



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Bianca Domingues Ventura

Comparação do perfil dos macrófagos oriundos de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) major*

Rio de Janeiro

2023

Bianca Domingues Ventura

**Comparação do perfil dos macrófagos oriundos de camundongos BALB/c infectados
com *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) major***

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia, da Universidade do
Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Sílvia Amaral Gonçalves da Silva

Rio de Janeiro

2023

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

V469 Ventura, Bianca Domingues.

Comparação do perfil dos macrófagos oriundos de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) major* / Bianca Domingues Ventura. - 2023.

75 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. *Leishmania braziliensis* – Imunologia. 2. Macrófagos Peritoneais – Imunologia. 3. *Leishmania major* – Imunologia – Teses. 4. Leishmaniose – Fisiopatologia – Teses. I. Silva, Silvia Amaral Gonçalves da. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.993.161

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Bianca Domingues Ventura

**Comparação do perfil dos macrófagos oriundos de camundongos BALB/c infectados
com *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) major***

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia, da Universidade do
Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 06 de outubro de 2023.

Banca Examinadora:.

Prof.^a Dra. Patrícia Maria Lourenço Dutra
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Eduardo Fonseca Pinto
Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dra. Wânia Ferraz Pereira Manfro
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Luciana Silva Rodrigues
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva (Orientadora)
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Rio de Janeiro

2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe pelo amor e dedicação para que eu alcançasse os privilégios e tivesse uma qualidade de vida melhor através da educação.

Aos membros da família que se orgulham e me apoiam.

Ao meu marido, Pablo Feliz pelo amor, companheirismo, amizade e por me incentivar a seguir em busca da felicidade e dos meus sonhos nos momentos mais difíceis.

Agradeço, especialmente, a minha querida orientadora Dra. Silva Amaral. Pela oportunidade de desenvolver esse projeto, por compartilhar seus conhecimentos, pela sua dedicação e pelos conselhos e repreenções que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos meus companheiros de pesquisa, especialmente, a Rosiane Freire, Shay Gomes, Ludmila Rocha, Bruno Azevedo, Aline Delmondes e Raquel Albuquerque pelas trocas construtivas, pelas risadas diárias, pelas conversas, por todo auxílio quando foi preciso e por dividir as aflições diante dos desafios que nós, pesquisadores brasileiros, enfrentam por acreditar na ciência e no seu potencial para melhorar a nossa sociedade.

À todo o grupo do laboratório de imunofarmacologia parasitária.

À Francis Monique Saraiva por compartilhar os ensinamentos do método de dosagem de proteínas e me auxiliar nas dosagens das minhas amostras.

Ao Vínicius Lisboa e Roberto Stefan Ribeiro pelas leituras das amostras dos experimentos de citometria e por me confortarem diante da frustração com os experimentos que não deram certo.

À todos os professores e técnicos que contribuíram para a minha formação.

Aos membros da banca por terem aceitado o convite e pelo enriquecimento do meu trabalho através da avaliação.

Aos meus amigos que por diversas vezes me ouviram, me consolaram, me incentivaram a lutar pelo o que eu desejo e acredito e, que fazem a minha vida mais divertida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil pelo apoio financeiro.

RESUMO

VENTURA, Bianca Domingues. **Comparação do perfil dos macrófagos oriundos de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) major***. 2023. 75 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

A infecção por *Leishmania* sp. produz um variado espectro de manifestações clínicas em humanos e animais. Os estudos usando modelos animais são valiosos para ajudar na compreensão da relação entre parasito-hospedeiro. Camundongos BALB/c são susceptíveis a infecção pela maioria das espécies de *Leishmania*, entretanto são considerados resistentes à *L. braziliensis*, pois apresentam pequenas lesões que regredem em poucas semanas. O macrófago é a célula hospedeira principal do parasito e também a célula efetora final, capaz de controlar a infecção. A resistência à infecção se correlaciona com uma resposta Th1 envolvendo macrófagos com fenótipo M1, enquanto a susceptibilidade à Th2-M2, sendo essa dicotomia Th1-Th2 bem evidenciada, sobretudo para infecção com *L. major*. O objetivo desse estudo foi avaliar comparativamente o perfil dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* e *L. major* na orelha. Os macrófagos peritoneais foram analisados em três momentos diferentes da infecção 7, 15 e 21 dias após infecção (DPI). Nossos resultados mostraram que os animais infectados com *L. braziliensis* são capazes de controlar totalmente a lesão em 21 DPI, com pico em 15 DPI, como esperado. Os animais infectados com *L. major* desenvolveram lesões que aumentaram de forma progressiva. Macrófagos de BALB/c infectados com *L. braziliensis* apresentaram capacidade de controlar o número de amastigotas, quando infectados *in vitro* e aumentaram a produção de NO com 15 DPI. Analisamos as subpopulações de grandes macrófagos peritoneais (LPM) e pequenos macrófagos peritoneais (SPM) e observamos que a infecção com *L. braziliensis*, promoveu uma maior frequência dos marcadores M1, principalmente em 7-15 DPI quando comparado com *L. major*. A maior frequência de LPM com fenótipo M1 até 15 DPI e a produção de NO pode ter colaborado para a resolução da lesão e o perfil resistência dos camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*. Do mesmo modo, os SPM que correspondem a menor população, também apresentaram um perfil M1. No geral, estes resultados concordam com a ideia de que a resistência à infecção por *L. braziliensis* se correlaciona com a indução de macrófagos classicamente ativados (M1), enquanto a infecção com *L. major* se correlaciona com a presença de macrófagos alternativamente ativados (M2) e não controle da infecção.

Palavras-chave: BALB/c; macrófagos; *Leishmania (V.) braziliensis*; *Leishmania (L.) major*.

ABSTRACT

VENTURA, Bianca Domingues. *Comparison of the profile of macrophages from BALB/c mice infected with Leishmania (V.) braziliensis and Leishmania (L.) major*. 2023. 75 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Infection with *Leishmania* sp. produces a varied spectrum of clinical manifestations in humans and animals. Studies using animal models are valuable in helping to understand the parasite-host relationship. BALB/c mice are susceptible to infection by most *Leishmania* species, however they are considered resistant to *L.braziliensis*, as they present small lesions that regress in a few weeks. The macrophage is the main host cell of the parasite and also the final effector cell, capable of controlling the infection. Resistance to infection correlates with a Th1 response involving macrophages with an M1 phenotype, while susceptibility to Th2-M2, this dichotomy being well evidenced especially for infection with *L. major*. The objective of this study was to comparatively evaluate the profile of peritoneal macrophages in BALB/c mice infected with *L. braziliensis* and *L. major* in the ear. Peritoneal macrophages were analyzed at three different times of infection 7, 15 and 21 days after infection (DPI). Our results showed that animals infected with *L. braziliensis* are able to fully control the lesion at 21 DPI, peaking at 15 DPI, as expected. Animals infected with *L. major* developed lesions that progressively enlarged. BALB/c macrophages infected with *L. braziliensis* showed the ability to control the number of amastigotes when infected *in vitro* and increased NO production at 15 DPI. We analyzed the subpopulations of large peritoneal macrophages (LPM) and small peritoneal macrophages (SPM) and observed that infection with *L. braziliensis* promoted a higher frequency of M1 markers, especially at 7-15 DPI when compared to *L. major*. The higher frequency of LPM with M1 phenotype up to 15 DPI and the production of NO may have contributed to the resolution of the lesion and the resistance profile of BALB/c mice infected with *L. braziliensis*. In the same way, the SPM that correspond to the smallest population, also showed an M1 profile. Overall, these results agree with the idea that resistance to *L.braziliensis* infection correlates with the induction of classically activated macrophages (M1), while infection with *L.major* correlates with the presence of alternatively activated macrophages (M2) and uncontrolled infection.

Keywords: BALB/c; macrophages; *Leishmania (V.) braziliensis*; *Leishmania (L.) major*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Endemicidade da leishmaniose cutânea no mundo.	14
Figura 2 – Endemicidade de leishmaniose visceral no mundo.	15
Figura 3 – Casos de leishmaniose cutânea e mucosa.	16
Figura 4 – Casos de leishmaniose visceral.	17
Figura 5 Representação esquemática das principais organelas intracelulares das formas promastigota (esquerda) e amastigota (direita) do parasito <i>Leishmania</i>	18
Figura 6 – Esquema de classificação taxonômica de <i>Leishmania</i>	20
Figura 7 – Representação esquemática do ciclo biológico do parasito.	22
Figura 8 – Formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana.	26
Figura 9 – Papel do macrófago na infecção pela <i>Leishmania</i>	29
Figura 10 – Polarização e plasticidades dos macrófagos.	31
Figura 11 – Origem dos macrófagos peritoneais.	32
Figura 12 – Comportamento das subpopulações de macrófagos peritoneais sob estímulo.	33
Figura 13 – Desenho experimental.	36
Figura 14 – Atividade anti- <i>Leishmania</i>	39
Figura 15 - Desenvolvimento da lesão na orelha de camundongos BALB/c infectados com <i>L. braziliensis</i> ou <i>L. major</i>	43
Figura 16 – Lesão na orelha de camundongo BALB/c infectado.	44
Figura 17 – Capacidade microbicida de macrófagos oriundos de animais infectados <i>in vivo</i>	45
Figura 18 – Produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongo BALB/c infectados com <i>L. braziliensis</i> ou <i>L. major</i>	47
Figura 19 – Produção de citocinas por macrófagos de camundongo BALB/c infectados com <i>L. major</i>	49
Figura 20 – População LPM e SPM de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados.	51
Figura 21 – Porcentagem de macrófagos LPM e SPM de camundongos BALB/c infectados com <i>L. braziliensis</i> ou <i>L. major</i>	52
Figura 22 – Frequência de macrófagos LPM expressando marcadores para fenótipo M1 e M2.	54
Figura 23 – Intensidade média de fluorescência (MFI) da população LPM.	55
Figura 24 – Proporção de fenótipo M1 e M2 na população LPM.	57

Figura 25 – População SPM de camundongos BALB/c infectados com <i>L.. braziliensis</i> ou <i>L. major</i>	58
Figura 26 – Frequência de macrófagos SPM expressando marcadores para fenótipo M1 e M2.	59
Figura 27 – Intensidade média de Fluorescência (MFI) da população SPM.....	61
Figura 28 – Proporção de marcadores M1 e M2 na população SPM.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos monoclonais.	41
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag <i>Lb</i>	Antígeno de <i>L. braziliensis</i>
Ag <i>Lm</i>	Antígeno de <i>L. major</i>
ARG-1	Arginase 1
ATRA	Ácido trans retinóico
CD206	Receptor de manose
CD11b	Integrina alfa M
CO ₂	Dióxido de carbono
CCL12	<i>CC motif chemokine ligand</i>
CCL17	<i>CC motif chemokine ligand</i>
CCL18	<i>CC motif chemokine ligand</i>
CCL22	<i>CC motif chemokine ligand</i>
CCL24	<i>CC motif chemokine ligand</i>
DTH	<i>Delayed-type hypersensitivity</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FMO	<i>Fluorescence Minus One Control</i>
IFN- γ	Interferon gama
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina
IL-6	Interleucina
IL-10	Interleucina
IL-12	Interleucina
IL-13	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
<i>Lb</i>	<i>Leishmania braziliensis</i>
<i>Lm</i>	<i>Leishmania major</i>
LTA	Leishmaniose tegumentar Americana
LC	Leishmaniose cutânea
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCDi	Leishmaniose cutânea disseminada
LM	Leishmaniose mucosa

LPS	Lipopolissacarídeo
LV	Leishmaniose visceral
LRV	Vírus de RNA de <i>Leishmania</i>
LPM	<i>Large peritoneal macrophage</i>
M1	Macrófago classicamente ativado
M2	Macrófago alternativamente ativado
MFI	Intensidade média de fluorescência
MHC II	<i>Major histocompatibility complex II</i>
MØB/c + <i>Lb</i>	Macrófagos de camundongo BALB/c infectados com <i>L. braziliensis</i>
MØB/c + <i>Lm</i>	Macrófagos de camundongo BALB/c infectados com <i>L. major</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>
NO ₂ ⁻	Nitrito
NaNO ₂	Nitrito de sódio
OPAS	Organização Pan Americana de Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SFB	Soro fetal bovino
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
SPM	<i>Small peritoneal macrophage</i>
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta
Th1	<i>T helper</i> tipo 1
Th2	<i>T helper</i> tipo 2
VEGF	Fator de crescimento endotelial
VSIG4	<i>V-Set and immunoglobulin domain containing 4</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
γ	gama
$\times$	multiplicação
μg	micrograma
μl	microlitro
μM	micromolar
mL	mililitro
mm	milímetro
nm	nanômetro
$\%$	porcentagem

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	OBJETIVOS	35
1.1	Objetivo geral.....	35
1.2	Objetivos específicos.....	35
2	MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1	Considerações éticas	36
2.2	Parasito e sua manutenção.....	36
2.3	Preparo do antígeno total de <i>Leishmania braziliensis</i> e <i>Leishmania major</i>	37
2.4	Infecção de camundongos BALB/c	37
2.5	Obtenção dos macrófagos e preparo da monocamada	38
2.6	Infecção <i>in vitro</i> e índice de infecção	39
2.7	Imunofenotipagem de macrófagos	40
2.8	Dosagem de óxido nítrico	41
2.9	Dosagem de citocinas.....	42
2.10	Análise gráfica e estatística	42
3	RESULTADOS	43
3.1	Curso da lesão de camundongos BALB/c infectados com <i>L. braziliensis</i> ou <i>L. major</i>	43
3.2	Caracterização do perfil dos macrófagos peritoneais oriundos de camundongos BALB/c infectados com <i>L. braziliensis</i> ou <i>L. major</i>	44
3.1.1	<u>Atividade anti-<i>Leishmania</i></u>	44
3.1.2	<u>Produção de óxido nítrico</u>	46
3.3	Avaliação da produção de citocinas por macrófagos de BALB/c infectados com <i>L. major</i>	48
3.4	Fenotipagem de macrófagos peritoneais provenientes de camundongos BALB/c infectados com <i>L. braziliensis</i> ou <i>L. major</i>	50
4	DISCUSSÃO	63
	CONCLUSÃO.....	68
	REFERÊNCIAS	69

INTRODUÇÃO

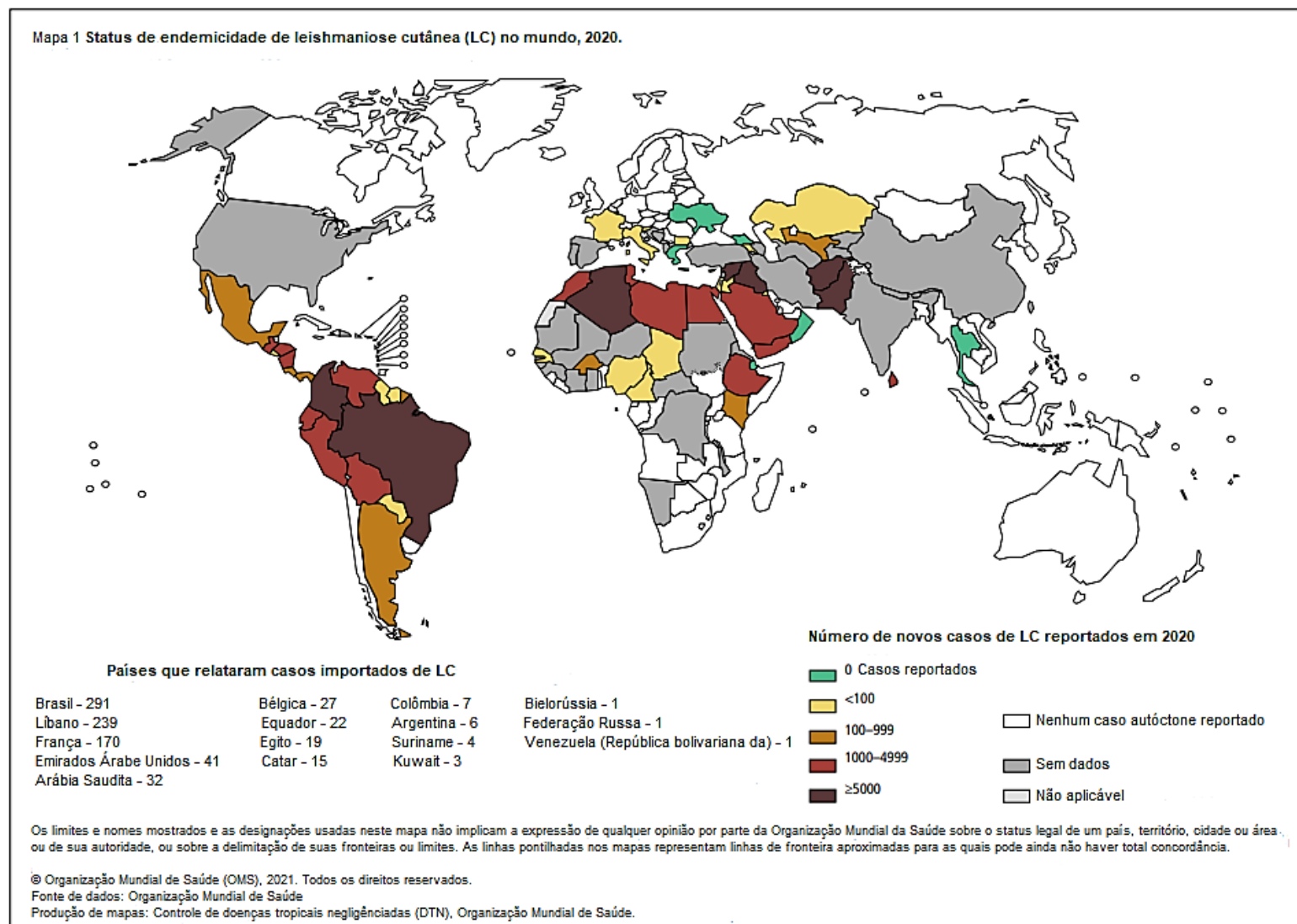
Leishmanioses é o nome dado ao conjunto de doenças antroponozoonóticas causadas por protozoários intracelulares pertencentes ao gênero *Leishmania*. A transmissão da *Leishmania* spp ocorre pela picada de insetos flebotomíneos fêmeas, infectados, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo. Mundialmente, as leishmanioses estão entre as dez principais doenças tropicais negligenciadas com mais de 12 milhões de pessoas infectadas (Akhoundi *et al.*, 2016; OPAS e OMS, 2021). Existem 3 formas principais da doença: leishmaniose visceral, leishmaniose cutânea (localizada ou difusa) e leishmaniose mucosa. Embora a leishmaniose cutânea seja a forma com maior número de casos da doença, a leishmaniose visceral é a forma cujo desfecho clínico mais frequentemente leva a morte, se não for tratada (Daga, Rohatgi e Mishra, 2021; Costa-da-Silva *et al.*, 2022).

As leishmanioses apresentam ampla distribuição geográfica e estão diretamente ligadas à pobreza. Fatores sociais, ambientais e climatológicos influenciam diretamente na epidemiologia dessas doenças que atualmente estão presentes em 99 países, distribuídos nas quatro regiões monitoradas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) que são: Américas, África Oriental, Norte da África e Oeste e Sudeste Asiático. Entre os países endêmicos, considera-se que 89 são endêmicos para leishmaniose cutânea e 80 são endêmicos para leishmaniose visceral. (Figura 1 e 2). (Ruiz-Postigo *et al.*, 2021; OPAS e OMS, 2021).

A leishmaniose visceral (LV) é endêmica em 13 países das Américas, com uma média de 2.488 casos por ano. Em 2021, 93,5% dos casos de LV foram notificados no Brasil. No período de 2001-2021 observou-se uma tendência crescente no números de casos de LV na região das Américas e, posteriormente, houve uma tendência decrescente, sendo registrados 1.799 casos de LV em 2021, o que representa o menor número de casos nesses 20 anos. (OPAS & OMS, 2022). Apesar dessa tendência decrescente do número de casos, devem ser implementadas ações de vigilância e, quando necessário realizar intervenções de saúde pública, pois, as ferramentas de prevenção e controle disponíveis são limitadas.

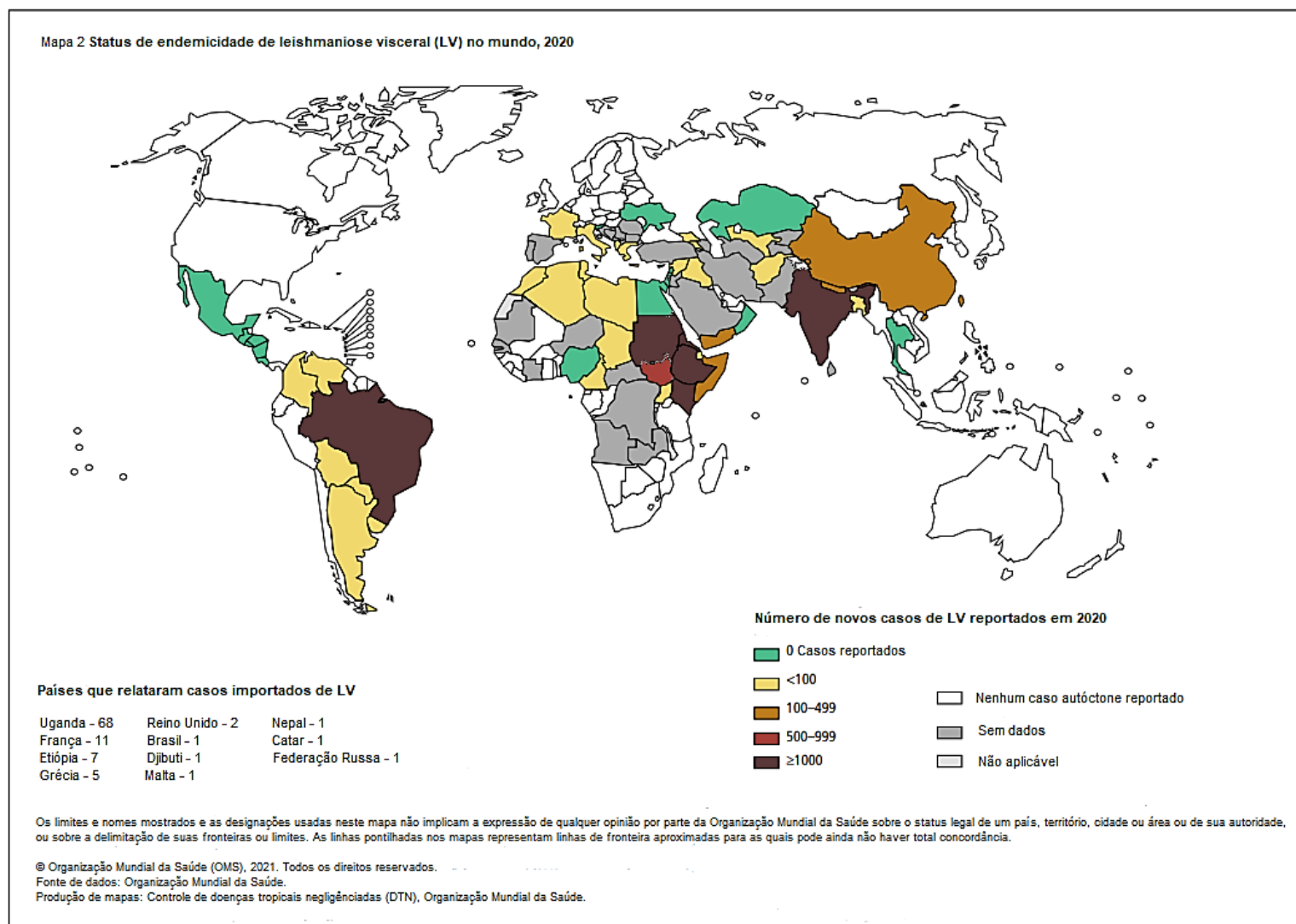
Nas Américas, as formas cutânea e mucosa da doença são endêmicas em 17 países com uma média de 52.645 casos por ano. Em 2021, os países com maior número de casos notificados foram Brasil (756), Colômbia (6.161), Peru (419) e Estado Plurinacional da Bolívia (281), que juntos representam 86% dos casos na Região. (OPAS e OMS, 2022)

Figura 1 – Endemicidade da leishmaniose cutânea no mundo.



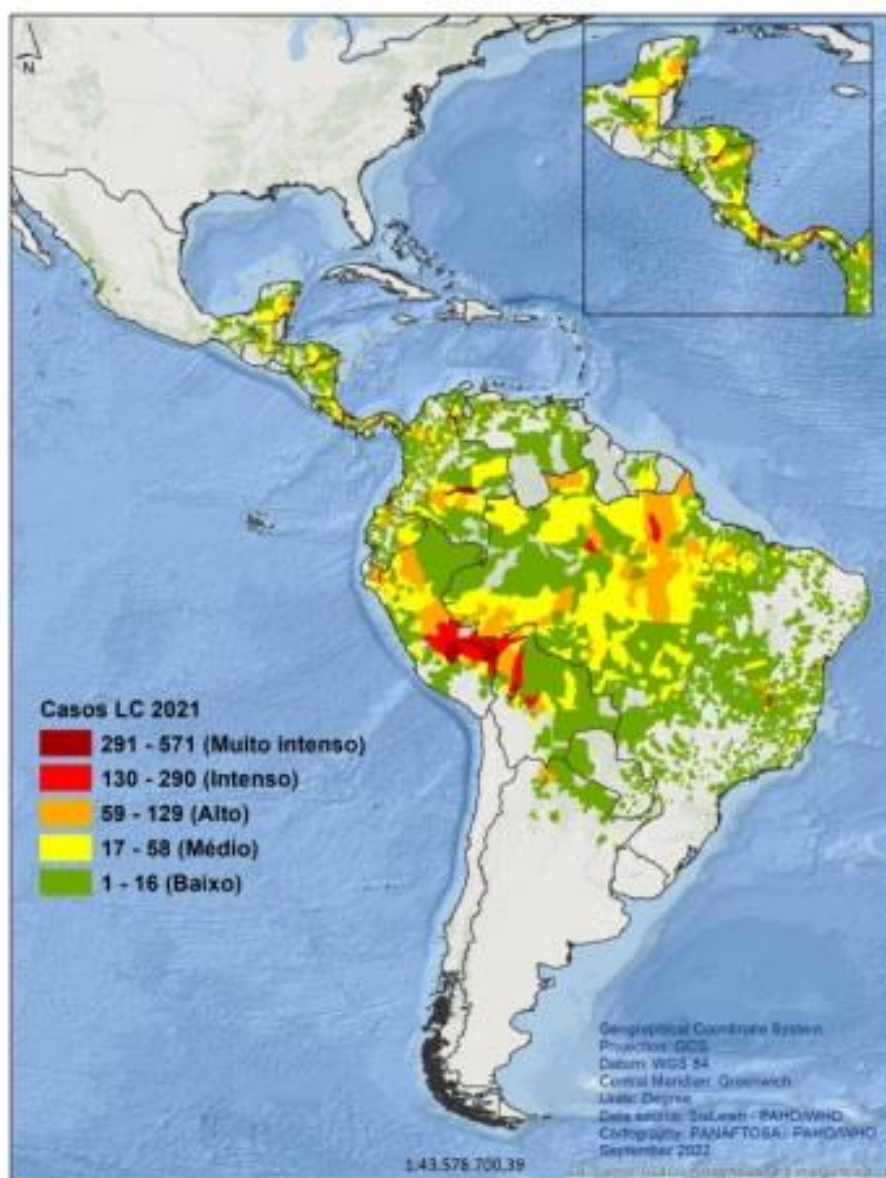
Fonte: Adaptado de OMS, 202

Figura 2 – Endemicidade de leishmaniose visceral no mundo.



Fonte: Adaptado de OMS, 2021.

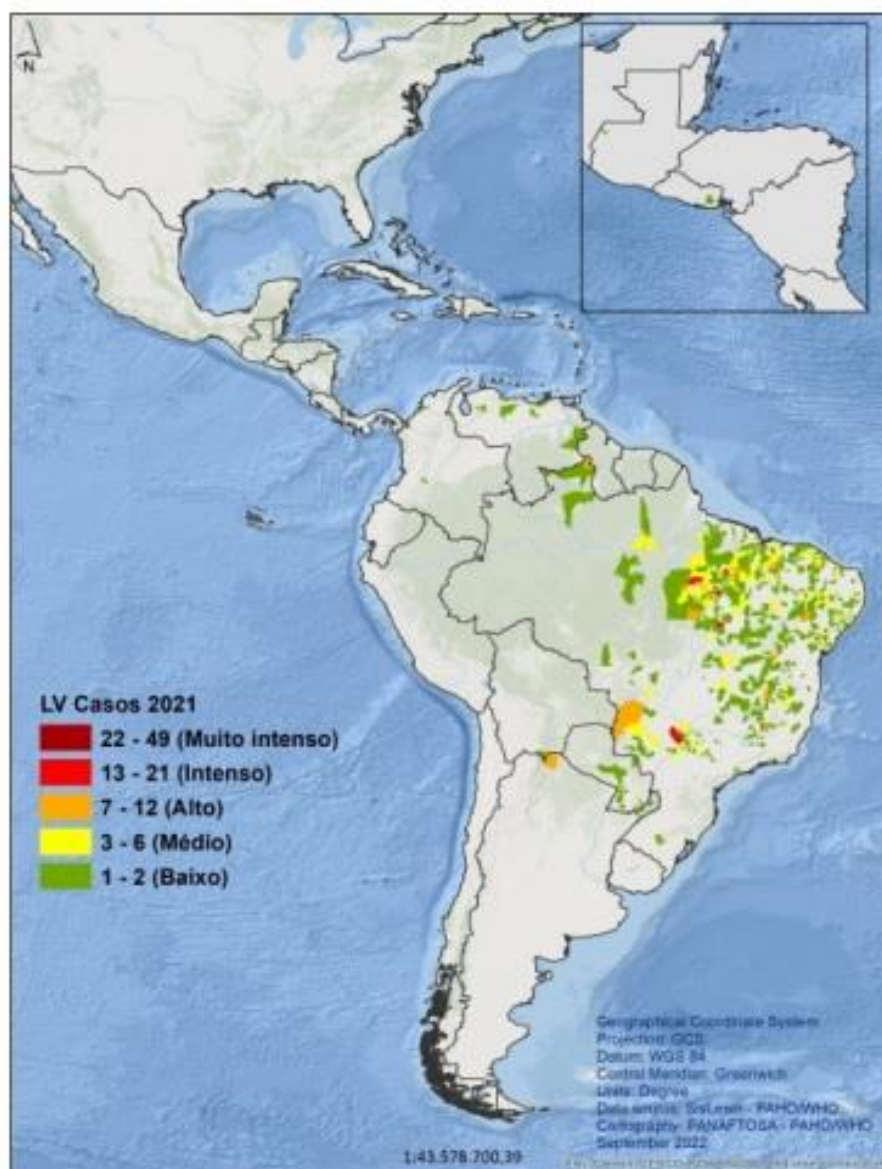
Figura 3 – Casos de leishmaniose cutânea e mucosa.



Legenda: Casos de leishmaniose cutânea e mucosa, segundo nível administrativo subnacional, Região das Américas, 2021.

Fonte: Organização Pan-Americana da Saúde. Sistema de informação regional de leishmaniose (SisLeish). Washington, D.C.

Figura 4 – Casos de leishmaniose visceral.



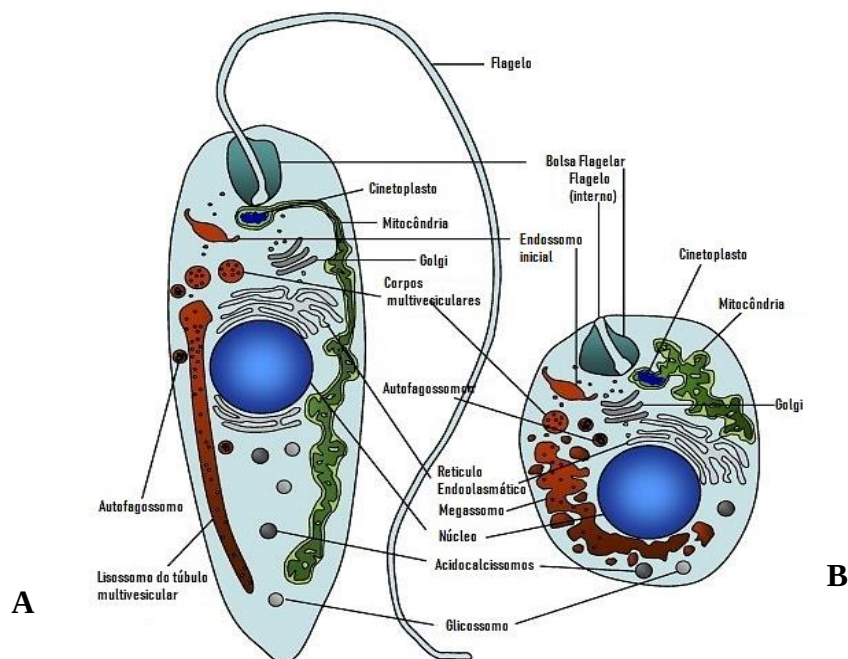
Legenda: Casos de leishmaniose cutânea e mucosa, segundo nível administrativo subnacional, Região das Américas, 2021.

Fonte: Organização Pan-Americana da Saúde. Sistema de informação regional de leishmaniose (SisLeish). Washington, D.C.

O Parasito *Leishmania*

A *Leishmania* é um parasito digenético (heteróximo), cujo o ciclo vital passa por um hospedeiro vertebrado e um hospedeiro invertebrado, apresentando duas formas evolutivas principais: promastigota, encontrada no trato digestório do inseto vetor (ordem Diptera, família Psychodidae, e subfamília Phlebotominae) e amastigota, encontrada em células dos hospedeiros vertebrados (Coura, 2013; Torres-Guerreiro *et al.*, 2017). Estas formas têm em comum um complexo flagelar composto de vacúolo contrátil, bolsa flagelar e flagelo. As amastigotas são arredondadas, com flagelo rudimentar não exteriorizado (Figura 5). As promastigotas são alongadas, apresentam flagelo livre, localizado na região anterior do parasito que possui a extremidade posterior mais afilada (Figura 5). Ambas apresentam um cinetoplasto que consiste no DNA mitocondrial, denominado kDNA (Neves, 2011; Teixeira *et al.*, 2013; Coura, 2013; Conceição-Silva e Alves, 2014).

Figura 5 - Representação esquemática das principais organelas intracelulares das formas promastigota (esquerda) e amastigota (direita) do parasito *Leishmania*.



Legenda: Representação esquemática das formas do parasito. (A) Promastigota; (B) Amastigota.
Fonte: Adaptado de Besteiro *et al.*, 2007.

O gênero *Leishmania* apresenta um grande número de espécies descritas, as quais são classificadas em três subgêneros: O subgênero *Sauroleishmania*, inclui as espécies parasitas de répteis e os subgêneros *Viannia* e *Leishmania* que incluem os parasitos de mamíferos (Figura 6). Esses dois subgêneros foram definidos pelas diferenças observadas no desenvolvimento das formas promastigotas no tubo digestivo do inseto vetor (Shaw e Lainson, 1972; Neves, 2011; Conceição-Silva e Alves, 2014). As espécies classificadas no subgênero *Viannia* desenvolvem-se no intestino posterior do flebotomíneo. Esse grupo inclui apenas as espécies encontradas nas Américas. Já as espécies do subgênero *Leishmania* geralmente se desenvolvem no intestino médio e anterior de flebotomíneos; estão incluídas nesse grupo as espécies que circulam nas Américas, África, Ásia e Europa (Conceição-Silva e Alves, 2014; Barratt, *et al.*, 2017). Com base no comportamento do parasito em cultura e em *hamsters*, Shaw e Lainson (1972) classificaram as espécies de *Leishmania* em 3 complexos: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania mexicana* e *Leishmania donovani*. A classificação das espécies de *Leishmania* em complexos fenotípicos ainda é utilizada porém, outros complexos foram criados e associados a dados obtidos através da filogenia molecular para classificar as espécies. (Figura 6) (Conceição-Silva e Alves, 2014; Akhoundi *et al.*, 2016; Barratt, *et al.*, 2017).

A classificação atual das espécies de *Leishmania* apresenta-se controversa pois, alguns autores consideram que determinadas espécies não são válidas filogeneticamente e ainda não foi possível resolver adequadamente a classificação dessas espécies por causa do número limitado de alguns isolados. Dados moleculares provaram a existência de sinônimas para algumas espécies e de apenas nove grupos monofiléticos. Diante disso, esses grupos apresentam espécies que devem ser tratadas como subespécies. Por exemplo, *L. braziliensis* e *L. peruviana* que passaram a ser subespécies, ao invés de, espécies distintas, assim como, *L. donovani* e *L. infantum*, entre outras. Portanto, o conceito de complexos fenotípicos proposto para classificação das espécies não está adequado e a taxonomia do gênero *Leishmania* permanece complexa. (Fraga *et al.*, 2010; Schönian, Mauricio e Cupolillo, 2010; Akhoundi *et al.*, 2016).

Alguns fatores que dificultam o consenso dos taxonomistas, incluem a recombinação ocasional, inclusive entre espécies diferentes, que confunde as fronteiras entre grupos filogenéticos, o grande número de espécies descritas que, posteriormente, foram consideradas sinônimas, a falta de dados de genotipagem homóloga para todas as espécies, bem como descobertas recentes de novas espécies ou variantes. Diante disso, há uma necessidade para a simplificação taxonômica em nível de espécie, bem como para uma revisão taxonômica em nível de gênero e subgênero que reflita os dados moleculares e filogenéticos (Bruschi e Gradoni, 2018).

Figura 6 – Esquema de classificação taxonômica de *Leishmania*.

Reino

Ordem

Família

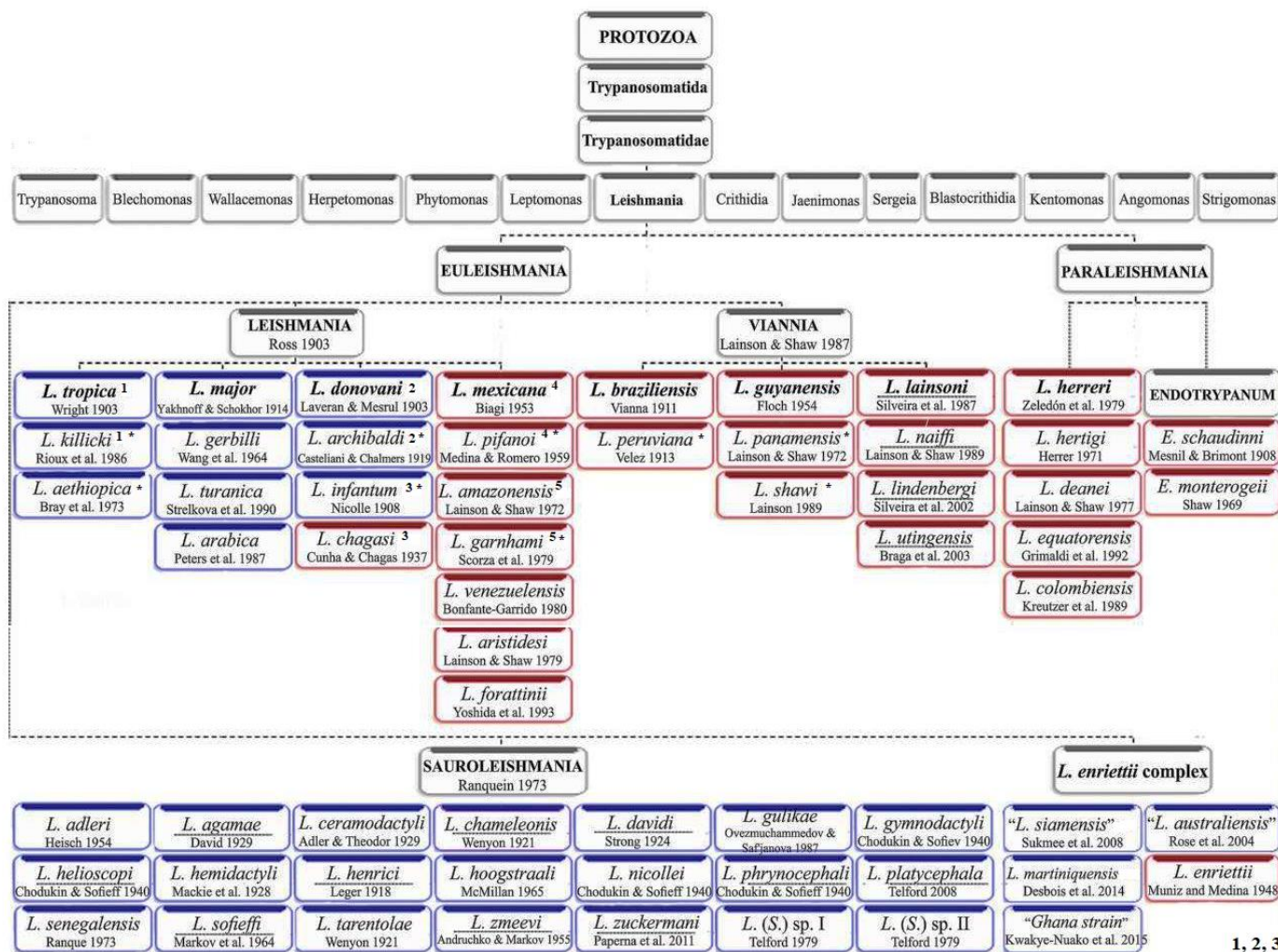
Gênero

Seção

Subgênero

Complexo

Espécies



1, 2, 3, 4, 5 consideradas espécies sinônimas
 * status de espécie em discussão

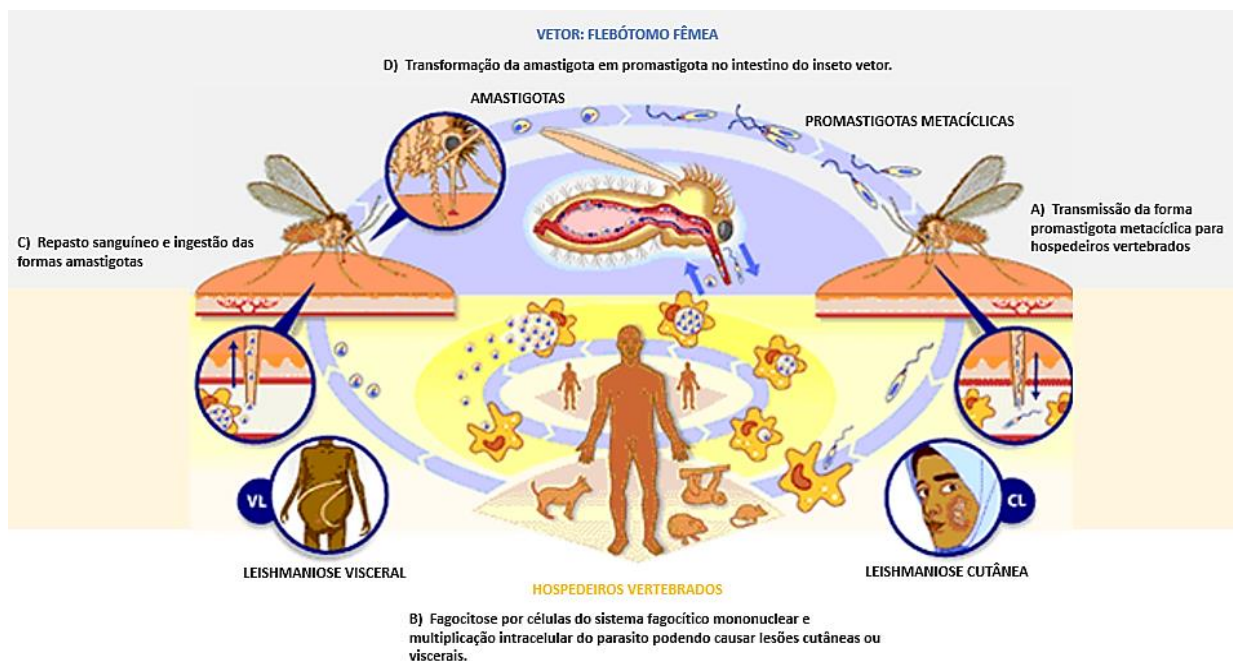
Fonte: Adaptado de Akoundi *et al.*, 2016.

Ciclo Biológico

O ciclo biológico da *Leishmania* (Figura 7) inicia-se durante o repasto sanguíneo do flebótomo fêmea infectado no hospedeiro vertebrado. As formas promastigotas são regurgitadas na junção derme-epiderme dos hospedeiros vertebrados, que são uma variedade de mamíferos como, roedores, xenartros, marsupiais, canídeos e primatas incluindo os humanos. (Neves, 2011; Conceição-Silva & Alves, 2014). Ao serem internalizadas por células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), sobretudo macrófagos, as promastigotas diferenciam-se em amastigotas no interior do vacúolo parasitóforo dessas células. No interior do vacúolo, as amastigotas multiplicam-se por divisão binária até que a célula hospedeira lise e as amastigotas livres possam invadir novas células (Figura 7).

A infecção para o hospedeiro invertebrado ocorre pela ingestão das amastigotas presentes no sangue ou na derme, no momento do repasto sanguíneo em indivíduo ou animal infectado. No intestino do inseto vetor, as amastigotas sofrem alterações morfológicas e bioquímicas e, diferenciam-se nas formas denominadas promastigotas procíclicas não-infectantes. Essas formas procíclicas multiplicam-se e se transformam em promastigotas metacíclicas que possuem capacidade infecciosa, o que permite a transmissão do parasito para um novo hospedeiro (Figura 7). (Conceição-Silva e Alves, 2014; Geiger *et al.*, 2016).

Figura 7 – Representação esquemática do ciclo biológico do parasito.



Legenda: Ciclo biológico. (A) Formas promastigotas metacíclicas regurgitadas por flebótomos fêmeas infectados na junção derme-epiderme do hospedeiro vertebrado; (B) Formas promastigotas fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente por macrófagos. As promastigotas diferenciam-se em amastigotas no interior do vacúolo parasitóforo dessas células. No interior do vacúolo, as formas amastigotas multiplicam-se por divisão binária até que a célula hospedeira lise e as amastigotas livres possam invadir novas células; (C) Durante o repasto sanguíneo, o inseto vetor ingere as formas amastigotas presentes no sangue ou na derme do indivíduo ou animal infectado; (D) No intestino do inseto vetor, as formas amastigotas se diferenciam em promastigotas próclicas que não tem capacidade infectante e posteriormente, as formas próclicas se diferenciam em promastigotas metacíclica, que possuem capacidade infectante, podendo ser transmitidas para um novo hospedeiro.

Fonte: Adaptado de OMS, 2017.

Formas clínicas das leishmanioses e aspectos da resposta imune

A Leishmaniose ocorre em humanos e diversas espécies de animais silvestres e domésticos, podendo se manifestar de diferentes formas, acometendo a pele, as mucosas ou atuar de maneira sistêmica. O estabelecimento das formas clínicas da doença depende do tropismo da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção (viscetrópicas ou dermatrópicas) e da resposta imune do hospedeiro (Conceição-Silva e Alves, 2014; Scott e Novais, 2016; Costa-da-Silva *et al.*, 2022).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é classificada de acordo com as principais manifestações clínicas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose cutânea disseminada (LCDi) (Figura 8). A LC manifesta-se como uma lesão ulcerada de bordos elevados, fundo plano e superfície granulosa, geralmente autolimitada que se desenvolve no local da inoculação do parasito. A infecção pode se desenvolver de forma atípica devido ao tipo e magnitude da resposta imunológica do hospedeiro vertebrado e da espécie do parasito, produzindo as formas mucosa ou difusa (Scott e Novais, 2016; Costa-da-Silva *et al.*, 2022). Também pode ocorrer a forma disseminada da doença (LCDi) caracterizada pela presença de inúmeras lesões, geralmente pequenas e distribuídas por várias regiões da pele. Na LCD ocorre a disseminação das lesões assim como na LCDi, porém, nesse caso essas tendem à forma tuberosa, sem ulceração. A LCD é uma condição rara em que as lesões estão repletas de parasitas e se caracteriza por múltiplos nódulos, pápulas ou tubérculos. A LM geralmente apresenta destruição tecidual progressiva que abrange a mucosa nasal, oral, faringe e laringe. Essa lesão geralmente surge semanas ou anos após o desaparecimento da lesão cutânea inicial, por disseminação hematogênica ou linfática, a partir do foco primário (Conceição-Silva e Alves, 2014; Brasil, 2017; Costa-da-Silva *et al.*, 2022). Também pode ocorrer concomitantemente à lesão cutânea (Costa *et al.*, 2014, Ávila *et al.*, 2018).

Aproximadamente, vinte e duas espécies de *Leishmania* são patogênicas, podendo causar diferentes formas de leishmaniose que variam em gravidade, desde lesões cutâneas até infecções sistêmicas. A LC é a forma mais comum, sendo causada principalmente por *L.(L.) major*, *L.(L.) tropica* e *L.(L.) aethiopica* no Velho Mundo e por *L.(L.) mexicana*, *L.(L.) amazonensis*, *L.(V.) braziliensis*, *L.(V.) panamensis* e *L.(V.) guyanensis* no Novo Mundo (Daga, Rohatgi & Mishra, 2021; Costa-da-Silva *et al.*, 2022).

No Brasil já foram identificadas sete espécies em ambos os subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*, cujas as mais documentadas são: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Brasil, 2017).

A resposta imune nas formas tegumentares da leishmaniose é complexa pois, a doença é espectral, com ampla variação de manifestações clínicas que vai desde a cura espontânea à doenças crônicas desfigurantes. Essa variação é consequência de vários fatores que dependem da espécie e das adaptações do parasito, além de, fatores ambientais e da resposta imune do hospedeiro (Conceição-Silva e Alves, 2014). Na leishmaniose, muito do que se conhece sobre a resposta imune do hospedeiro ao parasito é oriundo dos estudos em modelos experimentais de infecção usando camundongos, sobretudo dos estudos da resposta imune em camundongos infectados por *Leishmania major* (Scott *et al.*, 1988; Sacks e Noben-Trauth, 2002). A partir desses estudos, foi reconhecida a importância da regulação diferencial das subpopulações dos linfócitos T CD4 determinando o controle ou resistência à infecção. Neste sentido o controle da infecção está associado a uma resposta imune mediada por células T *helper* tipo 1 (Th1), com produção de citocinas pró-inflamatórias e ativação de macrófagos. Por outro lado, a susceptibilidade está associada a uma resposta envolvendo células T *helper* tipo 2 (Th2), produção de anticorpos e não ativação de macrófagos (De Moura *et al.*, 2005; Conceição-Silva e Alves, 2014; Loeuillet, Bañuls e Hide; 2016; Scott e Novais, 2016; Rossi e Fasel, 2018).

De forma similar, nos pacientes com leishmaniose tegumentar também foi observado um espectro imunológico que varia de indivíduos com forte resposta de células T, caracterizada por intensa reação de hipersensibilidade tardia (DTH) aos antígenos de *Leishmania* (resposta mediada por células) e altos níveis de interferon gama (IFN- γ), a indivíduos com DTH negativa mas, que apresentam altos níveis de anticorpos. Entre esses extremos estão os indivíduos com lesões que podem se auto curar ou tornar-se crônicas associado a níveis intermediários de anticorpos e resposta DTH positiva (Carvalho *et al.*, 1994; Scott e Novais, 2016; Carvalho, Bacellar e Carvalho, 2022). Portanto, indivíduos que apresentam resposta DTH positiva cursam com a forma clínica LC, com certo controle da multiplicação do parasito, sem danos importantes ao tecido, podendo apresentar cura espontânea. Por outro lado, indivíduos com resposta DTH exacerbada podem evoluir para LM, apresentando poucos parasitos na lesão e grande destruição tecidual. Em contraste, indivíduos com LCD não apresentam resposta imune celular específica, pois são anérgicos aos antígenos de *Leishmania*, resultando em resposta DTH negativa e na incapacidade de controlar a carga parasitária (Scott e Novais, 2016)

Além disso, estudos mostram que as espécies de *Leishmania* pertencentes ao subgênero *Viannia* possuem em seu genoma um vírus de RNA (LRV), o qual tem sido associado a gravidade da leishmaniose cutânea. Posteriormente, foi identificada uma outra espécie de LRV presente em espécies do subgênero *Leishmania*, como a *Leishmania major* (LRV2), sugerindo um papel ainda maior do LRV na determinação do curso da infecção, pois o LRV2 pode induzir respostas de citocinas pró-inflamatórias semelhantes às observadas anteriormente com o LRV1 das espécies do subgênero *Viannia*. Assim, a presença de LRV dentro de *Leishmania* sp. pode ser um dos fatores implicados na gravidade da doença devido a subversão da resposta imune do hospedeiro. (Ives *et al.*, 2011; Márquez e Roossinck, 2012; Zangger *et al.*, 2013; Zangger *et al.*, 2014; Rossi e Fasel, 2018; Grybchuk *et al.*, 2018; De Carvalho *et al.*, 2021).

Com isso, as evidências sugerem que o paradigma Th1-Th2 sozinho não explica completamente a patogênese. Além da resposta adaptativa, a importância da resposta imune inata como determinante do curso da infecção também tem sido alvo de estudos (Novais *et al.*, 2009; Gonçalves *et al.*, 2011; Giudice *et al.*, 2012; Novais *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2016; Scott & Novais, 2016; Costa-da-Silva *et al.*, 2022), uma vez que, o perfil de macrófagos M1 tem sido relacionado a resistência e o perfil M2 a susceptibilidade à infecção pela *Leishmania* sp. Além disso, os neutrófilos podem modular os fenótipos dos macrófagos e contribuir para uma resposta Th1-M1 ou Th2-M2 dependendo do contexto de ativação (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000; Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004; Carlsen *et al.*, 2015; Vellozo, Ribeiro-Gomes e Lopes, 2022; Almeida *et al.*, 2023).

Figura 8 – Formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana.



Legenda: Formas clínicas da leishmaniose tegumentar. (A) leishmaniose cutânea localizada; (B) leishmaniose cutânea mucosa; (C) leishmaniose cutânea difusa e (D) leishmaniose cutânea disseminada
Fonte: Brasil, 2006.

Modelos experimentais na leishmaniose tegumentar

A *Leishmania* (V.) *braziliensis* é uma espécie com relevância epidemiológica por apresentar ampla distribuição nas Américas (Brasil, 2017), possuir variabilidade genética (Ishikawa *et al.*, 2002; Cupolillo *et al.*, 2003; De Oliveira *et al.*, 2004; Lessa *et al.*, 2007) estando associada as manifestações clínicas LC, LCDi e LM. Estas últimas com menor resposta terapêutica e recidiva mais frequente (Barral, 2011; Brasil, 2017). Além disso, a *Leishmania* (V.) *braziliensis* apresenta variada virulência entre as diferentes cepas do parasito, que pode influenciar na resposta imunológica do hospedeiro, contribuindo para o diversificado espectro de manifestações clínicas (De Oliveira *et al.*, 2004; Bacellar *et al.*, 2011; De Oliveira e Brodskn, 2012; Conceição-Silva e Alves, 2014; Cysne- Finkelstein *et al.*, 2018).

A maioria das linhagens de camundongos, incluindo o BALB/c, são consideradas resistentes a infecção causada por *L. (V.) braziliensis* e outras espécies do subgênero *Viannia*. Essa refratariedade tem sido associada a incapacidade da *L. (V.) braziliensis* inibir a resposta imune Th1 nesses animais (De Moura *et al.*, 2005; Natale, Mello e Manzoni de Almeida, 2016; Dutra e Da Silva, 2017).

Camundongos BALB/c ou C57BL/6 infectados com *Leishmania* (V.) *braziliensis* apresentam pequenas lesões que se resolvem espontaneamente em poucas semanas (De Krey, Lima e Titus, 1998; De Moura *et al.*, 2005; De Araújo *et al.*, 2014). Entretanto, camundongos C57BL/6 knockout para TNF ou para iNOS, quando infectados com *L. (V.) braziliensis*, não controlam a lesão (Rocha *et al.*, 2007). Estudos mostram que macrófagos de BALB/c co-cultivados com neutrófilos são capazes de reduzir o parasitismo intracelular por *L. (V.) braziliensis* (Novais *et al.*, 2009). Neste contexto, o neutrófilo seria ativado pelo parasito e promoveria um ambiente inflamatório favorável ao controle da infecção (Falcão *et al.*, 2015). Entretanto, ainda se conhece pouco acerca da resposta imune inata e da funcionalidade dos macrófagos de camundongos BALB/c frente a infecção pela *L. (V.) braziliensis*.

Polarização e plasticidade fenotípica de macrófagos

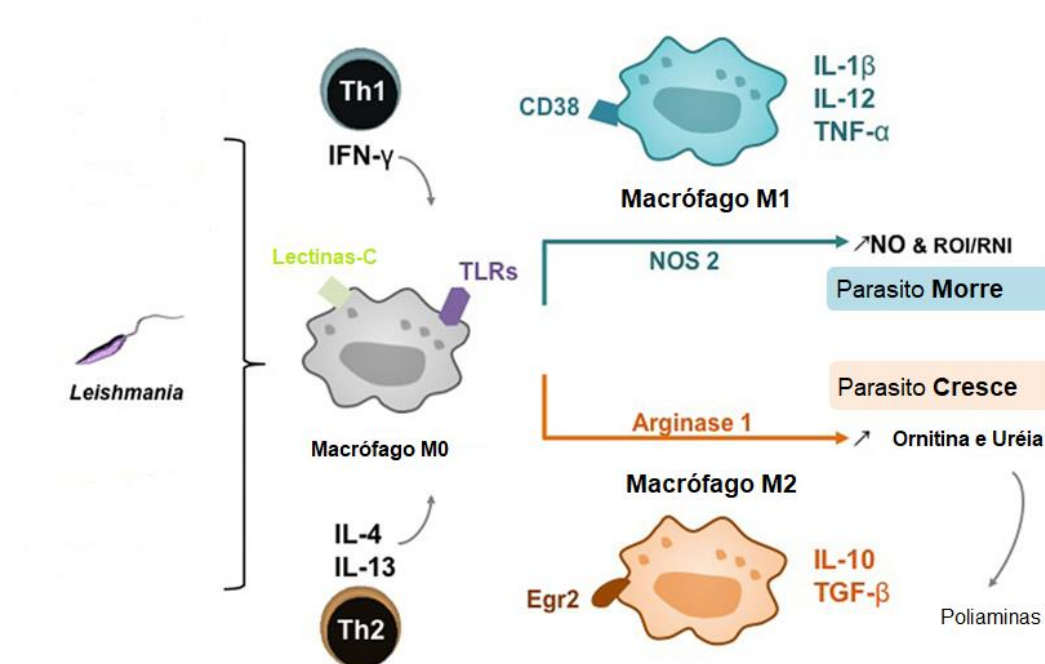
O macrófago é a principal célula hospedeira para a *Leishmania* sp. e também são células efetoras, capazes de controlar a infecção (Novais *et al.*, 2009; Giudice *et al.*, 2012; Novais *et al.*, 2014; Scorsa, Carvalho e Wilson, 2017). Como ocorre em outras células do sistema imune, os macrófagos apresentam uma plasticidade fenotípica, podendo sofrer diferenciação em macrófagos classicamente ativados (M1 ou fenótipo CAM) e macrófagos alternativamente ativados (M2 ou fenótipo AAM) dependendo do contexto de ativação.

Os macrófagos M1 resultam da ativação pelo IFN- γ e apresentam alta capacidade fagocítica, de apresentação de antígenos e microbicida (Figura 9). São produtores de espécies reativas do oxigênio (ROS), óxido nítrico (NO) e citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 12 (IL-12) e interleucina 1 beta (IL-1 β) (Italliani e Boraschi, 2014; Costa-da-Silva *et al.*, 2022; Almeida *et al.*, 2023). O IFN- γ produzido durante a resposta por células Th1 ativa a enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) que converte L-arginina em citrulina e NO, além de aumentar ROS (Conceição-Silva e Alves, 2014; Holzmuller *et al.*, 2018).

Os macrófagos M2 são originados por estímulo de citocinas como IL-4 e IL-13. Esse fenótipo está envolvido na imunomodulação e manutenção da homeostasia relacionada a processos de cicatrização e remodelação tecidual (Italliani e Boraschi, 2014; Costa-da-Silva *et al.*, 2022) (Figura 9). Diferentemente dos M1 que expressam iNOS, os macrófagos M2 expressam a enzima arginase I (ARG 1), que converte L-arginina em ornitina e ureia. A ornitina é precursora de poliaminas que são essenciais para o metabolismo e multiplicação dos parasitos. (Mosser e Edwards, 2009; Hölscher *et al.*, 2006; Conceição-Silva e Alves, 2014; Natale, Mello e Manzoni de Almeida, 2016). Assim, o macrófago M2 mantém um ambiente intracelular propício para a replicação do parasito, enquanto o macrófago M1 é responsável pela morte da *Leishmania* (Figura 9) (Parihar *et al.*, 2010; Horta *et al.*, 2012; Mukhopadhyay *et al.*, 2015; França-Costa *et al.*, 2015; Holzmuller *et al.*, 2018).

Macrófagos M2 em estágios avançados da inflamação podem assumir um fenótipo de macrófagos regulatórios. Esse tipo de macrófagos são capazes produzir grande quantidade de IL-10 e inibir processos inflamatórios induzidos pela ativação prolongada de macrófagos M1, limitando o dano tecidual (Flaming e Mosser, 2011).

Figura 9 – Papel do macrófago na infecção pela *Leishmania*.



Legenda: Papel dos macrófagos como célula efetora, capaz de controlar a infecção (fenótipo M1) e célula hospedeira (Fenótipo M2), frente a infecção por *Leishmania* sp.

Fonte: Adaptado de Holzmüller *et al.*, 2018.

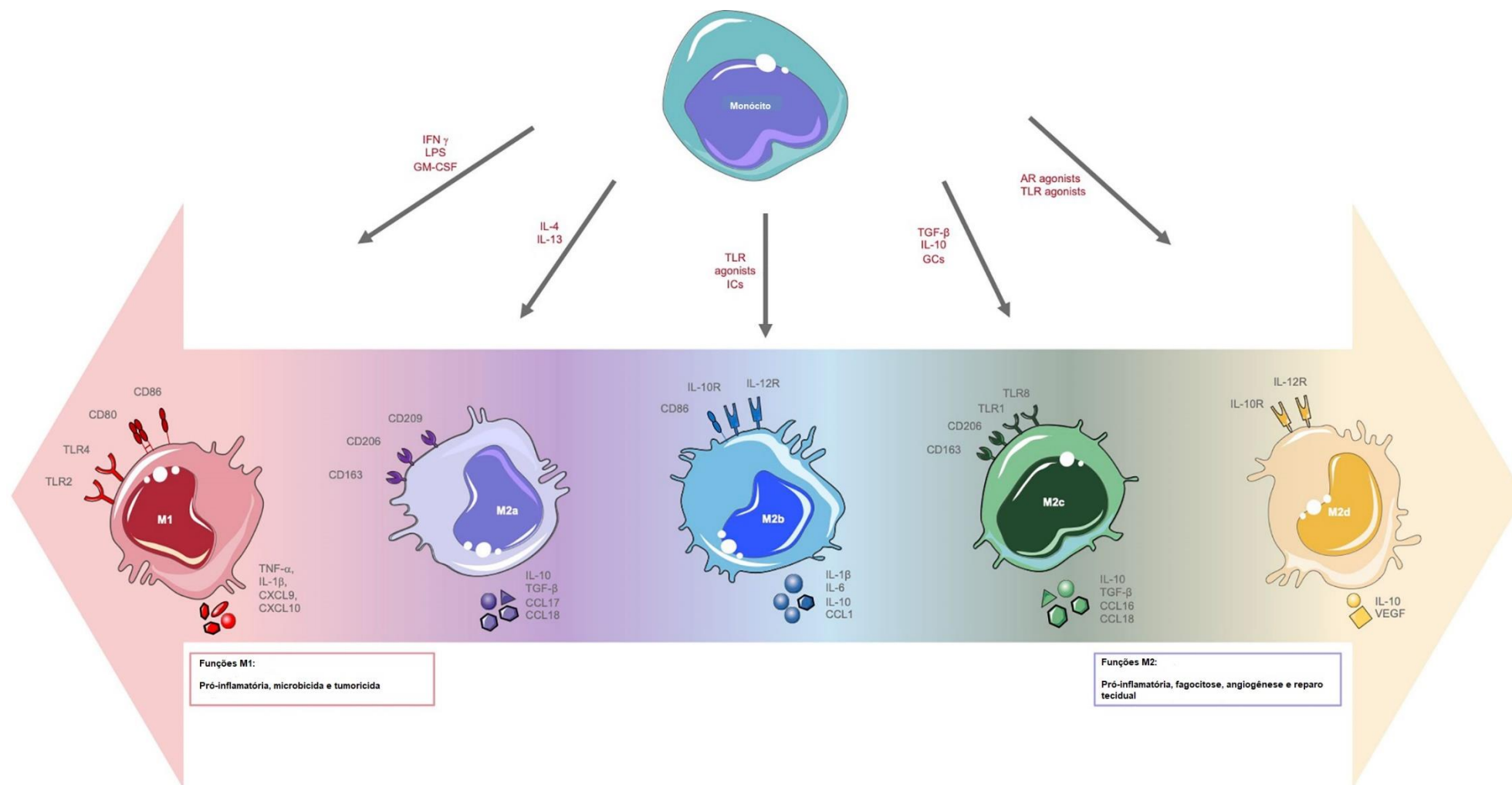
Dependendo do microambiente os macrófagos M2, podem ser divididos em quatro subtipos: M2a, M2b, M2c e M2d, de acordo com o estímulo de ativação e função (Figura 10).

- Macrófagos M2a são polarizados por fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), IL-4 ou IL-13. A IL-4, por sua vez, leva a expressão do receptor de manose (CD206). Esse subtipo é caracterizado pela expressão de ARG-1, IL-10 e produz as quimiocinas CCL24, CCL17 e CCL22, responsáveis pelo recrutamento de eosinófilos, basófilos e células Th2. A regulação positiva adicional de IL-10, TGF- β , CCL17, CCL18 e CCL12 demonstrou promover o crescimento celular, reparo tecidual e endocitose (Fraternali, Brundu e Magnani, 2015; Tomiotto-Pellissier *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019; Yao, Xu e Jin, 2019).

Macrófagos M2b são ativados por complexos imunes, ligantes do receptor Toll-like (TLR), células apoptóticas ou LPS. Após a ativação, esse subtipo libera citocinas com características pró e anti-inflamatórias TNF- α , IL-1b, IL-6 e IL-10 e expressam iNOS. Os macrófagos M2b secretam CCL1 que resultam na infiltração de eosinófilos, linfócitos Th2 e T reguladores (Tregs). Portanto, atuam na regulação da resposta imunológica e inflamação (Fraternale, Brundu e Magnani, 2015; Tomiotto-Pellissier *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019; Yao, Xu e Jin, 2019). – Macrófagos M2c são ativados por glicocorticoides, IL-10 e TGF- β . Esse subtipo é caracterizado pela alta expressão dos anti-inflamatórios IL-10, TGF- β , CCL16, CCL18, bem como do receptor tirosina-quinase Mer (MerTK), que promove fagocitose de células apoptóticas. Esse subtipo está envolvido na regeneração tecidual angiogênese (Fraternale, Brundu e Magnani, 2015; Tomiotto-Pellissier *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019; Yao, Xu e Jin, 2019). – Macrófagos M2d são ativados por antagonistas de TLR, IL-6 e adenosinas. As adenosinas levam a expressão de IL-10 e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que por sua vez, desencadeia a angiogênese e progressão tumoral (Ferrante *et al.*, 2013; Martinez e Gordon, 2014; Fraternale, Brundu e Magnani, 2015; Tomiotto-Pellissier *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019; Yao, Xu e Jin, 2019).

Os macrófagos M1 e M2 podem coexistir, mas o balanço entre eles e o fenótipo resultante dependem de fatores ativadores e inibidores no ambiente tecidual, determinando assim o desfecho da infecção (Martinez e Gordon, 2014; Holzmüller *et al.*, 2018; Tomiotto-Pellissier *et al.*, 2018; Chambers *et al.*, 2021).

Figura 10 – Polarização e plasticidades dos macrófagos.

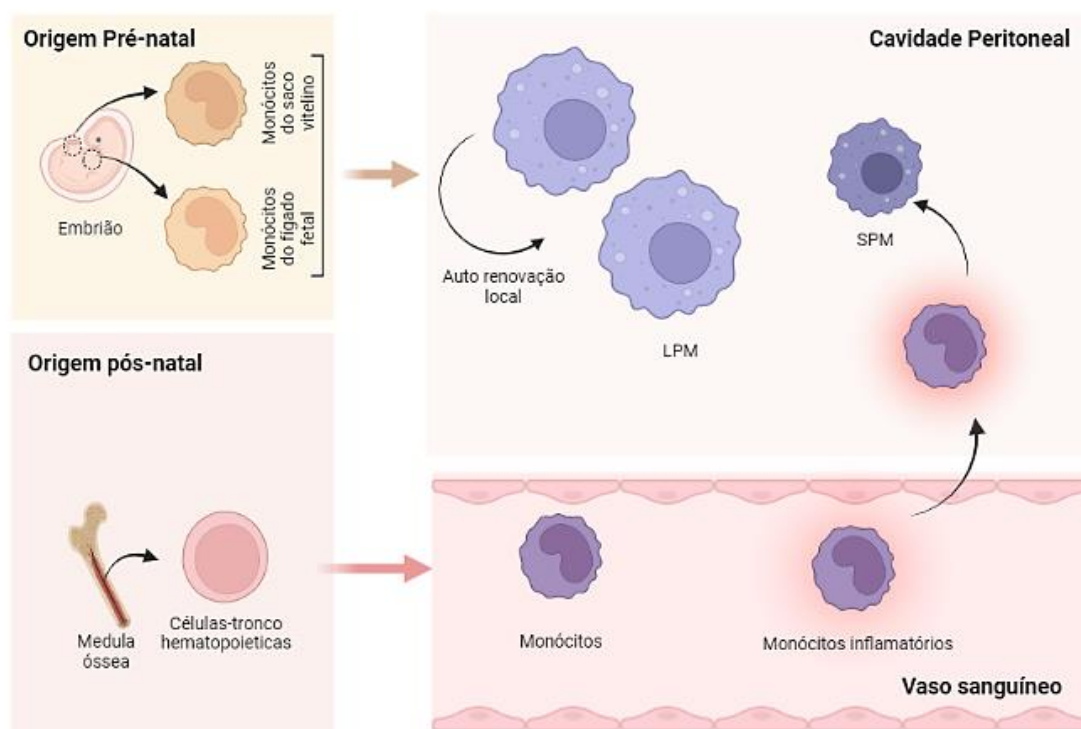


Legenda: Visão geral do espectro de polarização de macrófagos destacando estímulos, expressão de marcadores de superfície, secreção de citocinas e quimiocinas e funções de macrófagos polarizados M1 e M2.

Fonte: Polarização e plasticidade de macrófagos. Adaptado de Chambers *et al*, 2021

Os macrófagos peritoneais são amplamente utilizados como fonte para estudos funcionais em camundongo pois, desempenham papéis fundamentais no controle de infecções e patologias inflamatórias bem como na manutenção da robustez da resposta imune (Hashimoto *et al.*, 2013; Cassado; D'Império Lima; Bortoluci, 2015). É descrita a existência de dois subconjuntos de macrófagos que coexistem na cavidade peritoneal, as quais apresentam fenótipos, funções e origens distintas (Ghosn *et al.*, 2010). O primeiro subconjunto é chamado de grande macrófago peritoneal (LPM) também conhecidos como macrófagos CD11b^{hi} e F4/80^{hi}. Esse subconjunto de macrófagos é derivado de um precursor embrionário e mantidos localmente por auto renovação. O segundo subconjunto é denominado pequeno macrófago peritoneal (SPM) e expressa consideravelmente níveis mais baixos de CD11b e F4/80 e níveis elevados de MHC II, que não é expresso em LPM. As células SPM são derivadas de monócitos, enquanto as LPM têm características de macrófagos teciduais (Figura 11).

Figura 11 – Origem dos macrófagos peritoneais.



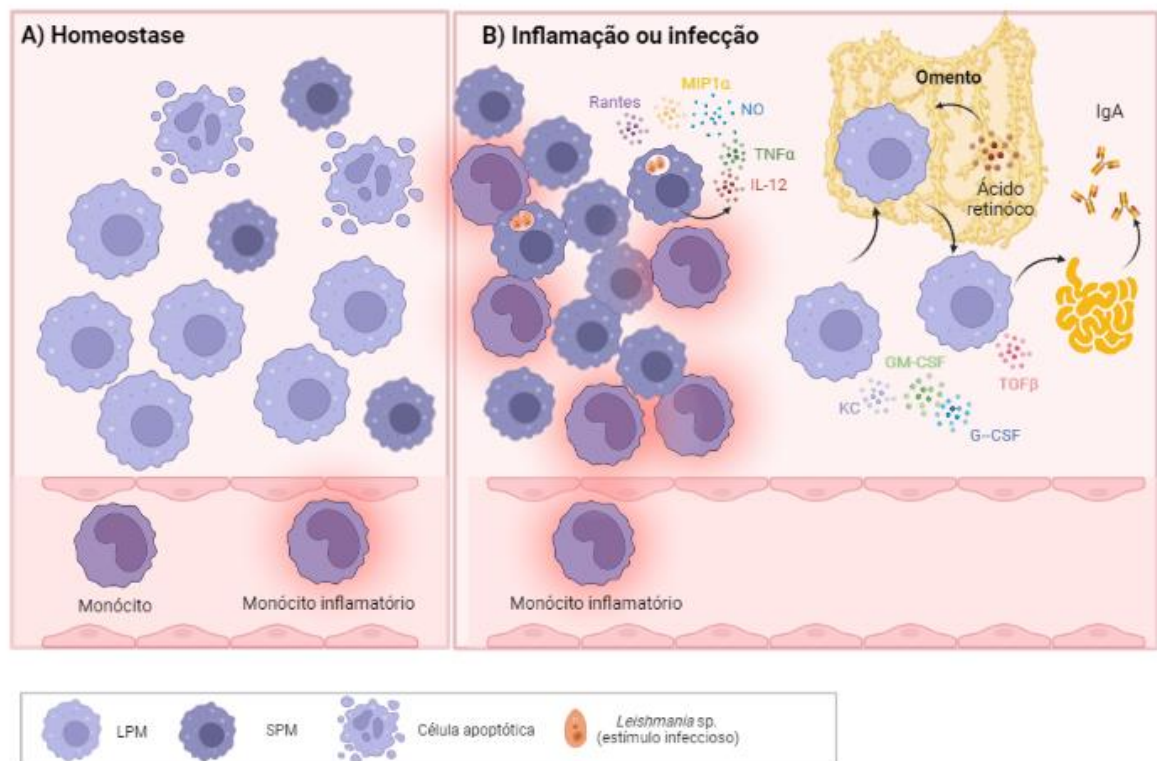
Legenda: Origem das subpopulações de macrófagos peritoneais (LPM e SPM).

Fonte: Adaptado de Cassado; D'Império Lima; Bortoluci, 2015. Criado com Biorender.

Os LPMs, que são a principal população de macrófagos peritoneais em estado estacionário, parecem ser responsáveis pela fagocitose de células apoptóticas e reparo tecidual. Sob estímulo do lipopolissacarídeo (LPS), tioglicolato e diante de um processo infeccioso ou inflamatório, esses subconjuntos de macrófagos se comportam de maneira distinta, no qual o SPM passa a predominar a cavidade peritoneal e se diferencia em SPM maduros podendo assumir um perfil pró-inflamatório e o LPM desaparece da cavidade peritoneal e migra para o omento (Figura 12). Esse processo é denominado “Reação de desaparecimento de macrófagos.

Além disso, os SPM parecem desenvolver um perfil eficiente para controlar infecções como macrófagos M1, enquanto LPMs assumem um papel na manutenção das condições fisiológicas do peritônio como M2. Ambos mostram atividade fagocítica e produzem NO em resposta ao estímulo, porém *in vitro*, o LPS estimula o LPM mas, não o SPM a produzir NO. Já *in vivo*, o LPS estimula ambas as subpopulações a produzir NO, embora com diferentes padrões de resposta (Ghosn *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014; Cassado; D’Império Lima; Bortoluci, 2015).

Figura 12 – Comportamento das subpopulações de macrófagos peritoneais sob estímulo.



Legenda: Reação de desaparecimento de macrófagos.

Fonte: Adaptado de Cassado; D’Império Lima; Bortoluci, 2015. Criado com Biorender.

Os LPM apesar de serem considerados uma população relativamente homogênea, podem ser subdivididos com base na expressão de arginase 1 e VSIG4. Diante disso, uma maior proporção de LPM VSIG4⁺ demonstra ser positiva para Arginase 1 em comparação com LPM VSIG4⁻. A avaliação da expressão desses marcadores na subpopulação LPM também mostrou que a distribuição dessa subpopulação em diferentes linhagens de camundongo varia significativamente, no qual LPM de camundongos C57BL/6 expressam menos Arginase 1 do que LPM de BALB/c ou SJL, apesar da proporção semelhante de LPM VSIG4⁺ para VSIG4 (Stepniak *et al.*, 2008).

Essas descobertas se estendem aos modelos atuais de heterogeneidade de macrófagos e elucidam o conhecimento sobre a diversidade, desenvolvimento e função de macrófagos peritoneais. Com isso, eles revelam um novo cenário para interpretar e reinterpretar os dados de estudos utilizando macrófagos da cavidade peritoneal.

Sendo assim, o estudo exploratório dos mecanismos da imunidade inata, sobretudo sobre o macrófago, que representa a principal célula hospedeira e a célula efetora final envolvida no controle da infecção por *Leishmania*, poderá contribuir para a compreensão do perfil de resistência e susceptibilidade à infecção. Nesse contexto, o comportamento diferente de camundongos BALB/c frente a infecção com *L. braziliensis* e com a *L. major* pode ser um modelo interessante para esta finalidade. Além disso, esse conhecimento pode contribuir para e revelar alvos para intervenções vacinais e terapêuticas.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Identificar comparativamente o perfil de macrófagos peritoneais provenientes de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) major*.

1.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar se a infecção *in vivo* pelas diferentes espécies de *Leishmania* é capaz de alterar a capacidade microbicida dos macrófagos peritoneais frente a infecção *in vitro*;
- b) Analisar se há modulação na produção de óxido nítrico produzido pelos macrófagos que corrobore com a sua capacidade microbicida;
- c) Avaliar se a infecção *in vivo* é capaz de modular diferencialmente a produção de citocinas;
- d) Investigar se a infecção *in vivo* é capaz de modular o perfil fenotípico M1 e M2 dos macrófagos;

2 MATERIAL E MÉTODOS

Figura 13 – Desenho experimental



Legenda: Infecção de camundongos BALB/c com *L.braziliensis* ou *L. major* e avaliação *in vitro* dos macrófagos e do curso da lesão em 7, 15 e 21 dias após infecção.

Fonte: A autora, 2023. Criado com BioRender.

2.1 Considerações éticas

Foram usados nesse estudo camundongos da linhagem BALB/c mantidos no biotério da disciplina de parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. O estudo foi aprovado pela comissão de ética para cuidado e uso de animais experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ. Registro nº 025/2022.

2.2 Parasito e sua manutenção

Foram utilizadas *Leishmania Viannia brasiliensis* (Cepa cão Thor MCAN/BR/98/R619) e *Leishmania Leishmania major* (Cepa LV39 MRHO/SU/59/P). A *L. brasiliensis* foi mantida em hamsters dourado (*Mesocricetus auratus*) infectados com 10^6 promastigotas (50 µl) na pata. A infecção foi mantida em torno de quatro semanas e foi realizado o isolamento do parasito diretamente da lesão ou do linfonodo drenante (Inguinal e Poplíteo).

A *L. major* foi mantida em camundongo BALB/c (*Mus musculus*). Os camundongos foram infectados com 10^6 promastigotas de *Leishmania major* (10 μ l) na orelha ou pata. O isolamento do parasito foi feito da lesão ou linfonodo drenante. As promastigotas de *Leishmania braziliensis* isoladas foram mantidas em cultura usando meio *Schnneider's* (Sigma-Aldrich) com 20% de soro fetal bovino (Cultilab) à 27°C. Já as promastigotas de *Leishmania major* isoladas foram mantidas em cultura usando meio *Schnneider's* (Sigma-Aldrich) com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) à 27°C.

2.3 Preparo do antígeno total de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania major*

Promastigotas de *L. braziliensis* e *L. major* foram cultivadas em primeira passagem em meio *Schnneider's* suplementado com soro. No início da fase estacionária do crescimento, as células foram centrifugadas à 1.300 g por 10 minutos e lavadas duas vezes em PBS. Em seguida, o sedimento foi ressuspenso em meio RPMI (Gibco) e o número de parasitos foi ajustado para 2×10^8 /ml.

A suspensão de células passou por 15-20 ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido para a lise completa dos parasitos, confirmada por visualização em microscópio. O antígeno total foi aliquotado e estocado à -80°C até o uso.

A dosagem de proteínas utilizando o método de Lowry (Lowry, 1951), mostrou que 2×10^8 /ml de parasito contém 1,5 mg/ml de proteína. Foi utilizado nos ensaios 20 μ g/ml do antígeno.

2.4 Infecção de camundongos BALB/c

Camundongos BALB/c machos ou fêmeas, com idade entre 2 e 3 meses foram divididos em 2 grupos: a) infectados (n= 3-5 animais) e b) controle, sem infecção (n= 3-5 animais). A infecção foi realizada com 10^6 promastigotas de *L. (V.) braziliensis* ou *L. (L.) major* (em 10 μ l) em fase estacionária na orelha com auxílio de agulha hipodérmica 13 x 0.30 mm. As promastigotas foram usadas no máximo até a quinta passagem em cultura.

O desenvolvimento da lesão foi acompanhado nesse período com medidas realizadas 2 vezes por semana, utilizando um medidor de espessura (Vonder), comparando o tamanho da orelha infectada com a orelha contralateral não infectada. Após 7, 15 e 21 dias de infecção, os grupos de animais foram eutanasiados e os macrófagos peritoneais obtidos para os ensaios (Figura 13).

2.5 Obtenção dos macrófagos e preparo da monocamada

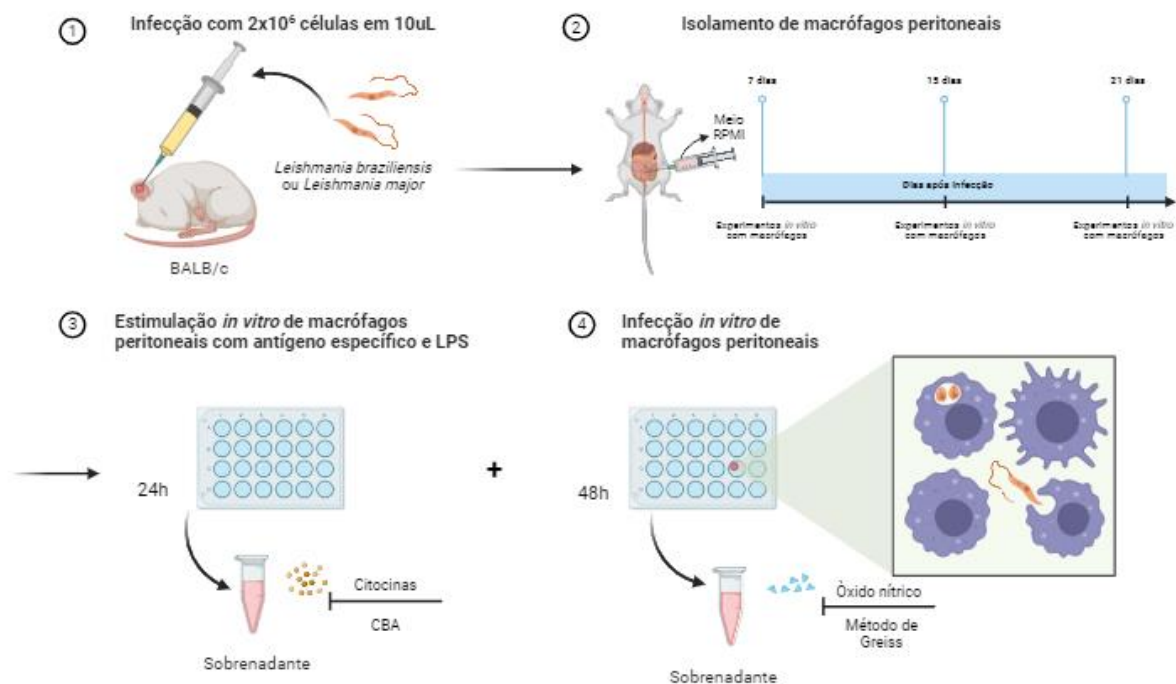
Os macrófagos foram obtidos por lavagem da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c com 5 ml de meio de cultura RPMI (Gibco) gelado e subsequente aspiração. A suspensão de células obtida foi ajustada para a concentração de $2 \times 10^6/\text{ml}$ e plaqueados em placa de 24 poços (Kasvi) (300-500 μl /poço) com uma lamínula redonda estéril no fundo de cada poço. Para aderência, as células foram mantidas na estufa de 37°C com 5% de CO₂ por uma hora, quando então, foram removidas as células não aderentes por lavagem com PBS (*Phosphate Buffer Saline*) morno (37°C), obtendo-se assim, a monocamada de macrófagos.

2.6 Infecção *in vitro* e índice de infecção

As monocamadas de macrófagos peritoneais foram infectadas com promastigotas de *L. braziliensis* (MØB/c + *Lb*) ou *L. major* (MØB/c + *Lm*) em fase estacionária na proporção de 5 parasitos para cada macrófago (5:1). Após 4h de interação, o sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados 3 vezes com PBS estéril morno (37°C) para retirar as promastigotas que não entraram nos macrófagos. Para avaliar a infecção, as monocamadas foram incubadas com meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino por 48h. Após coloração com corante Panótico (Laborclin), a contagem de macrófagos e amastigotas foi feita em microscópio de luz em no mínimo 100 macrófagos por lamínula. Os resultados foram expressos como índice de infecção, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Índice de infecção} = \frac{\text{Porcentagem (\%) de macrófagos infectados} \times \text{N}^{\circ} \text{ de amastigotas}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de macrófagos}} \quad (1)$$

Figura 14 – Atividade anti-*Leishmania*



Legenda: Avaliação *in vitro* de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c após a infecção

Fonte: A autora, 2023. Criado com BioRender.

2.7 Imunofenotipagem de macrófagos

Os macrófagos foram obtidos por lavagem peritoneal de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania braziliensis* (MØB/c + *Lb*) ou *Leishmania major* (MØB/c + *Lm*) e de camundongos controle (sem infecção). Posteriormente, foram analisados por citometria de fluxo após a marcação com anticorpos específicos para macrófagos e fenótipos M1 e M2. Em tubos para citometria foi preparado uma suspensão celular de $1-2 \times 10^6/100-200\mu\text{l}$. Os tubos com a suspensão de células foram mantidos no gelo para evitar a aderência dos macrófagos e a marcação seguiu as recomendações do fabricante. Resumidamente, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 450g e temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 100-200 μl de PBS (Etapa de lavagem). Após, foram adicionados os anticorpos monoclonais conjugados para antígenos de superfície (anti-F4/80 BM8 – FITC; anti-CD206 MR6F3 – PE Cyanine 7 e CD11b M170 – APC Cyanine 7) (Invitrogen – eBioscience™) e incubados por 20 min a 4°C, protegidos da luz (Tabela 1). Ao final do tempo de incubação foi feita uma nova etapa de lavagem.

Em seguida, para a marcação intracelular, as células foram fixadas e permeabilizadas usando 100-200 μl do fixador celular e 300-500 μl do permeabilizador do Kit de Tampão de Fixação e Permeabilização Intracelular (Invitrogen – eBioscience™), seguindo as recomendações do fabricante. Posterior a etapa de permeabilização, os anticorpos monoclonais para antígenos intracelulares (iNOS CXNFT – APC e Arginase 1 A1exF5 – PE) (Invitrogen – eBioscience™) foram adicionados e as células foram incubadas por 30 min a 4°C, protegidos da luz (Tabela 1). Para finalizar foi realizada uma etapa de lavagem.

A leitura das amostras foi realizada no citômetro de fluxo (BD FACS Canto II) e a análise dos resultados foi feita usando o programa FlowJo Software. Nos resultados foram considerados macrófagos com perfil M1 aqueles que expressam ARG 1⁻ iNOS⁺, Macrófagos com perfil M2 os que expressam ARG1⁺ CD206⁺ e macrófagos com perfil misto M1/M2 os que expressam ARG 1⁺iNOS⁺.

Tabela 1 – Anticorpos monoclonais.

Anticorpo monoclonal	Clone	Fluorocromo	Diluição	Fabricante
F4/80	BM8	FITC	0.5 µg/mL	Invitrogen – eBioscience™
CD206	MR6F3	PE Cyanine 7	0.25 µg/mL	Invitrogen – eBioscience™
CD11b	M170	APC Cyanine 7	0.3 µg/mL	Invitrogen – eBioscience™
iNOS	CXNFT	APC	0.06 µg/mL	Invitrogen – eBioscience™
Arginase 1	AlexF5	PE	0.5 µg/mL	Invitrogen – eBioscience™

Legenda: Anticorpos monoclonais conjugados utilizados para imunofenotipagem de macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c infectados com *L. braziliensis* ou *L. major*.

Fonte: A autora, 2023.

2.8 Dosagem de óxido nítrico

O óxido nítrico é uma molécula altamente instável, por isso a sua produção foi avaliada pela concentração de nitrito (NO_2^-) que é um produto da oxidação mais estável e facilmente dosado pelo método de Griess (Green *et al.*, 1982). Uma curva de 0 a 250 µM de nitrito de sódio (NaNO_2), assim como, os sobrenadantes foram plaqueados em placas de 96 poços (Kasvi) (50µl por poço). Foram adicionados aos poços 50µl do reagente de Griess (0,1% de diidrocloreto de naftiletilenodiamino e 1% de sulfonamida do paraminobenzeno em 5% de ácido fosfórico – 1:1). As amostras foram incubadas no escuro por 15 minutos em temperatura ambiente. Após o tempo decorrido, foram analisadas em leitor de microplacas à 570nm (Bio-Tek instruments, Highland Park, USA). Os valores da absorbância dos sobrenadantes foram comparados com os da curva padrão de NaNO_2 através do cálculo da equação da reta. Os resultados foram expressos em % do controle.

2.9 Dosagem de citocinas

Monocamadas de macrófagos foram estimuladas com 20µg/ml do antígeno total de *L. braziliensis* (Ag *Lb*) ou *L. major* (Ag *Lm*) e 3µg/ml de lipopolissacarídeo (LPS) por 24h. Nos controles, os macrófagos foram tratados apenas com meio RPMI. Após esse período, os sobrenadantes foram colhidos e congelados à -80°C até a dosagem das citocinas.

As citocinas foram dosadas por citometria de fluxo pelo método *Cytometric Bead Array* (CBA), utilizando o kit Mouse Inflammation para detecção de IL-6, IL-10, MCP-1, IFN-γ, TNF e IL-12p70 (BD Biosciences Pharmigen, CA, USA), seguindo as recomendações do fabricante.

Os sobrenadantes dos macrófagos foram incubados em tubo de plástico para citometria com as microesferas de captura fluorescentes (FITC) recobertas com anticorpos específicos para cada citocina e com o anticorpo de detecção conjugado ao marcador ficoeritrina (PE) sob proteção da luz, em temperatura ambiente por 2 horas.

Uma curva padrão foi feita incubando as microesferas em diferentes concentrações (0-5000 pg/ml) de acordo com o procedimento anterior. Após o tempo de incubação, em cada tubo foi adicionado 500 µl de solução de lavagem e feita uma centrifugação à 200 g por 5 minutos.

O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspenso com 300 µl da solução de lavagem fornecida pelo fabricante. A leitura foi feita em citômetro de fluxo (BD FACS Canto II) e a análise dos resultados foi feita através do programa FCAP Array Software.

2.10 Análise gráfica e estatística

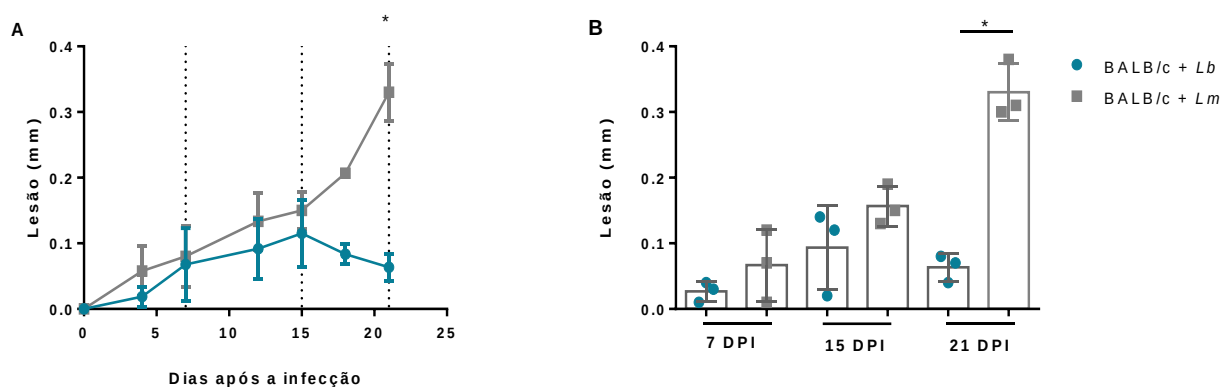
Os dados obtidos foram analisados usando o teste One Way ANOVA de comparações múltiplas, utilizando o software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA) Valores de *p* iguais ou menores que 0,05 foram considerados significativo.

3 RESULTADOS

3.1 Curso da lesão de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* ou *L. major*

Inicialmente avaliamos o curso da lesão na orelha de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* em comparação com a infecção por *L. major* durante 21 dias. Como esperado, nos animais infectados com *L. braziliensis* houve um pico no tamanho das lesões (0.11mm) com 15 dias de infecção (DPI), seguida da sua diminuição (0.06mm) com 21 DPI, enquanto que as lesões dos animais infectados com *L. major* cresceram de forma progressiva, apresentando lesões de 0.08 mm em 7 DPI, 0.15mm em 15 DPI e 0.33mm em 21 DPI (Figura 15 A e B). O aspecto da lesão na orelha também demonstrou diferenças no tamanho da lesão em BALB/c infectados com *L.braziliensis* comparado a *L. major* (Figura 16).

Figura 15 - Desenvolvimento da lesão na orelha de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* ou *L. major*.

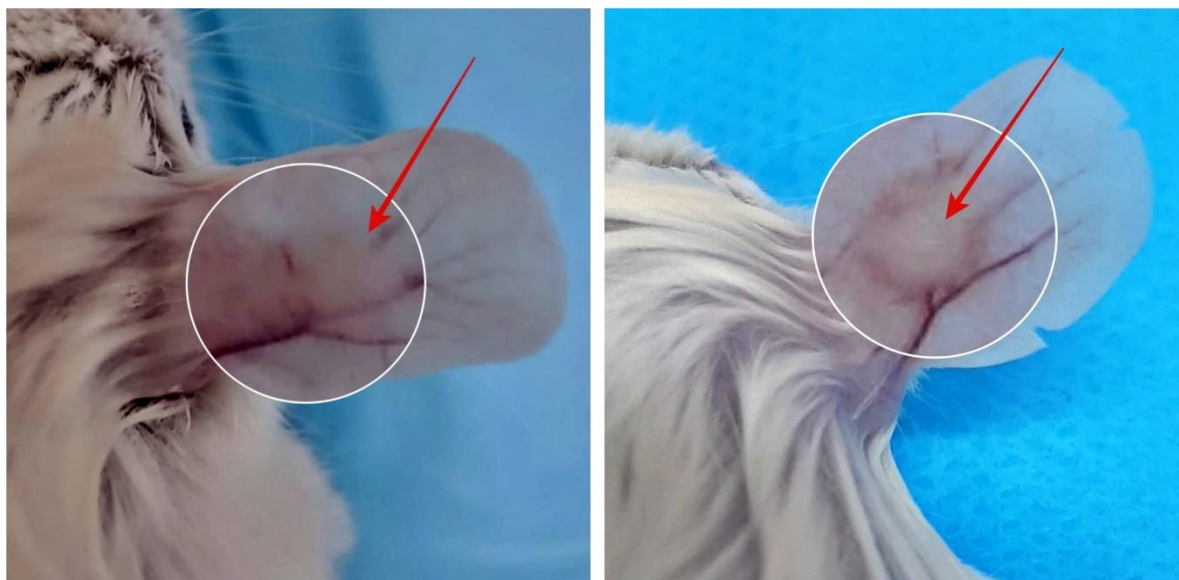


Legenda: Desenvolvimento da lesão na orelha de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* ou *L. major*. (A) Curso da lesão na orelha de BALB/c infectados com *L. braziliensis* ou *L. major*; (B) Valores individuais da progressão da lesão na orelha de BALB/c infectados com *L. braziliensis* ou *L. major*.

Nota: Desenvolvimento da lesão de camundongos BALB/c infectados na orelha com 10^6 promastigotas de *L. braziliensis* ou *L. major*. A progressão da lesão foi acompanhada durante 21 dias com medições realizadas duas vezes por semana comparando a orelha infectada com a orelha contralateral sem infecção. Em 7 dias de infecção N=3; 15 dias de infecção N=3; 21 dias de infecção N=3. * $p < 0.05$

Fonte: A autora, 2023.

Figura 16 – Lesão na orelha de camundongo BALB/c infectado.



Legenda: Lesão na orelha de camundongo BALB/c infectado. (A) Lesão na orelha de camundongo BALB/c infectado com *Leishmania braziliensis* (15 DPI); (B) Lesão na orelha de camundongo BALB/c infectado com *Leishmania major* (15 DPI).

Fonte: A autora, 2023.

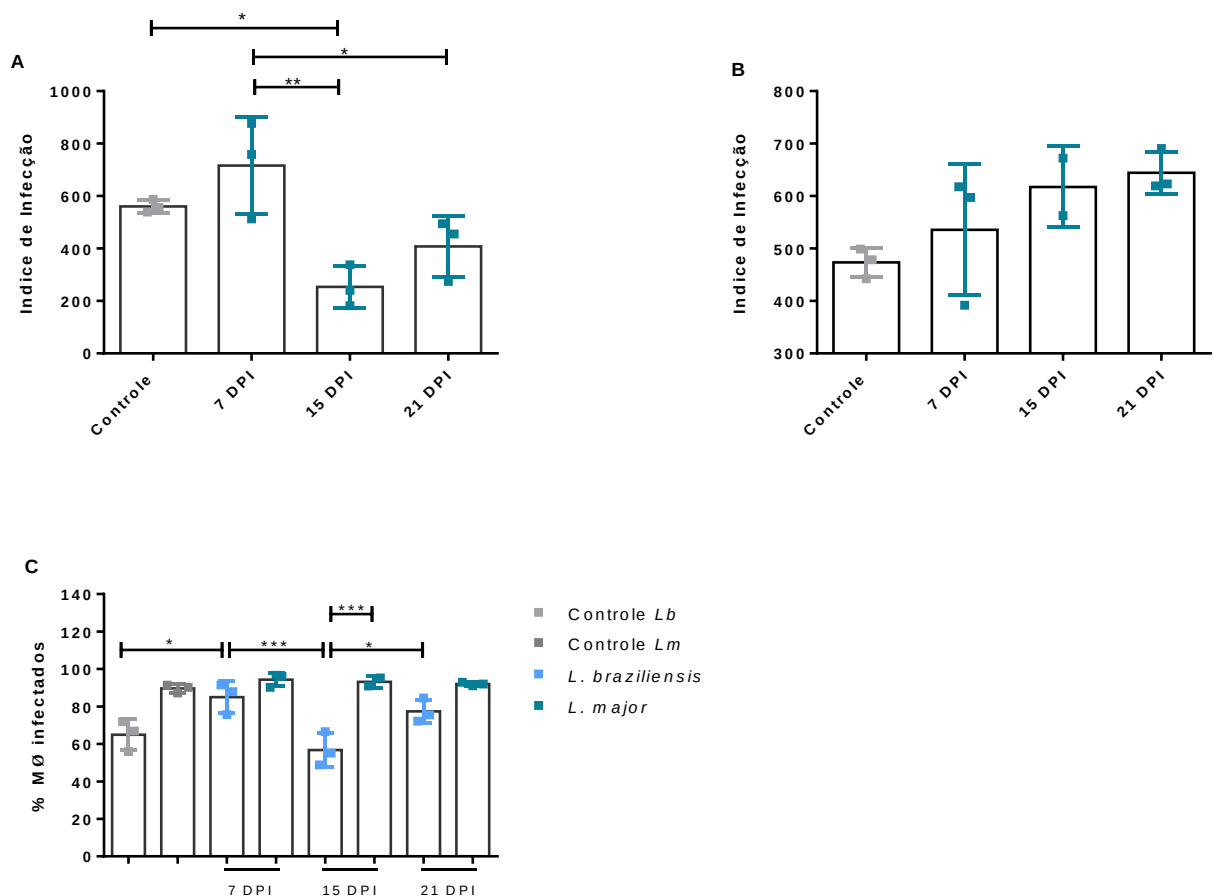
3.2 Caracterização do perfil dos macrófagos peritoneais oriundos de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* ou *L. major*

3.1.1 Atividade anti-*Leishmania*

Como parte dos ensaios para analisar comparativamente o perfil dos macrófagos nos dois contextos de infecção, investigamos inicialmente sua capacidade microbicida *in vitro*. Os macrófagos peritoneais foram obtidos em momentos diferentes da infecção (7, 15 e 21 DPI) de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* ou *L. major*. As monocamadas de macrófagos foram infectadas *in vitro* e o índice de infecção foi avaliado em 48 h após a infecção. Os sobrenadantes das culturas foram colhidos para posterior análise da produção de NO e citocinas.

Os resultados mostraram que nos MØB/c + *Lb*, o índice de infecção e a porcentagem de macrófagos infectados foi significativamente maior na primeira semana de infecção (7 DPI) em comparação a segunda semana de infecção (15 DPI). Nesse período, os macrófagos apresentaram o menor índice de infecção e a menor porcentagem de infecção (Figura 17A e 17C). Já os MØB/c + *Lm*, o índice de infecção foi aparentemente maior na segunda (15 DPI) e terceira (21 DPI) semana de infecção comparado ao controle, porém esse resultado não foi estatisticamente significativo (Figura 17 B). Além disso, a porcentagem de macrófagos infectados foi maior frente a infecção com *L. major* em comparação a infecção por *L. braziliensis* em 15 DPI (Figura 17 C).

Figura 17 – Capacidade microbicida de macrófagos oriundos de animais infectados *in vivo*.



Legenda: Capacidade microbicida de macrófagos de BALB/c infectados *in vivo*. (A) Índice de infecção de MØB/c + *Lb* e controle; (B) Índice de infecção de MØB/c + *Lm* e controle; (C) Porcentagem de macrófagos infectados *in vitro* com *L. braziliensis* ou *L. major*.

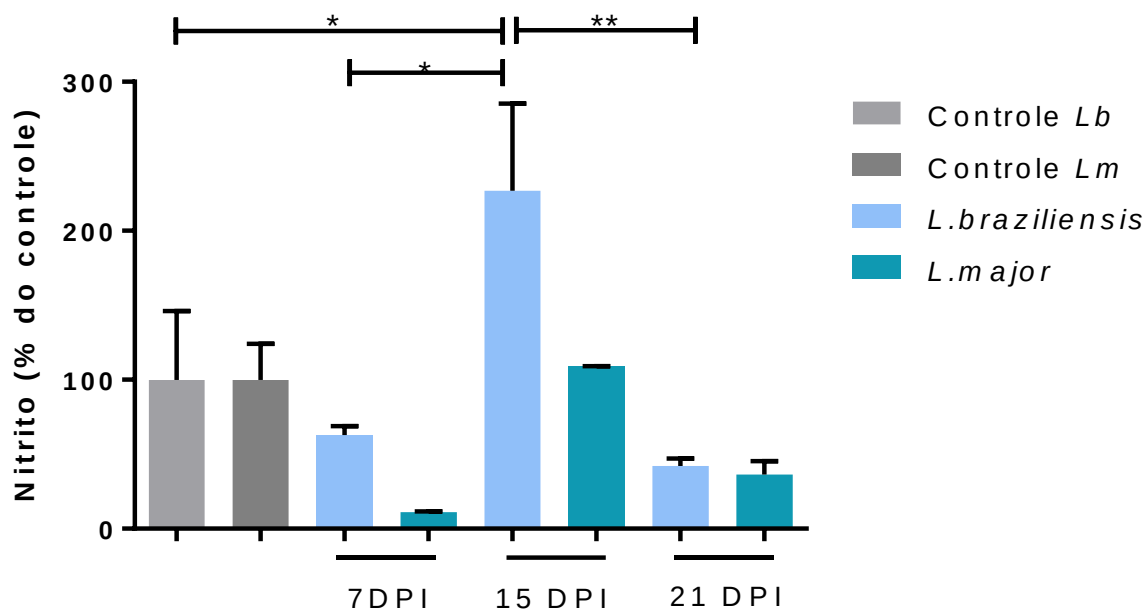
Nota: Monocamadas de macrófagos peritoneais foram infectadas com promastigotas de *L. braziliensis* ou *L. major* na proporção 5:1 por 4h, a 37°C e 5% de CO₂. Após a remoção dos parasitos não internalizados, as monocamadas foram incubadas com RPMI com 10% de soro por 48h. As amastigotas foram contadas em microscópio óptico. Mínimo de 100 macrófagos foram contados por lâminula. N=3. *p<0.05 **p<0.01 *** p<0.001

Fonte: A autora, 2023

3.1.2 Produção de óxido nítrico

Para verificar se a produção de óxido nítrico (NO) estaria alterada, o nitrito foi dosado nos sobrenadantes das culturas de macrófagos após 48 h de infecção *in vitro*. Os resultados mostram que a quantidade de nitrito produzida foi significativamente maior em MØB/c + *Lb* no período de 15 DPI (Figura 18). Em MØB/c + *Lm*, o resultado mostrou não ocorrer alteração significativa na produção de NO comparado ao controle em todos os momentos analisados (Figura 18). Além disso, MØB/c + *Lb* produziram mais nitrito do que os MØB/c + *Lm* em 15DPI.

Figura 18 – Produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongo BALB/c infectados com *L. braziliensis* ou *L. major*.



Nota: Produção de óxido nítrico. Camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas de *L. braziliensis* ou *L. major*. Animais controle não foram infectados. Monocamadas de macrófagos peritoneais provenientes de animais com ou sem infecção, foram infectadas com promastigotas de *L. braziliensis* ou *L. major in vitro* na proporção 5:1 por 4h, a 37°C e 5% de CO₂. Após a remoção dos parasitos não internalizados, as monocamadas foram incubadas com RPMI com 10% de soro por 48h e o sobrenadante foi coletado para dosagem de nitrito. O nitrito foi dosado pelo método de Griess. *p<0.05 **p<0.01. Os dados foram expressos como porcentagem do controle.

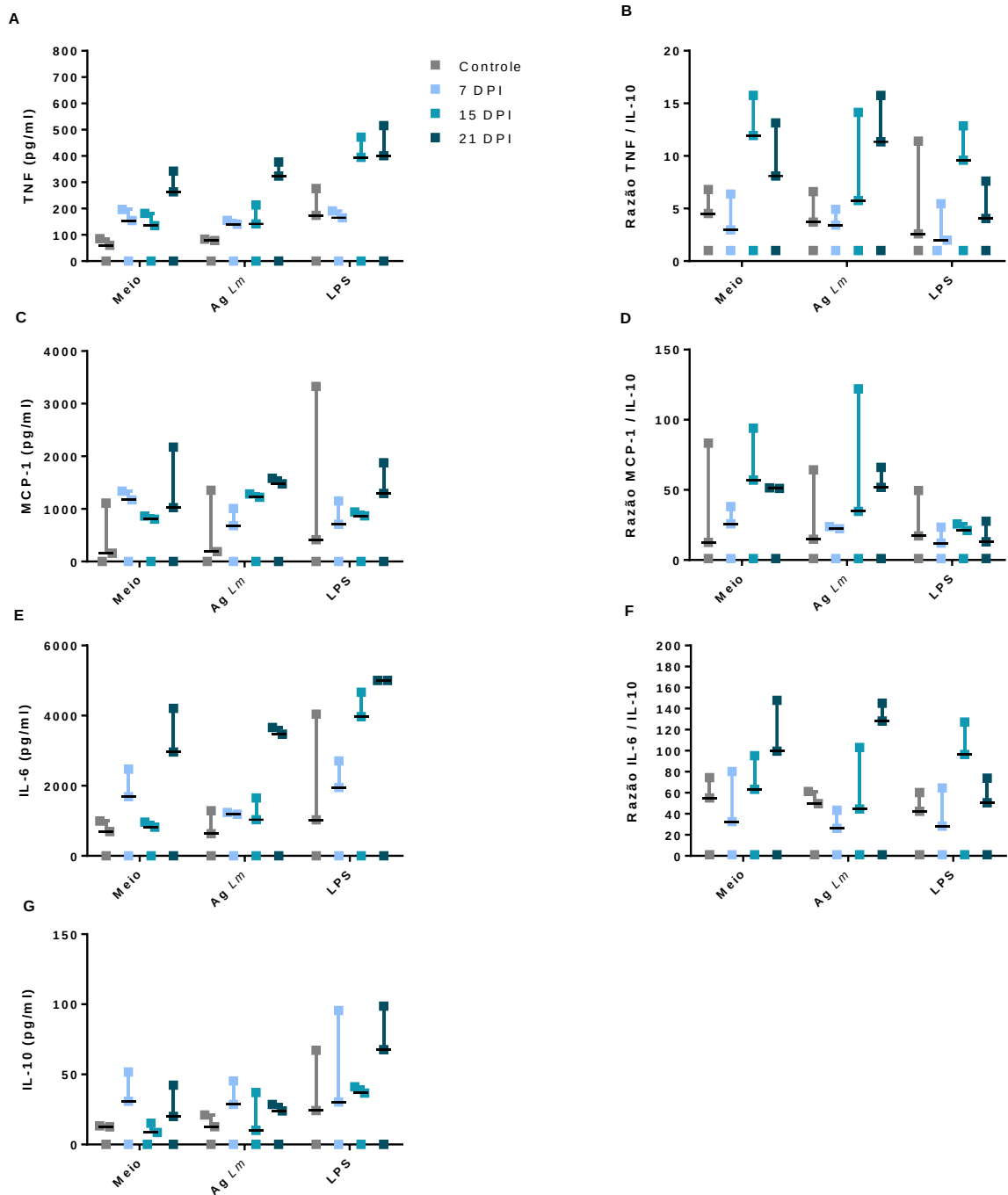
Fonte: A autora, 2023.

3.3 Avaliação da produção de citocinas por macrófagos de BALB/c infectados com *L. major*

A avaliação do perfil de citocinas de MØB/c + *Lm* foi feita nos sobrenadantes das culturas após 24h de estímulo *in vitro* com o antígeno específico ou LPS. Os resultados referentes a produção de citocinas por MØB/c + *Lm* mostraram que houve um aumento na produção de TNF sob estímulo do antígeno específico (Ag *Lm*) em 15 e 21 DPI comparado ao controle. Quando estimulados pelo LPS nos períodos de 15 e 21 DPI também podemos observar que os macrófagos, aparentemente, aumentaram a produção de TNF em relação ao controle e ao Ag *Lm* (Figura 19 A). A produção de MCP-1 aumentou sob estímulo do Ag *Lm*, porém, diminuiu sob estímulo do LPS em 15 DPI (Figura 19 C). Nossos resultados também demonstram que os macrófagos aumentam a produção de IL-10 e IL-6 quando estimulados pelo LPS nos três momentos do curso da infecção (Figura 19 E e G). Contudo, os resultados não foram estatisticamente significativos.

A razão entre as citocinas pró e anti-inflamatórias demonstraram que quando MØB/c + *Lm* foram estimulados com o Ag *Lm*, a razão IL-6/IL10 aumentou, enquanto que, sob estímulo do LPS, diminuiu. Em 15 DPI essas diferenças foram maiores sob estímulo do LPS comparado ao controle (Figura 19 F). A razão TNF/IL-10 em 21 DPI sob estímulo do Ag *Lm* aumentou e sob estímulo do LPS diminuiu, já com 15 DPI aumentou sob o estímulo do LPS comparado ao controle e Ag *Lm* (Figura 19 B). A razão MCP-1/IL-10 diminuiu quando MØB/c + *Lm* estão sob estímulo do LPS em 7, 15 e 21 DPI (Figura 19 D).

Figura 19 – Produção de citocinas por macrófagos de camundongo BALB/c infectados com *L. major*.



Legenda: Produção de citocinas por MØB/c + *Lm*. (A) Produção de TNF por MØB/c + *Lm* na orelha por 7, 15 e 21 DPI e sob estímulo do Ag *Lm* e do LPS *in vitro*; (B) Razão TNF/IL-10; (C) Produção de MCP-1 por MØB/c + *Lm* por 7, 15 e 21 DPI e sob estímulo do Ag *Lm* e do LPS *in vitro*; (D) Razão MCP-1/IL-10; (E) Produção de IL-6 por MØB/c + *Lm* por 7, 15 e 21 DPI e sob estímulo do Ag *Lm* e do LPS *in vitro*; (F) Razão IL-6/IL-10; (G)) Produção de MCP-1 por MØB/c + *Lm* por 7, 15 e 21 DPI e sob estímulo do Ag *Lm* e do LPS *in vitro*.

Nota: Monocamadas de macrófagos de BALB/c controle ou infectados por 7, 15 e 21 DPI com *L. major* sob estímulo do Ag *Lm* (20 µg/ml) e LPS (3 µg/ml) *in vitro* por 24h. Após esse período foi coletado a sobrenadante e feita a dosagem das citocinas pelo método CBA.

Fonte: A autora, 2023.

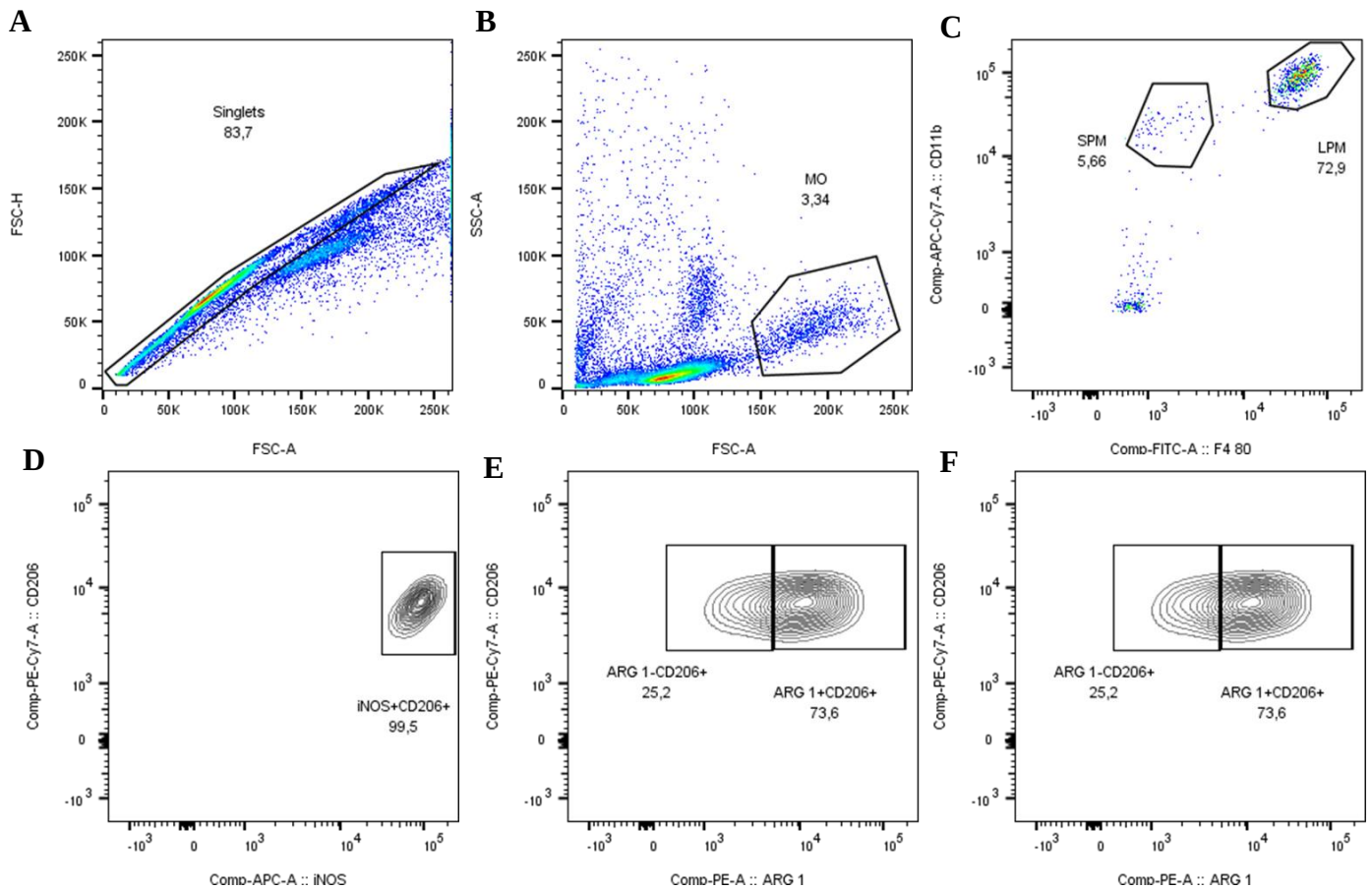
3.4 Fenotipagem de macrófagos peritoneais provenientes de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* ou *L. major*

Para investigar se a infecção com *L. braziliensis* e com *L. major* seriam capazes de modular, diferentemente, o perfil fenotípico dos macrófagos peritoneais, nós analisamos um conjunto de marcadores para macrófagos M1/M2 nos diferentes tempos de infecção (7, 15 e 21 DPI). Para isso, marcamos os macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c com anticorpos monoclonais específicos para os fenótipos M1 e M2 e analisamos por citometria de fluxo.

Inicialmente, definimos neste modelo diferentes populações de macrófagos a partir dos parâmetros de tamanho e granulosidade. Os resultados mostraram que a população de macrófagos LPM (Grandes Macrófagos Peritoneais) é maior que a população SPM (Pequenos Macrófagos Peritoneais) e que essa proporção não é alterada pela infecção (Figuras 20 C e 21).

Com relação a expressão dos marcadores para os fenótipos M1/M2 na população LPM, foi observado que aparentemente há células expressando tanto marcadores para o fenótipo M1 (iNOS) quanto para o fenótipo M2 (ARG1 e CD206) (Figuras 20 D, 20 E e 20 F).

Figura 20 – População LPM e SPM de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados.

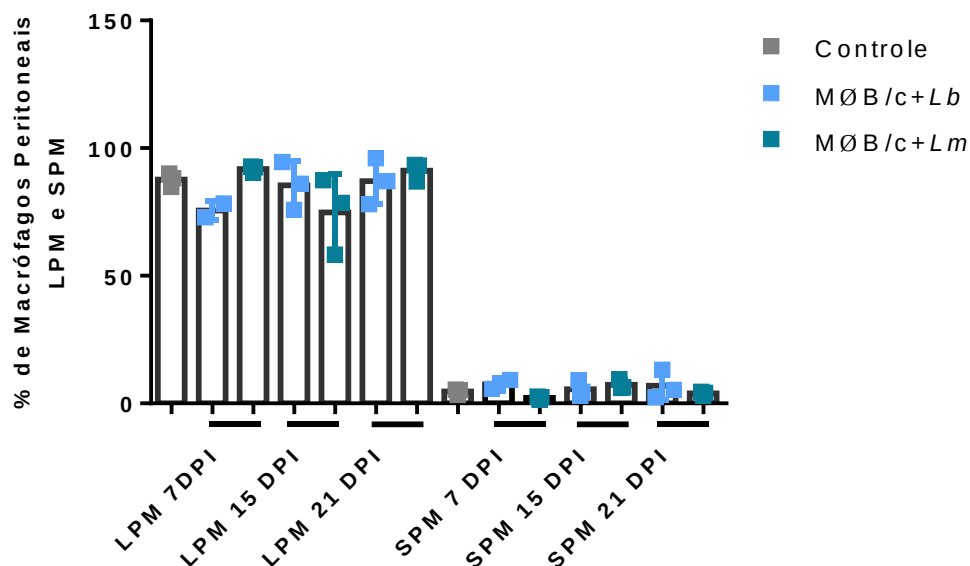


Legenda: População LPM e SPM de BALB/c infectado. (A) *Singlets*; (B) *Gating* de monócitos; (C) *Gating* da população SPM e LPM de macrófagos peritoneais; (D); Macrófagos LPM expressando iNOS⁺CD206⁺; (E) Macrófagos LPM expressando ARG 1⁻CD206⁺ e ARG 1⁺CD206⁺; (F) Macrófagos LPM expressando ARG 1⁻iNOS⁺ e ARG1⁺iNOS⁺.

Nota: Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania braziliensis* ou *Leishmania major* foram marcados com os anticorpos monoclonais: F4/80, CD206, CD11b, iNOS e ARG 1 e analisados por citometria de fluxo para investigação dos fenótipos M1/M2 e das populações de grandes macrófagos peritoneais (LPM) e pequenos macrófagos peritoneais (SPM).

Fonte: A autora, 2023.

Figura 21 – Porcentagem de macrófagos LPM e SPM de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* ou *L. major*.



Legenda: Porcentagem de macrófagos peritoneais LPM e SPM de BALB/c infectados.

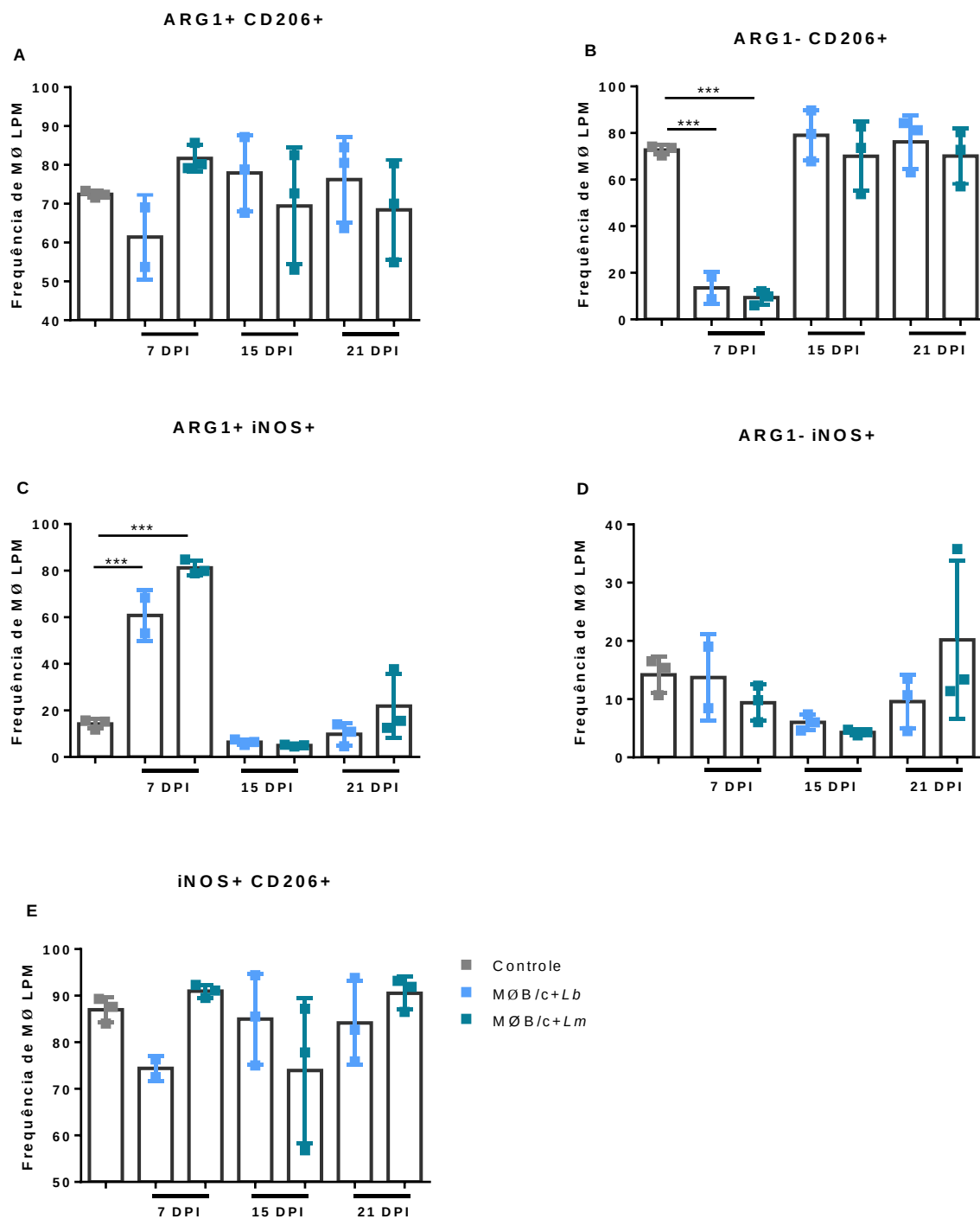
Nota: Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania braziliensis* ou *Leishmania major* foram marcados com os anticorpos monoclonais: F4/80, CD206, CD11b, iNOS e ARG 1 e analisados por citometria de fluxo para investigação dos fenótipos M1/M2 e das populações de grandes macrófagos peritoneais (LPM) e pequenos macrófagos peritoneais (SPM).

Fonte: A autora, 2023.

Avaliando quantitativamente a expressão desses marcadores entre os animais infectados, observamos que macrófagos LPM de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* ou *L. major* no período de 7 DPI, expressaram menos ARG 1⁻ CD206⁺ (M2) (Figura 22 B). A frequência de macrófagos LPM de camundongos BALB/c infectados expressando duplo-positivo ARG 1⁺ iNOS⁺ (M1/M2) foi maior no período 7 DPI em comparação aos animais controles, não infectados (Figura 22 C).

Os resultados da intensidade média de fluorescência (MFI) mostram que macrófagos LPM de BALB/c infectados com *L. major* expressaram mais iNOS na primeira semana de infecção (7 DPI) comparado aos macrófagos de animais controle, já na terceira semana de infecção (21 DPI) a MFI da iNOS foi maior em macrófagos LPM de animais infectados com *L. braziliensis* (Figura 23 A). Com relação a MFI da Arginase 1, os macrófagos LPM de BALB/c infectados com *L. major* expressaram mais ARG 1 no período de 7 DPI comparado ao controle (Figura 23 B). Além disso, a proporção de MFI para os marcadores iNOS e ARG 1 mostrou que MØB/c + *Lm* expressam mais ARG 1 até 15 DPI (Figuras 23 C e 23 D). Em 21 DPI essa proporção é invertida e MØB/c + *Lb* passam a expressar mais ARG 1 (Figura 23 E). O mesmo perfil foi observado em relação a iNOS durante esses períodos (Figuras 23 F, 23 G e 23 H).

Figura 22 – Frequência de macrófagos LPM expressando marcadores para fenótipo M1 e M2.

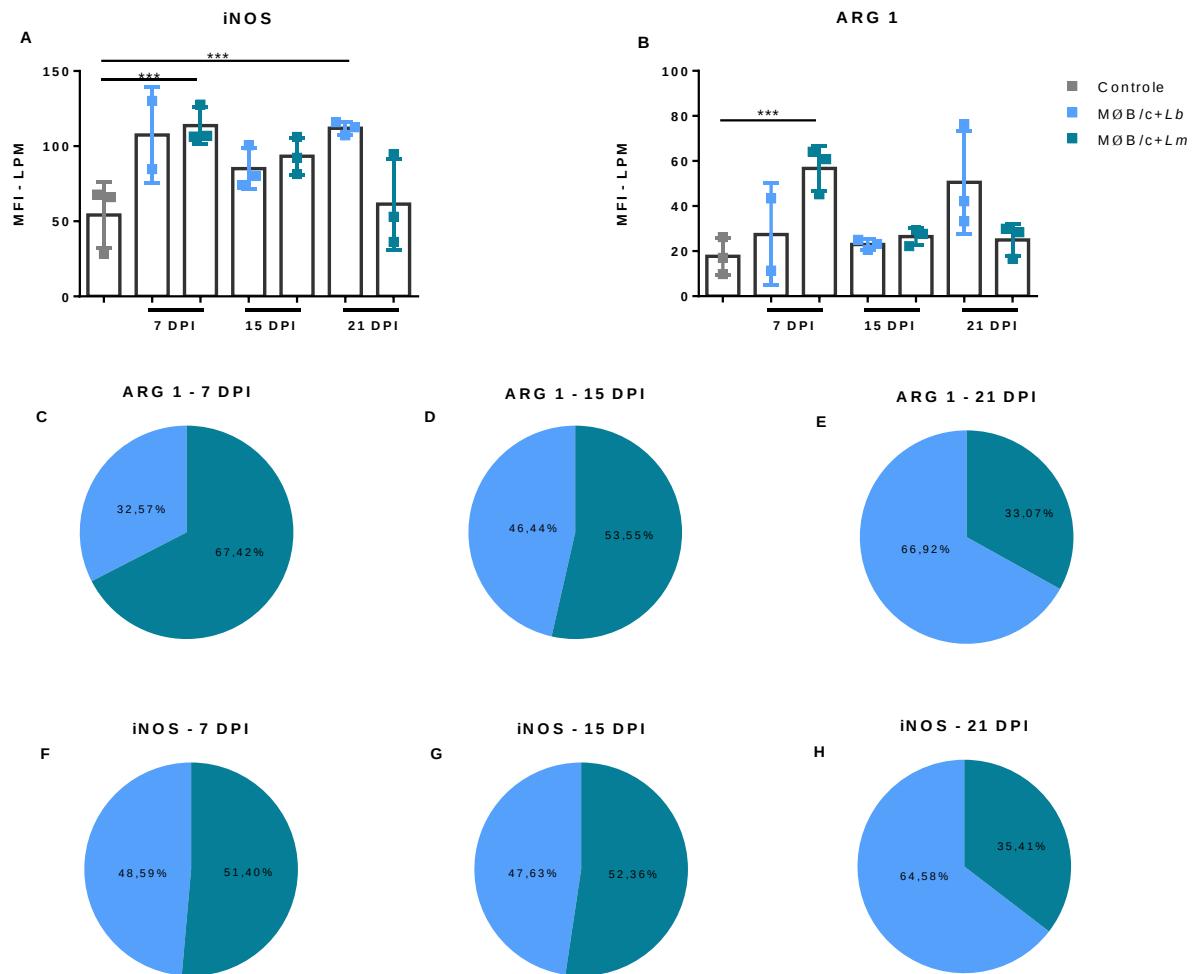


Legenda: Frequência de macrófagos LPM. (A) Frequência de macrófagos LPM expressando ARG 1⁺ CD206⁺; (B) Frequência de macrófagos LPM expressando ARG 1⁻ CD206⁺ (C) Frequência de macrófagos LPM expressando ARG 1⁺ iNOS⁺; (D) Frequência de macrófagos LPM expressando ARG 1⁻ iNOS⁺; (E) Frequência de macrófagos LPM expressando iNOS⁺ CD206⁺. *** p<0.001

Nota: MØB/c + Lb ou MØB/c + Lm foram marcados com os anticorpos monoclonais: F4/80, CD206, CD11b, iNOS e ARG 1 e analisados por citometria de fluxo para investigação dos fenótipos M1/M2.

Fonte: A autora, 2023.

Figura 23 – Intensidade média de fluorescência (MFI) da população LPM.



Legenda: MFI da população LPM. (A) MFI de iNOS em macrófagos LPM; (B) MFI de ARG 1 em macrófagos LPM; (C) Proporção de ARG 1 em macrófagos LPM 7 DPI; (D) Proporção de ARG 1 em macrófagos LPM 15 DPI; (E) Proporção de ARG 1 em macrófagos LPM 21 DPI; (F) Proporção de iNOS em macrófagos LPM 7 DPI; (G) Proporção de iNOS em macrófagos LPM 15 DPI; (H) Proporção de iNOS em macrófagos LPM 21 DPI *** $p < 0.001$

Nota: MØB/c + *Lb* ou MØB/c + *Lm* foram marcados com os anticorpos monoclonais: F4/80, CD206, CD11b, iNOS e ARG 1 e analisados por citometria de fluxo para investigação dos fenótipos M1/M2.

Fonte: A autora, 2023

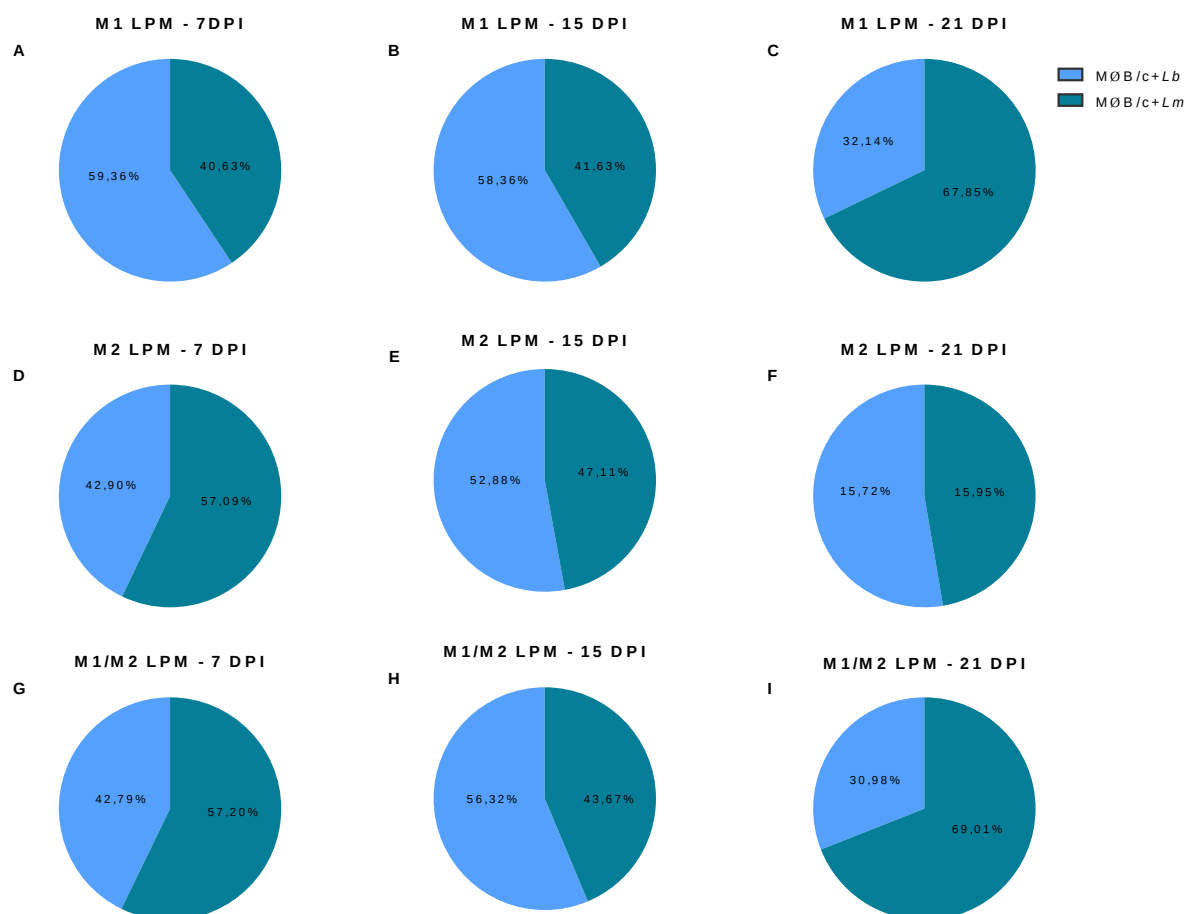
Analisando a proporção da frequência dos marcadores para os fenótipos M1 e M2 na população LPM, observou-se que macrófagos de BALB/c infectados com *L. braziliensis*, aparentemente, expressam mais um perfil M1 nos períodos de 7 e 15 DPI (Figuras 24 A e 24 B). A expressão desse perfil diminui nos macrófagos a partir de 21 DPI (Figura 24 C). Além disso, macrófagos de BALB/c infectados com *L. braziliensis* passam a expressar mais um perfil M2 com 15 DPI, apresentando um perfil misto M1 e M2 durante esse período (Figuras 24 E e 24 H). Na terceira semana de infecção (21 DPI) os macrófagos de BALB/c infectados com *L. braziliensis* não demonstram diferenças expressivas para o fenótipo M2 comparado aos infectados pela *L. major* (Figura 24 F). Os resultados também mostraram que macrófagos de BALB/c infectados com *L. major* tenderam a apresentar um perfil misto M1/M2, maior nos períodos de 7 e 21 DPI (Figuras 24 G e 24 I).

Os resultados referentes à população SPM para os fenótipos M1 e M2, mostram que aparentemente há células expressando tanto marcadores para o fenótipo M1 (iNOS) quanto para o fenótipo M2 (CD206) (Figuras 25 A, 25 B e 25 C).

A avaliação quantitativa desses marcadores indica que macrófagos SPM de BALB/c infectados com *L. braziliensis* expressam mais ARG¹⁻CD206⁺ (M2) na primeira semana de infecção (7 DPI) comparado ao controle e aos macrófagos de animais infectados com *L. major* (Figura 26 B).

Segundo os resultados, embora de forma não significativa estatisticamente, os macrófagos SPM de BALB/c infectados com *L. major* tenderam a expressar mais ARG¹⁺iNOS⁺ (M1-M2) no período de 15 DPI (Figura 26 C). Além disso, os resultados mostram que macrófagos SPM de BALB/c infectados com *L. braziliensis* tendem a expressar mais ARG⁻iNOS⁺ (M1) no período de 7 DPI (Figura 26 D).

Figura 24 – Proporção de fenótipo M1 e M2 na população LPM.

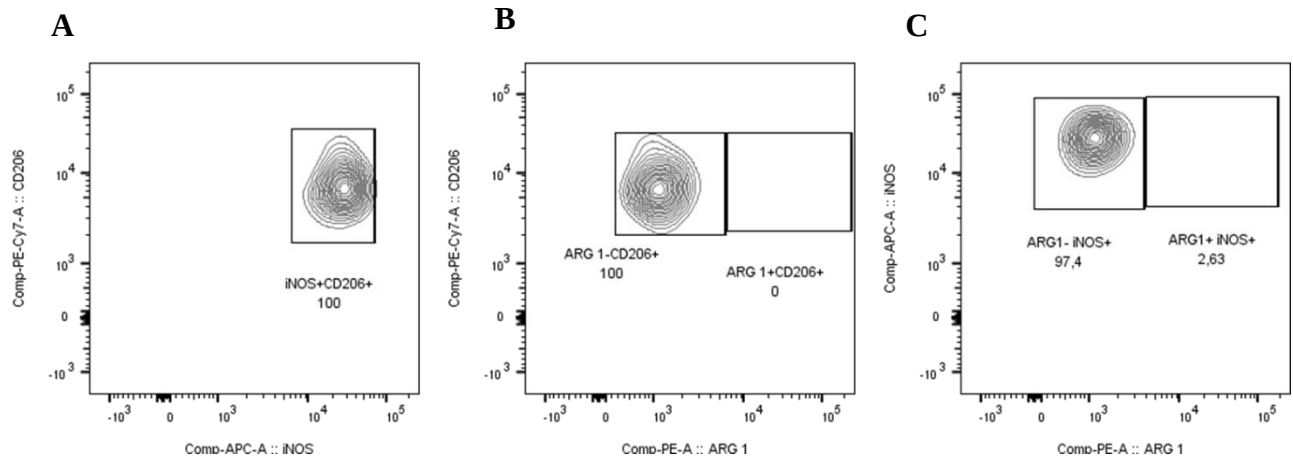


Legenda: Proporção de fenótipo M1 e M2 na subpopulação LPM. (A) Proporção de macrófagos M1 na população LPM 7 DPI; (B) Proporção de macrófagos M1 na população LPM 15 DPI (C) Proporção de macrófagos M1 na população LPM 21 DPI; (D) Proporção de macrófagos M2 na população LPM 7 DPI (E) Proporção de macrófagos M2 na população LPM 15 DPI; (F) Proporção de macrófagos M2 na população LPM 21 DPI; (G) Proporção de macrófagos M1/M2 na população LPM 7 DPI; (H) Proporção de macrófagos M1/M2 na população LPM 15 DPI; (I) Porcentagem de macrófagos M1/M2 na população LPM 21 DPI

Nota: MØB/c + *Lb* ou MØB/c + *Lm* foram marcados com os anticorpos monoclonais: F4/80, CD206, CD11b, iNOS e ARG 1 e analisados por citometria de fluxo para investigação dos fenótipos M1/M2. Foram considerados macrófagos com perfil M1 aqueles que expressam ARG¹⁻ iNOS⁺, Macrófagos com perfil M2 os que expressam ARG1⁺ CD206⁺ e macrófagos com perfil misto M1/M2 os que expressam ARG 1⁺ iNOS⁺.

Fonte: A autora, 2023.

Figura 25 – População SPM de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* ou *L. major*.

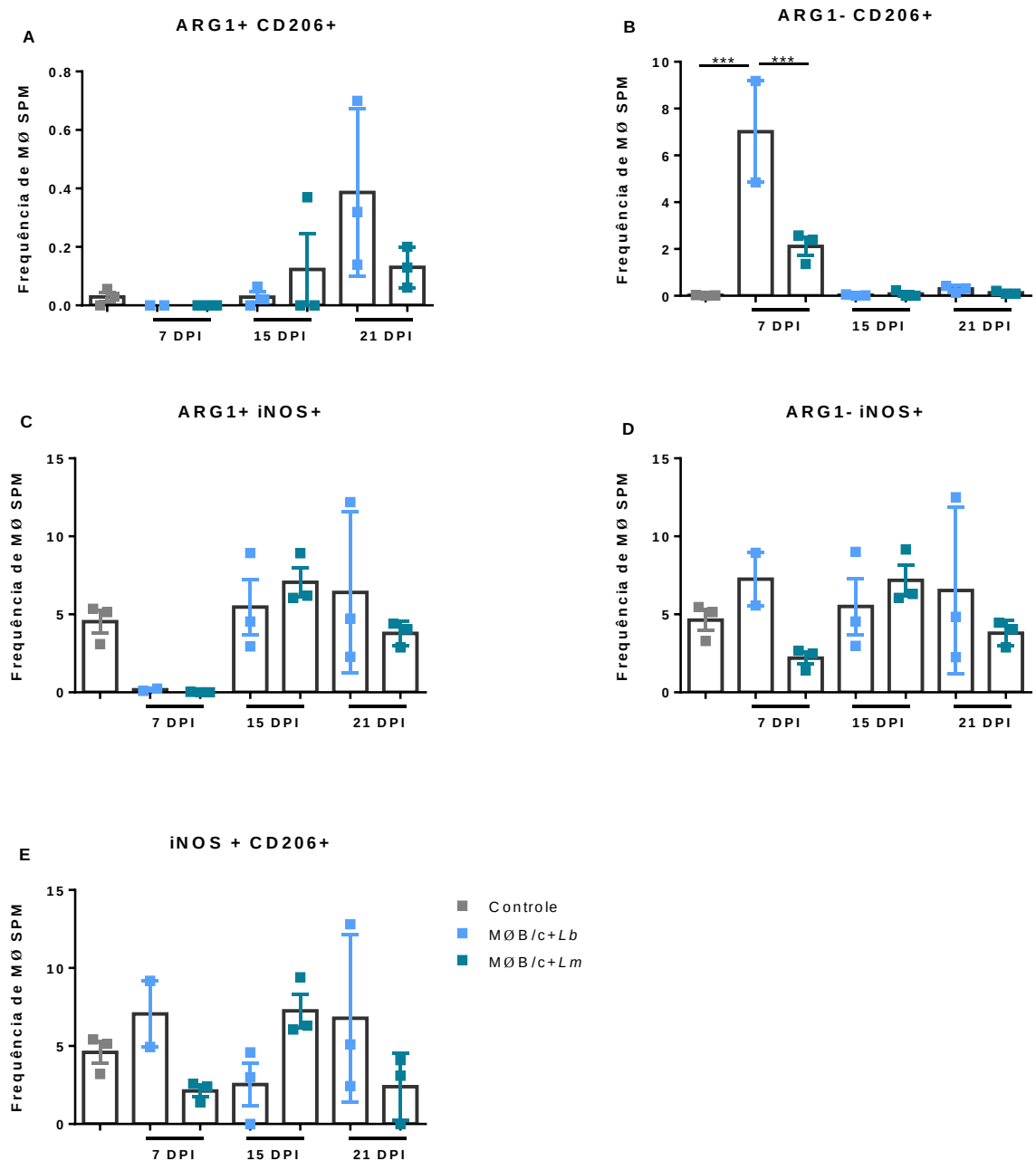


Legenda: População SPM de BALB/c infectados. (A); Macrófagos SPM expressando iNOS⁺CD206⁺; (B) Macrófagos SPM expressando ARG 1⁻CD206⁺ e ARG 1⁺CD206⁺; (C) Macrófagos SPM expressando ARG 1⁻iNOS⁺ e ARG 1⁺iNOS⁺.

Nota: MØB/c + *Lb* ou MØB/c + *Lm* foram marcados com os anticorpos monoclonais: F4/80, CD206, CD11b, iNOS e ARG 1 e analisados por citometria de fluxo para investigação dos fenótipos M1/M2 e das populações de grandes macrófagos peritoneais (LPM) e pequenos macrófagos peritoneais (SPM).

Fonte: A autora, 2023.

Figura 26 – Frequência de macrófagos SPM expressando marcadores para fenótipo M1 e M2.



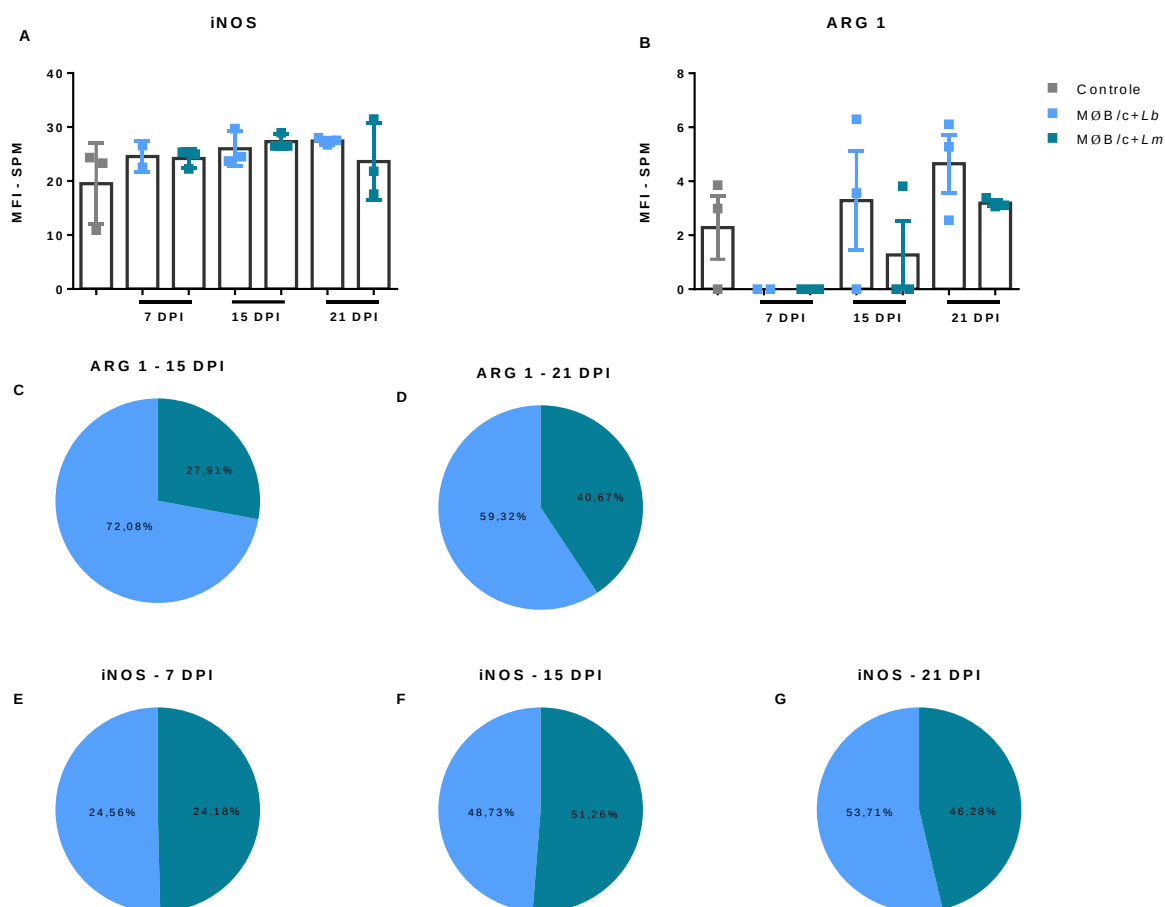
Legenda: Frequência de macrófagos SPM. (A) Frequência de macrófagos SPM expressando ARG 1⁺ CD206⁺ (B) Frequência de macrófagos SPM expressando ARG 1⁻ CD206⁺ (C) Frequência de macrófagos SPM expressando ARG 1⁺ iNOS⁺; (D) Frequência de macrófagos SPM expressando ARG 1⁻ iNOS⁺; (E) Frequência de macrófagos SPM expressando iNOS⁺ CD206⁺. ***p<0.001

Fonte: A autora, 2023.

A proporção de MFI para os marcadores ARG 1 e iNOS na população SPM indica que MØB/c + *Lb* tenderam a expressar mais ARG 1 na segunda (15 DPI) e terceira semana de infecção (21 DPI) (Figura 27 B). Já a proporção de iNOS indica que somente na terceira semana de infecção os MØB/c + *Lb* tenderam a expressar mais iNOS comparado aos MØB/c + *Lm* (Figura 27 A e 27 G).

Os resultados referentes a proporção da frequência dos marcadores para os fenótipos M1 e M2 demonstrou que MØB/c + *Lb*, aparentemente, expressam mais um perfil M1 nos períodos de 7 e 21 DPI (Figuras 28 A e 28 C). Os dados referentes ao fenótipo M2 mostraram que, no período de 15 DPI, MØB/c + *Lb* tendem a expressar menos um perfil M2 (Figura 28D), contudo com 21 DPI há uma inversão e esses macrófagos passam a expressar mais marcadores característicos de um perfil M2, apresentando um perfil misto de macrófagos M1/M2 nesse momento da infecção (Figuras 28 E e 28 H). Com 7 DPI os MØB/c + *Lb* também tenderam a expressar uma maior proporção de marcadores para um perfil misto M1/M2 comparado aos MØB/c + *Lm*, porém, com 15 DPI ocorre o inverso (Figuras 28 F e 28 G). Dessa maneira, os MØB/c + *Lm* aparentemente apresentam mais um perfil misto de marcadores M1/M2 neste período.

Figura 27 – Intensidade média de Fluorescência (MFI) da população SPM.

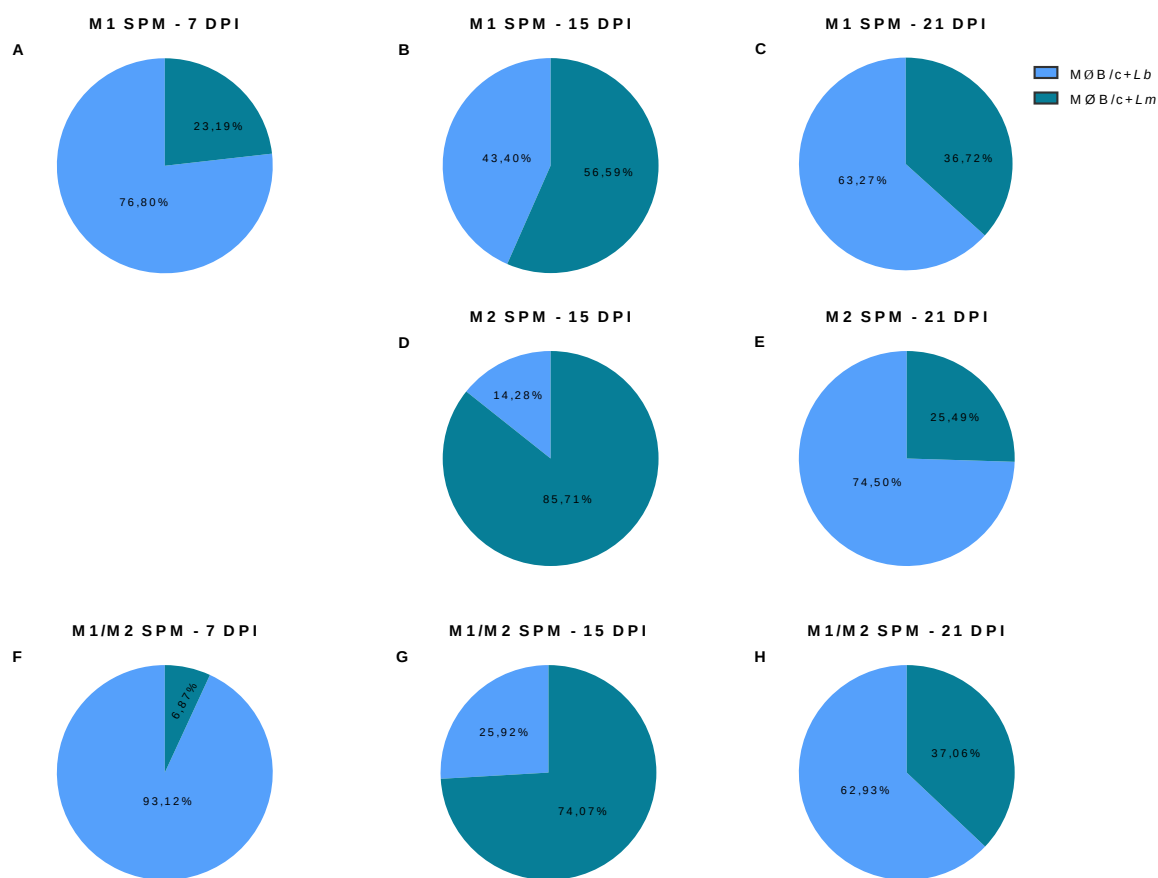


Legenda: MFI de macrófagos SPM. (A) MFI de iNOS em macrófagos SPM; (B) MFI de ARG 1 em macrófagos SPM; (C) Proporção de ARG 1 em macrófagos SPM 15 DPI; (D) Proporção de ARG 1 em macrófagos SPM 21 DPI; (E) Proporção de iNOS em macrófagos SPM 7 DPI; (F) Proporção de iNOS em macrófagos SPM 15 DPI; (G) Proporção de iNOS em macrófagos SPM 21 DPI. *** $p < 0.001$

Nota: Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania braziliensis* ou *Leishmania major* foram marcados com os anticorpos monoclonais: F4/80, CD206, CD11b, iNOS e ARG 1 e analisados por citometria de fluxo para investigação dos fenótipos M1/M2. Não foi possível demonstrar em gráfico a proporção de ARG 1 de macrófagos de BALB/c com 7 DPI pois, os valores foram iguais a zero.

Fonte: A autora, 2023.

Figura 28 – Proporção de marcadores M1 e M2 na população SPM.



Legenda: Proporção de fenótipo M1 e M2 na população SPM. (A) Proporção de macrófagos M1 na população SPM 7 DPI; (B) Proporção de macrófagos M1 na população SPM 15 DPI (C) Proporção de macrófagos M1 na população SPM 21 DPI; (D) Proporção de macrófagos M2 na população SPM 15 DPI (E) Proporção de macrófagos M2 na população SPM 21 DPI; (F) Proporção de macrófagos M1/M2 na população LPM 7 DPI; (G) Proporção de macrófagos M1/M2 na população LPM 15 DPI; (H) Porcentagem de macrófagos M1/M2 na população LPM 21 DPI.

Nota: Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania braziliensis* ou *Leishmania major* foram marcados com os anticorpos monoclonais: F4/80, CD206, CD11b, iNOS e ARG 1 e analisados por citometria de fluxo para investigação dos fenótipos M1/M2. Não foi possível demonstrar em gráfico a proporção de macrófagos M2 de BALB/c com 7 DPI pois, os valores foram igual a zero.

Fonte: A autora, 2023.

4 DISCUSSÃO

A população de macrófagos desempenha um papel significativo na infecção por *Leishmania*, podendo acumular funções de células hospedeiras, efetoras e eferocitose. Dependendo do estímulo, quando ativado, o macrófago pode adquirir a capacidade induzir uma resposta inflamatória por meio da produção de mediadores tais como, citocinas pró-inflamatórias, NO e ROS e matar o parasito ou pode assumir um perfil anti-inflamatório e manter um ambiente propício para a replicação da *Leishmania* (Giudice *et al.*, 2012; Scorsa, Carvalho e Wilson, 2017; Costa-da-Silva *et al.*, 2022; Almeida *et al.*, 2023). Assim, a interação entre o macrófago e a *Leishmania* desempenha um papel fundamental na patogênese da infecção. Uma vez que, camundongos BALB/c apresentam um perfil de resistência quando infectados pela *L. braziliensis* e um perfil de susceptibilidade quando infectados pela *L. major* (Sacks e Noben-Trauth, 2002; Rocha *et al.*, 2007), buscamos compreender a funcionalidade e o perfil fenotípico dessas células usando esses dois modelos de infecção.

Em nosso estudo, o perfil do curso clínico da lesão dos animais infectados com *L. braziliensis* e *L. major* na orelha, seguiu o esperado. A lesão do BALB/c infectado com *L. braziliensis* foi pequena e resolutive em três semanas, enquanto a infecção com *L. major* promoveu uma lesão maior e progressiva no mesmo período de tempo. De Moura *et al.* (2005) observaram a formação de lesão na orelha de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* e posterior cura clínica associado a resposta Th1 mas, com persistência de parasitos nos linfonodos drenantes, podendo refletir os casos de resposta imune protetora ou a forma mucosa da doença. Entretanto, nas condições experimentais do nosso estudo não detectamos parasitos na orelha dos animais infectados com *L. braziliensis* e nem os linfonodos drenantes, sendo necessário uma nova avaliação da carga parasitária da infecção com as duas espécies dermatrópicas de *Leishmania* para fazer a análise comparativa. O tamanho e pico da lesão na orelha diferiu um pouco em relação ao trabalho de Moura e colaboradores (2005), que ocorreu entre 4-5 semanas de infecção com lesões de aproximadamente 1mm. De acordo com Cangussú *et al.*, 2009 o curso da lesão de camundongos BALB/c infectados na orelha com *L. major* também apresentou crescimento progressivo com um inóculo de 10^3 promastigotas.

Contudo, o curso da lesão foi acompanhado por 12 semanas, apresentando lesão menor que 0.2 mm na terceira semana de infecção e aproximadamente 0.3 mm na quinta semana (Cangussú *et al.*, 2009), diferindo dos nossos resultados no qual foi observado lesão de 0.15mm com 15 DPI e 0.33mm com 21 DPI (Figura 15 A). Essas divergências observadas nos resultados podem estar relacionadas às diferenças entre as cepas dos parasitos e ao inóculo usado em nosso estudo.

Analizamos o perfil dos macrófagos peritoneais em três momentos diferentes da infecção nos dois modelos: 7, 15 e 21 DPI. Observamos que os macrófagos oriundos de camundongo BALB/c infectados com *Leishmania braziliensis* apresentaram maior capacidade microbicida quando infectados *in vitro* associado a um aumento da produção de NO, principalmente em 15 DPI (Figuras 17 A e 18).

Estudos já demonstraram que, macrófagos peritoneais de BALB/c são capazes de eliminar a *L. (V.) guyanensis* através da produção de ROS (Souza-Franco *et al.*, 2006). A infecção por *Leishmania major* induz uma resposta de estresse celular em macrófagos residentes de camundongo C57BL/6 (modelo de resistência) que induz sinais pró-inflamatórios (Filardy *et al.*, 2014). Além disso, foi demonstrado que os monócitos inflamatórios de C57BL/6 frente a infecção com *L. major* controlam a infecção via produção de ROS e NO (Gonçalves *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2011). Esses dados indicam que nesses modelos de resistência, a infecção por *Leishmania* pode ser controlada por monócitos e macrófagos pela produção de ROS e NO, sendo mecanismos microbicidas importantes envolvidos na resistência à leishmaniose. (Horta *et al.*, 2012; Carneiro *et al.*, 2016; Omar e Abdelal, 2022; Costa-da-Silva *et al.*, 2022).

Interessantemente, dados da literatura demonstram que macrófagos infectados com *L. major* dependem de citocinas de células T para controlar a infecção, enquanto a *L. braziliensis* ativa diretamente os macrófagos para matar o parasito (Scott e Sher, 1986).

Em camundongos resistentes, a infecção por *L. major* parece iniciar uma resposta precoce Th2 que é redirecionada efetivamente em camundongos resistentes por mecanismos dependentes de IL-12. Camundongos BALB/c apresentam falhas no desenvolvimento da resposta Th1 e esse desequilíbrio induzido pela *L. major* nos camundongos suscetíveis, direciona a resposta para um perfil mais Th2 associado a produção de citocinas IL-4, IL-13, IL-10 e TGF- β e diminuição dos mecanismos microbicidas dos macrófagos, impedindo o controle da infecção (Sacks e Noben-Trauth, 2002; Holzmüller *et al.*, 2018).

A manutenção de uma resposta Th1 equilibrada em associação a produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-1 β , IL-12 e TNF- α e aumento dos mecanismos microbicidas dos macrófagos levam ao perfil de resistência do BALB/c frente a infecção pela *L. braziliensis* (Dkrey, Lima e Titus, 1998; De Moura *et al.*, 2005; Holzmuller *et al.*, 2018).

Na infecção com *L. major*, macrófagos inflamatórios imaturos não conseguem induzir uma resposta M1 em camundongos BALB/c. Em contrapartida, na infecção com *L. braziliensis*, as linhagens de camundongo resistentes convertem macrófagos em um fenótipo M1 e reduzem a expressão de arginase 1 (Vellozo *et al.*, 2017; Vellozo, Ribeiro-Gomes e Lopes, 2022). Com isso, a resistência à infecção por *Leishmania* depende da maturação de macrófagos inflamatórios M1 e muda dependendo da espécie de *Leishmania*.

A interação com neutrófilos também pode regular o curso da infecção através da modulação de fenótipos dos macrófagos. A presença de neutrófilos pode contribuir para indução de uma resposta Th2-M2 e correlacionar-se com a susceptibilidade de BALB/c à infecção por *L. major* (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000; Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004). Enquanto, na infecção por *L. braziliensis*, neutrófilos e macrófagos parecem cooperar, promovendo resistência em camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados (Novais *et al.*, 2009; Carlsen *et al.*, 2015; Vellozo, Ribeiro-Gomes e Lopes, 2022; Almeida *et al.*, 2023). Em concordância com os dados da literatura, observamos que frente a infecção pela *L. major*, os macrófagos não apresentam capacidade microbicida suficiente para controlar a infecção, enquanto que, frente a infecção pela *L. braziliensis* observamos um aumento na capacidade microbicida dos macrófagos infectados *in vitro* associado a um aumento da produção de NO, principalmente em 15 DPI.

Para avançar na investigação sobre a possível capacidade da infecção com *L. braziliensis* e com *L. major* modular, diferentemente, o perfil fenotípico dos macrófagos peritoneais, nós analisamos um conjunto de marcadores. Conforme já descrito na literatura, observamos uma maior população de macrófagos LPM (72,9 %) e menor população SPM (5,66 %) (Ghosn *et al.*, 2010; Cassado; D'Império Lima; Bortoluci, 2015).

Cassado *et al.* (2011), mostraram que há uma substituição de macrófagos LPM por SPM e monócitos de camundongos C57BL/6 infectados com *Trypanosoma cruzi* ou estimulados com Zymosan por inoculação intraperitoneal.

Apesar de pertencerem a mesma família, o *T. cruzi* se comporta de maneira diferente da *Leishmania*, apresentando em seu ciclo biológico uma forma sanguínea (Tripomastigota) e a capacidade de infectar células do tecido cardíaco, esofágico e intestinal. Em nosso estudo utilizamos um inóculo e estímulo diferente que pode ter colaborado para que não ocorresse a “Reação de desaparecimento de macrófagos” frente a infecção pela *Leishmania*.

Avaliando as subpopulações de macrófagos peritoneais de BALB/c observamos que a infecção com *L.braziliensis*, promoveu uma maior frequência dos marcadores M1, principalmente em 7-15 DPI quando comparados com os macrófagos de *L. major* (Figura 24 A e B). A maior frequência de macrófagos LPM com fenótipo M1 em 7 e 15 DPI e a produção de NO pode ter colaborado para a resolução da lesão e o perfil resistência dos camundongos BALB/c infectados com *L.braziliensis*. Do mesmo modo, os macrófagos SPM que correspondem a menor população, também apresentaram um perfil M1 (Figura 28 A e 28 C). Por outro lado, a infecção pela *L. major* induziu um perfil mais M2, sobretudo com 7 DPI (Figura 24 D) que favorece a multiplicação do parasito e se relaciona com o crescimento progressivo das lesões. É possível que com 21 DPI a resposta imune ainda não esteja totalmente estabelecida quanto ao perfil dominante, o que explica a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos peritoneais. Como o BALB/c é suscetível a infecção por *L. major*, esses níveis de citocinas podem não ser suficientes ou não sustentem a modulação da resposta para um perfil de resistência Th1-M1 e a resposta é direcionada para um perfil de susceptibilidade Th2-M2.

Wang *et al* (2019), mostraram que macrófagos M2b podem produzir citocinas pró e anti-inflamatórias, além de, baixar os níveis de IL-12, que é o inverso funcional de macrófagos M1. Em nosso estudo, observamos que frente a infecção pela *L. major* os macrófagos apresentaram um perfil M2 e produziram citocinas pró-inflamatórias. Com isso, uma outra possibilidade, é que o subtipo M2b esteja atuante na infecção por essa espécie, o que explicaria a produção de citocinas pró-inflamatórias.

Até o momento não foi possível avaliar os níveis de citocinas produzidas pelos macrófagos frente a infecção pela *L. braziliensis*, o que deverá ser feito futuramente para comparar com os dados obtidos do modelo de infecção *L. major*. Acreditamos que a infecção com *L. braziliensis* possa induzir um perfil mais pró-inflamatório que pode explicar o aumento da capacidade microbicida dos macrófagos.

Os estudos de Vellozo *et al.* (2017) e Rigoni *et al.* (2020) mostraram que o tratamento com citocinas RANKL e INF- γ aumentaram a produção de NO pelos macrófagos de BALB/c e ajudou a induzir uma mudança no fenótipo de macrófagos M2 para M1 que é eficaz no controle da infecção pela *L. major*. Contudo, o tratamento com o ácido trans retinóico (ATRA) fez com que macrófagos inflamatórios de camundongos C57BL/6 perdessem a capacidade de controlar a infecção pela *L. major* promovendo a transição de macrófagos M1 para M2. Além de, reduzir citocinas pró-inflamatórias, ROS e NO após a injeção intraperitoneal. Esses dados demonstram a importância do fenótipo M1 para o controle da infecção pela *Leishmania* sp.

Em nosso estudo observamos que a infecção pela *L. braziliensis* promoveu maior frequência de macrófagos peritoneais com fenótipo M1 até 15 DPI, que antecede a resolução da lesão. Além disso, os macrófagos apresentam maior capacidade microbicida associada ao aumento de NO. Já, os macrófagos peritoneais oriundos de animais infectados por *L. major* apresentam um perfil M2, sobretudo em 7 DPI e um perfil misto M1/M2 com 21 DPI e não aumentou a produção de citocinas pró-inflamatórias e NO, o que pode ter favorecido a multiplicação do parasito.

Juntos nossos resultados sugerem que dependendo do microambiente os macrófagos alteram o seu perfil fenotípico e os macrófagos peritoneais podem, em algum momento do desenvolvimento do processo infeccioso, ter assumido um perfil pró-inflamatório eficiente para controlar a infecção pela *L. braziliensis* como macrófago M1. Enquanto que a infecção com a *L. major* se correlaciona com a presença de macrófagos M2 e não controle da infecção

CONCLUSÃO

Camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* são capazes de controlar totalmente a lesão. Os animais infectados com *L. major* desenvolveram leões que aumentaram de forma progressiva.

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* apresentaram maior capacidade microbida *in vitro* quando comparado aos macrófagos provenientes de BALB/c infectados com *L. major*. A maior capacidade microbida *in vitro* foi associada a um ligeiro aumento na produção de óxido nítrico.

A partir da análise por citometria foi possível definir, neste modelo, diferentes populações de macrófagos a partir dos parâmetros de tamanho e granulosidade. Foi demonstrado que a população de macrófagos LPM é maior que a população SPM.

A infecção com *L. braziliensis* promoveu a maior frequência de macrófagos LPM e SPM com fenótipo M1 até 15 DPI, que antecede a resolução da lesão. Já os macrófagos peritoneais oriundos de animais infectados por *L. major* apresentaram um perfil mais M2, sobretudo com 7 DPI, um perfil M1 e misto M1/M2 com 21 DPI e não aumentou a produção de citocinas pró-inflamatórias, o que pode ter favorecido a multiplicação do parasito.

No geral, estes resultados concordam com a ideia de que a resistência à infecção por *L. braziliensis* se correlaciona com a indução de macrófagos classicamente ativados (M1), enquanto a infecção com *L. major* se correlaciona com a presença de macrófagos alternativamente ativados (M2) e não controle da infecção.

Diante disso, esse estudo poderá contribuir para o melhor entendimento do papel dos macrófagos na infecção pela *Leishmania* sp., uma vez que, a resposta inata tem se mostrado importante na definição do curso da infecção. Além disso, esse conhecimento pode contribuir para revelar alvos para intervenções vacinais e terapêuticas a partir da modulação dos macrófagos.

REFERÊNCIAS

- Akhoundi, M. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. 2016; PLoS Negl Trop Dis 10 (3): e0004349.
- Almeida, F.S, Vanderley, S.E.R., Comberlang, F.C., Andrade A.G.D, Cavalcante-Silva, L.H.A., Silva E.D.S, Palmeira, P.H.D.S, Amaral, I.P.G.D., Keesen T.S.L. Leishmaniasis: Immune Cells Crosstalk in Macrophage Polarization. Tropical Medicine and Infectious Disease. 2023; 8(5):276.
- Ávila, L.R., Gomes, C.M., Oliveira, P.G., Gomes, R.S., Vinaud, M.C., Dorta, M.L., Uliana S.R.B., Ribeiro-Dias, F., Oliveira, M.A.P. Promastigote parasites cultured from the lesions of patients with mucosal leishmaniasis are more resistant to oxidative stress than promastigotes from a cutaneous lesion. Free Radic Biol Med. 2018.
- Bacellar, O., Machado, P. e Carvalho, E. In: Livro Aldina Barral e Jackson Costa. Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas. 1. ed.- Salvador, Editora Gráfica Contexto, 2011.
- Barratt, J., *et al.* Isolation of Novel Trypanosomatid, *Zelonia australiensis* sp. nov. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) Provides Support for a Gondwanan Origin of Dixerous Parasitism in the Leishmaniinae. 2017; PLoS Negl Trop Dis 11(1):e0005215.
- Brasil, Ministério da saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. - Brasília, 2017. 189p.
- Cangussú, S. D. De Souza, C. C., Campos, C.F., Vieira, L.Q., Afonso, L.C.C, Arantes, R.M.E. Histopathology of *Leishmania major* infection: revisiting *L. major* histopathology in the ear dermis infection model. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009; Vol. 104(6): 918-922.
- Carvalho, E. M. *et al.* Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. Acta Trop. 1994; 56, 315–325.
- Carvalho, A.M., Bacellar, O, Carvalho, E.M. Protection and Pathology in *Leishmania braziliensis*. Infection. Pathogens. 2022; 11(4):466.
- Carvalho, A. K. *et al.* Differential Recruitment of Dendritic Cells Subsets to Lymph Nodes Correlates with a Protective or Permissive T-Cell Response during *Leishmania (Viannia) Braziliensis* or *Leishmania (Leishmania) Amazonensis* Infection. Mediators of Inflammation, 2016. 12p.
- Carneiro, P. P., Conceição, J., Macedo, M., Magalhães, V., Carvalho, E. M., e Bacellar, O. The role of nitric oxide and reactive oxygen species in the killing of *Leishmania braziliensis* by monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis. PLoS ONE, 2016; 11(2).
- Cassado, A.A; D’Império Lima, M.R; Bortoluci, K.R. Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function. Front. Immunol, 2015; 6:225.

Carlsen, E.D., Jie, Z., Liang, Y., Henard C.A., Hay C., Sun, J., *et al.* Interactions between neutrophils and *Leishmania braziliensis* amastigotes facilitate cell activation and parasite clearance. *Journal of Innate Immunity*. 2015;7:354-363

Chambers M., Rees A., Cronin J.G., Nair M., Jones N. e Thornton C.A. Macrophage Plasticity in Reproduction and Environmental Influences on Their Function. *Front. Immunol.* 2021, 11:607328.

Conceição-Silva, F. e Alves, C.R. (Org.). *Leishmanioses do continente americano*. – Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014. 512p.

Costa D.C.S. *et al.* Oral Manifestations in the American Tegumentary Leishmaniasis. *Plos One*. 2014; 9(11): e109790.

Costa-da-Silva, C., De Oliveira, D. Ferreira, J. R. M., Guimarães-Pinto, K., Freire-de-Lima, L., Morrot, A., Decote-Ricardo, D. Filardy. A. A. e Freire-de-Lima, C. G. Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. *Trop Med Infect Dis*. 2022, 7(4): 54.

Cupolillo. *et al.* Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic áreas in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 41:3. 126-3.132, 2003.

Cysne-Finkelstein, L. *et al.* Evidence of subpopulations with distinct biological features within a *Leishmania (Viannia) braziliensis* strain. *Protist*, v.169, 1.ed, 107-131, 2018.

Daga, M.K, Rohatgi, I. e Mishra, R. Leishmaniasis. *Indian J Crit Care Med*, 2021. vol. 25,Suppl 2: S166-S170.

De Carvalho, R.V.H. *et al.* Endosymbiotic RNA virus inhibits Leishmania-induced caspase-11 activation. *iScience*, 2021; 24 102004.

De Krey, G.K., Lima, H.C. e Titus, R.G. Analysis of the imune responses of mice infection with *Leishmania braziliensis*. *Infection and Immunity*, 1998. p. 827-829.

De Moura, T. R. *et al.* Toward a novel experimental model of infection to study amarican cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infection and Immunity*, 2005. p. 5827-5834.

De Oliveira, C.I. *et al.* A. *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. *Microbes and Infection*, 2004. p. 977-984.

De Oliveira e Brodsky, C. I. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. *Frontiers in Immunology*, 2012. v.3:e00145

De Araújo, C. F. *et al.* *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* amastigote extracts differ in their enhancement effect on Leishmania infection when injected intradermally. *BMC Research Notes*. 2014; 7:70.

Dutra & Da Silva. In: Leon L. e Torres-Santos, E. (Eds.). Different aspects on chemotherapy of trypanosomatids. Editora Nova Biomedical, 2017. Cap.3, p. 39-57.

Falcão, S. A. C. *et al.* Exposure to *Leishmania braziliensis* triggers neutrophil activation and apoptosis. PLoS Negl Trop Dis, 2015 9(3): e0003601.

Filardy A.A., Costa-da-Silva A.C., Koeller C.M., Guimarães-Pinto K., Ribeiro-Gomes F.L., Lopes M.F., Heise N., Freire-de-Lima C.G., Nunes M.P., Dos Reis G.A. Infection with *Leishmania major* induces a cellular stress response in macrophages. PLoS ONE, 2014; 9:e85715.

França-Costa, J. *et al.* Arginase I, Polyamine, and Prostaglandin E2 Pathways Suppress the Inflammatory Response and Contribute to Diffuse Cutaneous Leishmaniasis. The Journal of Infectious Diseases. 2015, v.211, p. 426-435.

Fraga, J. *et al.* Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. Infect Genet Evol. 2010; 10: 238–245.

Fraternale A., Brundu S., Magnani M. Polarization and Repolarization of Macrophages. J Clin Cell Immunol. 2015, 6:319.

Flaming, B.D. e Mosser, D.M. Regulatory macrophages: setting the threshold for therapy. European journal of immunology, 2011; 41(9): 2498-2502.

Ferrante, C.J, Pinhal-Enfield G., Elson G., Cronstein B.N., Hasko G., Outram S., *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, 36:921–31.

Geiger, A. *et al.* Escaping Deleterious Immune Response in Their Hosts: Lessons from Trypanosomatids. Frontiers in Immunology. 2016; v.7, p. 212.

Grybchuck, D. *et al.* RNA viruses in trypanosomatid parasites: a historical overview. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2018; 113(4): e170487

Ghosn, E.E, Cassado,A.A, Govoni, G.R, Fukuhara, T., Yang, Y., Monarck, D.M, *et al.* Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010, 107(6):2568–73.

Gonçalves, R. *et al.* Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. Journal of experimental medicine. 2011; 208(6): 1253-1265.

Giudice, A. *et al.* O. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. BMC Infectious Diseases 2012, v. 12, p.75.

Green, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. Analytical Biochemistry, 1982; 126(1), 131-138.

Hashimoto D., Chow A., Noizat C., Teo P., Beasley M.B., Leboeuf M., Becker C.D., See P., Price J., Lucas D., Greter M., Mortha A., Boyer S.W., Forsberg E.C., Tanaka M., Van Rooijen N., García-Sastre A., Stanley E.R., Ginhoux F., Frenette P.S., Merad M. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*. 2013 Apr 18;38(4):792-804.

Horta, M. F. *et al.* Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Parasitology Research*. 2012; v.2012: 203818.

Hölscher, C. *et al.* Impairment of alternative macrophage activation delays cutaneous leishmaniasis in nonhealing BALB/c mice. *J Immunol*. 2006;176: 1115–1121

Holzmüller, P. *et al.* Trypanosomatid Infections: How Do Parasites and Their Excreted-Secreted Factors Modulate the Inducible Metabolism of L-Arginine in Macrophages? *Frontiers in Immunology*. 2018, v.9, p. 778.

Italiani, P e Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Frontiers in Immunology*. 2014; v.5, p.514.

Ishikawa, E. A. *et al.* Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002, 96, suppl. 1:S111-121.

Ives, A., Ronet, C., Prevel, F., Ruzzante, G., Fuertes-Marraco, S. *et al.* Leishmania RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science*, 2011; 331: 775–778.

Lessa, M. M. *et al.* Mucosal Leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. 2007, 73:843-847.

Lima, H.C., Bleyenbergh, J.A, Titus, R.G. A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals. *Parasitol Today*, 1997. 13(2):80-2.

Loeuillet C., Bañuls, A.L. e Hide M. Study of *Leishmania* pathogenesis in mice: experimental considerations. *Parasites & Vectors*. 2016; 9:144.

Lowry, O. H. *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951, 193:265-275.

Martinez, F. O. e Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports*. 2014; 6:13.

Márquez, L. M. e Roossinck M. J. Do persistent RNA viruses fit the trade-off hypothesis of virulence evolution? *Curr. Opin. Virol.* 2012; 2, 556–560.

Bruschi, F. e Gradoni L. (eds.). *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases*. Springer International Publishing, 2018; 2, 15-30.

Mukhopadhyay, D. *et al.* M2 Polarization of Monocytes-Macrophages Is a Hallmark of Indian Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015, 9(10): e0004145.

Mosser, D. M e Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *NIH Public Access*. 2009; 8: 958-969.

Neves, D.P. *Parasitologia humana*. – 12.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2011.

Novais, F. O. *et al.* Neutrophils and Macrophages Cooperate in Host Resistance against *Leishmania braziliensis* Infection *The journal of Immunology*. 2009; 183:8088-8098.

Novais, F. O. *et al.* Human Classical Monocytes Control the Intracellular Stage of *Leishmania braziliensis* by Reactive Oxygen Species. *The Journal of Infectious Diseases*, 2014. v. 209, p.1288–1296.

Natale, C. C., Mello, P. S. e Manzoni de Almeida, D. The Importance Murine Models in Characterization of the Immune Response Against Leishmaniasis : a Review. *Atlas de Ciências da Saúde*, 2016. São Paulo, v.4, N°.3, p. 35-59.

Omar, M., Abdelal, H.O. Nitric oxide in parasitic infections: a friend or foe? *Journal of Parasitic Diseases*, 2022. 46, 1147–1163.

Organização Pan Americana da Saúde. *Leishmanioses: informe epidemiológico das Américas* [Internet]. N°. 10, Washington, D.C.: OPS; 2021. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>.

Organização Pan Americana da Saúde. *Leishmanioses: informe epidemiológico das Américas* [Internet]. N°. 11, Washington, D.C.: OPS; 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/documentos/leishmanioses-informe-epidemiologico-das-americas-no-11-dezembro-2022>

Parihar, A., Eubank, T. D. e Doseff, A. I. Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death. *Journal of Innate Immunity*. 2010; 2: 204-215.

Pereira WF, Ribeiro-Gomes FL, Guillermo LV, Vellozo NS, Montalvao F, Dosreis GA, *et al.* Myeloid-derived suppressor cells help protective immunity to *Leishmania major* infection despite suppressed T cell responses. *Journal of Leukocyte Biology*. 2011;90:1191-1197

Ribeiro-Gomes FL, Otero AC, Gomes NA, Moniz-De-Souza MC, Cysne-Finkelstein L, Arnholdt AC, *et al.* Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *Journal of Immunology*. 2004;172:4454-4462

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

Rossi, M. e Fasel, N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! *Int Immunol*. 2018, 30(3): 103–111.

Ruiz-Postigo, J.A *et al.* Global leishmaniasis surveillance: 2019–2020, a baseline for the 2030 Roadmap. *Weekly Epidemiological Record*, 2021. N° 35; 3: 401-419.

Sacks, D., Noben-Trauth, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*. 2002, 2 , 845–858.

Scorza, B. M., Carvalho, E. M. e Wilson, M. E. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. *Int. J. Mol. Sci*. 2017, 18(6), 1296.

Schönian, G., Mauricio, I. e Cupolillo, E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends Para- sitol*. 2010; 26: 466–9.

Scott P. *et al.* Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J Exp Med*. 1988; 1;168(5):1675-84.

Scott, P. e Sher, A. A spectrum in the susceptibility of leishmanial strains to intracellular killing by murine macrophages. *Journal of Immunology*. 1986;136:1461-1466

Scott, P. e Novais, F. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nature Reviews Immunology*, 2016. p.12.

Shaw, J. J. e Lainson, R. Leishmaniasis in Brazil: Observations on seasonal variations of *Lutzomyia flaviscutellata* in diferente types of forest and its relationship to enzootic rodent Leishmaniasis (*Leishmania mexicana amazonensis*). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1972. 66 (5): 709.

Sousa-Franco J., Araújo-Mendes E., Silva-Jardim I., L-Santos J., Faria D.R., Dutra W.O., Horta M.F. Infection-induced respiratory burst in BALB/c macrophages kills *Leishmania guyanensis* amastigotes through apoptosis: Possible involvement in resistance to cutaneous leishmaniasis. *Microbes Infect*. 2006;8:390–400.

Stepniak, D.T *et al.* Expression of a imune checkpoint receptor VSIG4 defines new subsets of mouse peritoneal macrophages Thermo Fisher Scientific, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008.<<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/posters/expression-immune-checkpoint-receptor-vsigt4-mouse-peritoneal-macrophages-poster.pdf>> Acesso em: 05 de abril de 2022.

Tacchini-Cottier F, Zweifel C, Belkaid Y, Mukankundiye C, Vasei M, Launois P, *et al.* An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4⁺ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *Journal of Immunology*. 2000;165:2628-2636

Tomiotto-Pellissier, F. *et al.* Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. *Frontiers in Immunology*, 2018. v.9

Torres-Guerrero, E. *et al.* Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, 2017. v.6, p. 750.

Teixeira, D. E. Atlas Didático. Ciclo de vida da *Leishmania*. 1ª Ed. – Rio de Janeiro. Fundação CECIERJ, 2013.

Vellozo, N.S, Ribeiro-Gomes, F.L, & Lopes, M.F. Shifting Macrophage Phenotypes in Leishmaniasis. *Macrophages - Celebrating 140 Years of Discovery*. IntechOpen, 2022.

Vellozo N.S., Pereira-Marques S.T., Cabral-Piccin M.P., Filardy A.A., Ribeiro-Gomes F.L., Rigoni TS, *et al.* All-trans retinoic acid promotes an M1- to M2-phenotype shift and inhibits macrophage-mediated immunity to *Leishmania major*. *Frontiers in Immunology*. 2017;8:1560

Wang L.X., Zhang S.X., Wu H.J., Rong X.L., Guo J. M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *J Leukoc Biol*. 2019, 106(2):345-358.

Wang *et al.*: Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. *BMC Immunology*, 2013; 14:6.

Yao Y., Xu X.H. e Jin L. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Front. Immunol*. 2019, 10:792.

Zangger, H. *et al.* Detection of *Leishmania* RNA Virus in *Leishmania* Parasites. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 2013; 7(1): e2006.

Zangger H, Hailu A, Desponds C, Lye LF, Akopyants NS, Dobson DE, Ronet C, Ghalib H, Beverley SM, Fasel N. *Leishmania aethiopica* field isolates bearing an endosymbiotic dsRNA virus induce pro-inflammatory cytokine response. *PLoS Negl Trop Dis*, 2014; 24;8(4):e2836.