer.

4.6 OBTENÇÃO DOS ANTICORPOS

Camundongos BALB/c foram infectados com 1×10^7 formas promastigotas de *Leishmania infantum*. Após 60 dias os animais foram eutanasiados e o sangue coletado para obtenção do soro. Os anticorpos foram purificados do soro em coluna de proteína G-sepharose (Invitrogen), segundo instruções do fabricante.

4.7 OBTENÇÃO DE PROMASTIGOTAS OPSONIZADAS

Para obtenção de parasitos opsonizados foi utilizado anticorpos purificados em proteína G de soro camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) infantum* por 2 meses. Os parasitos foram incubados com 100 µg/mL de anticorpo para 1×10^8 parasitos por 10 min antes da infecção dos macrófagos. As promastigotas opsonizadas foram lavadas 2x com PBS antes da infecção.

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos foram comparados para avaliar a significância das diferenças utilizando Anova One-Way seguido por teste Tuckey, utilizando o programa Graph-Pad Prism Software 6.0 (Inc. San Diego, CA, USA). Os dados foram apresentados em gráficos contendo média dos experimentos e desvio padrão. Foram considerados significantes os valores de $p < 0,05$.

5.RESULTADOS

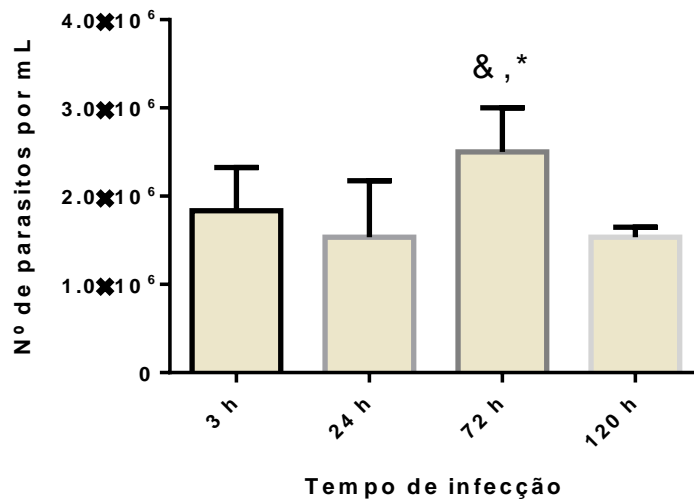
5.1 AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE OU RESISTÊNCIA DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS BALB/c OU C57BL/6 INFECTADOS COM *L. (V.) braziliensis*

Nesse experimento foi realizada a infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ou C57BL/6 com 1×10^6 promastigota de *L. braziliensis* em fase estacionária de cultura, na proporção de 1:10.

Durante a infecção de macrófagos de camundongos BALB/c com *L. braziliensis* (Figura 4A), houve um aumento significativo no número de parasitos recuperados por mL no ponto de 72 horas. Entretanto, a carga parasitária não se mantém entre os pontos de 72 horas e 120 horas, sugerindo resistência dos macrófagos de BALB/c.

Na infecção de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 com *L. braziliensis* (Figura 4B), foi observado um perfil de infecção semelhante com queda significativa no número de parasitos recuperados entre no ponto de 120 horas em relação ao ponto de 72h.

A



B

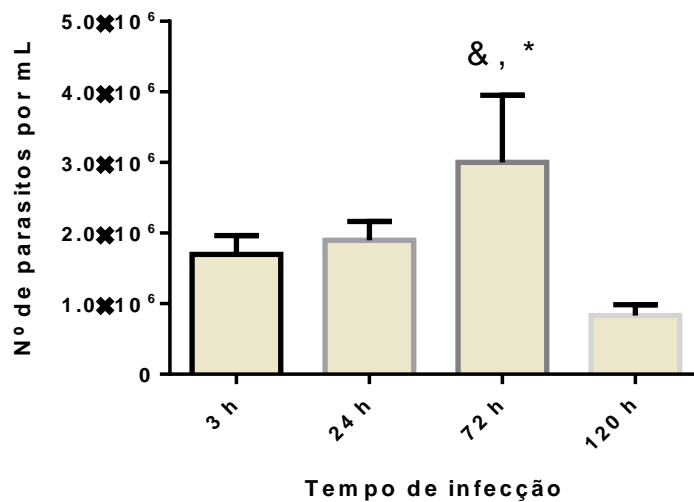


Figura 4: Avaliação da suscetibilidade ou resistência de macrófagos murinos, BALB/c ou C57BL/6, durante infecção *in vitro* por *Leishmania braziliensis*.

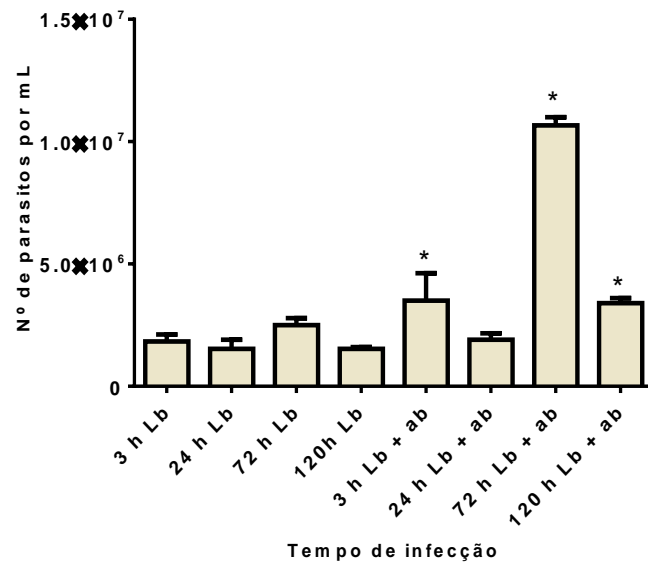
As figuras apresentam o número de parasitos recuperados por mL nos pontos de 3 horas, 24 horas, 72 horas e 120 horas após a infecção dos macrófagos murinos com 1×10^6 promastigotas de *L. braziliensis*, na proporção de 1:10. Os macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c e C57BL/6 cinco dias após o inóculo de 2 mL de tioglicolato. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata. (A) Infecção de macrófagos de camundongos BALB/c. (B) Infecção de macrófagos de camundongos C57BL/6. * significância com o ponto de 24 hrs, & significância com o ponto de 120 hrs. A análise estatística utilizada foi One-Way ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tuckey. Foram considerados significativos os resultados de ($p < 0,05$).

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FAGOCITÁRIA DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS BALB/c OU C57BL/6 INFECTADOS COM *L. (V.) braziliensis* E CAPACIDADE DE SOBREVIVÊNCIA DOS PARASITOS OPSONIZADOS COM ANTICORPO anti-*Leishmania*

Ao utilizarmos leishmânias opsonizadas com anticorpos anti-*Leishmania* durante infecção de macrófagos de camundongos BALB/c, observamos o aumento da atividade fagocitária dos macrófagos, indicado pelo aumento de parasitos recuperados no ponto de 3 horas (Figura 5A).

Além disso, observamos também aumento da capacidade de sobrevivência dos parasitos, quando analisados os pontos de 72 horas de ambos os grupos. Novamente, observamos uma queda significativa entre os pontos de 72 e 120 horas, o que sugere que os anticorpos não interferem na resistência de macrófagos de camundongos à infecção por *L. braziliensis*, (Figura 5A). Dados semelhantes foram observados na infecção de macrófagos de camundongos C57BL/6 (Figura 5B).

A



B

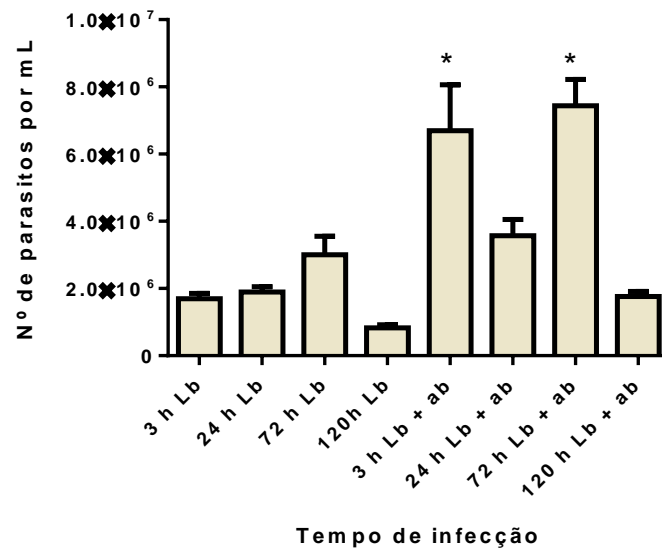


Figura 5: Avaliação da atividade fagocitária de macrófagos murinos, BALB/c ou C57BL/6, durante infecção *in vitro* por *Leishmania braziliensis* e da capacidade de sobrevivência dos parasitos opsonizados com anticorpo anti-*Leishmania*.

As figuras apresentam o número de parasitos recuperados por mL nos pontos de 3 horas, 24 horas, 72 horas e 120 horas após a infecção dos macrófagos murinos com 1×10^6 promastigotas de *L. braziliensis* opsonizadas (+ab) ou não, na proporção de 1:10. Os macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c e C57BL/6 cinco dias após o inóculo de 2 mL de tioglicolato. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata. (A) Infecção de macrófagos de camundongos BALB/c. (B) Infecção de macrófagos de camundongos C57BL/6. * representa significância estatística entre opsonizados e não opsonizados no mesmo tempo de infecção. A análise estatística utilizada foi One-Way ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tuckey. Foram considerados significativos os resultados de ($p < 0,05$).

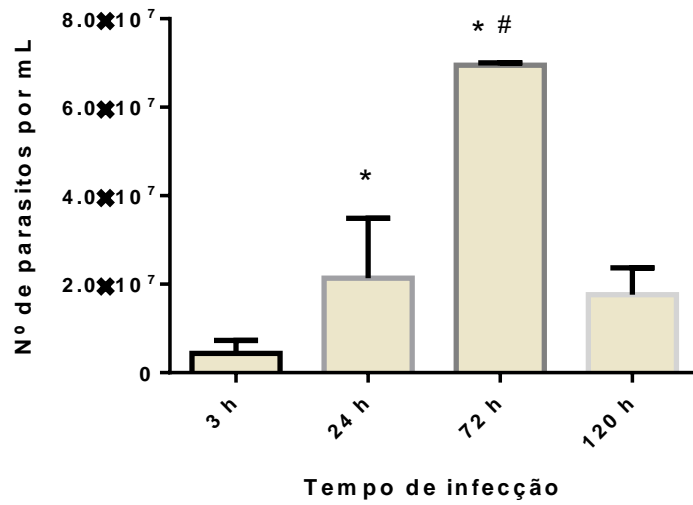
5.3 AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE OU RESISTÊNCIA DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS BALB/c OU C57BL/6 INFECTADOS COM *L. (L.) amazonensis*

Nesse experimento foi realizada a infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ou C57BL/6 com 1×10^6 promastigotas de *L. amazonensis* na fase estacionária de cultura, opsonizados ou não com anticorpo anti-*Leishmania*, na proporção de 1:10.

Ao avaliarmos a infecção *in vitro* de macrófagos de camundongos BALB/c com *L. amazonensis* (Figura 6A), foi observada uma crescente no número de parasitos recuperados por mL até o ponto de 72 horas. Sugerindo suscetibilidade dos macrófagos. Porém, entre os pontos de 72 e 120 horas observou-se uma queda significativa dos parasitos, apontando para resistência desses fagócitos de BALB/c.

Quando analisamos a infecção de macrófagos de C57BL/6 com *L. amazonensis*, observamos uma crescente no número de parasitos recuperados por mL até o ponto de 120 horas (Figura 6B).

A



B

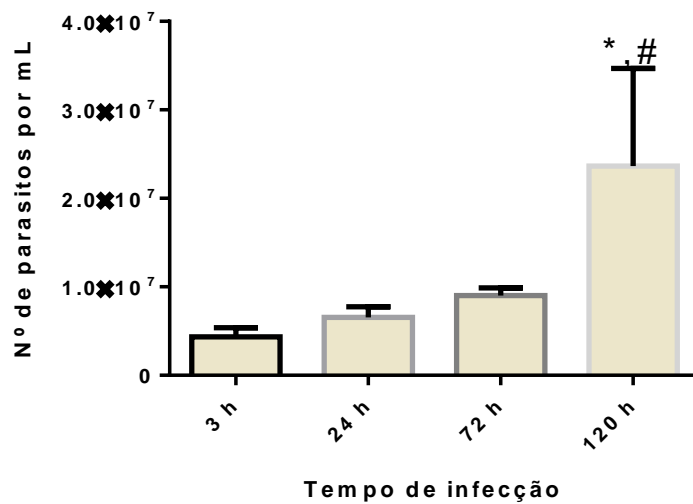


Figura 6: Avaliação da suscetibilidade ou resistência de macrófagos murinos, BALB/c ou C57BL/6, durante infecção *in vitro* por *Leishmania amazonensis*.

As figuras apresentam o número de parasitos recuperados por mL nos pontos de 3 horas, 24 horas, 72 horas e 120 horas após a infecção dos macrófagos murinos com 1×10^6 promastigotas de *L. amazonensis*, na proporção de 1:10. Os macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c e C57BL/6 cinco dias após o inóculo de 2 mL de tioglicolato. Foram realizados

três experimentos independentes em triplicata. (A) Infecção de macrófagos de camundongos BALB/c.. (B) Infecção de macrófagos de camundongos C57BL/6. * significância estatística com o ponto de 3 h e # significância estatística com os demais pontos. A análise estatística utilizada foi One-Way ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tuckey. Foram considerados significativos os resultados de ($p < 0,05$).

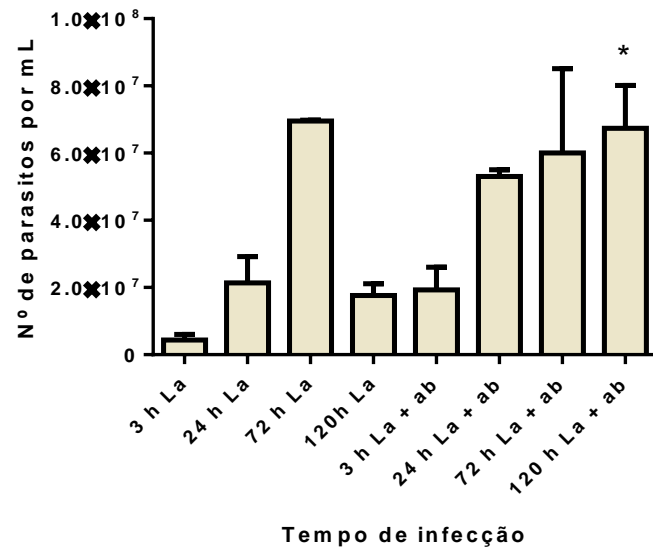
5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FAGOCITÁRIA DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS BALB/c OU C57BL/6 INFECTADOS COM *L. (V.) amazonensis* E CAPACIDADE DE SOBREVIVÊNCIA DOS PARASITOS OPSONIZADOS COM ANTICORPO anti-*Leishmania*

Durante a infecção de macrófagos de BALB/c com *L. amazonensis* opsonizadas com anti-*Leishmania*, não houve diferença estatística entre os pontos de 3 horas de ambos grupos, sugerindo que a atividade fagocitária dos macrófagos murinos não foi alterada (Figura 7A). Entretanto, foi observada uma maior sobrevivência dos parasitos, quando analisamos os pontos de 120 horas das infecções por leishmanias não opsonizadas e opsonizadas. Indicando que a opsonização facilitou a manutenção da *L. amazonensis* por longos períodos.

Ao avaliarmos a atividade fagocitária de macrófagos de C57BL/6, embora não havendo diferenças estatísticas significativas entre os pontos de 3 horas, observa-se um aumento no número de parasitos recuperados nos tempos de 24 e 72h. Tal dado sugere que, quando associada ao anticorpo, não há aumento na fagocitose de *L.*

amazonensis (Figura 7B), mas favorece a proliferação dos parasitos no interior dos macrófagos.

A



B

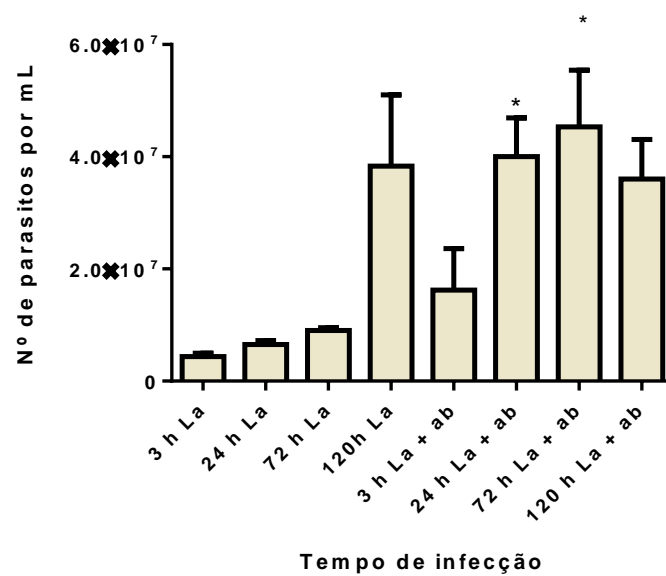


Figura 7: Avaliação da atividade fagocitária de macrófagos murinos, BALB/c ou C57BL/6, durante infecção *in vitro* por *Leishmania amazonensis* e da capacidade de sobrevivência dos parasitos opsonizados com anticorpo anti-*Leishmania*.

As figuras apresentam o número de parasitos recuperados por mL nos pontos de 3 horas, 24 horas, 72 horas e 120 horas após a infecção dos macrófagos murinos com 1×10^6 promastigotas de *L. amazonensis* opsonizadas (+ab) ou não, na proporção de 1:10. Os macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c e C57BL/6 cinco dias após o inóculo de 2 mL de tioglicolato. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata. (A) Infecção de macrófagos de camundongos BALB/c. (B) Infecção de macrófagos de camundongos C57BL/6. * representa significância estatística entre parasitos opsonizados e não opsonizados no mesmo tempo de infecção. A análise estatística utilizada foi One-Way ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tuckey. Foram considerados significativos os resultados de ($p < 0,05$).

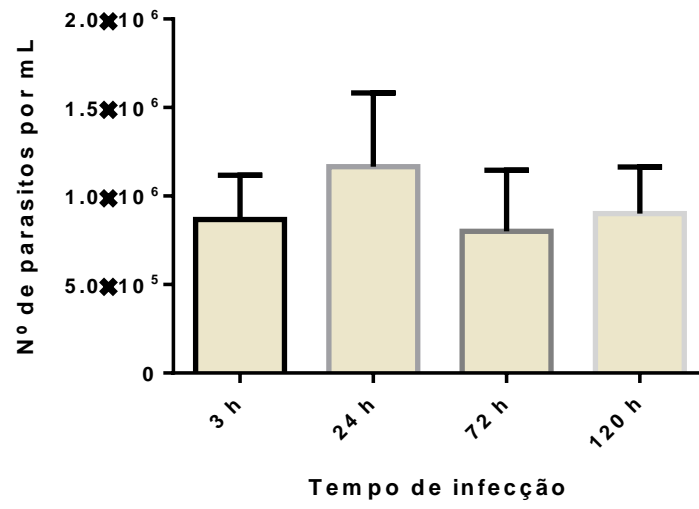
5.5 AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE OU RESISTÊNCIA DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS BALB/c OU C57BL/6 INFECTADOS COM *L. (L.) infantum*

Nesse experimento foi realizada a infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ou C57BL/6 com 1×10^6 promastigotas de *Leishmania infantum* na fase estacionária de cultura.

Durante a infecção de macrófagos de camundongos BALB/c com *L. infantum* (Figura 8A), não houve diferenças estatísticas entre pontos de infecção até 120 horas. Observa-se uma tendência a suscetibilidade dos macrófagos à infecção.

O mesmo fenômeno foi observado durante a infecção de macrófagos de camundongos C57BL/6 com *L. infantum* (Figura 8B), não houve diferenças estatísticas entre pontos de infecção até 120 horas.

A



B

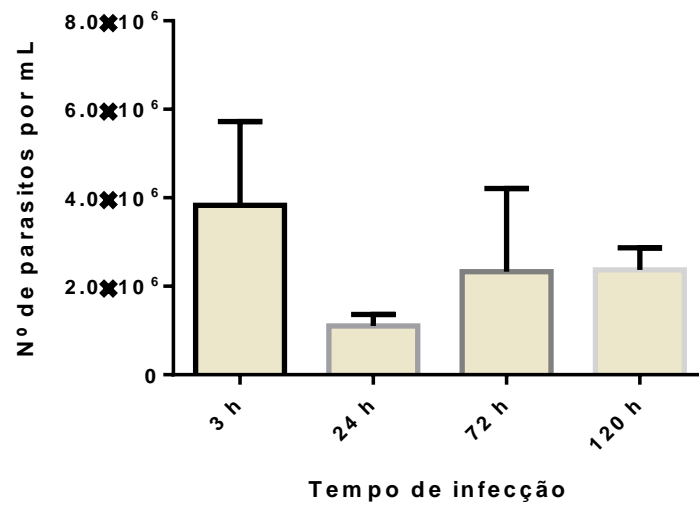


Figura 8: Avaliação da suscetibilidade ou resistência de macrófagos murinos, BALB/c ou C57BL/6, durante infecção *in vitro* por *Leishmania infantum*.

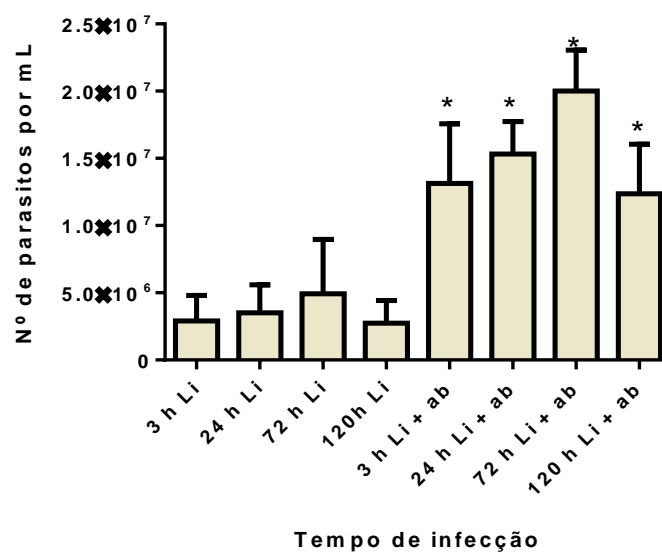
As figuras apresentam o número de parasitos recuperados por mL nos pontos de 3 horas, 24 horas, 72 horas e 120 horas após a infecção dos macrófagos murinos com 1×10^6 promastigotas de *L. infantum*, na proporção de 1:10. Os macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c e C57BL/6 cinco dias após o inóculo de 2 mL de tioglicolato. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata (A) Infecção de macrófagos de camundongos BALB/c.. (B) Infecção de macrófagos de camundongos C57BL/6.. A análise estatística utilizada foi One-Way ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tuckey. Foram considerados significativos os resultados de ($p < 0,05$).

5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FAGOCITÁRIA DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS BALB/c OU C57BL/6 INFECTADOS COM *L. (L.) infantum* E CAPACIDADE DE SOBREVIVÊNCIA DOS PARASITOS OPSONIZADOS COM ANTICORPO anti-*Leishmania*

Ao analisarmos a infecção dos macrófagos de BALB/c com *L. infantum* opsonizadas (Figura 9A), observamos um aumento no número de parasitos recuperados por mL, no ponto de 3 horas, demonstrando aumento na atividade fagocitária dos macrófagos. Há também aumento da carga parasitária em todos os pontos em relação à infecção com leishmânias não opsonizadas, o que está associado ao aumento na capacidade de sobrevivência e proliferação dos parasitos.

Quando analisamos a infecção de macrófagos C57BL/6 com parasitos *L. infantum* opsonizados, observamos o aumento da fagocitose dos macrófagos. Além disso, os dados obtidos sugerem um aumento na capacidade de sobrevivência dos parasitos quando opsonizados até o ponto de 72 horas (Figura 9B). Entretanto, em 120 h não há diferença com o controle não opsonizado, indicando uma possível resistência na manutenção de *L. infantum* em macrófagos de camundongos C57BL/6.

A



B

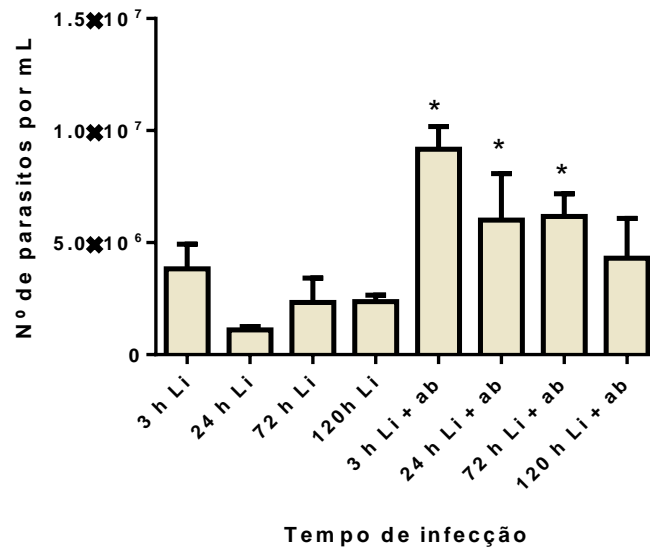


Figura 9: Avaliação da atividade fagocitária de macrófagos murinos, BALB/c ou C57BL/6, durante infecção *in vitro* por *Leishmania infantum* e da capacidade de sobrevivência dos parasitos opsonizados com anticorpo anti-*Leishmania*.

As figuras apresentam o número de parasitos recuperados por mL nos pontos de 3 horas, 24 horas, 72 horas e 120 horas após a infecção dos macrófagos murinos com 1×10^6 promastigotas de *L. infantum* opsonizadas (+ab ou não, na proporção de 1:10). Os macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c e C57BL/6 cinco dias após o inóculo de 2 mL de tioglicolato. Os experimentos foram realizados em triplicata. (A) Infecção de macrófagos de camundongos BALB/c. (B) Infecção de macrófagos de camundongos C57BL/6. * representa significância estatística entre parasitos opsonizados e não opsonizados nos mesmos tempos de infecção. A análise estatística utilizada foi One-Way ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tuckey. Foram considerados significativos os resultados de ($p < 0,05$).

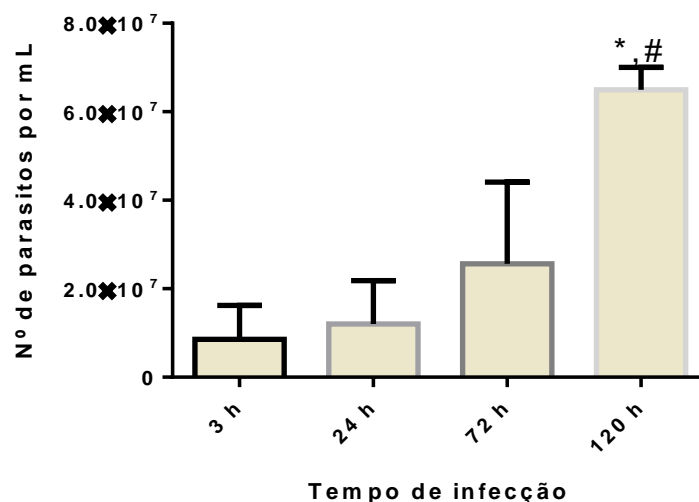
5.7 AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE OU RESISTÊNCIA DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS BALB/c OU C57BL/6 INFECTADOS COM *L. (L.) major*

Nesse experimento foi realizada a infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ou C57BL/6 com 1×10^6 promastigotas de *Leishmania major* na fase estacionária opsonizados ou não com anticorpo anti-*Leishmania*, na proporção de 1:10.

Durante a infecção de macrófagos de camundongos BALB/c com *L. major*, observamos um crescente no número de parasitos recuperados por mL, com diferenças estatísticas detectadas no ponto de 120 horas. Tais resultados sugerem suscetibilidade dos macrófagos à infecção por *L. major* (Figura 10A).

Na infecção de macrófagos de camundongos C57BL/6 com *L. major*, observamos o mesmo fenômeno que em macrófagos de BALB/c. Os pontos de 24 horas e 72 horas apresentam diferenças estatísticas com relação ao ponto de 120 horas. Sugerindo que esses macrófagos também são suscetíveis à infecção por *L. major* (Figura 10B). Em ambos os casos os dados sugerem que os macrófagos favorecem a proliferação das leishmanias.

A



B

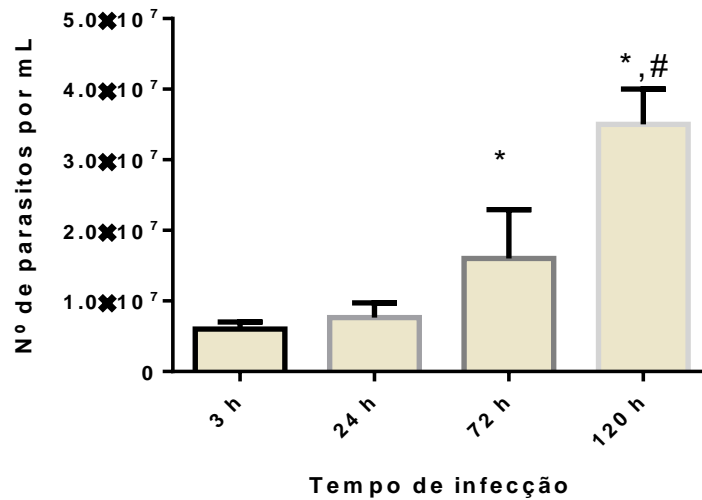


Figura 10: Avaliação da suscetibilidade ou resistência de macrófagos murinos, BALB/c ou C57BL/6, durante infecção *in vitro* por *Leishmania major*.

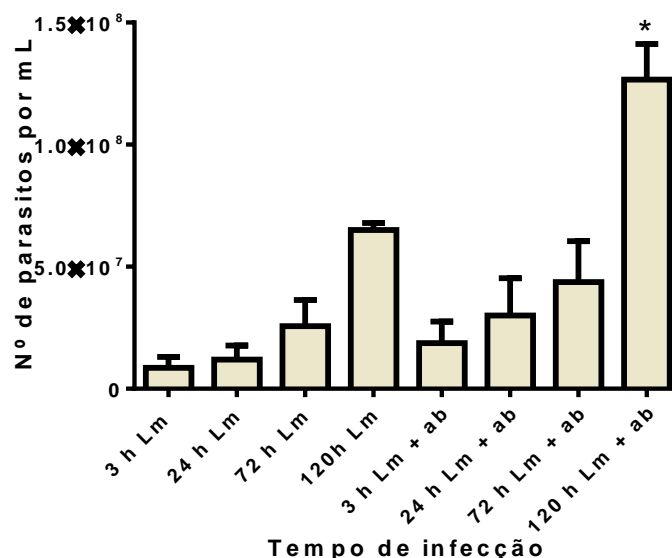
As figuras apresentam o número de parasitos recuperados por mL nos pontos de 3 horas, 24 horas, 72 horas e 120 horas após a infecção dos macrófagos murinos com 1×10^6 promastigotas de *L. major*, na proporção de 1:10. Os macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c e C57BL/6 cinco dias após o inóculo de 2 mL de tioglicolato. Os experimentos foram realizados em triplicata. (A) Infecção de macrófagos de camundongos BALB/c. (B) Infecção de macrófagos de camundongos C57BL/6. * representa significância estatística com o ponto de 3h e # representa significância estatística com os demais pontos. A análise estatística utilizada foi One-Way ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tuckey. Foram considerados significativos os resultados de ($p < 0,05$).

5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FAGOCITÁRIA DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS BALB/c OU C57BL/6 INFECTADOS COM *L. (L.) major* E CAPACIDADE DE SOBREVIVÊNCIA DOS PARASITOS OPSONIZADOS COM ANTICORPO anti-*Leishmania*

Ao analisarmos os resultados dos experimentos com leishmânias opsonizadas, não foi observado aumento na capacidade fagocitária dos macrófagos murinos de BALB/c. Porém observamos uma que o fenômeno de suscetibilidade é intensificado e os números de promastigotas recuperadas no ponto de 120 horas têm um aumento significativo em relação à infecção com *L. major* não opsonizada. Tais resultados sugerem que a associação da leishmânia ao anticorpo anti-*Leishmania*, proporciona maior sobrevivência dentro dos macrófagos (Figura 11A).

Já quando realizamos os experimentos utilizando leishmânias não opsonizadas, não houve diferenças estatísticas significativas entre os pontos de infecção (Figura 11B). Tais dados sugerem que os anticorpos não alteram a capacidade fagocitária dos macrófagos de camundongos C57BL/6 e nem aumento da capacidade de sobrevivência dos parasitos.

A



B

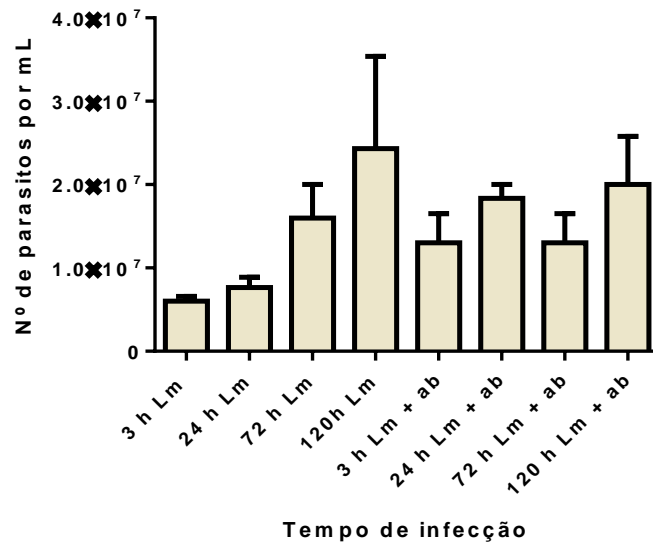


Figura 11: Avaliação da atividade fagocitária de macrófagos murinos, BALB/c ou C57BL/6, durante infecção *in vitro* por *Leishmania major* e da capacidade de sobrevivência dos parasitos opsonizados com anticorpo anti-*Leishmania*.

As figuras apresentam o número de parasitos recuperados por mL nos pontos de 3 horas, 24 horas, 72 horas e 120 horas após a infecção dos macrófagos murinos com 1×10^6 promastigotas de *L. major* opsonizadas (+ab) ou não na proporção de 1:10. Os macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c e C57BL/6 cinco dias após o inóculo de 2 mL de tioglicolato. Os experimentos foram realizados em triplicata. (A) Infecção de macrófagos de camundongos BALB/c. (B) Infecção de macrófagos de camundongos C57BL/6. * representa significância estatística entre parasitos opsonizados e não opsonizados no mesmo tempo. A análise estatística utilizada foi One-Way ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tuckey. Foram considerados significativos os resultados de ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

As manifestações clínicas das leishmanioses são resultado de interações entre a capacidade de virulência da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção e das respostas imunes do hospedeiro (PEARSON; DE QUEIROZ SOUSA, 1996). Além disso, a idade e estado nutricional do hospedeiro também podem influenciar no prognóstico da doença (MURRAY et al., 2005).

Os macrófagos desempenham um papel duplo na infecção por *Leishmania*, podendo ser responsáveis pela destruição dos parasitos ou fornecendo a eles um local seguro para sua replicação, e isso vai depender de como irá ocorrer sua ativação (TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018).

Além disso, embora o foco da maioria dos estudos esteja na resposta adaptativa celular, aspectos importantes relacionados à resposta das células B devem levantados durante a infecção por *Leishmania*. Visto que há desafios no controle, tratamento e formulação de vacinas que necessitam de uma melhor compreensão da imunidade humoral (CONDE et al., 2022).

Durante a resposta imune humoral, os anticorpos podem atuar na neutralização, opsonização e ativação do sistema complemento (SC) (MAURI & BOSMA, 2012). Já foi descrito que a opsonização com anticorpos de amastigotas de *Leishmania* pode aumentar a eficiência da internalização do parasita e/ou modificar qualitativamente a resposta do hospedeiro em macrófagos infectados (KIMA et al., 2000).

Diferentes espécies do gênero *Leishmania* são capazes de modular as respostas imunes em modelos de camundongos distintos (HEINZEL et al., 1989; IBRAIM et al., 2013, PÉREZ-CABEZAS et al., 2019). É necessária a compreensão da relação parasito-hospedeiro específica para formulações de tratamentos eficazes. Além da avaliação do papel da resposta humoral na infecção por leishmânias.

Neste estudo, buscamos avaliar a suscetibilidade ou resistência de macrófagos *in vitro* de duas linhagens de camundongos: BALB/c e C57BL/6 à

infecção por diferentes espécies de leishmania opsonizadas ou não com anticorpos anti-*Leishmania*

De acordo com Da Silva e Sacks (1987), as promastigotas obtidas durante a fase estacionária de crescimento dentro do vetor invertebrado ou em cultura são muito mais virulentas para um hospedeiro vertebrado do que formas obtidas durante a fase logarítmica (DA SILVA; SACKS, 1987). Objetivando, então, que as infecções fossem realizadas da melhor forma possível, buscou-se utilizar as formas mais infectantes do parasito, no quinto dia de cultura.

Durante o ensaio de infecção *in vitro*, tanto com macrófagos de camundongos BALB/c quanto de camundongos C57BL/6, foi observada a tendência de resistência dos macrófagos à infecção por *L. braziliensis*, mesmo quando as promastigotas foram opsonizadas com anticorpo anti-*Leishmania*.

Tais resultados contrariam estudos anteriores, nos quais camundongos BALB/c foram considerados suscetíveis à infecção por *Leishmania braziliensis*, com base em lesões dérmicas progressivas (CHILDS et al., 1984). Entretanto, camundongos C57BL/6 já são considerados resistentes à leishmaniose tegumentar provocada por parasitos da espécie *L. (V.) braziliensis* (ROCHA et al., 2007).

Tal resistência também foi observada anteriormente, em nosso laboratório, no trabalho de Mirian Vieira Teixeira. Durante a infecção de macrófagos murinos peritoneais provocados por tioglicolato, tanto em camundongos C57BL/6 quanto em BALB/c, foi observada queda do número de parasitas por células a partir de três dias após infecção (TEIXEIRA, MV, SOARES, SAE, SOUZA, VA et al., 2022).

O parasito *Leishmania amazonensis* é uma importante espécie causadora da leishmaniose tegumentar humana e apresenta um amplo espectro de doenças (BARRAL et al., 1991). Estudos em modelos *in vivo* em camundongos BALB/c demonstram que são altamente suscetíveis ao desenvolvimento de lesões crônicas características induzidas por *L. amazonensis* (CALABRESE E DA COSTA, 1992). Entretanto, ao avaliarmos a infecção *in vitro* de macrófagos de camundongos BALB/c com *L. amazonensis*, foi observada uma crescente no número de parasitos recuperados por mL até o ponto de 72 horas. Sugerindo suscetibilidade dos macrófagos. Porém, entre os pontos de 72 e 120 horas observou-se uma queda

significativa dos parasitos, apontando para uma resistência dos macrófagos de BALB/c à infecção.

De acordo com Afonso e Scott, camundongos C57BL/10 desenvolvem lesões crônicas com parasitas persistentes cargas, sendo suscetíveis à infecção por *L. amazonensis* (AFONSO & SCOTT, 1993). O presente trabalho traz resultados que corroboram com a literatura, ao avaliarmos a infecção de macrófagos de C57BL/6 *in vitro* com *L. amazonensis*, observamos uma crescente no número de parasitos recuperados por mL até o ponto de 120 horas. Tal resultado sugere que esses macrófagos são suscetíveis a tal espécie de leishmânia.

Quando utilizadas leishmânias opsonizadas com anti-*Leishmania* infectando macrófagos de camundongos BALB/c, foi observado um crescimento no número de parasitos recuperados quando comparados ao ponto de 3 horas de infecção com *L. amazonensis* não opsonizada. Além disso, embora não tenha havido significância entre os pontos de 120 horas entre leishmânias não opsonizadas e opsonizadas, não houve queda na recuperação dos parasitos, sugerindo que, quando opsonizadas, as leishmânias conseguem modular a atividade leishmanicida dos macrófagos e sobreviver por mais tempo. O mesmo foi observado no ensaio de infecção com macrófagos de C57BL/6.

Comumente, é observada a suscetibilidade de macrófagos de camundongos BALB/c à infecção por *Leishmania infantum* (MÉNDEZ, 1996; WILSON, 1998). Os resultados obtidos nos ensaios de infecção de macrófagos de camundongos BALB/c com *L. infantum*, não houve diferenças estatísticas entre pontos de infecção até 120 horas. O mesmo fenômeno foi observado nos ensaios de infecção com macrófagos de camundongos C57BL/6.

Nos resultados obtidos dos ensaios de infecção dos macrófagos de BALB/c com *L. infantum* opsonizadas, nota-se um aumento no número de parasitos recuperados por mL, nos pontos de 72 horas. Embora não tenha havido diferença estatística entre os pontos de 120 horas entre as infecções com leishmânias não opsonizadas e opsonizadas ($p > 0,39$), observa-se que a carga parasitária se mantém mais alta quando realizada a infecção com leishmânias associadas ao anticorpo anti-*Leishmania*. Tal observação remete à suscetibilidade dos macrófagos de BALB/c à infecção com *L. infantum* opsonizada.

Os resultados dos ensaios de infecção com macrófagos C57BL/6 com parasitos *L. infantum* opsonizados, também sugerem que, quando associadas ao anticorpo anti-*Leishmania*, as leishmânias da espécie *L. infantum*, adquirem mecanismos de escape, tornando o macrófago de C57BL/6 mais suscetível à infecção. Há registros de resultados similares ao apresentado neste trabalho, no qual um modelo similar foi utilizado, em Méndez et al., onde observaram internalização bem sucedida de promastigotas e sobrevivência, durante infecções por *L. (L.) infantum* (MÉNDEZ, 1996).

Classicamente, macrófagos de camundongos C57BL/6 estão relacionados à resistência durante a infecção por *Leishmania major* e essa resistência deve-se, principalmente, a maior facilidade de ativação dos macrófagos M1, pela subpopulação de linfócitos Th1, que produz várias citocinas pró-inflamatórias, principalmente interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que são cruciais para a eliminação desse patógeno intracelular por meio do desencadeamento de uma explosão oxidativa (MILLS, 2000). Por outro lado, macrófagos de camundongos BALB/c possuem maior tendência a atingir o perfil M2 (MILLS, 2000), sendo susceptíveis à infecção por *L. major*. No entanto, nos resultados obtidos durante os ensaios de infecção *in vitro* do presente trabalho, observou-se uma tendência de suscetibilidade tanto de macrófagos de camundongos BALB/c, quanto de C57BL/6.

Os resultados dos experimentos de infecção de macrófagos murinos de BALB/c com leishmânias opsonizadas, estão associados à intensificação do fenômeno de suscetibilidade dos macrófagos e os números de promastigotas recuperadas têm um aumento significativo em relação à infecção com promastigotas de *L. major* não opsonizadas. Tais resultados sugerem que a associação da leishmânia ao anticorpo anti-*Leishmania*, proporciona maior sobrevivência dentro dos macrófagos. Já nos ensaios de infecção de macrófagos de C57BL/6 com leishmânias opsonizadas, não houve diferenças estatísticas significativas entre os pontos de infecção.

Ao investigar quais os mecanismos de entrada de *L. major* em macrófagos, Guy e Belosevic, demonstraram que ingestão de amastigotas ocorre principalmente através dos receptores para Fc e CR3 (GUY E BELOSEVIC, 1993) Um estudo

utilizando modelo de infecção *in vivo* de camundongos BALB/c, demonstrou a que a presença de anticorpos circulantes é fundamental para o desenvolvimento da doença, comprovando a relação do receptor Fc para entrada de amastigotas nas células. A opsonização com anticorpos de amastigotas de *Leishmania* pode aumentar a eficiência da internalização do parasita e/ou modificar qualitativamente a resposta do hospedeiro em macrófagos infectados (KIMA et al., 2000).

A opsonização com IgG promove a fagocitose de formas amastigotas por meio dos receptores Fc dos macrófagos e a liberação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 (KANE E MOSSER, 2001). A IL-10 induz respostas anti-inflamatórias nos macrófagos e alterações em seu metabolismo, o que favorece a proliferação de amastigotas (NADERER et al ., 2007).

O presente trabalho apresenta resultados que corroboram com o já descrito em relação à atividade humoral, na qual os anticorpos estão mais relacionados à reprodução dos parasitos e sobrevivência dentro dos macrófagos do que à cura das lesões.

Estudos como esse colaboram para a maior compreensão do papel da imunidade humoral e o papel dos anticorpos na opsonização dos parasitos, inclusive em casos de co-infecção ou uma infecção posterior a outra espécie de leishmânia. Compreender os mecanismos de escape dos parasitos do gênero *Leishmania* é de extrema importância para a elaboração de novos métodos de tratamento, uma vez que as leishmanioses apresentam extensa distribuição geográfica e desafios nos métodos de tratamento atuais.

7. CONCLUSÕES

Macrófagos de BALB/c são resistentes à infecção por *L. (V) braziliensis* e *L. (L) amazonensis* e susceptíveis à *L. (L) infantum* e *L. (L.) major* em infecções in vitro. Macrófagos de C57BL/6 apresentam resistência quando infectados por *L. (V.) braziliensis*, porém são suscetíveis à infecção por *L. (L.) amazonensis*, *L. (L) infantum* e *L. (L.) major*.

Ao utilizarmos leishmanias opsonizadas, observamos aumento da fagocitose dos macrófagos tanto de camundongos BALB/c quanto C57BL/6 infectados por *L. braziliensis* e *L. infantum*. A capacidade de sobrevivência e proliferação foi aumentada durante a infecção por *L. amazonensis*, em ambos macrófagos murinos. E durante a infecção in vitro de macrófagos de BALB/c por *L. infantum* e *L. major*.

8. REFERÊNCIAS

- AFONSO, L.C., Scott, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infect. Immun.**v. 61, p. 2952–2959, 1993.
- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, 2016.
- ANDERSON C.F., MOSSER D. M. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. **J Leukoc Biol.** v. 72, p. 101–106, 2002.
- ARANGO D., G.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 491, 2014.
- BARRAL, A. et. al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** N. 44, p. 536–546. 1991.
- CALABRESE, K. S.; COSTA, S. C. Enhancement of *Leishmania amazonensis* infection in BCG non-responder mice by BCG-antigen specific vaccine. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 49-56, 1992.
- CARDOSO, F. O. et al. Immunopathological Studies of *Leishmania amazonensis* Infection in Resistant and in Susceptible Mice. **The Journal of Infectious Diseases**, v.201, n.12, p.1933-1940, 2010.
- CHILDS, G. E. et al. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis: I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiopica*. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 78, n. 1, p. 25-34, 1984.
- CONDE, Luciana et al. Humoral response in Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 1797, 2022.

DA SILVA, R.; SACKS, D. L. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 11, p. 2802–2806, 1987.

DAVID, C. V., & CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic therapy**, 22(6), 491-502, 2009.

FINNIN, M.; HAMILTON, J. A.; MOSS, S. T. Characterization of a CSF-induced proliferating subpopulation of human peripheral blood monocytes by surface marker expression and cytokine production. **Journal of leukocyte biology**, v. 66, n. 6, p. 953-960, 1999.

FRATERNALE, A.; BRUNDU, S.; MAGNANI, M.. Polarization and repolarization of macrophages. **J Clin Cell Immunol**, v. 6, n. 319, p. 2, 2015.

HURRELL, B. P. et al. Rapid sequestration of *Leishmania mexicana* by neutrophils contributes to the development of chronic lesion. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 5, p. e1004929, 2015.

KUMAR, R.; NYLÉN, S.. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 3, p. 251, 2012.

LU, J. et al. Discrete functions of M2a and M2c macrophage subsets determine their relative efficacy in treating chronic kidney disease. **Kidney international**, v. 84, n. 4, p. 745-755, 2013.

MANN, Sarah et al. A Review of leishmaniasis: current knowledge and future directions. **Current tropical medicine reports**, v. 8, n. 2, p. 121-132, 2021.

MAURI, C., BOSMA, A. Immune regulatory function of b cells. **Annu. Rev. Immunol.** 30, 221–241, 2012. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074934

MILLS, Charles D. et al. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **The Journal of immunology**, v. 164, n. 12, p. 6166-6173, 2000.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, 366(9496), 1561-1577, 2005.

MUXEL, S. M. et al. Arginine and polyamines fate in *Leishmania* infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2682, 2018.

OLIVEIRA, Anna Mariah Ribeiro et al. Estudo epidemiológico descritivo dos casos notificados de Leishmaniose visceral no estado de Goiás no período de 2011 a 2020. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 27, n. 2, p. 917-930, 2023.

PAHO. Manual of procedures for leishmaniasis surveillance and control in the Americas. **Pan American Health Organization**, Washington, D.C., 2019.

PEARSON, R. D.; DE QUEIROZ SOUSA, A. Clinical Spectrum of Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 1–11, 1996.

PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970-974, 2008.

ROCHA, F. J. S. et al. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 8, p. 3823–3832, 2007.

SASIDHARAN, S.; SAUDAGAR, P.. Leishmaniasis: where are we and where are we heading?. **Parasitology Research**, v. 120, n. 5, p. 1541-1554, 2021.

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 6, p. 1296, 2017.

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

SOLBACH, W., & LASKAY, T. The host response to *Leishmania* infection. **Advances in immunology**, 74, 275-317, 1999.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2017.

TAVARES, Kassio Samay Ribeiro et al. Análise da distribuição espacial dos casos de leishmaniose tegumentar americana no estado de Goiás. **Diversitas Journal**, v. 7, n. 1, p. 0228-0237, 2022.

TEIXEIRA, MV, SOARES, SAE, SOUZA, VA et al. Macrófagos murinos não suportam a proliferação de amastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* mesmo na ausência de óxido nítrico e presença de alta atividade de arginase. **Parasitol Res** 121 , 2891–2899, 2022.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F. et al. Macrophage polarization in leishmaniasis: broadening horizons. **Frontiers in immunology**, p. 2529, 2018.

WANG, N.; LIANG, H.; ZEN, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1–M2 polarization balance. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 614, 2014.

WANG, Q. et al. Fra-1 protooncogene regulates IL-6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages. **Cell research**, v. 20, n. 6, p. 701-712, 2010.

WILSON, M. E. et al. The importance of TGF- β in murine visceral leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 161, n. 11, p. 6148-6155, 1998.

WOLFS, I. M.J.; DONNERS, M. M.P.C.; DE WINTHER, M. P.J. Differentiation factors and cytokines in the atherosclerotic plaque micro-environment as a trigger for macrophage polarisation. **Thrombosis and haemostasis**, v. 106, n. 11, p. 763-771, 2011.

ANEXOS

ANEXO 1



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



Goiânia, 16 de dezembro de 2019.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO ATENDIMENTO DE PENDÊNCIA DO PROTOCOLO Nº. 102/19

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Pesquisa – Mestrado

II - Identificação:

- Data de apresentação a CEUA: 04/10/2019
- Data do atendimento da pendência: 04/12/2019
- Título do projeto: Susceptibilidade de macrófagos alternativamente ativados murinos à infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*
- Pesquisador Responsável/ Unidade: Milton Adriano Pelli de Oliveira
- Pesquisadores Participantes: Mirian Vieira Teixeira; Santiago Aguiar Espellet Soares; André Murilo de Souza Marques
- Médico Veterinário/CRMV: Milton Adriano Pelli de Oliveira – CRMV/GO 4520
- Unidade onde será realizado: IPTSP

III – Respostas as pendências:

- 1- Solicitação da CEUA: Os Pontos Finais Humanitários devem ser corretamente descritos, como quais são os efeitos adversos das administrações de substâncias ou infecção de animais, o que será feito caso algum animal apresente algum efeito adverso, em qual tempo será realizada alguma intervenção para minimizar a dor e sofrimento e/ou quando será realizada a eutanásia com este intuito.

Resposta do Pesquisador Responsável: Todos os pesquisadores serão devidamente treinados para o correto manuseio de animais para não causar estresse nos animais. Os animais serão sedados utilizando 60 mg/Kg de cetamina 10 mg/Kg de xilazina antes da eutanásia.

Após a inoculação de tioglicolato ou de *T. crassiceps*, será avaliado o comportamento dos animais, os quais podem apresentar postura arqueada e apatia moderada nas primeiras 6 horas após o inóculo. Entretanto, estes animais deverão apresentar um comportamento normal 24 horas após a inoculação destes produtos. Não serão fornecidos medicamentos analgésicos após a inoculação, já que estes medicamentos interferem com a resposta dos macrófagos, objetivo do trabalho. Caso o animal apresente uma postura arqueada e apatia por 24 h ou mais, os animais serão anestesiados como descritos anteriormente e eutanasiados, pois o procedimento de inoculação pode ter lesado vísceras dos animais prologando o estresse inflamatório e mesmo contaminação da cavidade peritoneal com material intestinal.

No caso da infecção com *Taenia crassiceps*, os animais serão acompanhados diariamente e pesados semanalmente. Serão avaliados postura, capacidade de locomoção e peso dos animais durante a fase de experimentação. Caso a infecção cause alterações na postura e dificuldade de locomoção, os

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFPG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com



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



animais serão anestesiados como descritos anteriormente e eutanasiados. O peso dos animais não deve ultrapassar 60 g, sendo que animais acima deste peso serão anestesiados e eutanasiados. No caso de infecção por *Leishmania*, os animais serão acompanhados diariamente e as lesões nas patas medidas semanalmente. Serão avaliadas, postura, capacidade de locomoção e tamanho das lesões durante a fase de experimentação. Caso a infecção cause alterações na postura e dificuldade de locomoção, os animais serão anestesiados e eutanasiados. Adicionalmente, animais com lesões iguais ou superiores a 3 mm serão anestesiados e eutanasiados.

VI - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, o projeto foi considerado **APROVADO** pela *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás.

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(s) pesquisador(es) responsável(is) deverá(ão) encaminhar à CEUA-PRPI-UFPG 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 em 01/12/2024.

VII - Data da reunião: 16/12/2019.



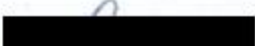
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Susceptibilidade de macrófagos alternativamente ativados murinos à infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*”, registrada com o protocolo nº 102/19, sob a responsabilidade de Milton Adriano Pelli de Oliveira que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG), em reunião de 16/12/2019.

- Finalidade: () Ensino (x) Pesquisa Científica
- Vigência da autorização (início e fim): 16/12/2019 a 31/12/2024
- Espécie/linhagem/raça: camundongos, BALB/c e C57BL/6
- Nº de animais autorizados: 168
- Peso/Idade: 25g/6-12 semanas
- Sexo: fêmeas
- Origem (fornecedor): Biotério do IPTSP/UFG


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

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua.ufg@gmail.com