



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

MIRIAN VIEIRA TEIXEIRA

**Análise da proliferação de amastigotas de *Leishmania*
(*Viannia*) *braziliensis* em macrófagos murinos**

Goiânia

2021



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

2. Nome completo do autor

MIRIAN VIEIRA TEIXEIRA

3. Título do trabalho

Análise da proliferação de amastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em macrófagos murinos

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(a) autor(a) e ao(a) 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 24/11/2023, às 11:04, 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 **MIRIAN VIEIRA TEIXEIRA, Discente**, em 27/11/2023, às 15:12, 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 **2390188** e o código CRC **623B867D**.

Referência: Processo nº 23070.047731/2021-23

SEI nº 2390188

MIRIAN VIEIRA TEIXEIRA

**Análise da proliferação de amastigotas de *Leishmania*
(*Viannia*) *braziliensis* em macrófagos murinos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás como requisito para obtenção do título de Doutor

Área de concentração: Biologia da Relação Parasito - Hospedeiro

Orientador: Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira

**Goiânia
2021**

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

Teixeira, Mirian Vieira

Análise da proliferação de amastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em macrófagos murinos [manuscrito] / Mirian Vieira Teixeira. - 2021.
xvii, 95 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2021.
Bibliografia. Anexos.
Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, lista de figuras.

1. *Leishmania (V.) braziliensis*. 2. amastigotas. 3. macrófagos M1.
4. macrófagos M2. I. Oliveira, Milton Adriano Pelli de , orient. II. Título.

CDU 57



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE MIRIAN VIEIRA TEIXEIRA - Aos trinta dias do mês de setembro do ano de 2021 (30/09/2021), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. MILTON ADRIANO PELLIDE OLIVEIRA (PTSP/UFG), MARINA CLARE VINAUD (PTSP/UFG), LUÍS CARLOS CROCCO AFONSO (ICEB/UFOP), CLAYSON MOURA GOMES (PUC/GO) e LILIAN CRISTIANE BAEZA (UNIOESTE/PR) para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada por WEBCONFERÊNCIA, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: **"Análise da proliferação de amastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em macrófagos murinos"**, em nível de DOUTORADO, área de concentração em **BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, de autoria de **MIRIAN VIEIRA TEIXEIRA**, 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 PELLIDE 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 tese que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1492/2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata Aprovada ou Reprovada:

Banca Examinadora	Aprovada / Reprovada
Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira	<u> Aprovada </u>
Profa. Dra. Marina Clare Vinaud	<u> Aprovada </u>
Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso	<u> Aprovada </u>
Prof. Dr. Clayson Moura Gomes	<u> Aprovada </u>
Profa. Dra. Lilian Cristiane Baeza	<u> Aprovada </u>

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 **DOUTORA 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 18 h 00 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, HELOISA 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 **Marina Clare Vinaud, Professor**



do **Magistério Superior**, em 30/09/2021, às 18:02, 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 **Milton Adriano Pelli De Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 30/09/2021, às 18:02, 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 **Luís Carlos Crocco Afonso, Usuário Externo**, em 30/09/2021, às 18:04, 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 **Clayson Moura Gomes, Usuário Externo**, em 30/09/2021, às 18:04, 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 **Lilian Cristiane Baeza, Usuário Externo**, em 30/09/2021, às 18:13, 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 **2381359** e o código CRC **B5D7D580**.

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

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno (a): Mirian Vieira Teixeira

Orientador (a): Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira

Membros:

1. Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso (DECBI- ICEB/UFOP)

2. Profa Dra. Lilian Cristiane Baeza (UNIOESTE/PR)

3. Profa. Dra. Marina Clare Vinaud (IPTSP/UFG)

4. Prof. Dr. Clayson Moura Gomes (PUC/GO)

5. Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira (IPTSP/UFG)

Data: 30/09/2021

Dedico este trabalho aos meus pais Weser e Ilma e irmãs Núbia e Lilian Margareth. Muito obrigada por todo apoio, incentivo e amor incondicional transmitidos ao longo de toda esta jornada. O amor de vocês faz toda a diferença.

Ao meu orientador Milton Oliveira. Muito obrigada pela oportunidade e inspiração. Obrigada por ser um exemplo de profissionalismo e ética.

“O importante é não parar de questionar”.
(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

À Deus, Senhor da minha vida, por me sustentar e me guiar em todos os momentos da minha trajetória e, por permitir que tudo na minha vida aconteça da melhor forma.

Ao meu orientador Professor Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira, por ter me aceito em seu laboratório e pela oportunidade de realizar esta pesquisa. Agradeço sua orientação, paciência, disponibilidade, a forma interessada, extraordinária e pertinente como acompanhou a realização deste trabalho. Obrigada pelo apoio, por todos os ensinamentos compartilhados de forma admirável, suas críticas construtivas, as discussões e reflexões que foram fundamentais ao longo de todo processo do Doutorado. Muito Obrigada!!!

À Universidade Federal de Goiás (UFG) por viabilizar as condições necessárias para cumprimento deste percurso acadêmico.

Aos docentes e coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito - Hospedeiro da UFG, Professor Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira e Prof. Dr. Everton Kort Kamp Fernandes, pelo incentivo e valiosos conhecimentos ensinados.

A Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito - Hospedeiro da UFG, pelo excelente atendimento e auxílio nas dúvidas, informações.

Aos colegas do Laboratório de Citocinas: Mestrando André, Mestranda Bianca, Mestranda Daniela, Doutorando Ernandes (Migo!!!!), Doutorando José (Zé), Mestrando Santiago, Mestrando Vagner, Mestranda Jéssica, Mestra Fernanda, Dra. Polyanna, pelo companheirismo diário no laboratório e auxílio prestado em vários momentos no decorrer dos experimentos. Obrigada por me ajudarem em todos os momentos que precisei.

A Sra. Iraci, servidora do Biotério IPTSP-UFG, pelo auxílio e cuidado com os animais. Muito Obrigada!!!!

À Prof.^a Dra. Fátima Ribeiro Dias, por ter disponibilizado seu laboratório, colaborando com este trabalho.

À Prof.^a Dra. Célia Almeida Soares por contribuir para a realização do presente trabalho.

A banca de qualificação e defesa: Dra. Fátima Ribeiro Dias, Dra. Menira Borges de Lima Dias e Souza, Dr. Clayson Moura Gomes e de defesa, Dr. Luís Carlos Crocco Afonso, Dra. Lilian Cristiane Baeza, Dra. Marina Clare Vinaud, Dr. Clayson Moura Gomes, que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta Tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), pelo apoio financeiro para execução desta pesquisa.

À Secretaria de Estado da Educação de Goiás (SEDUC-GO) pela concessão de licença, para o meu aprimoramento profissional.

Às amigas Doutorandas Luciana Escher e Marta Lima, por todos os momentos felizes compartilhados e pelo apoio nos momentos de desafios. Obrigada por me oferecerem um ombro amigo sempre que precisei. Amigas que a pós-graduação me deu e que eu quero levar para o resto da vida! Muito obrigada!!!!

A minha família, por todo apoio, compreensão e estímulo. Muito obrigada por tudo! O amor que sinto por vocês é incondicional.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram, para que se tornasse possível a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

FIGURAS	xiii
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Leishmania, ciclo biológico e Leishmaniose	17
2.2 Macrófagos: ativação e polarização M1 e M2	21
2.2.1 Macrófagos M1.....	22
2.2.2 Macrófagos M2.....	24
2.3 Resposta imune a infecção por <i>Leishmania sp.</i>	27
2.4 Macrófagos M2a em infecções por <i>Leishmania spp.</i>	31
3 JUSTIFICATIVA	34
4 OBJETIVOS	36
4.1 Geral.....	36
4.2 Específicos	36
5 MATERIAIS E MÉTODOS	37
5.1 Animais e considerações éticas	37
5.2 Parasitos.....	37
5.3 Obtenção e cultura dos macrófagos murinos derivados da medula óssea (BMDM) e avaliação da atividade fagocítica e leishmanicida.....	38
5.4 Detecção de Nitrito.....	39
5.5 Atividades de arginase.....	39
5.6 Infecção dos camundongos e acompanhamento do curso da lesão.....	40
5.7 Análises Estatísticas.....	40
6 RESULTADOS	41
6.1 Diferentes cepas de <i>Leishmania (V) braziliensis</i> não proliferaram dentro de macrófagos murinos não estimulados	41
6.2 Sobrevivência de amastigotas de <i>L. (V) braziliensis</i> (JCJ8) dentro de macrófagos MΦ (IFN- γ + LPS).....	42
6.3 Sobrevivência de amastigotas de <i>L. (V) braziliensis</i> (JCJ8) dentro de MΦ (IL -4).....	44
6.4 Destino <i>Leishmania braziliensis</i> em macrófagos de camundongos C57 BL/6 Inosko.....	45
6.5 Tamanho da lesão desencadeada em camundongos WT e iNOSKO por <i>L. (V.) braziliensis</i>	48
7 DISCUSSÃO	49
8 CONCLUSÃO	54
9 REFERÊNCIA	55
10 ANEXOS	71
Anexo 1- Parecer do Comitê de Ética.....	71
Anexo 2- Manuscrito para submissão na revista Parasitology Research	75

FIGURAS

FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Leishmania spp.</i> no hospedeiro mamífero.....	18
Figura 2. Subpopulações e polarização de macrófagos M2.....	25
Figura 3. Diferentes cepas de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> não proliferaram dentro de macrófagos murinos não estimulados.....	41
Figura 4. Produção de óxido nítrico de MΦ (IFN- γ + LPS) com <i>L. (V.) braziliensis</i>	42
Figura 5. Sobrevivência de <i>L. (V.) braziliensis</i> dentro de MΦ (IFN- γ + LPS).....	43
Figura 6. Atividade arginase de MΦ (IL-4) infectado por <i>L. (V.) braziliensis</i>	44
Figura 7. Macrófagos ativados por IL-4 não suportam à amplificação da infecção por <i>L.(V.) braziliensis</i>	45
Figura 8. <i>L. (V.) braziliensis</i> não prolifera dentro de macrófagos iNOSKO.....	46
Figura 9. Tamanho da lesão desencadeada em camundongos WT e iNOSKO por <i>L. (V.) braziliensis</i>	48

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

BMDMs - Macrófagos derivados de medula óssea (do inglês Bone marrow derived macrophages).

CSFs - Fator estimulador de colônia

CT - Controle

DP - Desvio Padrão

eNOS - Óxido Nítrico Sintase Endotelial

IFN- γ - Interferon-gama

IFN- γ KO – Camundongos Deficientes (do inglês *knockout*) do gene IFN- γ

IL- Interleucina

IL-1, 4, 10 – Interleucina 1, 4, 10 etc.

iNOS - Óxido Nítrico Sintase Induzida

iNOS KO - Camundongos Deficientes do gene *iNOS*

iNOS- Óxido nítrico sintase induzida

IPTSP- Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

LCL- Leishmaniose Cutânea Localizada

LD - Leishmaniose Disseminada

LDif - Leishmaniose Difusa

Leishbank - Banco imunobiológico de leishmanioses da região Centro-Oeste

LM - Leishmaniose Mucosa

LPS - Lipopolissacáride

LPS - Lipopolissacarídeo

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

LV - Leishmaniose Visceral

M1 - macrófagos classicamente ativados

M2- Macrófagos alternativamente ativados

MHC II- Complexo de histocompatibilidade II

MΦ- Macrófagos

NADPH - Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida

ND – Não Detectado

NO - Óxido nítrico

PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos

SOD - Superóxido dismutase

TGF-β - Fator de transformação e crescimento-beta

Th1- Linfócitos T auxiliares do tipo 1 (do inglês T helper 1)

Th2- Linfócitos T auxiliares do tipo 2 (do inglês T helper 2)

TLRs- Receptores semelhantes a *Toll*

TNF-α- Fator de necrose tumoral-alfa

Treg- Linfócitos T reguladores

UFG- Universidade Federal de Goiás

WT - Camundongo Selvagem

RESUMO

Leishmania (Viannia) braziliensis é a principal espécie responsável pela leishmaniose tegumentar americana no Brasil. No entanto, o uso desta espécie de parasita para estudar a infecção por *Leishmania* em modelo murino tem sido menos conduzido quando comparado com outras espécies de *Leishmania*. O controle da infecção murina por *Leishmania* tem sido associado ao óxido nítrico (NO) produzido pela NO sintase induzível (iNOS) do macrófago M1, enquanto a arginase expressa por macrófagos M2 está relacionada à proliferação de *Leishmania*. O objetivo deste estudo foi analisar a capacidade de *L. (V.) braziliensis* proliferar dentro de macrófagos murinos in vitro por um período de 9 dias. Macrófagos foram derivados de precursores da medula óssea (BMDM) de camundongos selvagens e foram cultivados com IFN- γ e LPS, ou IL-4, ou BMDM nocaute iNOS (iNOS KO), sendo avaliados produção de óxido nítrico, atividade da arginase e infecção por *L. (V.) braziliensis*. O número de macrófagos infectados e a carga parasitária foram determinados por microscopia óptica. Foram inoculados (10^6) de parasitos promastigotas de *L. (V.) braziliensis* na pata dos camundongos selvagens e desprovidos de iNOS e a progressão da lesão foi mensurada semanalmente. Observou-se que BMDM do tipo selvagem não suportam a proliferação de amastigotas de cepas de *L. (V.) braziliensis* após o terceiro dia infecção, mesmo dentro de macrófagos tratados com IL-4 ou macrófagos iNOS KO. A atividade da arginase foi maior em macrófagos iNOS KO do que em macrófagos tratados com IL-4, mostrando que a ausência de proliferação é independente da arginase (*V.) braziliensis* foi capaz de causar doença não controlada em camundongos iNOS KO in vivo. Os dados obtidos sugerem que macrófagos murinos não suportam a proliferação de amastigotas de *L. (V.) braziliensis*, mesmo na ausência de óxido nítrico e presença de alta atividade de arginase. Portanto, mais estudos relacionados as necessidades de amastigotas internalizadas nas células hospedeiras são necessários, para a busca de melhores métodos para interferir na diversidade das formas de leishmaniose causadas por diferentes *Leishmania spp.*

Palavras-chave: *Leishmania (V.) braziliensis*, amastigotas, macrófagos M1; macrófagos M2.

ABSTRACT

Leishmania (Viannia) braziliensis is the main species responsible for American tegumentary leishmaniasis in Brazil. However, the use of this parasite species to study *Leishmania* infection in a murine model has been less conducted when compared to other *Leishmania* species. Control of murine *Leishmania* infection has been associated with nitric oxide (NO) produced by inducible NO synthase (iNOS) from M1 macrophage, while arginase expressed by M2 macrophages is related to *Leishmania* proliferation. The aim of this study was to analyze the ability of *L. (V.) braziliensis* to proliferate within murine macrophages in vitro for a period of 9 days. Macrophages were derived from bone marrow precursors (BMDM) of wild-type mice and were cultured with IFN- γ and LPS, or IL-4, or BMDM iNOS knockout (iNOS KO), and nitric oxide production, arginase activity, and infection with *L. (V.) braziliensis*. The number of infected macrophages and parasite load were determined by light microscopy. Promastigotes of *L. (V.) braziliensis* parasites were inoculated (10^6) into the paw of wild-type and iNOS-deficient mice and lesion progression was measured weekly. Wild-type BMDM were observed to not support proliferation of amastigotes of *L. (V.) braziliensis* strains after day 3 infection, even within IL-4-treated macrophages or iNOS KO macrophages. Arginase activity was higher in iNOS KO macrophages than in IL-4 treated macrophages, showing that the absence of proliferation is arginase independent. *L. (V.) braziliensis* was able to cause uncontrolled disease in iNOS KO mice in vivo. The data obtained suggest that murine macrophages do not support proliferation of *L. (V.) braziliensis* amastigotes, even in the absence of nitric oxide and presence of high arginase activity. Therefore, further studies related to the requirements of amastigotes internalized in host cells are needed, for the search of better methods to interfere in the diversity of leishmaniasis forms caused by different *Leishmania spp.*

Keywords: *Leishmania (V.) braziliensis*, amastigotes, M1 macrophages; M2 macrophages.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete a pele e áreas da mucosa nasal, oral e faríngea. Um total de 98 países apresenta transmissão endêmica de leishmaniose. Um comitê da Organização Mundial da Saúde (OMS) informou que a estimativa atual global de incidência de leishmaniose cutânea é 600.000 novos casos a cada ano. O Brasil, junto com seis outros países, apresentou 84% dos casos nas Américas de leishmaniose cutânea (Organização Pan-Americana da Saúde, 2019).

No Brasil, as três espécies mais importantes de *Leishmania* que causam a LTA pertencem a dois subgêneros: (1) *Viannia*, representadas principalmente pelas espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*, que estão associadas às formas clínicas cutânea ou mucosa; (2) *Leishmania*, representado por *L. (L.) amazonensis*, que está associada com o desenvolvimento de lesões cutâneas localizadas e disseminadas. Entre as espécies citadas, *L. (V.) braziliensis* é a mais prevalente e cerca de 5% dos pacientes com LTA apresentaram a forma clínica mucosa causada por esta espécie (Ashford, 2000; Antinori et al., 2012).

Os parasitos são transmitidos aos hospedeiros por insetos denominados flebotomíneos, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (Lainson & Shaw, 1987). Ao invadir um hospedeiro vertebrado, os parasitos entram em contato com as células da imunidade inata, das quais, os macrófagos possuem um papel crucial. Macrófagos estão presentes na maioria dos tecidos do corpo, possuem diferentes origens e uma grande variedade de funções (Wynn et al., 2013).

Durante uma infecção, os macrófagos residentes interagem com moléculas de superfície dos patógenos e secretam mediadores pró-inflamatórios, promovendo a inflamação local e migração de monócitos sanguíneos que darão origem a novos macrófagos. Macrófagos em diferentes tecidos podem responder de maneira diferente aos patógenos. Assim, *Leishmania*, interagem normalmente com macrófagos da derme que é a porta de entrada das formas promastigotas inoculadas pelo inseto vetor (Van Assche et al., 2011).

O microambiente da infecção é fundamental para definir o perfil e a forma de ação dos macrófagos, os quais podem ser divididos em pelo menos dois grupos. Um grupo, conhecido como macrófagos classicamente ativados (M1), pode ser gerado pelo estímulo com IFN- γ ou moléculas de patógenos. Estes macrófagos possuem uma grande capacidade de produzir moléculas microbicidas como as espécies reativas do oxigênio (ROS) ou do nitrogênio (RNS). Estas moléculas são cruciais para o controle de diversos patógenos como *Leishmania spp.*, *Paracoccidioides spp.*, *Trypanosoma cruzi*, entre outros (Gazzinelli et al., 1998; Moreira et al., 2010; Murray & Wynn, 2011; Van Assche et al., 2011; Feriotti et al., 2013).

O segundo grupo, conhecido como macrófagos alternativamente ativados (M2), pode ser gerado pela ação da interleucina 4 (IL-4) e IL-13. Macrófagos M2 possuem um importante papel na manutenção da homeostasia e reparo tecidual (Murray & Wynn, 2011; Wynn et al., 2013). Os macrófagos M2 possuem uma baixa capacidade para combater patógenos intracelulares e muitas vezes favorece a proliferação destes microrganismos (Murray & Wynn, 2011; Feriotti et al., 2013; da Silva & Floeter-Winter, 2014).

A presença de um microrganismo no interior dos macrófagos é capaz de alterar as características dos fagócitos, incluindo o seu metabolismo, a capacidade de sintetizar proteínas, expressão de microRNAs, entre outros (Locati et al., 2013). Em relação ao metabolismo geral, macrófagos M1 aumentam o consumo de glicose pela via da glicólise, enquanto macrófagos M2 preferencialmente usam as vias oxidativas (Cheng et al., 2014).

A disponibilidade de nutrientes, como o ferro também é reduzida em macrófagos M1, o que interfere com a sobrevivência de *Leishmania* e *Paracoccidioides* (Cano et al., 1994; Ben-Othman et al., 2014). Nesse sentido, vale ressaltar, que os patógenos também se adaptam ao ambiente desfavorável (Van Assche et al., 2011; Ben-Othman et al., 2014).

A infecção de camundongos por *L. (L.) major* apresenta uma dicotomia clara, em que algumas linhagens de camundongos, como camundongos BALB/c, desenvolvem doença descontrolada e outras, como camundongos C57BL/6, desenvolvem lesões autocurativas (Heinzel et al., 1989). Esta dicotomia foi explicada pelo paradigma Th1/ Th2, mas este modelo imunológico

não é claro para infecção murina com outras espécies de *Leishmania* (Alexander & Bryson, 2005).

Em modelos murinos de infecção por *L. (V.) braziliensis*, os mecanismos imunológicos de controle do patógeno não foram totalmente esclarecidos, como os da infecção por *L. (L.) major* (DeKrey et al., 1998; Souza-Neto et al., 2004; Rocha et al., 2007; Oliveira et al., 2010; Gomes et al., 2016; Avila et al., 2018). Na infecção murina por *L. (V.) braziliensis* observa-se que IFN- γ e IL-12p40 são componentes de uma resposta imune protetora (Maioli et al., 2004; de Souza et al., 2006; Oliveira et al., 2010). Em contrapartida, foi observada uma menor produção de citocinas do perfil Th2, tais como IL-4 e IL-13, quando comparado com a infecção por *L. (L.) major* (DeKrey et al., 1998; Rocha et al., 2007).

A injeção de *L. (V.) braziliensis* na pata ou orelha de camundongos, mostra a replicação do parasita no local da infecção, acompanhada pelo desenvolvimento de uma pequena lesão, cujo tamanho e duração dependem do parasita isolado e da cepa de camundongo (Rocha et al., 2007; Pereira et al., 2009; Costa et al., 2011; Gomes et al., 2016).

No entanto, nunca foi descrito o desenvolvimento de doença disseminada não controlada, devido a uma resposta imune Th2 em camundongos não imunossuprimidos, quando desafiados com diferentes cepas de *L.(V.) braziliensis*. Por outro lado, camundongos que não possuem moléculas relacionadas com Th1, como IFN- γ , desenvolvem lesão descontrolada com alto número de parasitas (Rocha et al., 2007; Oliveira et al., 2010; Gomes et al., 2016).

Portanto, a polarização de macrófagos para M1 ou M2 é um fator importante para o hospedeiro no resultado da doença. No entanto, são escassos os estudos que realizaram uma análise comparativa sobre o impacto de diferentes tipos de macrófagos e proliferação de amastigotas de *L. (V.) braziliensis*.

Assim, a hipótese deste estudo é que amastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* proliferam em macrófagos murinos polarizados para M2. O conhecimento de como diferentes tipos de macrófagos afeta o curso de doenças infecciosas causadas por *Leishmania spp.* deve fornecer benefícios terapêuticos no controle dessas infecções.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leishmania, ciclo biológico e Leishmaniose

Leishmania é um gênero de protozoários da família *Trypanosomatidae*, que abriga organismos unicelulares, com um flagelo simples e uma organela rica em DNA, o cinetoplasto (Ross, 1903). São parasitos intracelulares obrigatórios no hospedeiro mamífero, com pelo menos duas morfologias distintas, a promastigota e a amastigota, que estão relacionadas com as suas habilidades e necessidade de adaptação (Sharma & Singh, 2009).

Parasitos do gênero *Leishmania* constituem uma família heterogênea com 53 espécies, das quais 20 são infecciosas para seres humanos (Akhoundi et al., 2017). *Leishmania* causam um espectro de doenças, coletivamente chamado de leishmaniose, que variam desde lesões ulcerativas cutâneas (Leishmaniose tegumentar americana), até infecções viscerais fatais (Leishmaniose Visceral), e afetam cerca de 12 milhões de pessoas em todo o mundo (Kedzierski, 2011; Alvar et al., 2012).

Estudos filogenéticos baseados na sequência da proteína de choque térmico conservada, hsp 70, mostram que o gênero desenvolveu um clado monofilético formado por três subgêneros principais e correspondentes a *L. (Leishmania)*, *L. (Viannia)* e *L. (Sauroleishmania)* (Fraga et al., 2010).

O ciclo de vida de *Leishmania* distingue-se em dois estágios de desenvolvimento, um no hospedeiro vertebrado mamífero e o outro no hospedeiro invertebrado, insetos flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (Sacks & Perkins, 1984; Killick-Kendrick, 1986).

A transmissão desses parasitos ocorre durante hematofagia de fêmeas do flebotomíneos, que regurgita junto com a saliva, formas infectantes do parasito denominadas promastigotas metacíclicas, a qual assim como em toda outra forma promastigota, apresentam um flagelo evidente. No sítio da infecção, após inoculação das formas promastigotas metacíclicas desencadeia-se uma resposta imune inata, em que parasitos são fagocitados por células do sistema fagocitário mononuclear, principalmente por macrófagos. Dentro dessas células, os parasitos diferenciam-se na sua forma intracelular denominada amastigota, sem flagelo aparente (Sacks & Perkins, 1984; Killick-Kendrick, 1986) (Figura 1).

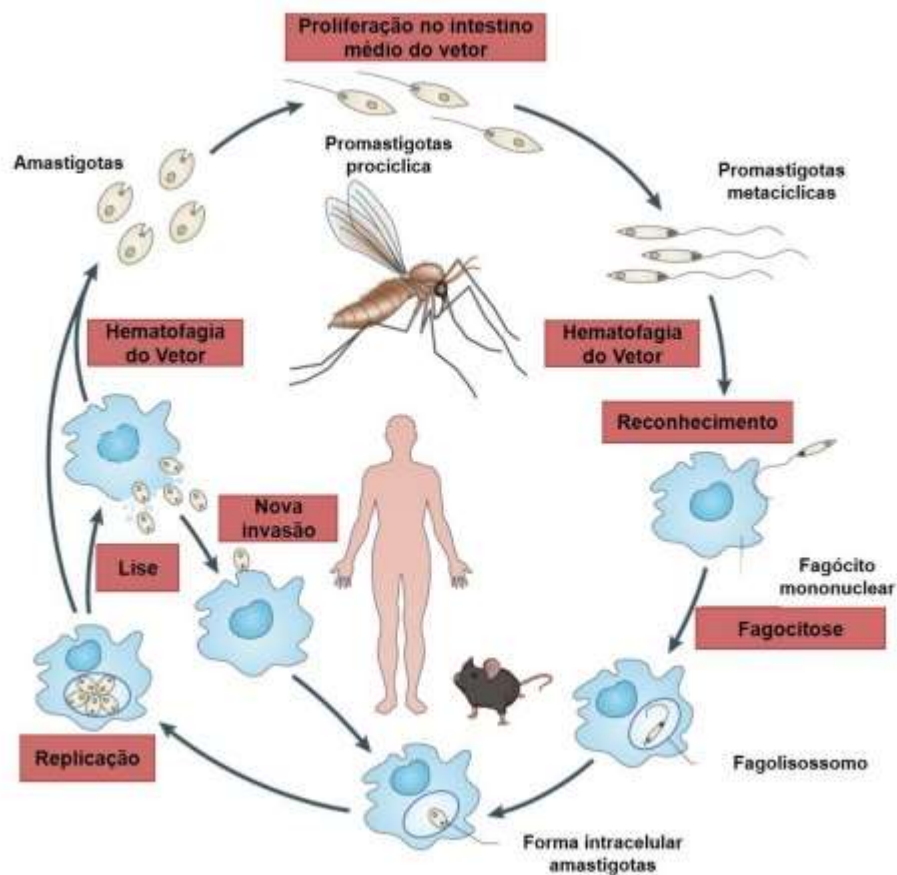


Figura 1. Ciclo biológico de *Leishmania spp.* no hospedeiro mamífero. No momento da hematofagia, o vetor inocula formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* no hospedeiro mamífero. Leishmanias metacíclicas são reconhecidas pelas células do sistema fagocitário mononuclear, que fagocitam o parasito e formam o fagolisossomo, onde a *Leishmania* se diferencia em amastigota, forma intracelular replicante, e proliferam, podendo romper as células infectadas e, infectar novas células mononucleares ou volta ao ciclo do vetor. No vetor, ao ingerir formas amastigotas do hospedeiro infectado, esses parasitos leishmanias se diferenciam em promastigotas procíclicas, proliferam e passam pela metociclo-gênese, transformando-se em promastigotas metacíclicas.
 Fonte: Adaptado de Kaye & Scott, 2011.

As formas amastigotas do parasito, evadem dos mecanismos inatos de defesa e, multiplicam-se por divisão binária, podendo romper estas células e infectar outras, ampliando assim a infecção (Lainson et al., 1987; Hepburn, 2003). A continuidade do ciclo se dá, quando outro flebotômíneo, não infectado, ingere sangue do vertebrado infectado contendo as formas amastigotas do parasito. No tubo digestório do flebotômíneo, as formas amastigotas passam por um processo de diferenciação, a metociclo-gênese, em que diferenciam em promastigotas procíclicas e, em seguida, diferenciam-se forma infectante, a metacíclica, a qual migra para a probóscide do vetor, sendo inoculada em um

vertebrado durante outro repasto sanguíneo (Lainson et al., 1987; Hepburn, 2003).

O sucesso da infecção causada pelo parasita *Leishmania* é possível graças a expressão de fatores de virulência, entre outras proteínas por esse parasito. As diferentes formas de vida dos parasitos *Leishmania* expressam diferenças em seu perfil proteico, o que auxilia na adaptação dessas formas às pressões ambientais às quais estão submetidas. Durante a diferenciação de promastigotas e amastigotas, observa-se que os níveis de mRNA regulam estágios iniciais desse processo enquanto a modificações pós-traducionais regulam as etapas finais da diferenciação (Lahav et al., 2011).

A comparação quantitativa do proteoma de promastigotas e amastigotas evidenciou uma diferença de até 30% na expressão de proteínas das espécies *L. infantum* (McNicoll et al., 2006), *L. donovani* (Bente et al., 2003), *Leishmania mexicana* (Nugent et al., 2004) e *Leishmania panamensis* (Walker et al., 2006). Considerando as diferentes expressões das proteínas regulatórias em promastigotas e amastigotas, as vias com diferenças mais significativas foram as que regulam resposta ao estresse, metabolismo, ciclo celular e citoesqueleto (Bente et al., 2003).

Essas funções celulares estão condizentes com processos de infecção onde parasitas necessitam expressar proteínas para aumentar chances de sobrevivência no interior de macrófagos, por exemplo (Walker et al., 2006). As formas amastigotas apresentam atividade mitocondrial e resposta ao estresse induzidas. Por habitarem os fagolisossomos, há repressão de proteínas da via glicolítica e indução de proteínas do Ciclo do Ácido Tri carboxílico (TCA) (Lahav et al., 2011).

A análise proteômica de promastigotas de *L. amazonensis* em diferentes fases do seu ciclo de vida também mostrou uma redução nos níveis de proteínas glicolíticas nas fases mais tardias. No entanto a fosfoglicerato mutase foi induzida e considerada como um ótimo alvo de fármacos contra a leishmaniose. Além disso, a indução de proteínas de resposta ao estresse, como hsp70, superóxido dismutase e peroxidases, evidencia o processo de adaptação à infecção (Alcolea et al., 2016). Neste sentido, a triagem por proteínas diferencialmente expressas no parasito, que o auxiliam a estabelecer a infecção, tem se tornado cada vez mais alvo de investigação.

No Brasil são reconhecidas sete espécies causadoras da Leishmaniose tegumentar americana: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) lindenbergi*, sendo, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* as principais espécies do ponto de vista da saúde pública (Silveira et al., 2004).

Dependendo da relação parasito-hospedeiro, isto é, da espécie de Leishmania, das características genéticas do hospedeiro e do vetor, da resposta imunológica e fatores ambientais, pode-se desenvolver um espectro de manifestações clínicas da LTA, representando diferentes padrões imunopatológicos (Lainson & Shaw, 1997).

No Brasil, a leishmaniose tegumentar é causada principalmente pelo protozoário da espécie *L. braziliensis*, que apresenta amplo espectro clínico de manifestações, que incluem a leishmaniose cutânea localizada (LCL), que é a forma clínica mais frequente da doença e, caracteriza-se por uma única lesão ou poucas lesões cutâneas ulceradas, de aspecto arredondado e bordas elevadas, que tende à cura espontânea. Uma falha da resposta imune contra o parasito, causa a Leishmaniose cutânea disseminada (LD), caracterizada pela presença de múltiplas lesões ulceradas em várias áreas do corpo, podendo em alguns casos ocorrer lesões nas mucosas (Clem, 2010).

A leishmaniose mucosa (LM), é uma manifestação clínica em que há uma resposta imune celular exacerbada e uma baixa carga parasitária, compromete as mucosas oral e nasofaríngea. A leishmaniose mucocutânea, é caracterizada pela ocorrência simultânea de LM com uma manifestação cutânea localizada, que ocorre meses ou anos após a LCL (Clem, 2010).

2.2 Macrófagos: ativação e polarização M1 e M2

Macrófagos são células do sistema imune inato, pertencentes ao sistema fagocítico mononuclear e, que estão amplamente distribuídas em quase todos os tecidos do organismo, possuindo diferentes origens e uma grande variedade de funções (Wynn et al., 2013). Os macrófagos estão presentes na maioria dos tecidos do corpo, (Wynn et al., 2013). Macrófagos residentes dos tecidos são derivados de progenitores fetais e são mantidos nos respectivos locais por um mecanismo de auto-renovação, independente da entrada de novos monócitos sanguíneos (Hoeffel & Ginhoux, 2015).

Atuam no controle de processos infecciosos e inflamatórios, para o desenvolvimento e cicatrização de tecidos e manutenção da homeostase do organismo (Epelman et al., 2014; Taylor et al., 2005). Os macrófagos expressam na superfície ou no citoplasma diferentes Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRP), os quais reconhecem diversos estímulos, como microrganismos. Dentre esses receptores estão a família de receptores *Toll-like* (TLRs) reconhecem componentes derivados de patógenos, o CR3 (terceiro receptor do complemento), o CR1, (o primeiro receptor do complemento), o receptor de manose, e o receptor gama Fc (Ueno & Wilson, 2012).

Na superfície do macrófago, também estão presentes moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), responsáveis pela apresentação de antígenos para linfócitos T, atuando dessa forma como efetores da resposta adaptativa. A apresentação de antígenos se faz por meio de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) presentes na superfície do macrófago. A interação do macrófago com células TCD4⁺ se dá quando partículas se acoplam às moléculas do complexo de histocompatibilidade classe II (MHC II) e com células TCD8⁺, quando as partículas se conjugam às moléculas do complexo de histocompatibilidade classe I (MHC I) (Yang et al., 2014).

Os macrófagos participam da resposta do hospedeiro contra patógenos invasores, pelo processo da fagocitose ou pela regulação das respostas de outras células imunes (Gordon, 2016). O mecanismo de fagocitose ocorre a partir da interação entre receptores do macrófago e a partícula invasora, que é

internalizada em vesículas denominadas fagossomos, os quais se fundem com os lisossomos e, neste local as enzimas hidrolíticas, ROS, NO e várias proteínas antimicrobianas, contribuem para a degradação microbiana (Gordon, 2016).

Os macrófagos são células extremamente plásticas, sendo capazes de alterar rapidamente seu perfil funcional, por meio de um processo definido como polarização, que é a forma como os macrófagos respondem a estímulos vindos do microambiente local e, adquirem um fenótipo funcional específico (Viola et al., 2019).

Com base em programas específicos de expressão gênica, que levam à aquisição de diferentes marcadores na superfície celular, à secreção de certas citocinas e a adaptações metabólicas, os macrófagos são geralmente classificados em macrófagos classicamente ativados, pró-inflamatórios ou M1 (Nathan, 1983), e alternativamente ativados, anti-inflamatório ou macrófagos M2 (Stein, 1992; Doyle et al., 1994).

2.2.1 Macrófagos M1

Os macrófagos M1 são originados mediante ao estímulo de IFN- γ e a produtos microbianos, como os lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas (Mosser & Edwards, 2008; Martinez & Gordon, 2014). Esses, macrófagos produzem uma quantidade significativa de citocinas, que contribuem para uma resposta imune Th1, como IL-1 β , IL-15, IL-18, IL-12 e TNF- α , e várias quimiocinas como CCL15/HCC-2, CCL20/MIP-3 α , CXCL13/BCA-1, CXCL9/Mig, CXCL10/IP-10 e CXCL11/I-TAC, que da mesma forma, induzem a ativação da resposta Th1 (Mantovani et al., 2002; Mantovani et al., 2004; Martinez & Gordon, 2014).

Também, apresentam altos níveis de moléculas de MHC-II, como a HLA-DR, que está relacionado com a capacidade de apresentação de antígenos e, de moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 e, baixos níveis de MRC1 (receptor de manose) ou Fc γ RII. Além disso, os macrófagos M1 possuem alta capacidade endocítica e de eliminar patógenos intracelulares (como por exemplo, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania spp.*), acidificação do fagossomo e liberação de óxido nítrico (NO) através da ação de iNOS (Carlin et

al., 1989; Mosser & Handman, 1992; MacMicking et al., 1997; Gruenheid & Gros, 2000; Martinez et al., 2008).

O aumento da capacidade microbicida de macrófagos M1, se dá através da produção de moléculas, entre elas ROS, tais como ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e NO, que podem matar o parasito (Liew et al., 1990).

A produção de ROS no interior dos macrófagos, induzida por fagocitose e pelas citocinas IFN- γ e TNF- α é gerada por meio de um processo denominado de explosão respiratória, caracterizado pelo aumento do consumo de oxigênio. Este mecanismo microbicida é dependente de um complexo multienzimático, chamado nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) oxidase ou fagócito oxidase (PHOX), que são ativadas, durante a fagocitose, quando são translocadas para a membrana plasmática ou do endossoma (Buchmuller-Rouiller & Mael, 1987; Forman & Torres, 2002).

O NADPH reduz o oxigênio extracelular a O_2^- , que sob ação da enzima superóxido dismutase, produz H_2O_2 e O_2 , os quais podem reagir com outras moléculas (Forman & Torres, 2002; Blos et al., 2003). Nos macrófagos, assim como em neutrófilos a inibição da explosão respiratória, favorece a permanência e sobrevivência de patógenos no fagolissomo (Buchmuller-Rouiller & Mael, 1987; Forman & Torres, 2002).

Outro mecanismo microbicida dos macrófagos é a produção de espécies reativas de nitrogênio (RNI), tais como o NO, que é um radical livre gasoso, altamente reativo e facilmente difusível nos líquidos corporais e tecidos, que dependendo da sua concentração e condições químicas ambientais, apresenta meia vida fisiológica de segundos a minutos (Dusse et al., 2003).

O NO é sintetizado, a partir do substrato L-arginina, que é convertida em citrulina por uma família de enzimas chamadas óxido nítrico sintases (NOS). Existem três isoformas de NOS, a NOS neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS), que são expressas constitutivamente e estão localizadas no citosol e dependem da via de cálcio (Ca^{2+})/calmodulina, a outra isoforma é induzida (iNOS), com ação independente de Ca^{2+} (Estevez & Jordan, 2002).

A iNOS, está presente em vários tipos celulares, como macrófagos, neutrófilos e fibroblastos, sendo induzida em resposta a diversos estímulos

antigênicos, como LPS e por citocinas (IFN- γ e TNF- α) (Liew et al., 1997). Nos macrófagos, a síntese de NO resulta da ação da iNOS, que converte o aminoácido L-arginina em outro aminoácido, L-citrulina liberando NO. Este último pode ser convertido em dois metabólicos: nitrito (NO₂-) e nitrato (NO₃), que são adotados como meio indireto da produção de NO, por serem facilmente mensurados (Robbins & Grisham, 1997; Dusse, 1998).

Em macrófagos ativados, a ação citotóxica do NO resulta da sua ação direta ou conjunta com intermediários reativos de oxigênio, secretados simultaneamente. Como exemplo, o peroxinitrito (ONOO⁻), resultante da combinação de NO e ânion superóxido (O₂⁻) que é um poderoso oxidante de proteínas. O ONOO⁻ pode, posteriormente, ser protonado na presença de íon hidrogênio (H⁺), originando um radical altamente reativo e tóxico, o hidroxil (HO[•]), aumentando efetivamente a ação tóxica do NO e do O₂⁻ (Robbins & Grisham, 1997)

Também produzido por macrófagos ativados para perfil M1, o ânion superóxido (O₂⁻) é um radical livre, produto de redução enzimática parcial de uma molécula de O₂ pela enzima NADPH-oxidase, que atua no fagossomo, mas pode ser liberado no citoplasma e causar danos a membrana celular. Se liberado para o citosol, o O₂⁻ é convertido a H₂O₂ por ação da enzima superóxido dismutase (SOD), presente na membrana e na parte interna do invólucro do fagossomo. H₂O₂ pode causar danos celulares, mesmo não sendo um radical. Por ação da catalase e do sistema glutation-peroxidase-glutation-redutase, H₂O₂ é convertido em oxigênio (O₂) e água (Robbins & Grisham, 1997)

2.2.2 Macrófagos M2

Os macrófagos M2 são células relacionadas funcional e fenotipicamente, que possuem um papel crítico na inflamação tipo Th2 e na fase de resolução e reparação tecidual. Em decorrência da predominância funcional, podem ser subdivididos em quatro subpopulações M2a, M2b, M2c e M2d (Figura 2).

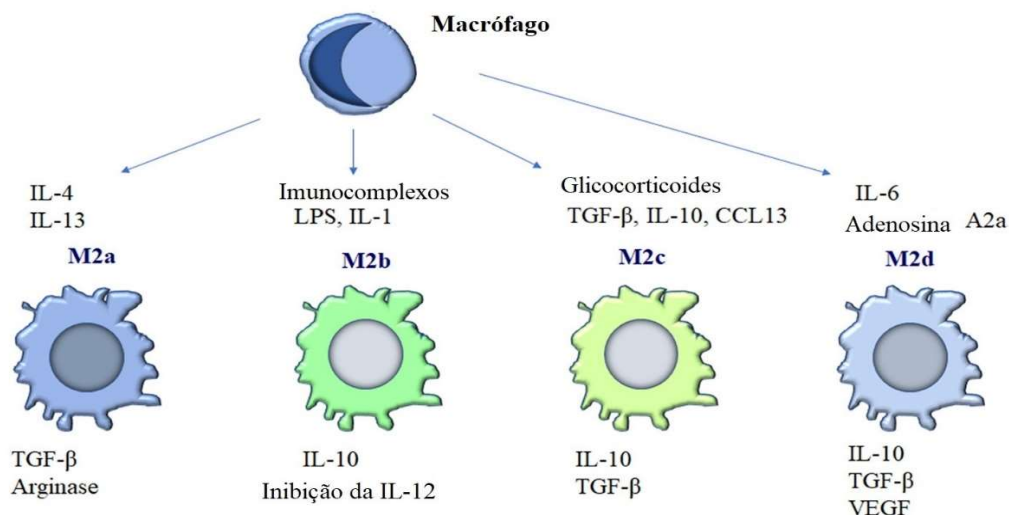


Figura 2. Subpopulações e polarização de macrófagos M2. Os macrófagos sofrem polarização dependendo dos estímulos recebidos. Os macrófagos M2 são subdivididos em M2a, M2b, M2c, M2d dependendo de estímulos recebidos. IL-4 e IL-13 induzem macrófagos M2a, sua função principal é inibir genes M1 e remover debris durante o reparo de tecidos. Imunocomplexos, LPS e IL-1 promovem macrófagos M2b, que desempenham atividade regulatória. Os glicocorticoides, TGF-β, IL-10 e CCL13 induzem a desativação de macrófagos M1, que conseqüentemente, adquirem uma atividade regulatória, provavelmente pela produção de TGF-β. Os macrófagos M2d são ativados em resposta a IL-6 e ao agonista do receptor de adenosina A2 (A2R) e, desempenham um papel na atividade pró-angiogênica.

Fonte: Adaptado de Di Benedetto et al. 2019.

Essas células são identificadas com base na expressão marcadores como, CD200R, CD206, CD163, arginase-1, STAT-3 e IL-10 (Mantovani et al., 2004; Duluc et al., 2007; Martinez et al., 2008; Gordon & Taylor, 2005; Gordon & Martinez, 2010).

Quando os macrófagos são estimulados com as citocinas IL-4 e IL-13, produzidas principalmente por células Th2, mastócitos e basófilos, são ativados para o grupo M2a, os quais promovem diminuição dos mediadores inflamatórios, diminuição da expressão de moléculas de superfície como CD14 e CCR5 (Wang et al., 1998; Mantovani et al., 2002).

O estímulo das células M2a por IL-4, induz o aumento da expressão de vários receptores, como do tipo “Scavenger”, receptores para lectinas de membrana do tipo C como a dectina-1 e a “*dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin*” (DC-SIGN) (Martinez et al., 2006) e, também a expressão fibronectina 1 (FN-1) e a proteína associada a matriz βIG-H3, promotoras da fibrogênese associada ao fator de coagulação FXIII e o fator de crescimento

“insulina-like” 1 (IGF-1), o que viabiliza a sinalização para a reparação tecidual e proliferação celular (Gratchev et al., 2001; Törocsik et al., 2005).

Em modelos murinos, as células M2a não expressam iNOS, o que altera a via metabólica do NO e faz com que não haja produção de NO, comprometendo a atividade microbicida contra os patógenos intracelulares. Entretanto, esses macrófagos expressam altos níveis de arginase-1 e, promovem crescimento celular, formação de colágeno e reparação tecidual (Modolell et al., 1995; Hesse et al., 2001; Martinez et al., 2008).

Os macrófagos M2b são originados pelo estímulo de LPS ou IL-1 β , através de “Toll like receptor” 4 (TLR4) ou IL-1R e imunocomplexos reconhecidos pela porção Fc da imunoglobulina G (Fc γ R) (Sutterwala et al., 1998; Bowie & O'Neill, 2000) e, expressam CCL1, TNF, CD86 e IL-6, altos níveis de IL10 e baixos níveis de IL-12 (Mosser & Edwards, 2008; Ito et al., 2016; Giant et al., 2017; Wang et al., 2019) ou promover a persistência da infecção (MacParland et al., 2017; Wang et al., 2019; Atri et al., 2018).

Os estímulos IL-10, TGF- β ou glicocorticoides originam macrófagos do tipo M2c. Esses macrófagos são caracterizados, pela regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-12, diminuição da expressão de MHC-II e de moléculas coestimuladoras, necessárias para apresentação de antígenos por monócitos e macrófagos e, aumento da atividade de eliminação de debris celulares e promoção de programa funcional de reparação (Mantovani et al., 2003; Mantovani et al., 2004; Martinez & Gordon, 2014). O TGF- β regula negativamente a expressão de CD163, molécula que está associada ao perfil de macrófago M2 e, impede a produção de; citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 α e IL-18 induzidas por LPS (Bogdan et al., 1992).

Em resposta a vários sinais de estresse, os glicocorticoides são liberados, sendo essenciais para manutenção da homeostase. O reconhecimento dessas moléculas, ocorre no núcleo celular e favorece a supressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12 e de mediadores pró-inflamatórios como iNOS (Valledor & Ricote, 2004). Também, inibem a resposta inflamatória, através do aumento da expressão de IL-10 e, de outras moléculas com funções anti-inflamatórias como o receptor “scavenger” CD163, que interfere no sistema IL-1 (Martinez et al., 2008).

A última subpopulação M2d é ativada por adenosina e interleucina-6, sendo associada ao crescimento de tumores e angiogênese (Duluc et al., 2007; Ferrante et al., 2013; Huang et al., 2018). A estimulação com adenosina, pode resultar na polarização de macrófagos M1 para M2d (Ferrante et al., 2013), fenótipo este que expressa altos níveis de IL-10, VEGF e iNOS e, secreta CCL5, CXCL10 e CXCL6 e baixos níveis de IL-12 e TNF- α (Wang et al., 2010; Lawrence & Natoli, 2011; Csóka et al., 2012; Ferrante et al., 2013).

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica, que apresenta propriedades pró e anti-inflamatórias, com capacidade de modular a maioria dos aspectos do sistema imune inato. No sítio de infecção, a IL-6, tem como uma das funções induzir a diferenciação de monócitos para macrófagos, por indução da expressão do receptor para fator estimulante de colônia monócito (M-CSF) por mecanismos dependentes de ERK (Chomarat et al., 2000).

Em modelos experimentais de LC e LV, foram demonstradas funções contraditórias da IL-6 (Rot et al., 2004; Holowka & Von Andrian, 2020; Griffith et al. 2014), em promover (Steigerwald & Moll, 2005; Racoosin & Beverley, 1997), suprimir (Carvalho et al., 2012) ou não alterar a defesa intracelular do hospedeiro à leishmaniose (Weinkopff et al., 2013).

2.3 Resposta imune na infecção por *Leishmania sp.*

Na infecção por *Leishmania sp.* a resposta imunológica envolve um conjunto de fatores, tais como a ação de citocinas, das moléculas co-estimulatórias, da saliva do flebotomíneo e fatores genéticos do hospedeiro. A inoculação das formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania sp.* na pele do hospedeiro vertebrado, através da picada da fêmea flebotomíneo inicia o processo de infecção (Lainson & Shaw, 1987), sendo que alguns desses parasitos resistem a lise mediada pelo sistema complemento, devido moléculas presentes na superfície e entram em contato com as células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas (DC) (Passero et al., 2012), modulando a resposta imune do hospedeiro (Olivier et al., 2005).

Estudos demonstram, que neutrófilos também são recrutados para o local da infecção, onde reconhecem os parasitos e os fagocitam, sendo usados pela

Leishmania sp. como uma forma de entrar silenciosamente nos macrófagos, evitando a sua ativação (Scott & Novais, 2016). Os neutrófilos são fagocitados pelos macrófagos, sendo os últimos os hospedeiros definitivos para proliferação dos parasitos e ao mesmo tempo as células efetoras para a destruição desses parasitos (Peters & Sacks, 2009; Liu & Uzonna, 2012).

As formas promastigotas, após o reconhecimento e ativação dos macrófagos, são fagocitadas e ficam retidas dentro dos fagossomos, os quais se fundem aos lisossomos, formando os fagolisossomos. No combate a invasores, dentro dos fagolisossomos, ocorrem vários processos celulares, como: degradação por enzimas por proteases, nucleases, fosfatases, lipases e esterases, o estresse oxidativo e produção de NO (Van Assche et al., 2011).

Assim, os parasitos do gênero *Leishmania* ao habitar os fagolisossomos, resistem às enzimas do lisossomo e ao pH ácido da célula por diversos mecanismos de escape, além de escapar da resposta humoral (Van Assche et al., 2011).

A resposta específica a leishmaniose é mediada principalmente por linfócitos T e, está relacionado com a expansão de células T auxiliares, que por muito tempo foi considerado apenas Th1/Th2 para explicar aspectos da imunidade e inflamação (Mills et al., 2000). Porém, após a descoberta da linhagem Th17 (Langrish et al., 2005), e de outras subpopulações de células T, como células Treguladoras (Tregs), células Thelper foliculares (Tfh), células Th22 e Th9, também já foram descritas participando dos processos imunes e inflamatórios (Sundrud & Trivigno, 2013).

Os linfócitos T auxiliares 1 (Th1) ou 2 (Th2), são caracterizados de acordo com as citocinas que secretam, quando reconhecem o antígeno ligado ao MHCII apresentado pelo fagócito. O linfócito Th1 secreta citocinas pro- inflamatórias, sendo a principal o IFN- γ , potente ativador do macrófago, enquanto as citocinas IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β estão envolvidas com a resposta Th2, que na leishmaniose contribuem para a progressão da doença. O linfócito Th2 secreta citocinas, como IL-4 e IL13, que além de promoverem a resposta humoral possuem capacidade anti-inflamatória, inibindo a ativação do fagócito (Pirmez et al., 1993).

A IL-4 promove a diferenciação de células T naive em células efetoras Th2 secretoras de IL-4 e IL-5, e diminui a produção de IFN- γ (Noben -Trauth,

2000). A IL-10 é uma importante citocina reguladora, que suprime a atividade de macrófagos, células Th1 e células NK, e inibe a maturação de células dendríticas, todas essas células necessárias para a defesa contra patógenos intracelulares (O'Garra & Vieira, 2007; Couper et al., 2008; Sabat et al., 2010). Além disso, a produção de IL-10 é modulada por diferentes citocinas, incluindo TGF- β , IL-6, IL-12 e IL-27 (McGeachy et al., 2007; Stumhofer et al., 2007; Cyktor & Turner, 2011).

Em contraste, a inibição da produção de IL-10 promove respostas imunes contra diferentes doenças infecciosas. Assim, a IL-10 atua como um imunorregulador crucial durante infecções causadas por patógenos intracelulares, como os parasitos *Leishmania* (Couper et al., 2008; Cyktor & Turner, 2011).

A infecção experimental em camundongos tem sido utilizada para elucidar aspectos da relação parasita-hospedeiro na leishmaniose. A resposta de linfócitos Th1 e Th2 ficou bem clara nos estudos com *L. major*, empregando camundongos BALB/c e C57BL/6 (Liew et al., 1990; Mills et al., 2000; McMahon-Pratt & Alexander, 2004). Em diferentes linhagens de camundongos, como C57BL/6, CBA e C3H/He, a infecção por *L. major* induz o início de uma resposta Th1 específica, dependente de IL-12, caracterizada pelo aumento da expressão de INF- γ , que induz a síntese de iNOS em macrófagos e produz NO, que mata parasita, resultando na cura da infecção.

Em oposição, uma resposta Th2 específica ao parasita é desenvolvida em camundongos BALB/c, que é caracterizado pelo aumento da expressão de IL-4, propiciando a multiplicação descontrolada do parasita, o desenvolvimento progressivo da lesão, ocasionando doença (Awasthi et al., 2004).

Há diferenças entre o comportamento das linhagens de camundongos, frente ao desafio em relação às várias espécies de *Leishmania*. A título de exemplos, camundongos da linhagem C57BL/10, são capazes de curar uma infecção por *L. major*, pois ocorre produção de altos níveis de IFN- γ e nenhuma produção de IL-4. Entretanto, não conseguem resolver a lesão se infectados por *L. amazonensis*, pois há produção de IL-4 e pouca ou nenhuma produção de IFN- γ (Afonso & Scott, 1993).

Do mesmo modo, linhagens de camundongos susceptíveis a *L. major*, podem ser resistentes a *Leishmania braziliensis*, e linhagens de camundongos resistentes a *L. major*, podem ser susceptíveis a *L. amazonensis* (Maioli, 2004).

Os mecanismos imunológicos de controle do patógeno em modelos murinos de infecção por *L. (V.) braziliensis* são menos claros que os de *L. (L.) major* (DeKrey et al., 1998; Souza-Neto et al., 2004; Rocha et al., 2007; Oliveira et al., 2010; Gomes et al., 2016; Avila et al., 2018). Na infecção murina por *L. (V.) braziliensis* observa-se que IFN- γ e IL-12p40 são componentes de uma resposta imune protetora (Maioli et al., 2004. de Souza et al., 2006; Oliveira et al., 2010). Em contrapartida, foi observada uma menor produção de citocinas do perfil Th2, tais como IL-4 e IL-13, quando comparado com a infecção por *L. (L.) major* (DeKrey et al. 1998; Rocha et al., 2007).

Camundongos BALB/c infectados na pata com *L.(V.) braziliensis* desenvolvem uma lesão que é ligeiramente menor que a desencadeada em camundongos C57BL/6 infectados com a mesma espécie, com o pico da lesão variando entre 1 e 2 mm em BALB/c e 0,2 a 0,4 mm em C57BL/6 (DeKrey et al., 1998; Maioli et al., 2004; Gomes et al., 2016). Apesar do aparecimento de lesões nos camundongos infectados com *L (V.) braziliensis*, estas são transientes e geralmente não se tornam ulceradas como ocorre na infecção por *L. (L.) major* (Carvalho et al., 2012).

Assim, o controle da infecção murina por *L. (V.) braziliensis* depende de macrófagos M1 com a produção de NO, enquanto a baixa produção de citocinas relacionadas à ativação alternativa de macrófagos reduz a expressão da arginase e dificulta o estabelecimento do perfil M2, favorecendo a cura da infecção (Rocha et al., 2007).

Apesar da cura completa da lesão observada em camundongos C57BL/6 infectados por *L. (L.) major* e *L. (V.) braziliensis*, os parasitos não são eliminados completamente, sendo possível detectar no linfonodo dos animais a presença destes (Rocha et al., 2007).

Ressalta-se ainda que o controle da *L. (V.) braziliensis* na infecção murina pode ser independente de IFN- γ e NO, já que alguns camundongos desprovidos de IFN- γ não desenvolvem lesão quando são inoculados com macerados de biópsias de pacientes contendo formas amastigotas (Oliveira et al., 2010). Além disto, o controle dos parasitos no baço é feito na ausência do NO (Rocha et al.,

2007). Estes dados demonstram que, embora exista diferença entre a infecção de macrófagos murinos por *L.(L.) major* e *L.(L.) braziliensis*, ambos os parasitos são mantidos viáveis durante a infecção *in vivo* dentro de macrófagos teciduais.

Assim, no modelo murino, resistência e susceptibilidade à leishmaniose, bem como o padrão Th1/Th2 de resposta, só podem ser considerados fenótipos se definida a espécie de *Leishmania*, o que mostra a complexidade de fatores provenientes tanto do hospedeiro como do microrganismo infectante.

Outras subpopulações de linfócitos T, cujo papel tem sido investigado na imunologia das leishmanioses são Th17 e Tregs. Células Th17 são uma subpopulação de células T CD4⁺ que produzem IL-17, com papel na indução de resposta inflamatória tecidual em doenças autoimunes, na morte de patógenos e recrutamento de neutrófilos, importantes para resposta imune inata (Bedoya et al., 2013; Shen et al., 2014). Elevados níveis de IL-17 foram encontrados em pacientes com leishmaniose cutânea e visceral (Gonzalez-Lombana et al., 2013).

Células T regulatórias CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺(Tregs) são uma subpopulação de células T que atua na regulação na tolerância imunológica e homeostase do sistema imune (Shen et al. 2014), e pode reconhecer uma ampla gama de antígenos (Sakaguchi, 2011), sendo a atividade supressora uma das suas principais características, que podem suprimir respostas imunes mediadas por diferentes tipos celulares, como macrófagos (Larkin et al., 2013). Um modelo experimental de infecção murina por *L. major*, sugere que as Tregs auxiliam na sobrevivência do parasito e na reativação da doença (Katara et al., 2013).

2.4 Macrófagos M2a em infecções por *Leishmania spp.*

A participação dos macrófagos M2 em doenças infecciosas pode estar associada à resolução ou piora do quadro dessas doenças (Gordon & Martinez 2010). O papel das subpopulações de macrófagos M2 na infecção por *Leishmania* não foram completamente investigados. No entanto, em muitos casos, parasitos protozoários aproveitam resposta anti-inflamatória, para persistir no hospedeiro (Noel et al., 2004; Raes et al., 2007).

Evidências obtidas em diferentes estudos, que avaliaram infecções por parasitos, indicam que macrófagos M2 dependente de IL-4 / IL13, exacerba a

doença, limitando eliminação dos parasitas dependente de macrófagos M1, o que promove a proliferação do parasita (Noel et al., 2004; Raes et al., 2007).

Em Leishmaniose cutânea, a suscetibilidade dos macrófagos a *Leishmania* e o desenvolvimento de um curso de infecção que não cicatriza foi associada a marcadores de macrófagos M2, como CD206 e arginase, que é induzida por IL-4, IL-13, TGF- β 1 ou IL-10 (El-Gayar et al., 2003).

Em modelo de camundongo com infecção por *L. major*, a arginase-1 é induzida em linhagens de camundongos suscetíveis e resistentes, durante o desenvolvimento da doença. Estudos com o uso de inibidores globais da arginase (bloqueio Arg1, bem como a isoforma Arg2 sem seletividade de tipo de célula) forneceram as primeiras evidências de um papel da Arg1, como promotor de doença em camundongos BALB / c infectado por uma *L. major*, que desenvolveram doença visceral e letal após infecção cutânea por *L. major* (Iniesta et al.,2005).

Entretanto, a inibição da arginase-1, leva a redução do número de parasitas e atrasa o desfecho da doença em camundongos suscetíveis, enquanto o tratamento com L-ornitina aumenta a suscetibilidade de camundongos resistentes (Iniesta et al., 2001). Dessa forma, a atividade da arginase-1 e a produção de poliaminas são fatores importantes na regulação da doença na leishmaniose (Kropf et al., 2005).

A participação de macrófagos M2a em infecções por *Leishmania spp.*, foi demonstrada em modelo experimental *in vitro*, como estratégia de persistência da infecção por esses parasitos (Farrow et al., 2011).

Em macrófagos tratados com IL-4, previamente à infecção por *Leishmania major* ou *Leishmania infantum*, o metabolismo da L-arginina foi influenciado através da arginase-1, para a síntese de poliaminas, que promovem o crescimento intracelular do parasita. Por outro lado, a inibição da arginase-1 do macrófago reduziu a proliferação dos parasitas, devido a um aumento na produção de NO (Iniesta et al., 2001).

Em outro estudo *in vitro*, foi verificado que em macrófagos não estimulados infectados por *Leishmania spp.*, a atividade da arginase aumentou em relação aos macrófagos não infectados; evidenciando que a infecção por esses parasitos, indiretamente regulou positivamente a atividade da arginase (Badirzadeh et al., 2017).

Outra indicação da contribuição de macrófagos M2a, para a suscetibilidade a parasitos *Leishmania*, foi demonstrado usando camundongos deficientes em IL4R α específicos, para macrófagos/neutrófilos. Esses camundongos, apresentaram progressão tardia da doença com respostas imunes tipo Th2, melhora nas funções efetoras leishmanicidas de macrófagos e redução da atividade da arginase-1 (Hölscher et al., 2006).

Por meio de um estudo, via citometria de fluxo, em células isoladas de homogenatos de lesões cutâneas, os autores demonstraram que ocorre alta expressão de arginase – 1, que foi relacionada com a alteração da ativação eficiente dos linfócitos T, levando a demora e falha de resolução das lesões da leishmaniose cutânea (Abebe et al., 2012). Esse mesmo grupo de pesquisa, em modelo experimental de leishmaniose cutânea, observou que o aumento na atividade da arginase – 1, contribuiu para o desenvolvimento da leishmaniose persistente, devido à supressão local de resposta imune por células T (Modolell et al., 2009).

Dados mais recentes sugerem, que a principal célula hospedeira responsável pela persistência de *L. (L.) major* na leishmaniose experimental são os macrófagos dérmicos que apresentam um perfil M2 dependente de IL-4 com alta atividade arginase e ausência para iNOS (Lee et al., 2018). Outra célula importante, responsável pela manutenção de amastigotas vivos de *L. (L.) major in vivo* em modelo murino são monócitos inflamatórios identificados como CD11b + Ly6C + CCR2 + CX3CR1 + (Romano et al., 2017) e células CD11c + Ly6C + CCR2⁺ F4 / 80 + (Heyde et al., 2018). Para *L. (V.) braziliensis*, a principal célula hospedeira que suporta persistência / proliferação na infecção murina é menos clara, entretanto, células com perfil M2 com alta atividade de arginase e baixa produção de NO parecem ser importantes para promover doenças mais graves (Costa et al., 2011).

3 JUSTIFICATIVA

L. (V.) braziliensis é a principal espécie responsável pela leishmaniose tegumentar americana no Brasil. O modelo murino de infecção com diferentes espécies de *Leishmania* tem sido usado extensivamente para estudar a leishmaniose cutânea e, oferece uma oportunidade única para a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares no local da infecção (Scorza et al., 2017).

O modelo de infecção de camundongo por *L. (L.) major* teve uma relevância fundamental para a compreensão da infecção por *Leishmania* devido ser o primeiro a mostrar a presença de regulação imunológica do resultado da doença in vivo com base no paradigma Th1 / Th2 (Alexander & Brombacher, 2012; Heinzl et al., 1989).

Embora o modelo de infecção murina por *L. (L.) major* ajudasse a compreender vários parâmetros imunológicos da infecção por *Leishmania* em animais e em humanos, ainda existem lacunas para explicar todos os aspectos do comportamento da doença causado por outras espécies de leishmania, por esse modelo (Alexander & Brombacher, 2012).

O uso de parasitos *Leishmania (V.) braziliensis* para estudar a infecção por leishmania em modelo murino tem sido menos conduzido, quando comparado com outras espécies de *Leishmania* (Mears et al., 2015). Assim, é necessário um maior número de estudos que esclareçam os mecanismos responsáveis pela morte e escape desses parasitos.

Os macrófagos são responsáveis tanto pela morte dos parasitas e resolução da infecção, ou manutenção dos parasitas durante a infecção. A população de células que suporta a persistência e / ou proliferação de leishmania ainda não está bem definida e parece ser diferente entre as infecções por diferentes espécies de parasitas (Bogdan, 2020).

Diante do exposto, para entender a adaptação *L. (V.) braziliensis* em ambientes mais ou menos adequados para o seu desenvolvimento, é importante utilizar macrófagos ativados pelo menos de duas formas distintas: M1 e M2. O IFN- γ e a IL-4 são as principais citocinas descritas como capazes de polarizar macrófagos para M1 e M2. Alternativamente, a utilização de macrófagos de

animais desprovidos dos genes do óxido nítrico sintase induzida (iNOs), fundamental para a produção de RNS poderá auxiliar a nossa compreensão a respeito das adaptações dos patógenos, quando os principais mecanismos microbicidas estão presentes.

Assim, para uma melhor compreensão dos mecanismos de manutenção da infecção por *leishmania*, avaliamos a proliferação de amastigotas de *L.(V.) braziliensis* em diferentes tipos de macrófagos murinos. O conhecimento de como diferentes tipos de macrófagos afeta o curso de doenças infecciosas causadas por *Leishmania spp.*, deve fornecer benefícios terapêuticos no controle dessas infecções.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar a proliferação de amastigotas de cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em macrófagos derivados da medula de camundongos C57BL/6 WT e desprovidos dos genes iNOS

4.2 Específicos

- ✓ Induzir os perfis de macrófagos M1 e/ou M2 pela utilização de IFN- γ e IL-4;
- ✓ Quantificar o número de parasitos dentro de macrófagos M1 e M2 3h, 3 dias, 5 dias e 9 dias após a infecção;
- ✓ Avaliar a produção de óxido nítrico (NO) nos sobrenadantes de culturas de macrófagos M1 e/ou M2 e infectados ou não por *L. (V.) braziliensis*;
- ✓ Determinar a atividade de arginase de macrófagos M1 e/ou M2 e infectados ou não por *L. (V.) braziliensis*;
- ✓ Comparar o tamanho da lesão desencadeada em camundongos C57 BL/6 WT e desprovidos dos genes iNOS, após a infecção com formas promastigotas *L. (V.) braziliensis*;

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais e considerações éticas

Foram utilizados camundongos, fêmeas C57BL/6 selvagens (WT) e deficientes em iNOS (iNOS^{-/-}) de 4 a 8 semanas. 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 a vontade, sendo a maravalha das estantes trocadas a cada sete dias. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética No Uso de Animais/ CEUA Nº 47/2017.

5.2 Parasitos

Foram utilizados isolados de *L. (V.) braziliensis* selecionados aleatoriamente do Leishbank (Banco de leishmanias da região Centro Oeste/UFG/Goiás) (Oliveira et al., 2010). Os isolados selecionados foram obtidos de pacientes com LCL (MHOM/BR2003/IMG3c, MHOM/BR2008/JCJ8c e MHOM/BR/2005/RPL5c).

As formas promastigotas foram cultivadas em meio Grace (Grace's Insect Medium, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) suplementado com 20% soro bovino fetal inativado (SFB - Cripion, Andradina, SP, Brasil), 2mM L-glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 100 U/mL, penicilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e 100 µg/mL estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e, mantidas em estufa BOD à 26°C. Os parasitos foram repicados a cada dois dias a partir de 2 x 10⁶ parasitos/mL.

Para os experimentos, a cultura foi mantida a 26°C, por 5 dias. Os parasitos, em fase estacionária de crescimento, foram lavados duas vezes com salina tamponada com fosfatos pH 7,3 (PBS), centrifugadas a 10°C, 15 minutos a 1.400 g. Os parasitos foram ressuspensos em 1 mL de PBS e foi feita a quantificação em hematocítmetro, de uma alíquota da cultura diluída em PBS-formaldeído a 1%. Em seguida, os parasitos foram utilizados para infecção dos BMDMs e patas dos camundongos.

5.3 Obtenção e cultura dos macrófagos murinos derivados da medula óssea (BMDM) e avaliação da atividade fagocítica e leishmanicida

BMDMs foram obtidos após extração da medula óssea do fêmur e tíbia por meio de lavagem da medula com injeção de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) suplementado com 50 μ M de 2- mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 1 M de HEPES, 100 U/mL de penicilina (Sigma- Aldrich) e 100 μ g/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e 10% de SBF (Cripion, Andradina, SP, Brasil). As células foram centrifugadas a 600 g, por 10 minutos, a 10 °C. O sedimento celular foi ressuscitado em meio RMPI completo e as células foram quantificadas em hematocítômetro, após diluição de uma alíquota em solução de azul de tripano 0,1% em PBS, para exclusão de células mortas.

Em cada poço da placa de cultura de 24 poços (Corning-Costar - Kennebunk, ME, EUA), foram adicionadas 5×10^5 células em 500 μ L de RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) suplementado com 10% de SBF (Cripion, Andradina, SP, Brasil) e 30% de sobrenadante de fibroblastos L929 (ATCC) como fonte de fator estimulador de colônia (CSFs), que impulsionam a proliferação celular em direção a uma população > 95% pura de BMDMs, em estufa 5.0% CO₂ à 35°C, sendo o meio de cultura trocado a cada dois dias.

Após 10 dias, os poços da placa de cultura de 24 poços com BMDMs foram lavados (PBS), e adicionados 200 μ L de RPMI completo, em cada poço. As células foram estimuladas com lipopolissacarídeo (200 ng/mL) (LPS -E. coli 011:B4, Sigma-Aldrich) a 200 ng/mL e IFN- γ (BioLegend) a 20 ng/mL ou IL-4 (R&D Systems, Minneapolis, EUA) a 10ng/mL. Para controle, alguns poços não receberam estímulos (Meio), e foram incubadas em estufa 5.0% CO₂ à 35°C.

O procedimento foi realizado em duplicata para cada controle/tratamento. O estímulo com IFN- γ ocorreu por duas horas, antes da adição do LPS, e o com IL-4 ocorreu 18h antes da adição de Leishmania. BMDMs na concentração de 5×10^5 células por poço, estimuladas ou não, foram infectados ou não por 5×10^6 por formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (IMG3, JCJ8 e RPL5) seguindo-se a incubação por 3h a 35 °C. Após 3h, os poços foram lavados para retirar as leishmanias que não foram internalizadas e fixados, para serem corados.

Os demais poços foram incubados por 3 dias, 5 dias e 9 dias e posteriormente lavados, fixados e corados para avaliação da carga parasitária

com o corante panótico (InstantProv, Newprov, Pinhais, PR, Brasil) para quantificação de células infectadas em microscopia de luz no aumento de 100 X. O sobrenadante das culturas, após 3 dias foi utilizado para quantificar a produção de NO e, as células remanescentes foram utilizadas para a avaliação da atividade da enzima arginase.

5.4 Detecção de Nitrito

A detecção de nitrito em sobrenadante de cultura de BMDM e BMDM infectados por leishmanias foi feita através do método de Griess. BMDMs (5×10^5) estimulados ou não com LPS (LPS -E. coli 011:B4, Sigma-Aldrich) a 200 ng/mL e IFN- γ (BioLegend) a 20 ng/mL ou IL-4 (R&D Systems, Minneapolis, EUA) a 10ng/mL) por 18h e posteriormente infectados ou não por 5×10^6 promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (JCJ8) e após 3 dias, o sobrenadante das culturas foram coletados. Foram adicionados em placas de 96 poços (Corning-Costar) 50 μ L do sobrenadante das culturas em duplicata, seguido pelo reagente de Griess (0,05% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride, 0,5% de sufamilamida em 2.5% de ácido fosfórico) no mesmo volume.

A curva padrão foi feita usando solução estoque de nitrito em RPMI completo a 100 μ M. Após 10 minutos, foi feita a leitura da placa em leitora de ELISA (MULTISKAN) em filtro 550nm. O limite de detecção foi de 1,5 μ M.

5.5 Atividades de arginase

A avaliação da atividade de arginase foi feita conforme descrita por Corraliza (1995). BMDMs (5×10^5) estimulados ou não com LPS (LPS -E. coli 011:B4, Sigma-Aldrich) a 200 ng/mL e IFN- γ (BioLegend) a 20 ng/mL ou IL-4 (R&D Systems, Minneapolis, EUA) a 10ng/mL) por 18h e posteriormente infectados ou não por 5×10^6 promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (JCJ8) após 3 dias, foram lisados com 50 μ L tampão de lise (Tris-HCl 500 mM pH 7.5 contendo 1% de Triton) e depois 50 μ L de MnCl₂ (10 mM) foi adicionado em 50 μ L de cada amostra. Essas amostras foram incubadas por 10min à 56°C para ativar a arginase.

Depois foi adicionado 50µL de L-arginina (5M pH 9.7) e incubado por 60 min, à 37°C. A reação foi parada pela adição de 200µL de solução ácida H₂SO₄:H₄PO₄:H₂O (1:3:7). Subsequentemente, 25µL da solução de α-isonitropropiofenone em etanol absoluto foi adicionada e incubada à 100°C por 45 min. para o desenvolvimento de cor. Foi transferido 120µL da solução de cada amostra (em duplicata) em placa de 96 poços e feita a leitura na leitora de ELISA (MULTISKAN) em filtro 550nm. A curva padrão foi feita usando ureia e o limite de detecção do ensaio foi de 15 µg/mL de ureia.

5.6 Infecção dos camundongos e acompanhamento do curso da lesão

Camundongos C57BL/6 selvagens (WT) e deficientes em iNOS (iNOS^{-/-}) foram infectados com 10⁶ formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (JCJ8), em fase estacionária do crescimento, intradermicamente (i.d.), no coxim plantar da pata traseira esquerda. Após a infecção, o tamanho da lesão nas patas foi avaliado, semanalmente, durante 3 a 8 semanas. O tamanho da lesão (mm) foi acompanhado semanalmente, com auxílio de um paquímetro (Mytutoyo, São Paulo, SP, Brasil) e expresso pela medida da espessura da pata infectada (pata esquerda) menos a medida da espessura da pata não infectada (pata direita).

5.7 Análises Estatísticas

A avaliação da significância dos resultados foi feita por Teste Anova one -way seguido pelo teste de Tukey e teste *T student* , usando o programa GraphPad Prism Software 6.0 (Inc. San Diego, CA, USA). Os dados foram apresentados em gráficos contendo média ± desvio padrão. Valores de p < 0,05 foram considerados significantes.

6 RESULTADOS

6.1 Diferentes cepas de *Leishmania (V.) braziliensis* não proliferaram dentro de macrófagos murinos não estimulados

Para avaliar a sobrevivência do parasita dentro do macrófago por longos períodos, BMDM de camundongos C57BL /6 foram cultivados com três cepas diferentes de *L. (V.) braziliensis* (IMG3, JCJ8 e RPL5) por três horas, após este período foram feitas lavagens para excluir parasitas não internalizados. O número de células infectadas após os períodos de 3 horas, 3 dias, 5 dias, e 9 dias de infecção, bem como a carga parasitária avaliada através do número de parasitos intracelulares foi através da técnica de microscopia óptica. Como apresentado na figura 3A, a porcentagem de células infectadas e o número de parasitas por BMDM infectado (Figura 3B) diminuíram significativamente três dias após a infecção. Após 9 dias de infecção, a porcentagem de parasitas e o número de amastigotas das cepas de *L. (V.) braziliensis* diminuíram ligeiramente, mas não alcançaram significância estatística.

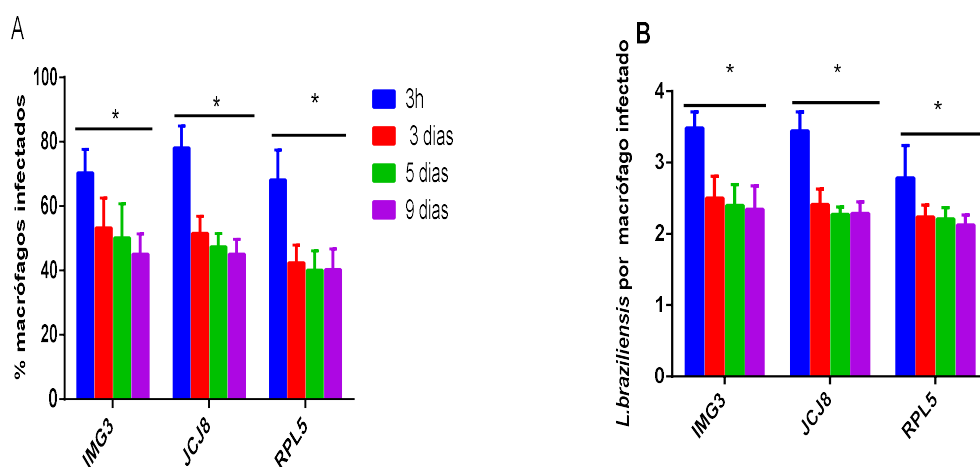


Figura 3. Diferentes cepas de *Leishmania (V.) braziliensis* não proliferaram dentro de macrófagos murinos não estimulados. Macrófagos derivados de medula óssea (BMDM camundongos C57BL/6 WT foram infectados por 3h com promastigotas de fase estacionária de *L. (V.) braziliensis* (IMG3c, JCJ8c; RPL5c) na proporção de 10: 1 (parasitos: macrófago) a 35°C (5% CO₂) em placas de 24 poços. Após este tempo, os poços foram lavados e coradas para avaliar a fagocitose. O meio dos demais poços foram repostos e incubados a 35°C (5% CO₂), por 3 dias, 6 dias e 9 dias para avaliar a atividade microbicida. Os dados representam a média ± desvio padrão da porcentagem de células infectadas (A) ou o número amastigota / células infectadas (B) de seis experimentos independentes. * indica diferença entre os pontos de tempo de 3 horas e posteriores por One-way anova seguido pelo teste de Tukey (p <0,05).

Estes dados sugerem que macrófagos murinos não estimulados não suportam a proliferação de amastigotas de *L. (V.) braziliensis*, pelo menos durante o período testado. Como os resultados anteriores mostraram similaridades nas características das cepas, os experimentos descritos a seguir foram realizados somente com a cepa de *L. (V.) braziliensis* (JCJ8).

6.2. Sobrevivência de amastigotas de *L. (V.) braziliensis* (JCJ8) dentro de macrófagos ativados por INF- γ + LPS

Como não foi observada proliferação ou morte significativa de amastigotas de *L. (V.) braziliensis* dentro de BMDM não estimulado entre três e nove dias após a infecção, decidimos investigar a sobrevivência de amastigotas dentro de macrófagos ativados com IFN- γ + LPS (M1).

Inicialmente, demonstramos que três dias após a adição de IFN- γ + LPS foi possível observar produção significativa de NO pelo BMDM que não foi alterada pela presença de amastigotas de *L. (V.) braziliensis* (Figura 4).

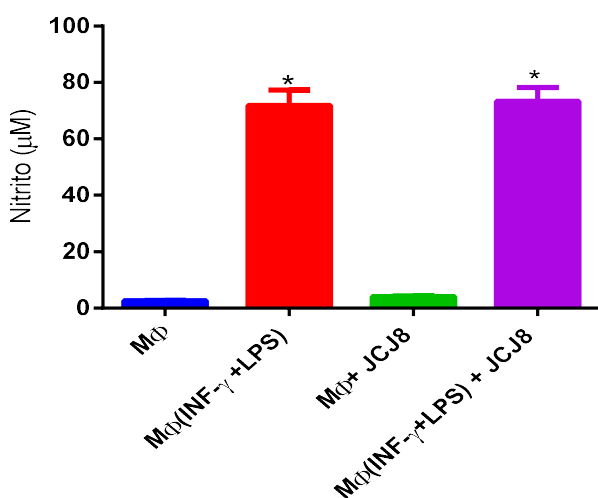


Figura 4. Produção de óxido nítrico de MΦ (INF- γ + LPS) com *L. (V.) braziliensis*. Macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) foram tratados com 20 ng / mL de IFN- γ + 200 ng/ mL de LPS por 4h e então infectados com promastigotas em fase estacionária de *L. (V.) braziliensis* JCJ8c na proporção de 10: 1 (parasitos: macrófago) por 72h. Os dados representam a média \pm desvio padrão do nitrito detectado no sobrenadante de cultura testado pelo método de Griess de três experimentos independentes. * indica diferença entre macrófagos não tratados e tratados por One-way anova seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A adição de IFN- γ associado ao LPS foi capaz de ativar os macrófagos para a eliminação dos parasitos, já que se observou a eliminação da carga parasitária de macrófagos infectados por *L. (V.) braziliensis* (JCJ8) após 3 dias, em relação a porcentagem de macrófagos infectados (Figura 5A) e número de parasitos por célula em macrófagos infectados (Figura 5B).

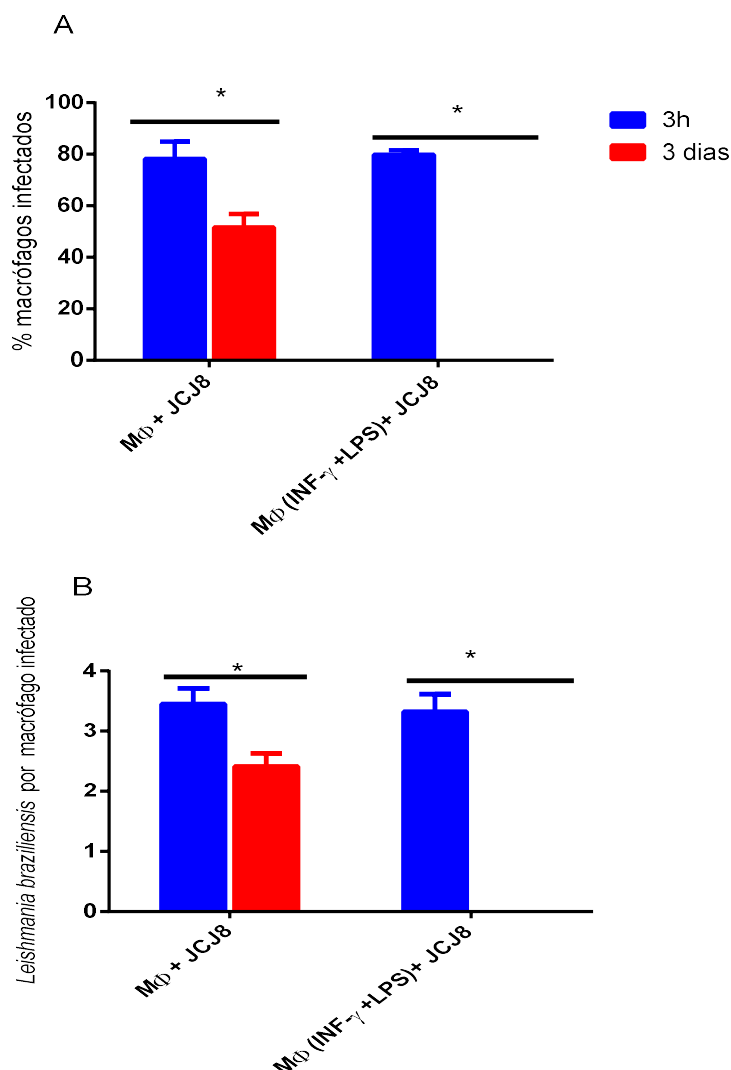


Figura 5. Sobrevivência de *L. (V.) braziliensis* dentro de M Φ (INF- γ + LPS). BMDM foram tratados com 20 ng / mL de INF- γ + 200 ng / mL de LPS por 4h e infectados por promastigotas de *L. (V.) braziliensis* JCJ8c em fase estacionária na proporção de 10: 1 (parasitos: macrófagos). As células foram cultivadas com promastigotas por 3 h, lavadas e cultivadas por 3 dias. Os dados representam a média \pm desvio padrão da porcentagem de células infectadas (A), ou o número de células amastigotas / infectadas (B) de seis experimentos independentes. * indica diferença entre 3 horas e 3 dias pelo teste t de Student (p <0,05).

6.3 Sobrevivência de amastigotas de *L. (V) braziliensis* (JCJ8) dentro de macrófagos ativados por IL-4

Como foi observada morte significativa de amastigotas de *L. (V) braziliensis* dentro de macrófagos M Φ (INF- γ + LPS) após três dias de infecção, investigamos a sobrevivência de amastigotas dentro de M Φ (IL-4).

Demonstramos que BMDM de camundongos C57 BL/6 WT estimulados com IL-4 por três dias, comparado ao controle, aumentaram significativamente a atividade de arginase, e a presença de amastigotas de *L. (V) braziliensis* aumentou essa atividade em BMDM estimulado por IL-4 (Figura 6).

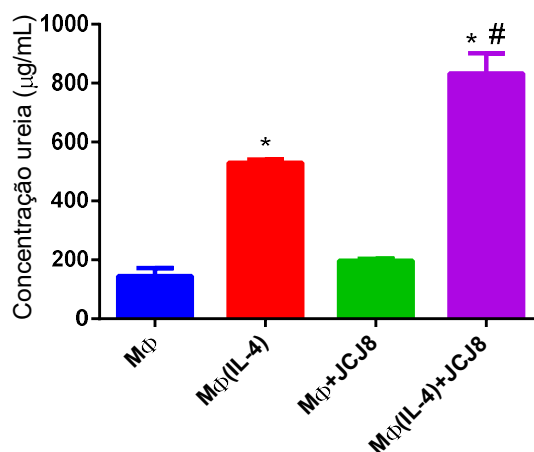


Figura 6. Atividade arginase de M Φ (IL-4) infectado por *L. (V.) braziliensis*. BMDM foram tratados com 10 ng / mL de IL-4 por 20h e então infectados por promastigotas em fase estacionária de *L. (V.) braziliensis* JCJ8c na proporção de 10: 1 (parasitos: macrófago) por 3 dias . Os dados representam a média \pm desvio padrão da atividade da arginase medida pela produção de ureia testada pelo método Corraliza de três experimentos independentes. * indica diferença entre macrófagos não tratados e tratados e # indica diferença entre BMDM tratado com IL-4 com ou sem leishmania por One-way anova seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Entretanto, observamos que a geração de M Φ (IL-4), não alterou a capacidade proliferativa de amastigotas *L. (V.) braziliensis* após 3 dias da infecção (Figura 7A e B).

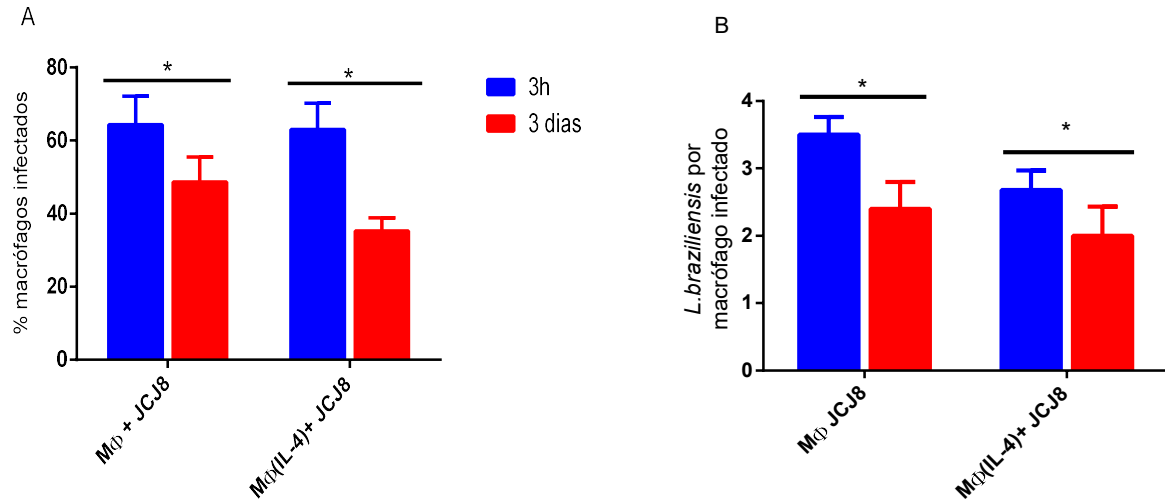


Figura 7. Macrófagos ativados por IL-4 não suportam à amplificação da infecção por *L. (V.) braziliensis*. BMDM foram tratados com 10 ng / mL de IL-4 por 20h e infectados por promastigotas em fase estacionária de *L. (V.) braziliensis* JCJ8c na proporção de 10: 1 (amastigotas: macrófagos). As células foram cultivadas com promastigotas por 3 h, lavadas e cultivadas por 3 dias. Os dados representam a média \pm desvio padrão da porcentagem de células infectadas (A) ou o número de células amastigotas / infectadas (B) de seis experimentos independentes. * indica diferença entre 3 horas e 3 dias pelo teste t de Student ($p < 0,05$).

6.4 Destino *Leishmania braziliensis* em macrófagos de camundongos C57 BL/6 iNOSKO

Como a presença de NO estava relacionada à morte de amastigotas de *L. (V.) braziliensis*, decidimos observar se a ausência de NO em macrófagos, poderia permitir proliferação de amastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Para tanto, o BMDM iNOSKO foi infectado com *L. (V.) braziliensis* e seguido por 9 dias. Semelhante ao que foi observado para BMDM WT, a porcentagem de macrófagos infectados e o número de parasitas dentro dos macrófagos não se alterou entre três e 9 dias após a infecção (Figura 8A e 8B).

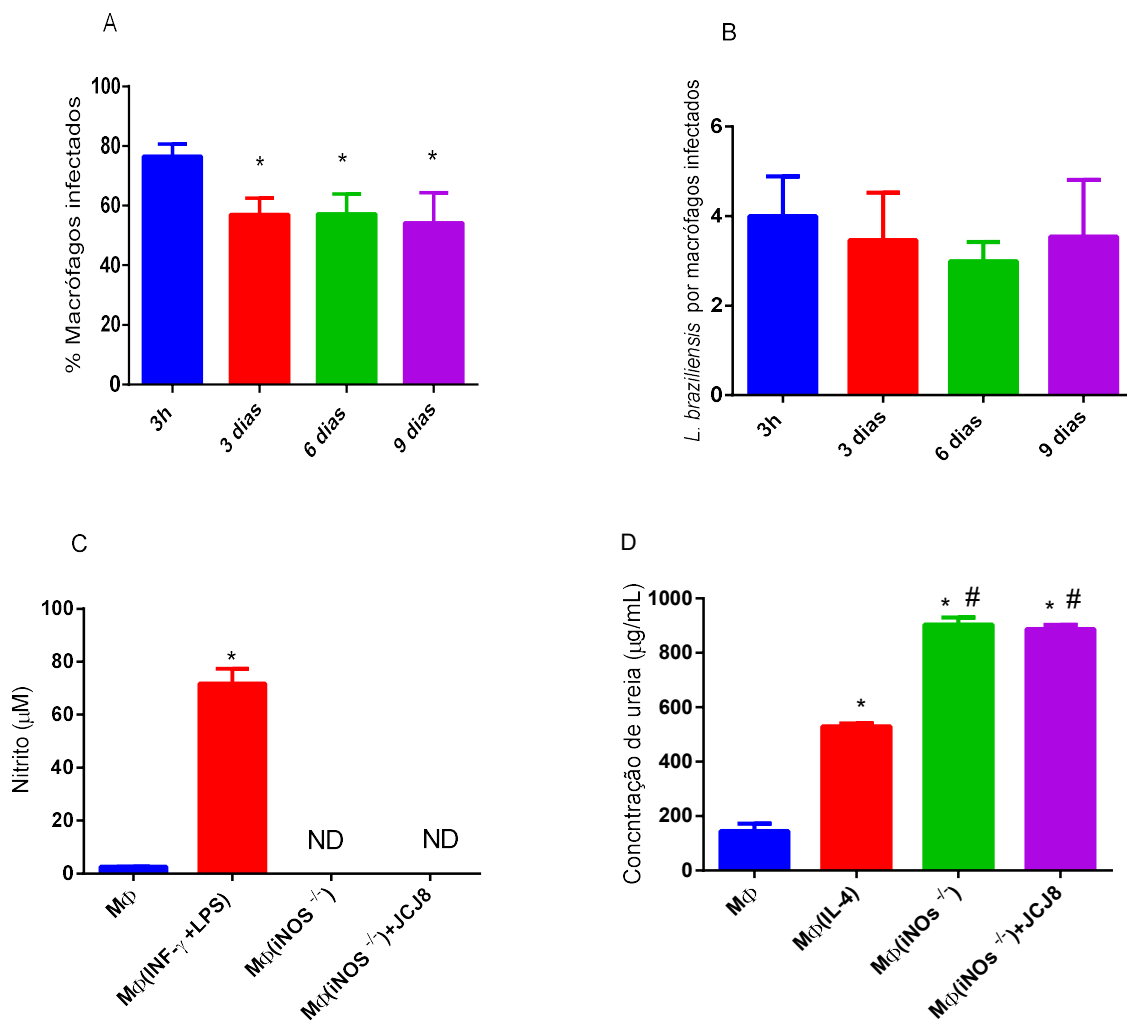


Figura 8. *L. (V.) braziliensis* não prolifera dentro de macrófagos iNOSKO. BMDM de camundongos C57BL / 6 iNOSKO foram infectados com promastigotas em fase estacionária de *L. (V.) braziliensis* JCJ8c na proporção de 10: 1 (amastigotas: macrófagos) As células foram infectadas por 3 h, lavadas e cultivadas por até 9 dias. Os dados representam a média \pm desvio padrão da porcentagem de células infectadas (A) ou o número de amastigotas/células infectadas (B) de quatro experimentos independentes. * indica diferença entre os pontos de tempo de 3 horas e posteriores por One-way anova seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). BMDM de camundongos C57BL / 6 WT foram tratados com 20 ng / mL de IFN- γ + 200 ng / mL de LPS por 4h ou (D) 10 ng / mL de IL-4 por 20h ou BMDM C57BL/6 iNOSKO e então infectados por promastigotas em fase estacionária de *L. (V.) braziliensis* JCJ8c na proporção de 10: 1 (amastigotas: macrófagos) por três dias . Os dados representam a média \pm desvio padrão do nitrito detectado no sobrenadante de cultura testado pelo método de Griess (C) ou a atividade da arginase medida pela produção de ureia testada pelo método Corraliza (D) de três experimentos independentes. * indica diferença entre macrófagos não tratados e tratados e # indica diferença entre Mφ iNOSKO e Mφ tratado com IL-4 por One-way anova seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Como esperado, não foi observada produção significativa de NO em BMDM iNOS KO (Figura 8C) e, curiosamente, observamos que a atividade da arginase no BMDM iNOS KO foi maior do que no WT BMDM tratado com IL-4, mas ausência de NO, no macrófago com alta atividade da arginase não suportou a proliferação de amastigotas de *L. (V.) braziliensis* (Figura 8D).

A infecção de camundongos WT com diferentes cepas de *L. (V.) braziliensis* não suportam infecção progressiva (Gomes et al., 2016), o que está de acordo com os resultados apresentados neste trabalho, porém a ausência de proliferação de parasitas por 9 dias em BMDM iNOSKO nos surpreendeu.

6.5 Tamanho da lesão desencadeada em camundongos WT e iNOSKO por *L. (V.) braziliensis*.

Para verificar a capacidade dessa cepa do parasita usada neste trabalho em causar lesão em camundongos, infectamos a pata de camundongos WT e iNOS KO com parasitas promastigotas e acompanhamos o tamanho da lesão. Conforme demonstrado na figura 9, ambos os camundongos WT e iNOS KO desenvolveram lesão semelhante e mensurável 3 semanas após a infecção, no entanto, os camundongos iNOS KO foram incapazes de controlar a doença após a 4ª semana, enquanto os camundongos WT foram curados na 8ª semana.

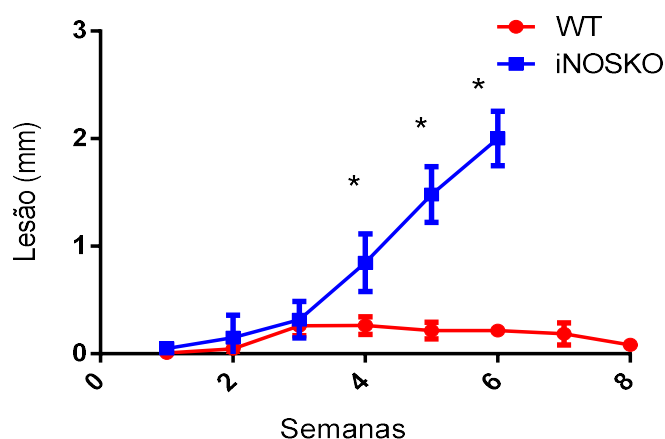


Figura 9. Tamanho da lesão desencadeada em camundongos WT e iNOSKO por *L. (V.) braziliensis*. O inchaço da pata de camundongos WT (vermelho) e iNOSKO (azul) foi seguido semanalmente após a infecção com 1.000.000 de promastigotas em fase estacionária de *L. (V.) braziliensis* JCJ8c. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão da diferença entre a pata infectada e a pata contralateral de três experimentos independentes, com 3 camundongos em cada. * indica diferença entre lesões de camundongos WT e INOSKO na mesma semana pelo teste t de Student ($p < 0,05$).

Esses dados mostraram, que a ausência de iNOS em camundongos suporta a proliferação de parasitas *in vivo*, mas a alteração adicional que ocorre nos macrófagos para suportar a proliferação de parasitas *L. (V.) braziliensis in vivo*, que está além da ausência de produção de NO, ainda não foram totalmente elucidados.

7 DISCUSSÃO

Os macrófagos atuam como células hospedeiras e efectoras, que podem ser instruídas a promover a sobrevivência intracelular de parasitos ou morte desses parasitos. A persistência e a sobrevivência de longo prazo dos parasitas *Leishmania* em modelos murinos foram amplamente estudadas, mas ainda são uma questão de debate (Bogdan, 2020). Neste estudo, avaliamos a sobrevivência de *L. (V.) braziliensis* após a infecção em macrófagos murinos classicamente e alternativamente ativados.

Os dados mostraram que BMDM WT não estimulado, não suportam a proliferação de amastigotas da espécie *L. (V.) braziliensis*, pelo menos por 9 dias em cultura e, esta ausência de proliferação foi observada para todas as três diferentes cepas de *L. (V.) braziliensis* utilizadas. A infecção de camundongos WT com *L. (L.) major* apresenta uma dicotomia clara em que algumas linhagens de camundongos, como camundongos BALB/c, desenvolvem doença descontrolada e outras, como camundongos C57BL/6, desenvolvem lesões auto curativas (Heinzel et al., 1989).

Esta dicotomia foi explicada pelo paradigma Th1 / Th2, mas este modelo imunológico não é claro para infecção murina com outras espécies de *Leishmania* (Alexander & Bryson, 2005). Por exemplo, a injeção de *L. (V.) braziliensis* na pata ou orelha de camundongos WT, mostra replicação do parasita no local da infecção acompanhada pelo desenvolvimento de uma pequena lesão, cujo tamanho e duração dependem da cepa do parasita e da linhagem de camundongo (Rocha et al., 2007; Pereira et al., 2009; Costa et al., 2011; Gomes et al., 2016).

No entanto, nunca foi descrito o desenvolvimento de doença disseminada não controlada devido a uma resposta imune Th2 em camundongos WT não imunossuprimidos, quando desafiados com diferentes cepas de *L. (V.) braziliensis*. Por outro lado, camundongos que não possuem moléculas relacionadas com Th1, como IFN- γ ou iNOS, desenvolvem lesão descontrolada com alto número de parasitas (Gomes et al. 2016; Oliveira et al. 2010; Rocha et al. 2007). Esses dados comprovam, que células hospedeiras murinas suportam a proliferação de amastigotas de *L. (V.) braziliensis* e o controle do parasita em camundongos pode ser mediado por NO estimulado por IFN- γ .

Infecções *in vitro* foram realizadas para avaliar resistência/susceptibilidade de BMDMs de camundongos C57BL/6 WT ativados classicamente ou alternativamente frente à infecção por *L. (V.) braziliensis* (JCJ8). Observamos, que na infecção de BMDMs *L. (V.) braziliensis* (JCJ8), as células respondem ao estímulo de IFN- γ e LPS, eliminando a carga parasitária das células após 3 dias. Este resultado corrobora dados da literatura, para o modelo murino de infecção, que tem sido observado um papel importante da produção de óxido nítrico no processo de morte da *L. (V.) braziliensis* (Rocha et al., 2007; Gomes et al., 2016).

Em nosso trabalho, demonstramos que após 3 dias de infecção de BMDMs estimulados com IL-4 e infectados por *L. (V.) braziliensis* (JCJ8), ocorre uma redução no número de células infectadas e quantidade de parasitos, indicando que ocorre a morte desse parasito. O que não ocorreu quando macrófagos estimulados com IL-4 foram infectados por *L. major* (dados não mostrados). De alguma forma, nossos resultados foram um pouco inesperados, porque esses dados podem indicar que macrófagos estimulados com IL-4 têm uma capacidade de controlar a infecção por *Leishmania*.

A IL-4 induz aumento da atividade da enzima arginase em macrófagos murinos (Gordon, 2016), o que facilita a proliferação e reprodução de parasitos no interior da célula hospedeira, isto é, à persistência do parasito (Biswas et al., 2011). Em trabalhos realizados por Iniesta et al. (2001), macrófagos tratados com IL-4, previamente à infecção por *Leishmania major* ou *Leishmania infantum*, o metabolismo da L-arginina foi influenciado através da arginase-1, para a síntese de poliaminas, que promovem o crescimento intracelular desses parasitos.

Em outro estudo *in vitro*, foi verificado que em macrófagos infectados por *Leishmania spp.*, a atividade da arginase aumentou em relação aos macrófagos não infectados; evidenciando que a infecção por esses parasitos, indiretamente regulou positivamente a atividade da arginase (Badirzadeh et al., 2017).

Uma vez que se acredita, que macrófagos são o nicho replicativo dos parasitos *Leishmania* e são as principais células produtoras de NO, no local infectado (Bogdan 2020), esperava-se que a ausência de iNOS no macrófago tornasse esta célula altamente suscetível à infecção e permissiva a proliferação de amastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Confirmamos aqui, que a ausência de iNOS em macrófagos murinos, permite a proliferação descontrolada de parasitas

L. (V.) braziliensis in vivo. No entanto, macrófagos iNOSKO não suportam a proliferação de amastigotas de *L. (V.) braziliensis* por nove dias em cultura. Esses dados indicam, que para a proliferação de amastigotas de *L. (V.) braziliensis*, a célula hospedeira deve ter algumas propriedades adicionais que estão faltando nos macrófagos iNOS KO.

A presença de arginase 1 em macrófagos parece ser essencial para gerar células suscetíveis (Iniesta et al., 2005). Esta enzima converte L-arginina em L-ornitina, que é posteriormente convertida em poliaminas, que são importantes para a proliferação de diferentes tipos de células, inclusive para parasitas *Leishmania*. Além disso, as enzimas arginase e iNOS competem pelo mesmo substrato arginina e como consequência diversas interações cruzadas inibitórias ocorrem entre as duas vias metabólicas da arginina. Por exemplo, as duas isoformas de arginase são inibidas pelo produto intermediário da síntese de NO, N- hidroxil- L- arginina (NOHA) em macrófagos M2 e, a arginase restringe a tradução de iNOS pela depleção da arginina, poliaminas também podem inibir a síntese de NO (Iniesta et al., 2005).

Recentemente, foram demonstradas populações de células importantes responsáveis por manter amastigotas vivos de *L. (L.) major* in vivo em modelo murino. Essa população inclui o macrófago dérmico residente em tecido (Lee et al., 2018); Monócitos inflamatórios identificados como células CD11b⁺ Ly6C⁺ CCR2⁺ CX3CR1⁺ (Romano et al., 2017) e células CD11c⁺ Ly6C⁺ CCR2⁺ F4/80⁺ (Heyde et al., 2018).

Pelo menos, para o macrófago dérmico residente em tecido, foi demonstrado que essas células têm um fenótipo M2 com alta atividade da arginase 1, mesmo em um ambiente Th1 dominante. No caso de *L. (L.) amazonensis*, foi descrito que os monócitos CCR2⁺ dependentes de IFN- γ inflamatórios tornam-se uma população permissiva de células expressando PDL1 e arginase 1 que suporta a proliferação de amastigotas (Carneiro et al., 2020).

A importância da arginase para permitir a proliferação do parasita foi demonstrada quando a enzima estava depletada em células hematopoéticas e endoteliais, o que converteu os camundongos BALB/c suscetíveis em resistentes *L. (L.) major* (Schleicher et al., 2016). Esses dados, suportam a ideia de que

macrófagos M2 com alta atividade de arginase são importantes para manter uma alta capacidade proliferativa de *L. (L.) major* *in vivo*. Curiosamente, a ausência de arginase 1 em células hematopoéticas e endoteliais de C57BL / 6 resistentes *L. (L.) major* não afetou a carga parasitária no local da infecção, mostrando que alguma capacidade proliferativa poderia ser alcançada independente da presença de arginase em macrófagos (Paduch et al., 2019).

É importante mencionar, que uma lesão maior com maior carga parasitária causada por *L. (V.) braziliensis* mais virulenta foi associada com maior atividade da arginase dependente de IL-4 (Costa et al., 2011). Com base nessas informações, seria de se esperar alguma proliferação de amastigotas em macrófagos M2 com alta atividade de arginase. Novamente, não observamos qualquer proliferação de amastigotas em macrófagos WT tratados com IL-4 que tinham atividade aumentada de arginase.

Além disso, os macrófagos iNOS KO apresentaram maior atividade arginase do que os macrófagos WT tratados com IL-4, mas também são incapazes de suportar a proliferação de amastigotas de *L. (V.) braziliensis*, indicando que a atividade da arginase não é o fator ausente nos macrófagos iNOS KO que interrompem a proliferação. Vários estudos demonstraram uma grande plasticidade e subdivisão de macrófagos M2 e seu potencial para suportar a proliferação de *Leishmania* (Murray et al., 2011; Bogdan, 2020; Carneiro et al., 2021).

Além do macrófago M2 estimulado por IL-4, também conhecido como macrófagos M2a, outros subtipos, como macrófagos estimulados por imunocomplexos (M2b); IL-10 e macrófagos estimulados por TGF- β (M2c) e macrófagos estimulados por adenosina (M2d) foram relacionados a serem mais suscetíveis à infecção por *Leishmania* (Bogdan, 2020; Carneiro et al., 2021; Figueiredo et al., 2016).

Além disso, fica claro que macrófagos comprometidos com o perfil M2 alteram seu perfil metabólico de proteínas, lipídios e carboidratos (Geeraerts et al., 2017), o que interfere na disponibilidade de nutrientes para a proliferação do parasita. É importante ressaltar que é evidente que os parasitos *Leishmania* também interferem no metabolismo dos macrófagos, e a reprogramação metabólica dos macrófagos por *Leishmania* diferem entre as espécies (Bogdan, 2020).

Neste trabalho, mostramos que BMDMs C57BL / 6 não são permissivos para proliferação de amastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Suportando a ideia de que esse parasito tenha diferentes necessidades de nutrientes. Conhecer as características dos “alvos seguros” para a proliferação de parasitas e as necessidades de amastigotas de diferentes espécies é importante para a busca de melhores métodos para interferir na diversidade das formas de leishmaniose causadas por diferentes espécies. Em particular, mais estudos relacionados a *L. (V.) braziliensis* devido a sua importante relevância para a saúde pública na América do Sul.

8 CONCLUSÃO

- Diferentes cepas de *Leishmania (V.) braziliensis* não proliferaram dentro de macrófagos murinos não estimulados;
- IFN- γ associado ao LPS polarizam macrófagos de camundongos C57BL/6 para perfil de macrófagos classicamente ativado e tem um papel no processo de morte do isolado JCJ8;
- Macrófagos ativados por IL-4 não suportam à amplificação da infecção por *L.(V.) braziliensis*;
- A atividade da arginase foi maior em macrófagos iNOS KO do que em macrófagos tratados com IL-4;
- Macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) KOiNOS não suportaram a proliferação de amastigotas de *L. (V.) braziliensis* (JCJ8);
- *L. (V.) braziliensis* foi capaz de causar doença não controlada em camundongos iNOS KO in vivo.

9 REFERÊNCIAS

Abebe T, Hailu A, Woldeyes M, et al. Local Increase of Arginase Activity in Lesions of Patients with Cutaneous Leishmaniasis in Ethiopia. Correa-Oliveira R, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2012; 6(6):e1684.

Afonso LC, Scott P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. Infect Immun. 1993; 61(7):2952–2959.

Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, et al. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. Molecular Aspects of Medicine. 2017; 57:1–29.

Alcolea PJ, Alonso A, García-Tabares F, Mena MC, Ciordia S, Larraga V. Increased Abundance of Proteins Involved in Resistance to Oxidative and Nitrosative Stress at the Last Stages of Growth and Development of *Leishmania amazonensis* Promastigotes Revealed by Proteome Analysis. Stäger S, editor. PLoS ONE. 2016; 11(10): e0164344.

Alexander J, Brombacher F. T helper1/t helper2 cells and resistance/susceptibility to leishmania infection: is this paradigm still relevant? Front Immunol. 2012; 3:80 doi:10.3389/fimmu.2012.00080

Alexander J, Bryson K. T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. Immunol Lett.2005; 99(1):17-23

Alvar J, Vélez ID, Bern C, et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. Kirk M, editor. PLoS ONE. 2012; 7(5):e35671.

Antinori S, Schifanella L, Corbellino M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012; 31(2):109–118.

Ashford RW. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. International Journal for Parasitology. 2000; 30(12–13):1269–1281.

Atri C, Guerfali F, Laouini D. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *IJMS*. 2018; 19(6):1801.

Ávila LR, Gomes CM, Oliveira PG, et al. Promastigote parasites cultured from the lesions of patients with mucosal leishmaniasis are more resistant to oxidative stress than promastigotes from a cutaneous lesion. *Free Radical Biology and Medicine*. 2018; 129:35–45.

Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res*. 2004; 119(6):238–258.

Badirzadeh A, Taheri T, Taslimi Y, et al. Arginase activity in pathogenic and non-pathogenic species of *Leishmania* parasites. Jardim A, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11(7):e0005774.

Bedoya SK, Lam B, Lau K, Larkin J. Th17 Cells in Immunity and Autoimmunity. *Clinical and Developmental Immunology*. 2013; 2013:1–16.

Ben-Othman R, Flannery AR, Miguel DC, Ward DM, Kaplan J, Andrews NW. *Leishmania*-Mediated Inhibition of Iron Export Promotes Parasite Replication in Macrophages. Mukhopadhyay CK, editor. *PLoS Pathog*. 2014; 10(1): e1003901.

Bente M, Harder S, Wiesgigl M, et al. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics*. 2003; 3(9):1811–1829.

Biswas A, Bhattacharya A, Kar S, Das PK. Expression of IL-10-triggered STAT3-dependent IL-4R α is required for induction of arginase 1 in visceral leishmaniasis. *Eur J Immunol*. 2011; 41(4):992–1003.

Blos M, Schleicher U, Rocha FJS, Meißner U, Röllinghoff M, Bogdan C. Organ-specific and stage-dependent control of *Leishmania major* infection by inducible nitric oxide synthase and phagocyte NADPH oxidase. *Eur J Immunol*. 2003; 33(5):1224–1234

Bogdan C, Paik J, Vodovotz Y, Nathan C. Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *J Biol Chem*. 1992; 267(32):23301–23308.

Bogdan C. Macrophages as host, effector and immunoregulatory cells in leishmaniasis: Impact of tissue micro-environment and metabolism. *Cytokine*. 2020; 2(4):100041.

Bowie A, O'Neill LAJ. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of Leukocyte Biology*. 2000; 67(4):508–514.

Buchmüller-Rouiller Y, Mauël J. Impairment of the oxidative metabolism of mouse peritoneal macrophages by intracellular *Leishmania* spp. *Infect Immun*. 1987; 55(3):587–593.

Cano LE, Gomez B, Brummer E, Restrepo A, Stevens DA. Inhibitory effect of deferoxamine or macrophage activation on transformation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia ingested by macrophages: reversal by holotransferrin. *Infect Immun*. 1994; 62(4):1494–1496.

Carlin JM, Borden EC, Byrne GI. Interferon-Induced Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity Inhibits *Chlamydia psittaci* Replication in Human Macrophages. *Journal of Interferon Research*. 1989; 9(3):329–337.

Carneiro MB, Vaz LG, Afonso LCC, Horta MF, Vieira LQ. Regulation of macrophage subsets and cytokine production in leishmaniasis. *Cytokine*. 2021; 147:155309 doi:10.1016/j.cyto.2020.155309

Carvalho AK, Silveira FT, Passero LFD, Gomes CMC, Corbett CEP, Laurenti MD. *Leishmania* (V.) *brasiliensis* and *L. (L.) amazonensis* promote differential expression of dendritic cells and cellular immune response in murine model. *Parasite Immunology*. 2012; 34(8–9):395–403.

Carvalho LP, Passos S, Schriefer A, Carvalho EM. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front Immun.* 2012.

Cheng SC, Joosten LA, Netea MG. The interplay between central metabolism and innate immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014; 6:707-713.

Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Karolina Palucka A. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol.* 2000; 1(6):510–514.

Clem A. A current perspective on leishmaniasis. *J Global Infect Dis.* 2010; 2(2):124.

Costa DL, Carregaro V, Lima-Júnior DS, et al. BALB/c Mice Infected with Antimony Treatment Refractory Isolate of *Leishmania braziliensis* Present Severe Lesions due to IL-4 Production. Louzir H, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5(3):e965.

Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology.* 2008; 180(9):5771–5777.

Csóka B, Selmeczy Z, Koscsó B, et al. Adenosine promotes alternative macrophage activation *via* A2A and A2B receptors. *FASEB j.* 2012; 26(1):376–386.

Cyktor JC, Turner J. Interleukin-10 and Immunity against Prokaryotic and Eukaryotic Intracellular Pathogens. Maurelli AT, editor. *Infect Immun.* 2011; 79(8):2964–2973.

Da Silva MFL, Floeter-Winter LM. Arginase in *Leishmania*. In: Santos ALS, Branquinha MH, Levy CM d'Avila-, Kneipp LF, Sodr  CL, editors. *Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2014.

DeKrey GK, Lima HC, Titus RG. Analysis of the Immune Responses of Mice to Infection with *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun*. 1998; 66(2):827–829.

Di Benedetto P, Ruscitti P, Vadasz Z, Toubi E, Giacomelli R. Macrophages with regulatory functions, a possible new therapeutic perspective in autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*. 2019; 18(10):102369.

Doyle AG, Herbein G, Montaner LJ, et al. Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages *in vitro* : Comparison with interleukin-4 and interferon- γ . *Eur J Immunol*. 1994; 24(6):1441–1445.

Duluc D, Delneste Y, Tan F, et al. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood*. 2007; 110(13):4319–4330.

Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho M das G. Revisão sobre óxido nítrico. *J. Bras. Patol. e Med. Lab*. 2003; 39:343–350.

Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho M das G. Revisão sobre óxido nítrico. *J. Bras. Patol. e Med. Lab*. 2003; 39:343–350.

El-Gayar S, Thüning-Nahler H, Pfeilschifter J, Röllinghoff M, Bogdan C. Translational Control of Inducible Nitric Oxide Synthase by IL-13 and Arginine Availability in Inflammatory Macrophages. *The Journal of Immunology*. 2003; 171(9):4561–4568.

Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity*. 2014; 41:21–35.

Estévez AG, Jordán J. Nitric Oxide and Superoxide, a Deadly Cocktail. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002; 962(1):207–211.

Farrow AL, Rana T, Mittal MK, Misra S, Chaudhuri G. Leishmania-induced repression of selected non-coding RNA genes containing B-box element at their promoters in alternatively polarized M2 macrophages. *Mol Cell Biochem.* 2011; 350(1–2):47–57.

Ferioti C, Loures FV, Frank De Araújo E, Costa TAD, Calich VLG. Mannosyl-Recognizing Receptors Induce an M1-Like Phenotype in Macrophages of Susceptible Mice but an M2-Like Phenotype in Mice Resistant to a Fungal Infection. Richard Y, editor. *PLoS ONE.* 2013; 8(1):e54845.

Ferrante CJ, Pinhal-Enfield G, Elson G, et al. The Adenosine-Dependent Angiogenic Switch of Macrophages to an M2-Like Phenotype is Independent of Interleukin-4 Receptor Alpha (IL-4R α) Signaling. *Inflammation.* 2013; 36(4):921–931.

Figueiredo ABD, Souza-Testasica MC, Afonso LCC. Purinergic signaling and infection by Leishmania: A new approach to evasion of the immune response. *Biomedical Journal.* 2016; 39(4):244–250.

Forman HJ, Torres M. Reactive Oxygen Species and Cell Signaling: Respiratory Burst in Macrophage Signaling. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 166(supplement_1):S4–S8.

Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin J-C, Van Der Auwera G. Phylogeny of Leishmania species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution.* 2010; 10(2):238–245.

Gazzinelli RT, Talvani A, Camargo MM, et al. Induction of cell-mediated immunity during early stages of infection with intracellular protozoa. *Braz J Med Biol Res.* 1998; 31(1):89–104.

Geeraerts X, Bolli E, Fendt SM, Van Ginderachter JA. Macrophage Metabolism As Therapeutic Target for Cancer, Atherosclerosis, and Obesity. *Front Immunol.* 2017; 8:289 doi:10.3389/fimmu.2017.00289

Giat E, Ehrenfeld M, Shoenfeld Y. Cancer and autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews.* 2017; 16(10):1049–1057.

Gomes CM, Ávila LR, Santos JC, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* amastigotes from patients with mucosal leishmaniasis have increased ability to disseminate and are controlled by nitric oxide at the early stage of murine infection. *Pathogens and Disease*. 2016; ftw023.

Gonzalez-Lombana C, Gimblet C, Bacellar O, et al. IL-17 Mediates Immunopathology in the Absence of IL-10 Following *Leishmania major* Infection. Langhorne J, editor. *PLoS Pathog*. 2013; 9(3):e1003243.

Gordon S. Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity*. 2016; 44(3):463–475.

Gordon S, Martinez FO. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity*. 2010; 32(5):593–604.

Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5(12):953–964.

Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, et al. Alternatively Activated Macrophages Differentially Express Fibronectin and Its Splice Variants and the Extracellular Matrix Protein β IG-H3. *Scand J Immunol*. 2001; 53(4):386–392.

Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity. *Annu Rev Immunol*. 2014; 32(1):659–702.

Gruenheid S, Gros P. Genetic susceptibility to intracellular infections: Nramp1, macrophage function and divalent cations transport. *Current Opinion in Microbiology*. 2000; 3(1):43–48.

Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis: current and future management. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2003; 1(4):563–570.

Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med*. 1989; 169(1):59-72.

Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, et al. Differential Regulation of Nitric Oxide Synthase-2 and Arginase-1 by Type 1/Type 2 Cytokines In Vivo: Granulomatous Pathology Is Shaped by the Pattern of L-Arginine Metabolism. *The Journal of Immunology*. 2001; 167(11):6533–6544.

Heyde S, Philipsen L, Formaglio P, et al. CD11c-expressing Ly6C+CCR2+ monocytes constitute a reservoir for efficient *Leishmania* proliferation and cell-to-cell transmission. Peters NC, editor. *PLoS Pathog*. 2018; 14(10):e1007374.

Hoeffel G, Ginhoux F. Ontogeny of Tissue-Resident Macrophages. *Front Immunol*. 2015.

Hölscher C, Arendse B, Schwegmann A, Myburgh E, Brombacher F. Impairment of alternative macrophage activation delays cutaneous leishmaniasis in nonhealing BALB/c mice. *J Immunol*. 2006 Jan 15;176(2):1115-21. doi: 10.4049/jimmunol.176.2.1115. PMID: 16394000.

Holowka T, Bucala R. Role of Host and Parasite MIF Cytokines during *Leishmania* Infection. *TropicalMed*. 2020; 5(1):46.

Huang X, Li Y, Fu M, Xin H-B. Polarizing Macrophages In Vitro. In: Rousselet G, editor. *Macrophages*. New York, NY: Springer New York; 2018 .

Iniesta V, Carcelén J, Molano I, et al. Arginase I Induction during *Leishmania major* Infection Mediates the Development of Disease. *Infect Immun*. 2005; 73(9):6085–6090.

Iniesta V, Gómez-Nieto LC, Corraliza I. The Inhibition of Arginase by N ω -Hydroxy-L-Arginine Controls the Growth of *Leishmania* Inside Macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*. 2001; 193(6):777–784.

Ito I, Bhopale KK, Nishiguchi T, et al. The Polarization of M2b Monocytes in Cultures of Burn Patient Peripheral CD14⁺ Cells Treated with a Selected Human CCL1 Antisense Oligodeoxynucleotide. *Nucleic Acid Therapeutics*. 2016; 26(5):269–276.

Katara GK, Raj A, Kumar R, et al. Analysis of localized immune responses reveals presence of Th17 and Treg cells in cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. *BMC Immunol.* 2013; 14(1):52.

Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 9(8):604–615.

Kedzierski L. Leishmaniasis. *Human Vaccines.* 2011; 7(11):1204–1214.

Killick-Kendrick R, Molyneux DH. Transmission of leishmaniasis by the bite of phlebotomine sandflies: possible mechanisms. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 1981; 75(1):152–154.

Kropf P, Fuentes JM, Fahrnich E, Arpa L, Herath S, Weber V, Soler G, Celada A, Modolell M, Muller I. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *FASEB J.* 2005; 19, 1000-1002.

Lahav T, Sivam D, Volpin H, et al. Multiple levels of gene regulation mediate differentiation of the intracellular pathogen *Leishmania*. *FASEB j.* 2011; 25(2):515–525.

Lainson R, Ryan L, Shaw JJ. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1987; 82(3):421–424.

Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of Experimental Medicine.* 2005; 201(2):233–240.

Larkin J, Ahmed CM, Wilson TD, Johnson HM. Regulation of Interferon Gamma Signaling by Suppressors of Cytokine Signaling and Regulatory T Cells. *Front Immunol.* 2013.

Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11(11):750–761.

Lee SH, Charmoy M, Romano A, et al. Mannose receptor high, M2 dermal macrophages mediate nonhealing *Leishmania major* infection in a Th1 immune environment. *Journal of Experimental Medicine.* 2018; 215(1):357–375.

Liew FY, Wei X, Proudfoot L. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. Liew FY, Vickerman K, editors. *Phil Trans R Soc Lond B*. 1997; 352(1359):1311–1315.

Liu D, Uzonna JE. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front Cell Inf Microbio*. 2012.

Locati, M., Mantovani, A. Sica, A., 2013. Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity. *Adv Immunol* 120, 163-184.

MacMicking J, Xie Q, Nathan C. NITRIC OXIDE AND MACROPHAGE FUNCTION. *Annu Rev Immunol*. 1997; 15(1):323–350.

MacParland SA, Tsoi KM, Ouyang B, et al. Phenotype Determines Nanoparticle Uptake by Human Macrophages from Liver and Blood. *ACS Nano*. 2017; 11(3):2428–2443.

Maioli TU, Takane E, Arantes RME, Fietto JLR, Afonso LCC. Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice. *Parasitol Res*. 2004; 94(3):207–212.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*. 2004; 25(12):677–686.

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology*. 2002; 23(11):549–555.

Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000PrimeRep*. 2014.

Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *The Journal of Immunology*. 2006; 177(10):7303–7311.

Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 2008; 13(13):453.

McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, et al. TGF- β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol.* 2007; 8(12):1390–1397.

McMahon-Pratt D, Alexander J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *Immunological Reviews.* 2004; 201(1):206–224.

McNicoll F, Drummelsmith J, Müller M, et al. A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. *Proteomics.* 2006; 6(12):3567–3581.

Mears ER, Modabber F, Don R, Johnson GE. A Review: The Current In Vivo Models for the Discovery and Utility of New Anti-leishmanial Drugs Targeting Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9(9):e0003889 doi:10.1371/journal.pntd.0003889

Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology.* 2000; 164(12):6166–6173.

Modolell M, Choi B-S, Ryan RO, et al. Local Suppression of T Cell Responses by Arginase-Induced L-Arginine Depletion in Nonhealing Leishmaniasis. Jaffe C, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009; 3(7):e480.

Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G, Eichmann K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH 1 and TH 2 cytokines. *Eur J Immunol.* 1995; 25(4):1101–1104.

Moreira AP, Dias-Melicio LA, Soares AMVC. Interleukin-10 but not Transforming Growth Factor beta inhibits murine activated macrophages *Paracoccidioides brasiliensis* killing: Effect on H₂O₂ and NO production. *Cellular Immunology.* 2010; 263(2):196–203.

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8(12):958–969.

Mosser DM, Handman E. Treatment of murine macrophages with interferon- γ inhibits their ability to bind leishmania promastigotes. *J Leukoc Biol.* 1992; 52(4):369–376.

Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11(11):723–737.

Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *The Journal of experimental medicine.* 1983; 158(3):670–689.

Noben-Trauth N. Susceptibility to *Leishmania major* infection in the absence of IL-4. *Immunology Letters.* 2000; 75(1):41–44.

Noël W. Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends in Parasitology.* 2004; 20(3):126–133.

Nugent PG, Karsani SA, Wait R, Tempero J, Smith DF. Proteomic analysis of *Leishmania mexicana* differentiation. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 2004; 136(1):51–62.

O'Garra A, Vieira P. TH1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7(6):425–428.

Oliveira MAPD, Pires ADS, Bastos RPD, et al. *Leishmania* spp. parasite isolation through inoculation of patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice. *Rev Inst Med trop S Paulo.* 2010; 52(2):83–88.

Oliveira MAPD, Pires ADS, Bastos RPD, et al. *Leishmania* spp. parasite isolation through inoculation of patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice. *Rev Inst Med trop S Paulo.* 2010; 52(2):83–88.

Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion Mechanisms by Which *Leishmania* Parasites Can Escape the Host Immune Response: a Signaling Point of View. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18(2):293–305.

Organização Pan-Americana da Saúde. Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas. Washington, D.C.: OPAS; 2019.

Pace JL, Russell SW, Schreiber RD, Altman A, Katz DH. Macrophage activation: priming activity from a T-cell hybridoma is attributable to interferon-gamma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983; 80(12):3782–3786.

Paduch K, Debus A, Rai B, Schleicher U, Bogdan C. Resolution of Cutaneous Leishmaniasis and Persistence of *Leishmania major* in the Absence of Arginase 1. *J Immunol*. 2019; 202(5):1453-1464 doi:10.4049/jimmunol.1801249

Passero LFD, Carvalho AK, Bordon MLAC, et al. *Leishmania (Viannia) shawi* purified antigens confer protection against murine cutaneous leishmaniasis. *Inflamm Res*. 2012; 61(3):255–263.

Pereira CG, et al. Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection. *Vet Parasitol*. 2009; 165(3-4):231-40.

Peters NC, Sacks DL. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cellular Microbiology*. 2009; 11(9):1290–1296.

Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F, Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest*. 1993; 91(4):1390–1395.

Racoosin EL, Beverley SM. *Leishmania major*: Promastigotes Induce Expression of a Subset of Chemokine Genes in Murine Macrophages. *Experimental Parasitology*. 1997; 85(3):283–295.

Raes G, Beschin A, Ghassabeh GH, De Baetselier P. Alternatively activated macrophages in protozoan infections. *Current Opinion in Immunology*. 2007; 19(4):454–459.

Robbins RA, Grisham MB. Nitric oxide. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1997; 29(6):857–860.

Rocha FJS, Schleicher U, Mattner J, Alber G, Bogdan C. Cytokines, Signaling Pathways, and Effector Molecules Required for the Control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Mice. *Infect Immun*. 2007; 75(8):3823–3832.

Romano A, Carneiro MBH, Doria NA, et al. Divergent roles for Ly6C+CCR2+CX3CR1+ inflammatory monocytes during primary or secondary infection of the skin with the intra-phagosomal pathogen *Leishmania major*. Loke P, editor. *PLoS Pathog*. 2017; 13(6):e1006479.

Ross R. Further notes of Leishman's bodies. *Br Med J*. 1903;2:1401. doi: 10.1136/bmj.2.2239.1401.

Rot A, Von Andrian UH. C HEMOKINES IN INNATE AND ADAPTIVE HOST DEFENSE: Basic Chemokine Grammar for Immune Cells. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22(1):891–928.

Sabat R, Grütz G, Warszawska K, et al. Biology of interleukin-10. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2010; 21(5):331–344.

Sacks DL, Perkins PV. Identification of an Infective Stage of *Leishmania* Promastigotes. *Science*. 1984; 223(4643):1417–1419.

Sakaguchi S. Regulatory T Cells: History and Perspective. In: Kassiotis G, Liston A, editors. *Regulatory T Cells*. Totowa, NJ: Humana Press; 2011 .

Schleicher U, Paduch K, Debus A, et al. TNF-Mediated Restriction of Arginase 1 Expression in Myeloid Cells Triggers Type 2 NO Synthase Activity at the Site of Infection. *Cell Reports*. 2016; 15(5):1062–1075.

Scorza BM, Carvalho EM, Wilson ME . Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. *Int J Mol Sci*.2017;18(6) doi:10.3390/ijms18061296

Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol*. 2016; 16(9):581–592.

Sharma U, Singh S. Immunobiology of leishmaniasis. *Indian J Exp Biol*. 2009 Jun;47(6):412-23. PMID: 19634705.

Shen X, Du J, Guan W, Zhao Y. The balance of intestinal Foxp3⁺ regulatory T cells and Th17 cells and its biological significance. *Expert Review of Clinical Immunology*. 2014; 10(3):353–362.

Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99(3):239–251.

Souza-Neto SMD, Carneiro CM, Vieira LQ, Afonso LCC. *Leishmania braziliensis*: partial control of experimental infection by interleukin-12 p40 deficient mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99(3):289–294.

Steigerwald M, Moll H. *Leishmania major* Modulates Chemokine and Chemokine Receptor Expression by Dendritic Cells and Affects Their Migratory Capacity. *Infect Immun*. 2005; 73(4):2564–2567.

Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *The Journal of experimental medicine*. 1992; 176(1):287–292.

Stumhofer JS, Silver JS, Laurence A, et al. Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol*. 2007; 8(12):1363–1371.

Sundrud MS, Trivigno C. Identity crisis of Th17 cells: Many forms, many functions, many questions. *Seminars in Immunology*. 2013; 25(4):263–272.

Sutterwala FS, Noel GJ, Salgame P, Mosser DM. Reversal of Proinflammatory Responses by Ligating the Macrophage Fcγ Receptor Type I. *The Journal of Experimental Medicine*. 1998; 188(1):217–222.

Taylor-Robinson A. Th1/Th2-regulated arginase availability modulates *Leishmania* infection. *Trends Parasitol*. 2001 Jun;17(6):262. doi: 10.1016/s1471-4922(01)02003-7. PMID: 11378016.

Törőcsik D, Bárdos H, Nagy L, Ádány R. Identification of factor XIII-A as a marker of alternative macrophage activation. *Cell Mol Life Sci*. 2005; 62(18):2132–2139.

Ueno N, Wilson ME. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends in Parasitology*. 2012; 28(8):335–344.

Valledor AF, Ricote M. Nuclear receptor signaling in macrophages. *Biochemical Pharmacology*. 2004; 67(2):201–212.

Van Assche T, Deschacht M, Da Luz RAI, Maes L, Cos P. *Leishmania*–macrophage interactions: Insights into the redox biology. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011; 51(2):337–351.

Viola A, Munari F, Sánchez-Rodríguez R, Scolaro T, Castegna A. The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Front Immunol*. 2019; 10:1462.

Yang J, Zhang L, Yu C, Yang XF, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: Circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark. Res*. 2014; 2: 1-14.

Walker J, Vasquez J-J, Gomez MA, et al. Identification of developmentally-regulated proteins in *Leishmania panamensis* by proteome profiling of promastigotes and axenic amastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2006; 147(1):64–73.

Wang J, Roderiquez G, Oravec T, Norcross MA. Cytokine Regulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry and Replication in Human Monocytes/Macrophages through Modulation of CCR5 Expression. *J Virol*. 1998; 72(9):7642–7647.

Wang L, Zhang S, Wu H, Rong X, Guo J. M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *Journal of Leukocyte Biology*. 2019; 106(2):345–358.

Weinkopff T, Mariotto A, Simon G, et al. Role of Toll-Like Receptor 9 Signaling in Experimental *Leishmania braziliensis* Infection. Urban JF, editor. *Infect Immun*. 2013; 81(5):1575–1584.

Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 2013; 496(7446):445–455.

Anexo 1– Parecer do Comitê de Ética



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



Goiânia, 15 de maio de 2017.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO ATENDIMENTO DE PENDÊNCIAS DO PROTOCOLO N. 041/2017

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Doutorado

II - Identificação:

- Data de apresentação a CEUA: 10/05/2017**
- Título do projeto:** Análise proteômica das células hospedeiras e de *Leishmania braziliensis* durante a infecção de macrófagos
- Pesquisador Coordenador no SAP:** Milton Adriano Pelli de Oliveira
- Pesquisador Responsável/ Unidade:** Mirian Vieira Teixeira/Escola de Veterinária/UFG
- Pesquisadores Participantes:** Fátima Ribeiro Dias, Célia Maria de Almeida Soares, Lilian Cristiane Baeza, Pollyana Guimarães De Oliveira.
- Médico Veterinário/CRMV:** Daniel Silva Goulart CRMV/GO 4632.
- Unidade onde será realizado:** IPTSP/UFG

III - Objetivos e justificativa do projeto:

Objetivo Geral: Avaliar as alterações no perfil de proteínas por células hospedeiras e de *Leishmania braziliensis* durante a infecção de macrófagos.

Objetivos Específicos:

- Induzir os perfis de CMO e/ou AAMo pela utilização de IFN γ e IL-4;
- Quantificar o número de parasitos dentro CMO e/ou AAMo 1h, 48h, 72h e 120h após a infecção;
- Avaliar a produção de citocinas e quimiocinas liberadas por CMO e/ou AAMo após a infecção com *Leishmania braziliensis*;
- Obter o proteoma de CMO e/ou AAMo infectados por *Leishmania braziliensis* nos tempos 1h, 48h, 72h e 120h após a infecção;
- Obter o proteoma de *Leishmania braziliensis* nos tempos 1h, 48h, 72h e 120h após a infecção de CMO ou AAMo.
- Obter o proteoma de *Leishmania braziliensis* nos tempos 1h, 48h, 72h e 120h após a infecção de macrófagos animais PhoxKO ou iNOSKO.

Justificativa: Segundo os autores “ Parasitos *Leishmania* são capazes de sobreviver nos macrófagos do hospedeiro apesar das condições hostis. Estudos demonstram que a capacidade de secretar proteínas neste microambiente representa um mecanismo essencial no estabelecimento da infecção e no direcionamento da resposta imune celular (Chenik et al., 2006). As proteínas expressas pelo parasito estão envolvidas na sua



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



sobrevivência, pois podem modificar o ambiente tornando-o mais favorável ao seu desenvolvimento (Corrales et al., 2010).

Nesse sentido, para entender a adaptação dos microrganismos em ambientes mais ou menos adequados para o seu desenvolvimento, é importante utilizar macrófagos ativados para criarem um ambiente hostil como no cMO (macrófagos classicamente ativados) ou um ambiente permissivo como no AAMo (macrófagos alternativamente ativados). O IFNg e a IL-4 são as principais citocinas descritas como capazes de polarizar macrófagos para cMo e AAMo.

Alternativamente, a utilização de macrófagos de animais desprovidos dos genes do óxido nítrico sintase induzida (iNOs), fundamental para a produção de RNS (espécies reativas de nitrogênio) ou da fagócito oxidase, responsável pela geração de ROS (espécies reativas de nitrogênio) poderá auxiliar a nossa compreensão a respeito das adaptações dos patógenos, quando os principais mecanismos microbicidas estão presentes. Diante disso, essa pesquisa visa analisar a resposta proteômica das células hospedeiras e de *Leishmania braziliensis* durante a infecção de macrófagos PhoxKO, iNOsKO, cMo e AAMo, para compreender as adaptações que os parasitos sofrem quando estão presentes em um ambiente hostil, ou presentes em um ambiente favorável. A caracterização molecular do proteoma de *Leishmania braziliensis* abre novas possibilidades de investigação relacionadas ao tratamento, prognóstico e diagnóstico da LTA. As moléculas com atividade enzimáticas identificadas podem constituir alvos futuros que podem ser utilizados no controle da infecção, e o desenho racional de novos medicamentos contra o parasito. ”

IV - Sumário do projeto:

- Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:** Os autores relatam não existir no mercado células com as características a serem avaliadas no projeto em questão.
- Prevê Projeto Piloto:** Sim.
- Espécie animal utilizada/ número total de animais/ Número de animais por tratamento ou grupo experimental:** Serão utilizados um total de 25 *Mus musculus* (camundongo), C57BL/6. Contabilizando 10 animais para projeto piloto e 15 para servir de controle experimental. Também serão utilizados 15 *Mus musculus* (camundongo), C57BL/6 gp91phoxKO e 15 *Mus musculus* (camundongo), C57BL/6 iNOsKO. Todos fêmeas.
- Descrição do animal utilizado (Explicitar: espécie/ linhagem/ sexo (informar número por sexo)/ peso e/ou idade etc):** Serão utilizados um total de 25 *Mus musculus* (camundongo), C57BL/6 de 6-8 semanas de idade e 20g de peso. Contabilizando 10 animais para projeto piloto e 15 para servir de controle experimental. Também serão utilizados 15 *Mus musculus* (camundongo), C57BL/6 gp91phoxKO de 6-8 semanas de idade e 20 g de peso e 15 *Mus musculus* (camundongo), C57BL/6 iNOsKO de 6-8 semanas de idade e 20 g de peso. Todos fêmeas.
- Fonte de obtenção do animal:** Biotério UFG (UFMG).
- Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:** Os animais serão alimentados com ração industrializada específica para camundongos (Presence Ratos e Camundongos), de procedência conhecida,

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) -
CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua.ufg@gmail.com



palatável, sem antibióticos. Antes ser fornecida para os camundongos a ração será autoclavada para evitar contaminações, e cada camundongo receberá 5g de ração diária. A quantidade não consumida será desprezada. Água limpa (esterilizada e acidificada) e fresca será fornecida à vontade, e trocada diariamente. Os bebedouros são de material autoclavável e transparentes. Os bicos, por onde o animal bebe, são de aço inoxidável e autoclavados antes de entrar em contato com os animais. A alimentação e a limpeza da gaiola serão feitas diariamente. As gaiolas ficarão em estantes especiais para os animais, o que permitirá o estabelecimento de sistema fechado de criação. Proporcionando aos animais condições de iluminação, aeração, umidade do ar de 50%, temperatura de 22°C, e livre de ruídos que possam causar stress. É constituído por dois motores, responsáveis pelo insuflamento e a exaustão do ar para cada gaiola, sob as prateleiras. O ar insuflado e/ou exaurido passa por dois filtros absolutos de alta atividade, onde a eficiência é 99,997% na retenção de partículas maiores de 0,3 micra. Será utilizada uma capela de fluxo laminar para o manejo dos animais. Os camundongos serão mantidos, em grupos de cinco, em gaiolas com cama maravalha e 30 cm de comprimento, 20 cm de largura e 14 cm de altura. Este espaço permitirá que os animais apresentem postura adequada e movimentação/ ou comportamento padrão da espécie.

- ❑ **Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:** Segundo os autores o uso adequado de animais utilizados em experimentos exige a formação de profissionais qualificados, além disso, quando se lida com camundongos, deve-se ter em mente a necessidade de proteção não apenas dos animais, mas também do pesquisador evitando dessa forma, a ocorrência de mordidas e arranhões. Nesse sentido, determinados procedimentos e cuidados serão obrigatoriamente utilizados em qualquer tipo e etapa do manuseio com animais, como por exemplo, o uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs), luvas, óculos de proteção, máscara cirúrgica, gorros e jaleco, e os, Equipamentos de Proteção Coletiva (EPCs), como extintores de incêndio, lava olhos, e outros mais específicos e que devem ser empregados em casos particulares, como capela de fluxo laminar e capela de exaustão, além de caixa para descarte de material perfurocortante. Não colocou agente
- ❑ **Procedimentos experimentais do projeto de pesquisa:** Os autores relatam que “Os camundongos recém-chegados do biotério do laboratório deverão permanecer no mínimo por 15 dias para ambientação e acompanhamento das condições de saúde antes de iniciar os experimentos. Serão utilizados 30 camundongos fêmeas de 8 a 12 semanas de idade, mantidos em estante ventilada com alimentação e água a vontade. Para obtenção de macrófagos, os animais serão anestesiados, e a medula óssea (BMDM) do fêmur e tibia será extraída pela injeção de salina fosfatada (PBS) estéril. As células serão lavadas e cultivadas com 10 ng/mL de M-CSF (R&D Systems) por 10 dias, sendo o meio de cultura trocado a cada dois dias. Para a eutanásia será utilizado o método de decapitação. Os animais após a eutanásia serão incinerados antes do descarte.
- ❑ **Métodos utilizados para minimizar o sofrimento e aumentar o bem-estar dos animais antes, durante e após a pesquisa. Pontos Finais Humanitários:** Todos os pesquisadores serão devidamente treinados para o correto manuseio de animais para não causar estresse nos animais. Todos os procedimentos com animais, que possam causar dor ou angústia, serão desenvolvidos com sedação, analgesia ou anestesia adequados. Os animais serão sedados utilizando 0,2 mg de cetamina e 2 mg de xilasina.
- ❑ **Grau de invasividade: 2.**
- ❑ **Material utilizado em outros projetos:** Não.



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



- Método de eutanásia:** anestesia (cetamina e xilazina) seguida de decapitação.
- Destino do animal:** Carcaças incineradas na EVZ.

V – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

- Quanto aos documentos exigidos pela CEUA/UFG:** Estão de acordo com as exigências da CEUA/UFG.
- Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores:** Após o atendimento das pendências, estão de acordo com as Normativas do CONCEA.

VI - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto **APROVADO**.

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que a pesquisadora responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, a qual está prevista para finalizar suas ações até **31/12/2021**.

VII - Data da reunião: 15/05/2017.



Murine macrophages do not support proliferation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* amastigotes even in absence of nitric oxide and presence of high arginase activity

Mirian Vieira Teixeira¹; Santiago Spellet Soares¹; Vagniton Amélio Souza¹; Lilian Cristiane Baeza²; Celia Maria de Almeida Soares³; Milton Adriano Pelli de Oliveira¹.

¹Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235 S/N – Setor Universitário, Goiânia, GO, Brazil.

²Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua Universitária, 2069 - Jardim Universitário CEP 85819-110, Cascavel, PR, Brazil

³Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brazil.

*Corresponding author email: miltonoliveira.ufg@gmail.com;
Phone: +556232096126

Acknowledgments

We thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia da Interação Patógeno Hospedeiro (IPH), This work is part of the INCT program of Strategies of HPI. Milton Adriano Pelli de Oliveira and Celia Maria de Almeida Soares are Fellows from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Abstract

Leishmania (Viannia) braziliensis is the main species responsible for American tegumentary leishmaniasis in Brazil. Nevertheless, the use of this parasite species to study *Leishmania* infection in murine model has been less conducted when compared with other *Leishmania* species. The control of murine infection with *Leishmania* has been associated with nitric oxide (NO) produced by inducible NO synthase (iNOS) from M1 macrophage, while arginase expressed by M2 macrophages is related to *Leishmania* proliferation. Here we use three different strains of *L. (V.) braziliensis* and one strain of *L. (L.) major* to study a 9 days infection of macrophages *in vitro*. Wild type bone marrow derived macrophages (BMDM) supported proliferation of *L. (L.) major* amastigotes from the 3rd day after infection, while all strains of *L. (V.) braziliensis* did not proliferate even inside IL-4-treated or iNOS Knockout (KO) macrophages. The arginase activity was higher in iNOS KO than IL-4 treated macrophage showing that absence of proliferation is independent of arginase. Importantly, *L. (V.) braziliensis* were able to cause uncontrolled disease in iNOS KO mice *in vivo* demonstrated that murine macrophages present at the site of infection receive additional stimuli beyond inhibition of NO production or stimulation of arginase activity.

Keywords: *Leishmania Viannia braziliensis*, *Leishmania major*, amastigote.

Introduction

Murine model of infection with different species of *Leishmania* have been used extensively to study cutaneous leishmaniasis and offer a unique opportunity to understanding the cellular and molecular mechanisms in the site of infection (Scorza et al. 2017). The mouse *L. (L.) major* infection model had a paramount relevance to understanding *Leishmania* infection due to be the first one to show the presence of immune regulation of disease outcome *in vivo* based on Th1/Th2 paradigm (Alexander and Brombacher 2012; Heinzel et al. 1989). Although murine infection with *L. (L.) major* helped to understand several immunological parameters of *Leishmania* infection in animal and in human, this model fails to explain all aspects of the disease behavior caused by other leishmania species (Alexander and Brombacher 2012).

Leishmania (V.) braziliensis is the most common etiologic agent responsible for American tegumentary leishmaniasis in Brazil, nevertheless the use of this parasite specie to study leishmania infection in murine model has been less conducted when compared with other *Leishmania* species (Mears et al. 2015). Primary work using murine model infected with one strain of *L. (V.) braziliensis* showed a chronic infection in BALB/c mice with no sign of resolution in some animals, while C57BL/6 mice presented no evidence of infection (child 1984). More recent works, using different field isolates of *L. (V.) braziliensis* from two different groups, showed that the pattern of lesion is variable dependent on the strain of parasites. Additionally, C57BL/6 mice can develop higher lesion than BALB/c mainly in later periods (Pereira et al. 2009; Pires Ada et al. 2015). These authors also showed no self-healing lesions for at least 10 weeks in infection caused by some parasite strains in both C57BL/6 and BALB/c mice. While it was never described an uncontrolled disseminated lesion caused by *L. (V.) braziliensis* in wild type (WT) mouse, live parasites can be found in different organs of C57BL/6 mice during infection, including lymph node and spleen (Gomes et al. 2016; Pereira et al. 2009).

Different from WT mice, mouse that lack Th1 related molecules such as IFN-g or inducible nitric oxide synthase (iNOS) enzyme develop uncontrolled lesion with high number of parasites that disseminate to several organs when infected by any *L. (V.) braziliensis* strains tested (Gomes et al. 2016; Oliveira et

al. 2010; Rocha et al. 2007). These data clearly show that even in murine WT models there is a niche of host cells that support the persistence of parasite for long period. Additionally, the presence of Th1 response with high NO production is crucial to avoid leishmania proliferation and disease development. On the other hand, absence of Th1 response create an environment where host cells are highly susceptible to infection supporting uncontrolled amastigote proliferation.

The cell population that supports leishmania persistence and/or proliferation is still not well defined and seems to be different among infections with different parasites species (Bogdan 2020). Initial works using infected murine model suggested that undifferentiated phagocytes (Mirkovich et al. 1986) or mature macrophages (Stenger et al. 1996) were responsible for maintaining the parasite viability *in vivo*. Based on the Th1/Th2 paradigm and after the definition of M1 and M2 macrophage as a mirror of Th1/Th2 immune response (Mills et al. 2000), it was suggested that M2 macrophages were responsible to keep the parasite alive, while M1 macrophages were related to the parasite killing (Iniesta et al. 2001; Iniesta et al. 2002; Taylor-Robinson 2001).

More recent data suggest that the main host cell responsible for the persistence of *L. (L.) major* in experimental leishmaniasis are the dermal macrophages showing a IL-4-dependent M2 profile with high arginase activity and negative for iNOS (Lee et al. 2018). Other important cell responsible to maintain live *L. (L.) major* amastigotes *in vivo* in murine model are inflammatory monocytes identified as CD11b+Ly6C+CCR2+CX3CR1+ (Romano et al. 2017) and CD11c+Ly6C+CCR2+F4/80+ cells (Heyde et al. 2018). For of *L.(V.) braziliensis*, the main host cell that support persistence/proliferation in murine infection is less clear, however, cells with the M2 profile with high arginase activity and low NO production seems to be important to promote more severe disease (Costa et al. 2011). Here we analyzed the ability of *L. (L.) major* and *L. (V.) braziliensis* to proliferate inside murine macrophages *in vitro* for a 9 days period.

MATERIAL AND METHODS

Mice

Female wild type (WT) C57BL/6 and iNOS KO mice were used, aged 8-10 weeks. iNOS KO mice were originally purchased from Jackson Laboratories, ME/USA. Mice were bred at the animal facilities of Federal University of Goiás/IPTSP, Brazil and maintained in a clean conventional mouse facility with *ad libitum* access to water and food. All the experimental procedures were conducted according to the guidelines of the Animal Research Ethical Committee (CEUA) of the Federal University of Goiás, approved under the protocol 047/2017.

Parasites

In this study were used promastigote parasites of *L. (L.) major* (MHOM/IL/80/Friedlin) and parasites obtained from patients with localized cutaneous leishmaniasis (MHOM/BR/2008/JCJ8c; MHOM/BR/2003/IMG3c; MHOM/BR/2005/RPL5c;) previously characterized as *L. (V.) braziliensis* (Oliveira et al. 2010). Parasites were cultured in 24-well culture plates and passed every 3 days starting with 1×10^5 promastigotes/mL (for *L. (L.) major*) and 1×10^6 promastigotes per mL (for *L. (L.) braziliensis*) in Grace's Insect Medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with inactivated 20% fetal bovine serum (FBS-Cripion, Andradina, SP, Brasil), 2% human urine, 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich), 100 U/mL penicillin (Sigma-Aldrich) and 100 µg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich). Parasites in the stationary growth phase were harvested 5 days after the beginning of the culture and washed three times in PBS before using.

Infection of bone marrow-derived macrophage

Bone marrow-derived macrophage (BMDM) from WT and iNOS KO mice was obtained as described before (Oliveira et al. 2003). Briefly, single cell suspensions of bone marrow cells were obtained by flushing the femurs and tibia of mice with sterile PBS. The cell suspension (including erythrocytes) was cultured at 35°C, 5% CO₂, in 24-wells culture plates (Corning-Costar - Kennebunk, ME, EUA), at 5 x 10⁵ cells/ 500 μL, in complete RPMI medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 2 mM glutamine, 10mM HEPES (Sigma-Aldrich), 100 U/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin sulfate, 50 μM 2-ME (Sigma-Aldrich) and 10 % FBS. It was added to the medium 30 % (v/v) L929 (ATCC) cell culture supernatant as source of M-CSF. The supernatants were aspirated and medium was replenished every two days in order to renew the cytokine and nutrients' source. After 9 days the plates were washed with PBS and cultured in supplemented RPMI with 1x10⁶ promastigote parasites of *L. (V.) braziliensis* or 2x10⁵ promastigotes of *L. (L.) major* for 3h. Cells were washed 5X with PBS to removal remove non-internalized parasites and cultured with supplemented RPMI for different periods. In some experiments, cells were stimulated with 200 ng/mL of lipopolysaccharide (LPS; Escherichia coli O111:B4; Sigma-Aldrich) and 20 ng/mL of IFN-γ (Biolegend) for 4 hours before add parasite or 10 ng/ml of IL-4 (Biolegend) 18h before add parasites. Plates were stained with Instantprov kit (Newprov, Pinhais, PR, Brasil) and three hundred cells were counted to determine the percentage of infected cells and the mean number of intracellular amastigotes per infected cell under an inverted microscope.

Nitrite assay for the estimation of nitric oxide (NO)

Supernatant of BMDM culture was measured by Griess assay as described previously (Green et al. 1990). The culture supernatant (50μL) was placed in 96-wells culture plates and then added Griess reagent (0,5% sulfanilamide, 0,05% naphazoline hydrochloride, and 2.5% ortho-phosphoric acid) for 10 min at room temperature. The absorbance at 550 nm was determined in an ELISA reader. The results were expressed as μM of nitrite based on a

standard curve established by known concentrations of sodium nitrite (NaNO₂, Sigma-Aldrich) dissolved in culture medium.

Mouse infection

Groups of three mice were injected in the left footpad with 1×10^6 promastigote parasites and paw swelling was measured weekly using a dial thickness gauge (Mitutoyo, Kawasaki, Japan); the increase in paw thickness was calculated as the difference between the left paw (infected) and the right one (uninfected control paw).

Arginase activity assay

The plate containing cells were washed twice with PBS and then the cells were resuspended in 100 μ L of lysis buffer (Tris-HCl 500 mM pH 7.5 and Triton 1%). The arginase activity was determined by urea production as described previously (Corraliza et al. 1994) with some modifications. Briefly, the cell lysate (50 μ l) was added to 50 μ L of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 10 mM MnCl₂ (Vetec, Brazil). These samples were activated by heating the mixture at 56°C for 10 min. The hydrolysis reaction of *L*-arginine by arginase was carried out by incubating the lysate with 50 μ L of 0.5 M *L*-arginine (pH 9.7; Sigma Chemical Co., USA) at 37°C for 1 h. The reaction was stopped by the addition of 200 μ L H₂SO₄:H₄PO₄:H₂O (1:3:7).

Subsequently, 25 μ L of 9.0 % α -isonitropropiophenone solution in absolute ethanol was added and incubated at 100°C for 45 min. For the color development, 120 μ L of the solution from each sample (in duplicates) was transferred to a microplate and read in the ELISA reader on the 550nm filter. The standard curve was made using the assay detection limit for 0.015 mg / mL of urea.

Statistical analysis

The data are presented as mean \pm SD and were compared for significance by Student's *t* test or ANOVA followed by Tukey test using the Graph-Pad Prism Software 5.0 (Inc. San Diego, CA, USA). *P* <0.05 was considered significant.

Results

To evaluate the parasite survival inside of macrophage for long periods, BMDM from C57BL/6 mice were cultured with three different strains of *L.(V) braziliensis* or one strain of *L. (L.) major* promastigotes for three hours followed by washing to exclude non-internalized parasites. The percentage of infected cells (Fig 1A) and the number of parasites per infected BMDM (Fig1B) decreased significantly three days after infection when parasites form of *L.(V) braziliensis* species were used. The percentage of parasites and the number of amastigotes from *L. (V.) braziliensis* slightly decreased 9 days after infection, but it did not reach statistical significance. Infection of BMDM from BALB/c mice and elicited peritoneal macrophages from C57BL/6 or BALB/c mice showed similar results (data not shown), demonstrating clearly that non stimulated murine macrophages does not support proliferation of *L.(V) braziliensis* amastigotes, at least for the period tested.

On the contrary, infection of BMDM from C57BL/6 mice with *L. (L.) major* supported the proliferation of amastigotes demonstrated by a high percentage of infected cells and number of amastigotes inside macrophages (Fig 1A and 1B). In these experiments it was used lower number of parasites from *L. (L.) major* species because previous experiment indicated great proliferation of amastigotes from this species, what make it difficult to count the parasites after three days period. Even using this low dose, we were unable to quantify properly the infection at 9 days period with this parasite specie. Because it was not observed significant proliferation or killing of *L.(V) braziliensis* amastigotes inside of non-stimulated BMDM among three and nine days after infection, we decide to investigate the survival of amastigotes inside of macrophages activated with IFN-g + LPS (M1) or with IL-4 (M2). Initially we demonstrated that three days after adding IFN-g + LPS it was possible to observe significant production of NO by BMDM that was not altered by the presence of *L.(V) braziliensis* amastigotes (Fig 2A).

We also demonstrated that arginase activity increased three days after adding IL-4 and the presence of *L.(V) braziliensis* amastigotes increased this activity in IL-4 stimulated BMDM (Fig 2B). The increase of NO in M1

macrophages was related with the complete elimination of *L.(V) braziliensis* amastigotes (Fig 3A and C), but the generation of M2 macrophages by IL-4 did not change the ability of *L.(V) braziliensis* amastigotes to grow (Fig 3 B and D). Because the presence of NO was related to the killing of *L.(V) braziliensis* amastigotes, we decide to observe whether absence of NO in macrophages could allow *L.(V) braziliensis* amastigotes. For that, BMDM was infected with *L.(V) braziliensis* and followed for 9 days. Similar to what was observed for WT BMDM, the percentage of infected macrophages and the number of parasites inside macrophage did not change between three and 9 days after infection (Fig 4A and 4B).

As expected, we were not able to observe significant production of NO in iNOS KO BMDM and interestingly, we observed that arginase activity in iNOS KO BMDM was higher than in IL-4 treated WT BMDM, but absence of NO in macrophage with high arginase activity did not support proliferation of *L.(V) braziliensis* amastigotes (Fig 4). Infection of different WT mouse strains with *L.(V) braziliensis* does not support progressive infection (Gomes et al. 2016) what is in agreement with the results presented in this work, however, the absence of proliferation of parasites for 9 days in iNOS KO BMDM was a surprise.

To verify the ability of this parasite strain used in this work to cause lesion in mice we infected WT and iNOS KO mice paw with promastigote parasites and followed the lesion size. As demonstrated in figure 5, both WT and iNOS KO mice developed similar and mensurable lesion 3 weeks after infection, however, iNOS KO mice was unable to control the disease after the 4th week while WT mice was cured at the 8th week. This data showed that absence of iNOS in mice do support the proliferation of parasites *in vivo*, but the additional alteration that occurs in the macrophages to support the growing of *L.(V) braziliensis* parasites *in vivo* that is beyond of absence NO production still not know.

Discussion

Persistence and long-term survival of *Leishmania* parasites in murine models has been widely studied but it still a matter of debate (Bogdan 2020). The search for a “safe target” for *Leishmania* parasite allows us to identify the cells responsible for maintaining the parasite in the host and also the cell that promote amastigote proliferation. Most of studies in murine model were done with parasites other than *L. (V.) braziliensis*. Here we showed that while unstimulated murine BMDM support proliferation of *L. (L.) major* amastigotes, this cell does not allow proliferation of amastigotes from *L. (V.) braziliensis* species at last for 9 days in culture. This absence of proliferation was observed for all three different *L. (V.) braziliensis* strains used.

Infection of WT mice with *L. (L.) major* present a clear dichotomy where some mouse strain, such as BALB/c mice, develop uncontrolled disease and other, such as C57BL/6 mice, develop self-healing lesions (Heinzel et al. 1989). This dichotomy was explained by the Th1/Th2 paradigm, but this immunological model is not clear for murine infection with other *Leishmania* species (Alexander and Bryson 2005). For instance, injection of *L. (V.) braziliensis* in the paw or ear of WT mice shows parasite replication in the site of infection accompanied by the development of a small lesion which size and duration depends on the parasite isolate and mouse strain (Costa et al. 2011; Gomes et al. 2016; Pereira et al. 2009; Rocha et al. 2007). However, it was never described the development of uncontrolled disseminated disease due to a Th2 immune response in non-immunosuppressed WT mice when they are challenged with different strains of *L. (V.) braziliensis*. On the other hand, mouse that lack Th1 related molecules such as IFN-g or iNOS develop uncontrolled lesion with high number of parasites (Gomes et al. 2016; Oliveira et al. 2010; Rocha et al. 2007).

These data prove that murine host cells support *L. (V.) braziliensis* amastigote proliferation and the control of parasite in mice can be mediated by NO stimulated by IFN-g. Because macrophages are believed to be the replicative niche for leishmania parasites and are the major NO-producing cell in infected site (Bogdan 2020), it was expected that the absence of iNOS in macrophage rendered this cell to be highly susceptible to infection and permissive to *L. (V.) braziliensis* amastigote proliferation. We confirmed here that the absence of iNOS

in murine macrophages allow uncontrolled proliferation of *L. (V.) braziliensis* parasites *in vivo*. However, iNOS KO macrophages does not support *L. (V.) braziliensis* amastigote proliferation for nine days in culture. This data indicates that for *L. (V.) braziliensis* amastigote proliferation, the host cell must have some additional properties that is missing in iNOS KO macrophages.

The presence of arginase 1 in macrophages seems to be essential to generate *L. (L.) major* susceptible cells (Iniesta et al. 2005). This enzyme converts L-arginine to L-ornithine that is further converted in polyamines, which are important for proliferation of different cell types, including for *Leishmania* parasites. Additionally, arginase 1 from macrophages competes with the macrophage enzyme iNOS synthase, decreasing the availability of L-arginine for NO production and consequently inhibiting the parasite killing (Iniesta et al. 2005). Recently it was demonstrated important cell populations responsible to maintain live *L. (L.) major* amastigotes *in vivo* in murine model. These population including the tissue-resident dermal macrophage (Lee et al. 2018); Inflammatory monocytes identified as CD11b+ Ly6C+CCR2+CX3CR1+ (Romano et al. 2017) and CD11c+ Ly6C+CCR2+ F4/80+ cells (Heyde et al. 2018).

At least, for the tissue-resident dermal macrophage it was showed that these cells have a M2 phenotype with high arginase 1 activity, even in a Th1-dominant environment. In the case of *L. (L.) amazonensis*, it was described that the inflammatory IFN- γ dependent CCR2+ monocytes become a permissive population of cell expressing PDL1 and arginase 1 that supports amastigote proliferation (Carneiro et al. 2020). The importance of arginase to allow parasite proliferation was demonstrated when the enzyme was depleted in hematopoietic and endothelial cells, what rendered *L. (L.) major* susceptible BALB/c mice to resistant (Schleicher et al. 2016). This supports the idea that M2 macrophages bearing high arginase activity are important to maintain a high proliferative capacity of *L. (L.) major in vivo*. Interestingly, absence of arginase 1 in hematopoietic and endothelial cells of the *L. (L.) major* resistant C57BL/6 did not affect the parasite burden in the site of infection, showing that some proliferative capacity could be achieved independent of the presence of arginase in macrophages (Paduch et al. 2019).

It is important to mention that larger lesion with higher parasite burden caused by more virulent *L. (V.) braziliensis* was associated with higher IL-4

depended arginase activity (Costa et al. 2011). Based on this information, it would be expected some amastigote proliferation in M2 macrophages with high arginase activity. Again, we did not observe any amastigote proliferation in IL-4 treated WT macrophages that had increased arginase activity. Additionally, iNOS KO macrophages presented higher arginase activity than IL-4 treated WT macrophage but they are also unable to support *L. (V.) braziliensis* amastigote proliferation indicating that the arginase activity is not the missing factor in iNOS KO macrophages that halt proliferation. Several studies have demonstrated a great plasticity and subdivision of M2 macrophages and their potential to support *Leishmania* proliferation (Bogdan 2020; Carneiro et al. 2021; Murray et al. 2014).

Beyond the IL-4-stimulated M2 macrophage, also known as M2a macrophages, other subtypes such as immunocomplex-stimulated macrophages (M2b); IL-10 and TGF- β -stimulated macrophages (M2c) and adenosine-stimulated macrophage (M2d) were related to be more susceptible to *Leishmania* infection (Bogdan 2020; Carneiro et al. 2021; Figueiredo et al. 2016). Additionally, it is clear that macrophages committed to the M2 profile change their proteins, lipids and carbohydrates metabolic profile (Geeraerts et al. 2017), what interferes with nutrient availability for parasite proliferation. Importantly, it is evident that *Leishmania* parasites also interferes with macrophage metabolism and the metabolic reprogramming of macrophages by *Leishmania* differ between species (Bogdan 2020).

In this work we showed that C57BL/6 BMDMs supports proliferation of *L. (L.) major* amastigotes, but they are not that permissive for *L. (V.) braziliensis* amastigote. The precise reason for this difference is not known, however, it is possible that these parasites have different ability to modulate metabolic activity in macrophages or they have some differences between nutrients needs. Knowing the characteristics of the “safe targets” for parasites proliferation and the amastigote needs of different species is important to search for better methods to interfere with the diversity forms of leishmaniasis caused by different species. In particular, more studies related to *L. (V.) braziliensis* due to its important relevance for public health in the South America.

Compliance with ethical standards

All the experimental procedures were conducted according to the guidelines of the Animal Research Ethical Committee (CEUA) of the Federal University of Goiás, approved under the protocol 047/2017.

Conflicts of interest

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

References

Alexander J, Brombacher F (2012) T helper1/t helper2 cells and resistance/susceptibility to leishmania infection: is this paradigm still relevant? *Front Immunol* 3:80 doi:10.3389/fimmu.2012.00080

Alexander J, Bryson K (2005) T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. *Immunol Lett* 99(1):17-23

Bogdan C (2020) Macrophages as host, effector and immunoregulatory cells in leishmaniasis: Impact of tissue micro-environment and metabolism. *Cytokine X* 2(4):100041 doi:10.1016/j.cytex.2020.100041

Carneiro MB, et al. (2020) Th1-Th2 Cross-Regulation Controls Early Leishmania Infection in the Skin by Modulating the Size of the Permissive Monocytic Host Cell Reservoir. *Cell Host Microbe* 27(5):752-768 e7 doi:10.1016/j.chom.2020.03.011

Carneiro MB, Vaz LG, Afonso LCC, Horta MF, Vieira LQ (2021) Regulation of macrophage subsets and cytokine production in leishmaniasis. *Cytokine* 147:155309 doi:10.1016/j.cyto.2020.155309

Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M (1994) Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods* 174(1-2):231-5

Costa DL, et al. (2011) BALB/c mice infected with antimony treatment refractory isolate of *Leishmania braziliensis* present severe lesions due to IL-4 production. *PLoS Negl Trop Dis* 5(3):e965 doi:10.1371/journal.pntd.0000965

Figueiredo AB, Souza-Testasica MC, Afonso LCC (2016) Purinergic signaling and infection by *Leishmania*: A new approach to evasion of the immune response. *Biomed J* 39(4):244-250 doi:10.1016/j.bj.2016.08.004

Geeraerts X, Bolli E, Fendt SM, Van Genderachter JA (2017) Macrophage Metabolism As Therapeutic Target for Cancer, Atherosclerosis, and Obesity. *Front Immunol* 8:289 doi:10.3389/fimmu.2017.00289

Gomes CM, et al. (2016) *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* amastigotes from patients with mucosal leishmaniasis have increased ability to disseminate and are controlled by nitric oxide at the early stage of murine infection. *Pathog Dis* 74(4):ftw023 doi:10.1093/femspd/ftw023

Green SJ, Crawford RM, Hockmeyer JT, Meltzer MS, Nacy CA (1990) *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 145(12):4290-7.

Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM (1989) Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med* 169(1):59-72.

Heyde S, et al. CD11c-expressing Ly6C+CCR2+ monocytes constitute a reservoir for efficient *Leishmania* proliferation and cell-to-cell transmission. *PLoS Pathog.* 14(10):e1007374 2018) doi:10.1371/journal.ppat.1007374

Iniesta V, et al. (2005) Arginase I induction during *Leishmania major* infection mediates the development of disease. *Infect Immun* 73(9):6085-90 doi:10.1128/IAI.73.9.6085-6090.2005

Iniesta V, Gomez-Nieto LC, Corraliza I (2001) The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J Exp Med* 193(6):777-84 doi:10.1084/jem.193.6.777

Iniesta V, et al. (2002) Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol* 24(3):113-8 doi:10.1046/j.1365-3024.2002.00444.x

Lee SH, et al. (2018) Mannose receptor high, M2 dermal macrophages mediate nonhealing *Leishmania* major infection in a Th1 immune environment. *J Exp Med* 215(1):357-375 doi:10.1084/jem.20171389

Mears ER, Modabber F, Don R, Johnson GE (2015) A Review: The Current In Vivo Models for the Discovery and Utility of New Anti-leishmanial Drugs Targeting Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 9(9):e0003889 doi:10.1371/journal.pntd.0003889

Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM (2000) M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 164(12):6166-73

Mirkovich AM, Galelli A, Allison AC, Modabber FZ (1986) Increased myelopoiesis during *Leishmania* major infection in mice: generation of 'safe targets', a possible way to evade the effector immune mechanism. *Clin Exp Immunol* 64(1):1-7

Murray PJ, et al. (2014) Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* 41(1):14-20 doi:10.1016/j.immuni.2014.06.008

Oliveira MA, Lima GM, Shio MT, Leenen PJ, Abrahamssohn IA (2003) Immature macrophages derived from mouse bone marrow produce large amounts of IL-12p40 after LPS stimulation. *J Leukoc Biol* 74(5):857-67 doi:10.1189/jlb0302124 jlb0302124 [pii]

Oliveira MAP, et al. (2010) *Leishmania spp.* parasite isolation through inoculation of patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 52(2):83-88 doi:10.1590/S0036-46652010000200005

Paduch K, Debus A, Rai B, Schleicher U, Bogdan C (2019) Resolution of Cutaneous Leishmaniasis and Persistence of *Leishmania* major in the Absence of Arginase 1. *J Immunol* 202(5):1453-1464 doi:10.4049/jimmunol.1801249

Pereira CG, et al. (2009) Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection. *Vet Parasitol* 165(3-4):231-40 doi:S0304-4017(09)00416-6 [pii]10.1016/j.vetpar.2009.07.019

Pires Ada S, et al. (2015) Identification and Biological Characterization of *Leishmania (Viannia) guyanensis* Isolated from a Patient with Tegumentary Leishmaniasis in Goias, a Nonendemic Area for This Species in Brazil. *Biomed Res Int* 2015:350764 doi:10.1155/2015/350764

Rocha FJ, Schleicher U, Mattner J, Alber G, Bogdan C (2007) Cytokines, Signaling Pathways, and Effector Molecules Required for the Control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Mice. *Infect Immun* 75(8):3823-32

Romano A, et al. (2017) Divergent roles for Ly6C+CCR2+CX3CR1+ inflammatory monocytes during primary or secondary infection of the skin with the intra-phagosomal pathogen *Leishmania major*. *PLoS Pathog* 13(6):e1006479 doi:10.1371/journal.ppat.1006479

Schleicher U, et al. (2016) TNF-Mediated Restriction of Arginase 1 Expression in Myeloid Cells Triggers Type 2 NO Synthase Activity at the Site of Infection. *Cell Rep* 15(5):1062-1075 doi:10.1016/j.celrep.2016.04.001

Scorza BM, Carvalho EM, Wilson ME (2017) Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. *Int J Mol Sci* 18(6) doi:10.3390/ijms18061296

Stenger S, Donhauser N, Thuring H, Rollinghoff M, Bogdan C (1996) Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med* 183(4):1501-14 doi:10.1084/jem.183.4.1501

Taylor-Robinson A (2001) Th1/Th2-regulated arginase availability modulates *Leishmania* infection. *Trends Parasitol* 17(6):262 doi:10.1016/s1471-4922(01)02003-7

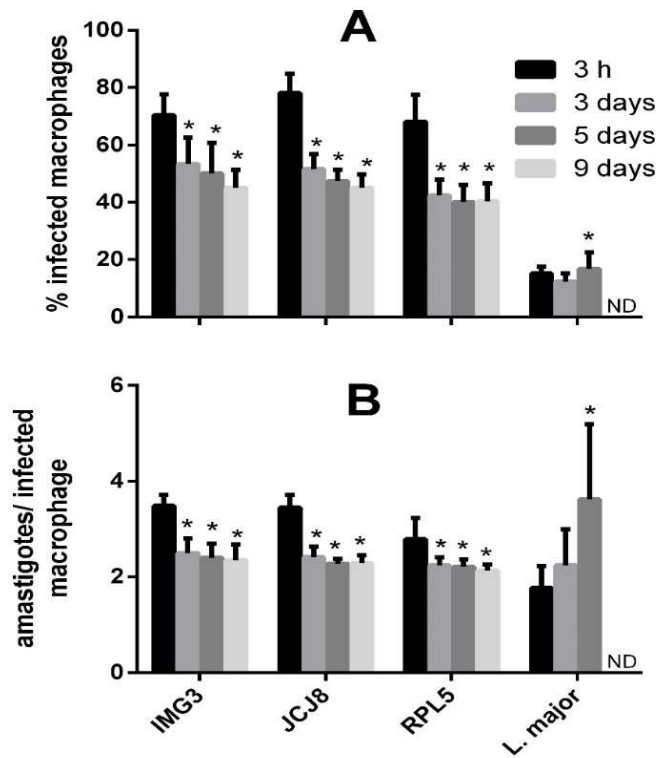


Figure 1. Survival of *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) major* inside macrophages. Bone marrow derived macrophages (BMDM) were infected with stationary phase promastigotes of *L. (V.) braziliensis* (IMG3c, JCJ8c; RPL5c) at the ratio 10:1 (amastigotes: macrophage) or *L. L. major* (Friedlin) at the ratio 2:1. Cells were cultured with promastigotes for 3 h, washed and cultured for until 9 days. The data represent the mean \pm SD of the percentage of infected cells (A) or the number of amastigote/infected cells (B) of from six independent experiments. * indicate difference among 3 hour and later time points by two way Anova followed by Tukey test ($p < 0.05$). ND = Not done.

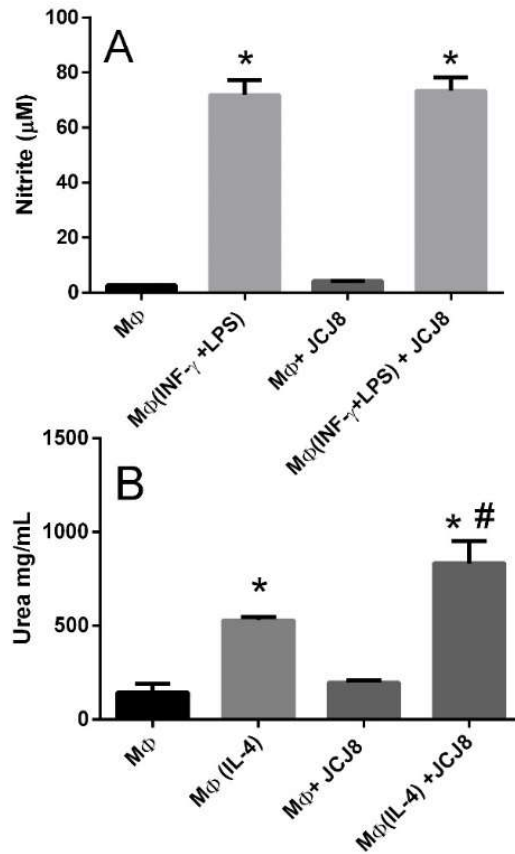


Figure 2. Nitric oxide production and arginase activity of cAMf or AAMf infected with *L. (V.) braziliensis*. Bone marrow derived macrophages (BMDM) were treated with 20 ng/mL of IFN γ + 200 ng/ mL of LPS for 4h (A) or 10 ng/ mL of IL-4 for 20h (B) and then infected with stationary phase promastigotes of *L. (V.) braziliensis* JCJ8c at the ratio 10:1 (amastigotes: macrophage) for 48h. The data represent the mean \pm SD of the nitrite detected in culture supernatant assayed by Griess method (A) or arginase activity measured by urea production assayed by Corraliza method (B) from three independent experiments. * indicate difference among untreated and treated macrophages and # indicate difference between IL-4 treated BMDM with or without leishmania by two-way Anova followed by Tukey test ($p < 0.05$).

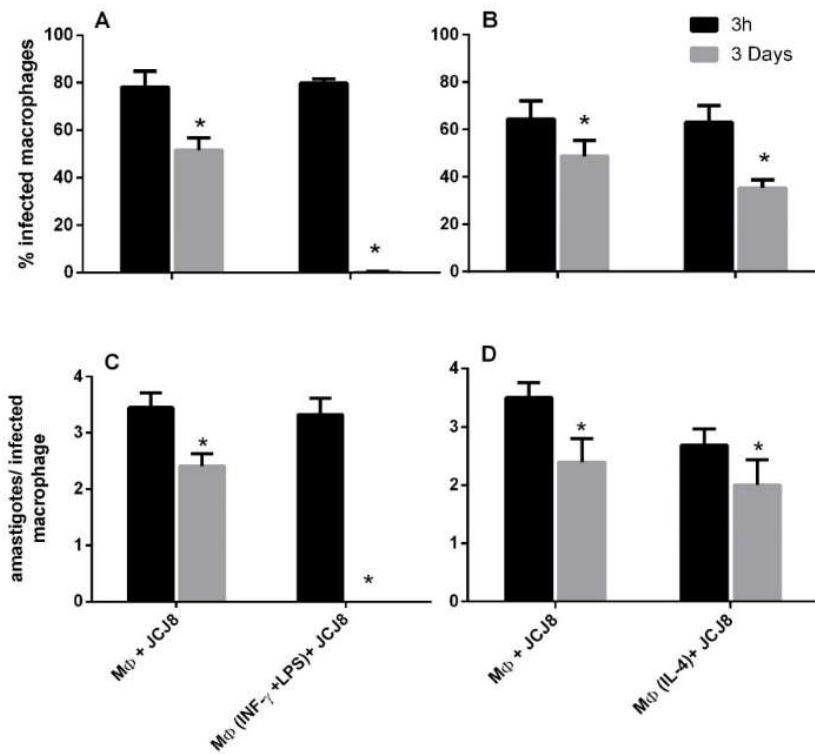


Figure 3. Survival of *L. (V.) braziliensis* inside cAMφ or AAMφ. Bone marrow derived macrophages (BMDM) were treated with 20 ng/mL of IFN γ + 200 ng/ mL of LPS for 4h (A, C) or 10 ng/ mL of IL-4 for 20h (B, D) and infected with stationary phase promastigotes of *L. (V.) braziliensis* JC38c at the ratio 10:1 (amastigotes: macrophage). Cells were cultured with promastigotes for 3 h, washed and cultured for 3 days. The data represent the mean \pm SD of the percentage of infected cells (A, B) or the number of amastigote/infected cells (C, D) of from six independent experiments. *indicate difference between 3 hour and 3 days by Student's *t* test ($p < 0.05$).

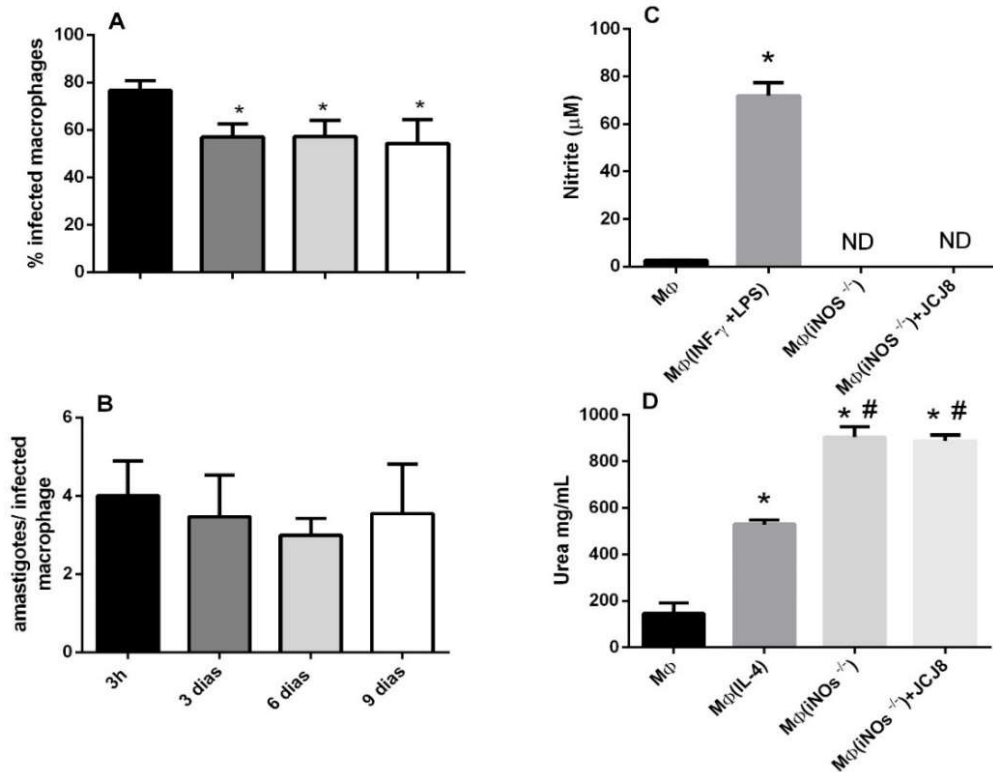


Figure 4. Survival of *L. (V.) braziliensis* inside iNOSKO Mφ. Bone marrow derived macrophages (BMDM) from iNOSKO C57BL/6 mice were infected with stationary phase promastigotes of *L. (V.) braziliensis* JCJ8c at the ratio 10:1 (amastigotes: macrophage). Cells were cultured with promastigotes for 3 h, washed and cultured for until 9 days. The data represent the mean \pm SD of the percentage of infected cells (A) or the number of amastigote/infected cells (B) of from four independent experiments. * indicate difference among 3 hour and later time points by two way Anova followed by Tukey test ($p < 0.05$). (C) BMDM from WT or iNOSKO C57BL/6 mice were treated with 20 ng/mL of IFN γ + 200 ng/ mL of LPS for 4h or (D) 10 ng/ mL of IL-4 for 20h and then infected with stationary phase promastigotes of *L. (V.) braziliensis* JCJ8c at the ratio 10:1 (amastigotes: macrophage) for 48h. The data represent the mean \pm SD of the nitrite detected in culture supernatant assayed by Griess method (D) or arginase activity measured by urea production assayed by Corraliza method (B) from three independent experiments. * indicate difference among untreated and treated macrophages and # indicate difference among iNOSKO Mφ and IL-4 treated Mφ by two-way Anova followed by Tukey test ($p < 0.05$).

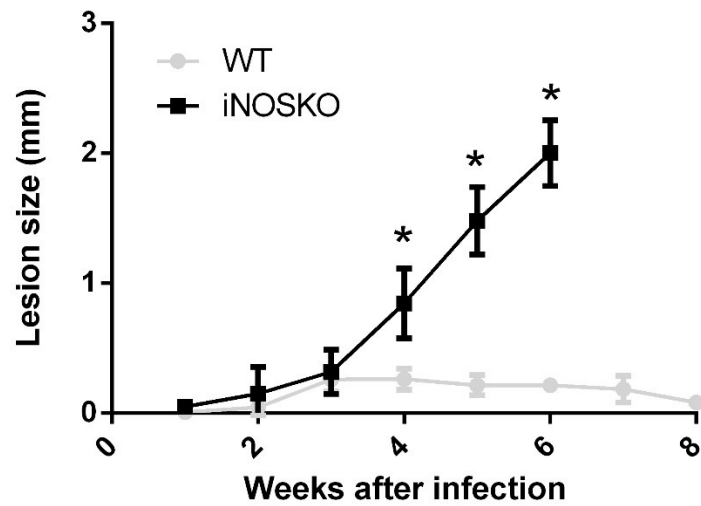


Figure 5: Lesion size triggered in WT and iNOSKO mice by *L. (V.) braziliensis*. Paw swelling of WT (gray) and iNOSKO mice (black) was followed weekly after infection with 1,000,000 stationary phase promastigotes of *L. (V.) braziliensis* JCJ8c. The values presented are the mean \pm SD of the difference between the infected and contralateral paw of a representative experiment from three independent experiments with 3 mice each. * indicate difference between WT and INOSKO mice lesions at the same week by Student's *t* test ($p < 0.05$).