Fabricio Petitto de Assis

Participação do fator de crescimento insulina
símile (IGF) -I na imunidade específica na
infecção por *Leishmania (L.) major*

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Fisiopatologia
Experimental

Orientador: Profa. Dra. Hiro Goto

**São Paulo
2008**

Aos meus pais,

*Obrigado pelo apoio incondicional nas
escolhas de minha vida, pela educação
correta e amor verdadeiro,
fundamentais para o meu crescimento.*

Ao meu irmão,

Obrigado pelo companheirismo e amizade. Obrigado pelo exemplo “mais velho” de sabedoria e curiosidade que me fazem sempre buscar o conhecimento.

A Mussya,

*Obrigado pela amizade, convívio,
apoio, companheirismo, cumplicidade e
felicidades. Divido com você essa
alegria e conquista.*

A minha família,

*Obrigado por estarem sempre ao meu
lado me apoiando e dando exemplos de
amor, força de vontade e perseverança.
Divido com vocês essa conquista.*

Agradecimentos

Ao longo do desenvolvimento deste trabalho e de toda minha vida acadêmica, pessoas especiais estiveram comigo, me ajudando a entender, aprender, criticar, procurar, descobrir, conhecer. A elas, meu sincero obrigado por toda a contribuição pessoal e profissional.

A Profa. Dra Hiro Goto, do laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da USP pela “adoção” do recém aluno de graduação. Com suas orientações me tornei um profissional, com sua amizade me tornei mais maduro, com suas cobranças me tornei mais responsável. Obrigado pela confiança e por despertar a curiosidade que me faz nunca querer parar de aprender e questionar.

Ao Prof. Dr. Magnus Gidlund do laboratório de Imunofisiopatologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP pela amizade e convivência e por ceder seu laboratório, equipamentos e reagentes para a realização de alguns experimentos apresentados neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo César Cotrim, do laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da USP pela amizade e livre acesso aos equipamentos e instalações de seu laboratório, bem como co-orientação neste trabalho.

Ao grande amigo José Angelo Lauletta Lindoso pela imensa dedicação ao meu aprendizado. Com ele não só aprendi a ler criticamente um artigo, executar criteriosamente um experimento, aprendi a ser honesto com os achados e ter ética. Obrigado pela convivência e pela amizade ao qual tenho grande felicidade em cultivar.

Ao amigo Fábio Alessandro de Freitas por estar sempre presente em momentos onde um amigo de verdade nunca te abandona. Obrigado pelos conselhos e ajuda indispensáveis na realização deste trabalho.

Aos amigos Francisco Assis, Fernando Henrique das Mercês Ribeiro e Regiane Mathias, pelos ensinamentos e paciência. A amizade de vocês me ensinou a ser sociável e dinâmico em um ambiente de trabalho sem perder a concentração e a seriedade.

Aos amigos Célia Maria Vieira Vendrame, Márcia Dias Teixeira Carvalho, Edite Hatsumi Kanashiro e Francisco Oliveira Rios pela ajuda, sugestões, ensinamentos e paciência no aprendizado, desenvolvimento de técnicas e experimentos descritos e utilizados neste trabalho, além da enorme amizade, obrigado.

A grande amiga e estagiária Gabrielli Santinoni Tonon pela amizade sincera e divertida e pela valiosa ajuda nos experimentos, sem a qual não seriam possíveis tantos resultados. Obrigado por estar sempre comprometida com os estudos, horários e por desenvolver meu lado “orientador”.

A Priscilla de Assis Guedes pela admiração e companheirismo que nos fizeram colegas de profissão. Seu dinamismo, inteligência e vontade de aprender me estimulam a nunca desistir e buscar sempre o melhor. Obrigado pela dedicação e seriedade com a qual desenvolve suas atividades provando que a determinação nos leva a vitória.

Aos amigos do Laboratório de Sorologia e Imunobiologia: Beatriz Julieta Celeste, Edna Barbosa de Souza, Maria das Graças Prianti, Alexandre Taneno, Arnaldo Rodrigues, Fernanda Signore, Mariço Yokoo, Camila Fazzani, Eduardo Milton Sanchez, Renata Prado, Erika Manuli, Luiza Reis, Laísa Castro, Daniel Ketelhuth, Marcel Murakami, Wesley Luzetti, Taccyanna Mikulski Ali e Maria Paulina Posada pelo auxílio nos experimentos, convivência, incentivo e alegrias ao longo dos anos.

Aos amigos do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (USP): Juliana Ide Aoki, Tatiane Salvador, Mônica Kudó, Sandra Moraes, Amanda Frade, Kelly Kanunfre, Sarita Gobbo, Lillian de Farias, Melissa Bastos, Fabiana Leoratti, Luciana Camizotti, Priscilla Appugliese, Piero Lourenço, Naiura Vieira, Patrick Abdala, Adriano Coelho, Érika Hoffmann, Juliana Coelho e Norival Kesper por contribuírem tanto na execução deste trabalho quanto pela amizade e convivência.

Aos funcionários do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo: Sandra Regina, Carmen Sanches Arroyo, Sueli de Fátima Bastos, Elizabete Ourique de Mello, Nice Bonfim Pinto, Paulo de Oliveira, Renato Racickas, Arthur de Jesus, Ione Salles e Nilzete Mira da Silva pela total atenção dispensada no preparo de soluções e materiais, desenvolvimento e aprendizado de técnicas, manutenção dos animais utilizados e amizade ao longo dos anos.

Ao Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina de São Paulo por oferecer as instalações e condições para o desenvolvimento deste trabalho e ao Programa de Fisiopatologia Experimental pelo acolhimento.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro ao projeto e bolsa de mestrado concedida no período de execução do mesmo.

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

Sumário

1 – INTRODUÇÃO	01
1.1 Leishmânia e leishmanioses.....	01
1.2 Imunidade inata e específica na leishmaniose	03
1.3 Interação macrófago/leishmânia.....	04
1.4 Fatores de crescimento nas leishmanioses	06
1.5 Fator de crescimento insulina-símile nas leishmanioses.....	08
2 – OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetivos específicos.....	10
3 – MÉTODOS.....	11
3.1 Animais.....	11
3.2 Parasitos	11
3.3 Métodos.....	11
3.3.1 Obtenção de amastigotas e promastigotas	11
3.3.2 Avaliação do efeito de IGF-I na evolução da leishmaniose cutânea murina.....	12
3.3.3 Avaliação do efeito de IGF-I em cultura de promastigotas.....	13
3.3.4 Obtenção de macrófagos (MØ) do peritônio de camundongos.....	13
3.3.5 Avaliação do efeito de IGF-I no parasitismo de macrófagos	13
3.3.6 Avaliação do efeito de IFN- γ ou IL-4 e IL-13 no parasitismo.....	15
3.3.7 Dosagem de Nitrito	16
3.3.8 Detecção e quantificação de IGF-I por Reação em Cadeia da Polimerase (<i>polymerase chain reaction</i> - PCR)	16
4 – RESULTADOS.....	19
4.1.1 Efeito do IGF-I no crescimento de promastigotas de <i>L. major</i>	19
4.1.2 Efeito do IGF-I na evolução da lesão em camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com promastigotas de <i>Leishmania (L.) major</i>	20
4.1.3 Efeito de IGF-I no parasitismo em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6.....	21

4.1.4 Efeito de IGF-I na produção de óxido nítrico no sobrenadante de cultura de macrófagos.....	23
4.1.5 Efeito de citocinas Th1 e Th2 no parasitismo em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6.....	26
4.1.6 Efeito de citocinas Th1 e Th2 na produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais de camundongos infectados por <i>L. (L.) major</i>	28
4.1.7 Efeito de citocinas Th1 e Th2 na expressão de RNA de IGF-I em macrófagos de camundongos infectados por <i>L. (L.) major</i>	31
5 – DISCUSSÃO.....	36
6 – CONCLUSÕES.....	45
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
8 – APÊNDICES	
8.1 Artigo publicado	
8.2 Aprovação da Comissão de Ética	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DEPC – dietilpirocarbonato

GM-CSF – *Granulocyte-monocyte-colony stimulating factor*

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

IFN- γ – *interferon-gamma*

IGF – *insulin-like growth factor*, fator de crescimento insulina smle

IL-4 – interleucina 4

IL-13 – interleucina 13

M – macrfago

NO – *nitric oxide*, xido ntrico

iNOS – sintase induzvel do NO

TGF- β – *transforming growth factor*- β , fator de crescimento e transformao β

USP – Universidade de So Paulo

WHO/OMS – World Health Organization/Organizao Mundial da Sade

LISTA DE SMBOLOS

g – gramas

h – hora

mg – miligramas

mL – mililitros

mm – milmetros

M – molar

mM – mlilar

nM – nanomolar

UI – unidades internacionais

μ L – microlitro

μ M – micromolar

Resumo

Petitto-Assis, F. Participação do fator de crescimento insulina símile (IGF)-I na imunidade específica na infecção por *Leishmania (L.) major* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

IGF-I induz proliferação e diferenciação celular. Neste estudo visamos sua participação na imunidade específica na leishmaniose. Estudamos efeito de citocinas Th1 (IFN- γ) e Th2 (IL-4 mais IL-13) na modulação da produção de IGF-I e seu reflexo no parasitismo de macrófago (M ϕ) de camundongos BALB/c e C57BL/6, infectados por amastigotas e promastigotas de *Leishmania (L.) major*. Iniciamos avaliando os efeitos de IGF-I no modelo, onde no desenvolvimento da lesão IGF-I induziu aumento maior de lesão em camundongos BALB/c. Nos camundongos C57BL/6 o efeito foi marcante com evolução progressiva da lesão enquanto que sem o fator, a lesão se controlava. Como a produção de IGF-I por M ϕ é modulada por citocinas, onde IFN- γ diminui e IL-4 e IL-13 aumentam a sua expressão, fomos estudar seus efeitos no modelo proposto onde M ϕ foram infectados com amastigotas ou promastigotas de *L.(L.) major* (parasitos/célula = 2:1) e incubados com IFN- γ (200U/mL) ou IL-4 (2ng/mL) mais IL-13 (5ng/mL). IFN- γ induziu aumento significativo na produção de NO nos dois modelos estudados. O efeito de citocinas Th1 e Th2 sobre o parasitismo em M ϕ foi distinto em BALB/c e C57BL/6. Quando infectados por amastigotas, o parasitismo aumentou sob estímulo com IL-4 mais IL-13 e diminuiu com IFN- γ como era esperado. No entanto, quando infectado por promastigota, o parasitismo aumentou com IL-4 mais IL-13 somente em células BALB/c. Por outro lado, o parasitismo diminuiu com IFN- γ somente em células C57BL/6. Mesmo na ausência do estímulo por citocinas, observou-se aumento na expressão de RNA de IGF-I nos M ϕ de animais BALB/c infectados por formas amastigotas ou promastigotas e de C57BL/6 infectados por promastigotas. Um resultado destoante foi à diminuição da expressão de IGF-I em M ϕ de C57BL/6 infectados por amastigotas. Em células BALB/c, essa expressão aumentada de IGF-I ocorrida em função da infecção, somente se alterou com IL-4 mais IL-13 quando infectadas por amastigotas. Em células C57BL/6, a expressão aumentada de IGF-I com a infecção por promastigota, sofreu diminuição sob estímulo com IFN- γ , não se alterando com citocinas Th2. A expressão diminuída de IGF-I com a infecção por amastigotas diminuiu ainda mais com IFN- γ e aumentou com citocinas TH2. Os dados sugerem a possibilidade de modulação do efeito de citocinas pela expressão diferenciada de IGF-I em macrófagos infectados por *L. (L.) major*.

Palavras-chave: macrófagos, *Leishmania (L.) major*, fator de crescimento insulina símile (IGF)-I, citocinas, óxido nítrico.

Abstract:

Petitto-Assis, F. Participation of insulin-like growth factor (IGF)-I on specific immunity in *Leishmania (L.) major* infection. [Master thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

Insulin-like growth factor (IGF)-I induces cell proliferation and differentiation. In this study, we focused on its participation on specific immunity. We studied the effect of Th1 (IFN- γ) and Th2 (IL-4 plus IL-13) cytokines on the modulation of the production of IGF-I and its influence on BALB/c and C57BL/6 macrophage (MØ) parasitism using *Leishmania (L.) major* amastigote and promastigote. IGF-I expression was increased in infected macrophages. Initially, we substantiated the effect of IGF-I on *in vitro* growth of *Leishmania (L.) major* promastigote, on cutaneous lesion development *in vivo* and diminished production of nitric oxide in MØ. On development of the lesion, IGF-I induced greater increase of the lesion in BALB/c mice. In C57BL/6 mice, its effect was more pronounced with progression of the lesion whilst without the factor it was controlled. Since IGF-I production by MØ is modulated by cytokines where IFN- γ decreases and IL-4 plus IL-13 increase its expression, we studied their effects in BALB/c and C57BL/6 MØ. Macrophages were infected with *L.(L.) major* amastigotes or promastigotes (parasites/cell = 2:1) and incubated with IFN- γ (200U/mL) or IL-4 (2ng/mL) plus IL-13 (5ng/mL). IFN- γ induced a significant increase of NO production by MØ from both models. The effect of Th1 and Th2 cytokines on parasitism was distinct when MØ infected with amastigotes, the parasitism increased upon IL-4 plus IL-13 stimuli and diminished with IFN- γ as expected. However, when infected with promastigotes, the parasitism increased with IL-4 plus IL-13 only in BALB/c cells. Conversely, the parasitism diminished with IFN- γ only in C57BL/6. Even in the absence of cytokine stimuli, an increase of the expression of IGF-I mRNA was observed in *L. (L.) major* amastigote- and promastigote- infected BALB/c MØ and in promastigote-infected C57BL/6 MØ. A dissonant result was a diminished IGF-I expression in amastigote-infected C57BL/6 MØ. In BALB/c this increased IGF-I expression with infection only altered with IL-4 plus IL-13 in amastigote-infected cells. In C57BL/6 cells, the increased IGF-I expression upon promastigote infection diminished under IFN- γ stimulus that was not altered with Th2 cytokines. A decreased IGF-I expression with amastigote-infection diminished even more with IFN- γ and increased with Th2 cytokines. These data suggest a possibility of modulation of the effect of cytokines on distinct expression of IGF-I in *L. (L.) major*-infected MØ.

Key-words: *Leishmania (L.) major*, insulin-like growth factor (IGF)-I, macrophages, cytokines, nitric oxide.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 Leishmânia e Leishmanioses

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* que se estabelecem no sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados. São transmitidos por flebotomíneos do subgênero *Phlebotomus* no (Velho Mundo) e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Lewis e Ward, 1987) durante o repasto sanguíneo. O gênero *Leishmania* divide-se em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia* que por sua vez agrupam um grande número de espécies que podem causar duas formas clínicas da doença: visceral e tegumentar (Pearson, 1993). No Brasil a leishmaniose tegumentar é causada principalmente pelas espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*, e a leishmaniose visceral pela *L. (L.) chagasi*. A espécie *L. (L.) major*, mais estudada quanto à imunidade, é a espécie prevalente no Velho Mundo (Lainson e Shaw, 1987).

Leishmânias são parasitos intracelulares obrigatórios que se reproduzem dentro do sistema fagocítico mononuclear dos mamíferos susceptíveis, onde em seu ciclo biológico apresentam-se sob duas formas morfológicas. No tubo digestivo do vetor apresenta-se sob a forma alongada e com flagelo externo, sendo denominada de promastigotas. Uma vez no hospedeiro vertebrado, são fagocitadas pelos macrófagos e diferenciam-se em forma arredondada e sem flagelo externo, sendo denominada de amastigotas. Estas medem de 3 a 6 mm de diâmetro e dividem-se exclusivamente dentro dos vacúolos dos macrófagos por divisão binária. Quando o inseto vetor pica um hospedeiro infectado adquire macrófagos com amastigotas que se transformam

em formas promastigotas no tubo digestivo do vetor, onde vivem extracelularmente, também se dividindo por divisão binária. Estas formas migram para o probóscide do inseto sendo inoculada nos mamíferos por regurgitação no repasto sanguíneo e, assim, completando o ciclo (Walters et al, 1993, Sacks et al., 1993). Neste processo de transmissão a saliva do vetor assume um papel importante servindo como um adjuvante, uma vez que proteínas contidas nela vão estimular o processo inflamatório e inibir a coagulação, aumentando a infectividade (Hall & Titus, 1995).

As leishmanioses são endêmicas em 88 países, sendo prevalente nas regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre. Países como Bolívia, Afeganistão, Peru, Índia, Sudão e Brasil detêm 90% dos casos de leishmanioses registrados em todo o mundo (WHO, 2001). No Brasil, a leishmaniose tegumentar ocorre em todas as regiões e são registrados, em média, 28.000 casos novos por ano. A leishmaniose visceral ocorre em 17 estados da federação, atingindo quatro das cinco regiões brasileiras. Sua maior incidência encontra-se na região Nordeste com 92% do total de casos registrados no país, mas com urbanização progressiva nos últimos anos (FUNASA, 2003). Muito se tem feito no intuito de desenvolver uma vacina efetiva para a doença, onde diversos antígenos tem sido identificados e caracterizados como potencialmente eficazes, porém até o momento nenhuma vacina totalmente efetiva foi produzida (Coler & Reed, 2005).

1.2 Imunidade inata e específica na leishmaniose

Nas leishmanioses em geral a resposta imune celular é considerada a mais importante tanto na resistência quanto na suscetibilidade. Estudos mais detalhados sobre a imunidade na leishmaniose cutânea experimental são em modelos de camundongos isogênicos BALB/c e C57BL/6 infectados com *Leishmania.(L.) major* onde foi estabelecido que a ativação preferencial da subpopulação de linfócitos T CD4⁺ (denominada T “helper” cells = Th), produzindo principalmente IFN- γ (subpopulação Th1) estaria relacionada à resistência à infecção enquanto que a ativação preferencial da subpopulação T CD4⁺, produzindo, entre outras, IL-4 e IL-13 (subpopulação Th2), leva à suscetibilidade à infecção. As citocinas Th1 estimulam os macrófagos na produção de H₂O₂ e NO, elementos leishmanicidas, enquanto que as citocinas Th2 atuam sobre macrófagos, sem levar ao desencadeamento desses mecanismos leishmanicidas (Sacks e Noban-Trauth, 2002; Cunningham, A.C, 2002). A estimulação da resposta Th2 resultaria na evasão e estabelecimento da infecção.

Embora a imunidade específica seja importante nas leishmanioses, os eventos iniciais, que ocorrem imediatamente após a transmissão de promastigotas pelo inseto vetor, ainda pouco elucidados, são cruciais na evolução da infecção e envolvem a participação de complemento (Mosser et al., 1986, Pearson e Steigbigel, 1980), de polimorfonucleares neutrófilos (Chang, 1981, Pearson e Steigbigel, 1981), células “natural killer” (NK) (Laskay et al., 1993, 1995), além dos fatores de crescimento que veremos abaixo. São esses elementos, entre outros, que formam a primeira barreira à infecção, promovendo a destruição de parasitos por lise, mecanismo

citotóxico ou fagocitose, dificultando a sua instalação. Esses elementos, ao mesmo tempo, durante o processo, constituem-se em elementos que auxiliam a evasão do parasito da resposta protetora do hospedeiro. Desta forma, por exemplo, a opsonização pelos fragmentos C3b e iC3b, resultante da ativação do complemento, promove evasão, levando à diminuição significativa de atividade oxidativa de macrófagos quando a fagocitose ocorre por receptores CR1 e CR3 dos parasitos opsonizados por esses fragmentos do complemento (Blackwell, 1985, Wright e Silverstein, 1983).

1.3 Interação macrófago/leishmânia

Na leishmaniose o parasito vive e multiplica-se no interior de células do sistema fagocítico mononuclear. Os macrófagos são células chave na infecção leishmaniótica podendo atuar como célula hospedeira onde os parasitos multiplicam-se e estabelecem a infecção, como células apresentadoras de antígeno ou como células efectoras, podendo atuar tanto na fase inespecífica quanto na fase específica da resposta imune (Mosser & Rosental, 1993; Sacks et al 1993).

Inicialmente, quando a promastigota entra em contato com o macrófago, ocorrem várias interações entre moléculas de superfície do parasito como as metaloproteinases de massa molecular 63 (gp63), o glicolípídeo lipofosfoglicano (LPG) e outras moléculas de ligação com fundamental importância na interação parasito/macrófago (Bogdan et al, 2000; Mosser & Rosental, 1993). No macrófago, uma série de receptores de membrana também atuam nessa interação como o receptor de fibronectina, de manose e os receptores de fragmentos do complemento,

CR1 e CR3 (Mosser & Brittingham, 1997). Mesmo contando com os fatores da saliva do vetor, as proteínas de membrana e as interações com os receptores das células do hospedeiro, a maioria dos parasitos é destruída devido aos mecanismos inatos do hospedeiro. Somente uma pequena fração do inóculo inicial consegue internalizar os macrófagos para estabelecer uma infecção (Hill et al 1983).

Esta interação da promastigota com o macrófago é fundamental e indispensável para a internalização do parasito por fagocitose, onde são emitidas extensões filamentosas pela célula que englobam o parasito formando um vacúolo parasitóforo circundado pela membrana da célula (Chang, 1979). Após a internalização o vacúolo parasitóforo funde-se com o lisossomo formando o fagolisossomo, o que resulta em uma maior acidez, com pH entre 4,7 a 5,4 (Antoine et al, 1990). Esse contém também enzimas proteolíticas capazes de lisar os parasitos. Nesta fase ocorre a ativação do macrófago, formando um microambiente hostil ao parasito que se utiliza de uma variedade de estratégias para sobreviver, sendo a mudança da forma promastigota para amastigota uma delas.

A produção de elementos efetores, como produtos reativos de oxigênio e nitrogênio, principalmente peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO), respectivamente, também constitui um importante mecanismo leishmanicida usado para controle da infecção. Após a fagocitose ocorre um aumento (*burst*) no consumo de oxigênio pelas células fagocíticas, sendo esse *burst* respiratório um potente mecanismo microbicida dessas células. Munida de oxigênio extra e com a ativação da enzima NADPH oxidase ou iNOS, essas células são capazes de gerar os produtos reativos de oxigênio como H_2O_2 . É gerado também produto reativo de nitrogênio,

NO (Bogdan et al, 2000; Bogdan & Rollingoff et al, 1998; Murray e Nathan, 1999; Stuehr et al, 1991).

Se por um lado, esses fatores efetores atuam no controle da infecção, a progressão da infecção depende da capacidade do parasito de evadir-se desses mecanismos inespecíficos e específicos do hospedeiro. Existem diversos mecanismos de evasão descritos, mas, uma estratégia utilizada por leishmânia para evasão é a utilização a seu favor de fatores de crescimento do hospedeiro.

1.4 Fatores de crescimento nas leishmanioses

Um dos mecanismo de sobrevivência e desenvolvimento adquirido pelos parasitos ao longo de sua evolução é a utilização de diversos fatores de crescimento do hospedeiro. Na leishmânia e nas leishmanioses, o fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos ("Granulocyte-monocyte-colony stimulating factor" = GM-CSF), entre vários efeitos, pode proteger *L. amazonensis* da morte induzida por choque térmico a 34/37° C (Charlab et al., 1990) e in vivo, em camundongo infectado por *L. major*, o fator leva a parasitismo maior na lesão (Greil et al, 1988). O fator de transformação de crescimento- β ("Transforming Growth factor b" = TGF- β) tem também efeito inativador de macrófagos e favorece a replicação do parasita intracelular, observado em estudos in vitro e in vivo (Barral et al, 1993; Barral e Neto et al, 1992; Li et al, 1999; Nelson et al, 1991; Wilson et al, 1998). O seu efeito leishmanicida no macrófago é exercido pela inibição da produção de NO (Li et al, 1999; Stenger et al, 1994; Green et al, 1994).

Um outro fator de crescimento que vem despertando grande interesse nos últimos anos por sua ação diversificada são os fatores de crescimento insulina-símile (“insulin-like Growth Factor” = IGF) (Cohick e Clemmons, 1993; Jones e Clemmons, 1995). São polipeptídeos filogeneticamente bem preservados que estão presentes na circulação e nos tecidos, sendo sintetizados pela maioria das células, incluindo macrófagos. As duas formas principais, IGF-I e IGF-II, mostram 60% de similaridade na sequência de aminoácidos e suas ações biológicas se dão, principalmente, através da ligação com o receptor de IGF-I. Esse receptor está presente em uma ampla variedade de tecidos e células, tendo sido identificado em células NK, monócitos, células B, células T CD4⁺ e CD8⁺, células mononucleares e polimorfonucleares neutrófilos. Em estudos *in vitro*, IGF-I promove síntese de DNA/proliferação, diferenciação celular e síntese de proteínas. *In vivo*, medeia o efeito de promoção de crescimento do hormônio de crescimento além de efeitos metabólicos similares a insulina e participação na regeneração e cicatrização de tecido.

Conhecem-se, principalmente, estudos relacionando IGF à patogênia de lesões teciduais, porém não se têm estudos relacionando leishmanioses com IGF além daqueles realizados por nosso grupo. Em estudos *in vitro* realizados anteriormente em nosso laboratório, observamos que IGF-I em concentrações fisiológicas induz um incremento na proliferação de formas promastigotas e amastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*, porém o mesmo não acontece quando estimulados com IGF-II (Gomes et al, 1998; Goto et al, 1998). Em camundongos BALB/c infectados com promastigotas de *Leishmania* pré-incubadas com IGF-I observou-se desenvolvimento de lesão de tamanho maior, um número

maior de parasitos viáveis e maior infiltrado inflamatório a partir de 7 dias de infecção. Uma análise mais detalhada mostrou que esse aumento do parasitismo foi devido não somente a um maior recrutamento de macrófagos, mas ao aumento do número de parasitos viáveis por macrófago, mostrando que IGF-I na interação parasito/hospedeiro favorece o crescimento parasitário (Gomes et al., 2000). Em continuidade aos experimentos realizados, como o efeito leishmanicida de macrófagos é exercido por NO e H₂O₂ e como o efeito de IGF-I observado na exacerbação da lesão pode ser por interferência deste fator nesses mecanismos, estudou-se o seu efeito nesses mecanismos na interação *L. (L.) amazonensis* e macrófago peritoneal de camundongo in vitro. Observou-se que o parasitismo de macrófagos estava aumentado sob efeito de IGF-I. Ao mesmo tempo, a produção de H₂O₂ não apresentava alteração, porém, NO apresentava-se reduzida em culturas de macrófagos de camundongo BABL/c infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* estimuladas com IGF-I em relação a culturas não estimuladas. Na sequência, observou-se que o efeito de IGF-I seria na ativação de arginase do parasito e provavelmente também do macrófago, com geração de poliaminas que são nutrientes para o parasito e reciprocamente reduzindo a produção de NO (Vendrame et al., 2007).

1.5 Fator de crescimento insulina-símile nas leishmanioses

Até recentemente o nosso grupo concentrou os estudos do efeito do IGF-I como elemento inespecífico do hospedeiro sobre *Leishmania* e na interação *Leishmania*-hospedeiro. No entanto, dados na literatura sugerem alguma participação

de IGF-I na resposta imune específica, uma vez que citocinas Th1 e Th2 têm efeitos diferentes na produção de IGF-I em macrófagos: citocinas Th2, IL-4 e IL-13, estimulam a produção de IGF-I (Wynes e Riches, 2003), enquanto que IFN- γ a inibe (Arkins et al., 1995). Além disso, em camundongo C57BL/6, tido como resistente à infecção por *L. major*, o nível sérico de IGF-I é mais baixo que no camundongo C3H, tido como suscetível a *L. major* (Bouxsein et al., 2002).

No estudo como fator inespecífico do hospedeiro, os efeitos aparentemente eram semelhantes independentemente da espécie de *Leishmania*. No entanto, como pretendemos iniciar estudos voltados à resposta específica, a espécie de *Leishmania* torna-se uma questão importante, uma vez que a resposta imune com produção de citocinas Th1 ligada à resistência e as Th2, à suscetibilidade é bem definida no modelo de camundongos isogênicos infectados com *Leishmania major*. Esta dicotomia clara não ocorre em outros modelos com outras espécies de *Leishmania* e as citocinas apresentam efeito diverso quando tomamos como exemplo *L. (L.) donovani* e *L. (L.) chagasi* (Goto e Lindoso, 2004) e *L. (L.) amazonensis* (Qi et al., 2004). Neste estudo, portanto, estudaremos inicialmente a participação de IGF-I em leishmaniose cutânea murina induzida por *L. major* e na interação *L. major*-macrófago e, como objetivo principal, a expressão de IGF-I sob estímulo de citocinas Th1 e Th2 e sua relação com o parasitismo de macrófagos e produção de NO.

OBJETIVOS

---

2 – OBJETIVO

- Avaliar a participação do fator de crescimento insulina smle (IGF-I) na imunidade especfica a infeco por *Leishmania (L.) major*.

2.1 – Objetivos especficos

- Avaliao do fator de crescimento IGF-I em culturas de promastigotas de *Leishmania (L.) major*;
- Efeito de IGF-I na evoluo da infeco por *L.(L.) major* em camundongos suscetveis BALB/c e resistentes C57BL/6;
- Avaliao do parasitismo “in vitro” e produo de xido ntrico (NO) em macrfagos pr-estimulados ou no com IGF-I;
- Efeitos de citocinas Th1 e Th2 na expresso de IGF-I por macrfagos de camundongos BALB/c e resistentes C57BL/6 e sua correlao com o grau de parasitismo por *L.(L.) major* e produo de xido ntrico.

MÉTODOS

---

3 – MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos machos, da linhagem BALB/c e C57BL/6 de 45 a 60 dias de idade, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP, foram mantidos no Biotério de Experimentação do Instituto de Medicina Tropical da USP, sob temperatura controlada e alimentados com ração balanceada e água a vontade.

3.2 Parasitas

Cepa de *Leishmania (Leishmania) major* LV 39 (MRHO/Sv/59/P) foi mantida em camundongos BALB/c, por inoculações subcutâneas no coxim plantar, periodicamente a cada 4 a 6 semanas, com promastigotas de culturas provenientes de amastigotas de lesão de animais previamente infectados.

3.3 Métodos

3.3.1 Obtenção de amastigotas e promastigotas

Para a obtenção de amastigotas, foi feita a remoção da pata de um animal infectado e limpeza do tecido necrosado. Em meio RPMI 1640 (LGC, Brasil) o tecido foi macerado e passado em gaze estéril para remoção de ossos e restos teciduais. A suspensão celular obtida foi passada 4 vezes por agulha fina (15x5 mm) para lise de macrófagos e liberação dos parasitos. Em seguida lavou-se a suspensão

celular três vezes em meio RPMI 1640 (LGC, Brasil) a 250 x g por 10 minutos a 4°C, com recuperação dos parasitos por centrifugação a 2100 x g por 30 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspensão em meio na concentração de uso. As formas promastigotas foram obtidas a partir de cultura de amastigotas em meio 199 (LGC, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (Crypion, Brasil), acrescido de penicilina (100UI/mL), gentamicina (10mg/mL), L-glutamina (2mM), HEPES (10 mM) e Hemina (20mg/mL), mantidas em estufa a 26° C. Promastigotas até o quarto repique e em fase estacionária de crescimento foram utilizadas nos experimentos. Para manutenção de cepa, 2x10⁶ promastigotas são inoculadas no coxim plantar de camundongos BALB/c.

3.3.2 Avaliação do efeito de IGF-I na evolução da leishmaniose cutânea murina

A medida de tamanho de lesão foi avaliada durante a evolução da infecção em camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. major* na presença ou ausência de IGF-I. Promastigotas de *L. major* foram pré-incubadas com IGF-I por 5 minutos com lavagem dos parasitos a seguir e inoculação de 1x10⁶ parasitos em 20µL no coxim plantar da pata traseira direita dos camundongos. Como controle, na pata esquerda foi inoculado meio 199 (LGC, Brasil) e a medida da lesão foi feita semanalmente utilizando-se micrômetro (Mitutoyo, Brasil). A diferença entre a espessura da pata direita e esquerda foi considerada como o tamanho da lesão.

3.3.3 Avaliação do efeito de IGF-I em cultura de promastigotas

Foram feitas culturas de promastigotas (5×10^5 /mL) de *L. major* em placas de 24 poços (COSTAR) onde os parasitos foram estimulados ou não com 50ng/mL de IGF-I (BD Bioscience Pharmingen, San Diego, EUA) ou ainda cultivados sem estímulo. A contagem dos parasitos foi feita diariamente em microscópio óptico (Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha) e o resultado expresso em número de parasitos /mL, em cada dia de cultura.

3.3.4 Obtenção de macrófagos (MØ) do peritônio de camundongos

Macrófagos foram obtidos do peritônio dos animais pela injeção de 5 mL de solução salina tamponada com fosfato 0,01 M, pH7,4 (*phosphate-buffered saline* = PBS). Após suave massagem do abdômen, o líquido foi aspirado e as células recuperadas por centrifugação $250 \times g$ por 10 minutos a 4°C, onde se despreza o sobrenadante. O botão celular é ressuspenso em meio RPMI 1640 (LGC, Brasil) e, após análise da viabilidade e contagem em câmara de Neubauer, a concentração celular é acertada para uso conforme necessidade.

3.3.5 Avaliação do efeito de IGF-I no parasitismo de macrófagos

Macrófagos peritoniais de camundongos BALB/c ou C57BL/6 foram colocados sobre lamínulas redondas estéreis colocadas dentro dos poços de cultura de placas de 24 poços (COSTAR), na quantidade de 5×10^5 células. Em seguida

foram incubados em ambiente úmido com atmosfera de 5% CO₂, a 37°C por 3 horas para adesão dos MØ na lamínula onde, após incubação, são lavadas com PBS estéril morno para retirada das células não aderentes. Antes da infecção, macrófagos ou parasitos foram pré-incubados ou não com 50ng/mL de IGF-I por 5 minutos com posterior lavagem para retirada do fator de crescimento. Amastigotas ou promastigotas, pré-incubadas ou não foram colocados na proporção de dois parasitos por MØ. As placas voltaram para cultura onde foram incubadas em ambiente úmido com atmosfera de 5% CO₂, a 33°C por 2 horas, onde após esse período são lavadas novamente para retirada de parasitos livres e adicionado 500µL de meio de cultura RPMI 1640 (LGC, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (Crypion, Brasil), 100UI/mL de penicilina e 10mg/ml de gentamicina. Para avaliação de IGF-I no sistema durante todo o período, este foi acrescentado a macrófagos infectados por promastigotas ou amastigotas na concentração de 50ng/mL. Controles só com macrófagos infectados sem o estímulo de IGF-I foram mantidos em todos os experimentos. As placas foram mantidas em incubadora úmida a 33°C com atmosfera de 5% CO₂, por 48 horas. No término do experimento as lamínulas foram lavadas com PBS, fixadas com metanol (Merk - Alemanha), coradas com Giemsa por 30 minutos e montadas invertidas em lâminas de vidro para avaliação do parasitismo por microscopia óptica. Foram contadas 100 células por lamínula e o resultado expresso em número de parasitos por 100 células.

3.3.6 Avaliação do efeito de IFN- γ ou IL-4 e IL-13 no parasitismo

Macrófagos peritoniais de camundongos BALB/c ou C57BL/6 foram colocados sobre lamínulas redondas estéreis colocadas dentro dos poços de cultura de placas de 24 poços (COSTAR), na quantidade de 5×10^5 células. Em seguida são incubados em ambiente úmido com atmosfera de 5% CO₂, a 37°C por 3 horas para adesão dos MØ na lamínula onde, após incubação, são lavadas com PBS estéril morno para retirada das células não aderentes. Amastigotas ou promastigotas foram colocados na proporção de dois parasitos por MØ onde as placas voltaram para cultura em ambiente úmido com atmosfera de 5% CO₂, a 33°C por 2 horas sendo posteriormente lavadas novamente para retirada dos parasitos livres e adicionado 500µL de meio de cultura RPMI 1640 (LGC, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (Crypion, Brasil), 100UI/mL de penicilina e 10mg/ml de gentamicina. Em alguns experimentos foi adicionado IFN- γ recombinante (BD Biosciences, EUA) na concentração de 200UI/mL ou ainda IL-4 e IL-13 recombinante (BD Biosciences, EUA) nas concentrações de 2ng/mL e 5ng/mL respectivamente. Controles só com macrófagos infectados sem o estímulo foram mantidos em todos os experimentos. As placas foram mantidas em incubadora úmida a 33°C com atmosfera de 5% CO₂, por 48 horas. No término do experimento as lamínulas foram lavadas com PBS, fixadas com metanol (Merk - Alemanha), coradas com Giemsa por 30 minutos e montadas invertidas em lâminas de vidro para avaliação do parasitismo por microscopia óptica. Foram contadas 100 células por lamínula e o resultado expresso em número de parasitos por 100 células.

3.3.7 Dosagem de Nitrito

Concentrações de nitrito refletem a produção de NO pelas células e são determinadas por ensaio em microplacas de poliestireno segundo Green et al (1982) modificado. Em placas de poliestireno (COSTAR) com 24 poços foram feitas culturas de MØ nos mesmos moldes acima citados, tanto para avaliação dos efeitos de IGF-I quanto de citocinas Th1 ou Th2, porém na quantidade de 2×10^6 células por poço. Após incubação de 48 horas, 100 µL do sobrenadante da cultura são distribuídos em placas de 96 poços e acrescido de igual volume do reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de diamino naftaleno diidrocloreto 2% de ácido fosfórico em água destilada estéril q.s.p 100mL) e incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. O nitrito é determinado usando nitrito de sódio (NaNO_2) como padrão e meio RPMI 1640 (LGC, Brasil). Os resultados são avaliados por leitura espectrofotométrica a 540 nm em aparelho Multiskan MCC/340 P versão 2.20 (Labsystems, Finlândia).

3.3.8 Detecção e quantificação de IGF-I por Reação em Cadeia da Polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR)

Purificação de RNA: Para obtenção de RNA total, 2×10^6 células/mL estimuladas ou não por citocinas e infectadas ou não por amastigotas ou promastigotas conforme descrito no item 3.3.6 foram ressuspensas em 1 mL de reagente TRIZOL (Invitrogen, EUA) e adicionado 200 µL de clorofórmio, sendo feita agitação vigorosa. Após centrifugação a 3200 x g, por 15 minutos a 4 °C foi coletada a fase aquosa e

misturada volume a volume com isopropanol e incubada por 30 minutos a -80 °C. Após nova centrifugação a 3200 x g por 15 minutos, foi acrescido etanol absoluto e feita recuperação do sedimento por centrifugação. Após o sedimento secar por 10 minutos, o mesmo foi ressuspensão em água livre de RNase, dosado por espectrofotometria e a integridade das amostras demonstrada por eletroforese em gel de agarose 1%.

Obtenção do cDNA: Dez microlitros das amostras de RNA total foram misturados com 10µL de uma solução constituída por: tampão BRL 5x (Invitrogen, EUA), dNTP (Invitrogen, EUA) 10mM, *random primers* (Invitrogen, EUA), DTT (Invitrogen, EUA) 100mM, *RNase inhibitor cloned* 10UI/µL (Invitrogen, EUA), *M-MLV Reverse Transcriptase* 200UI/µL (Invitrogen, EUA) em água destilada e deionizada tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e autoclavada, incubados por 60 minutos a 37°C e 15 minutos a 75°C.

Reação em cadeia da polimerase (PCR): Foram utilizados iniciadores (“primers”) de amplificação para detecção de IGF-I construídos a partir da sequência do RNA mensageiro de camundongos para esse fator de crescimento. Como controle da reação foram utilizados *primers* específicos para β-actina segundo Kropf et al (2005). Resumidamente, 3 microlitros de amostras de cDNA foram misturados com 47µL de uma solução para PCR feita com tampão PCR 10X (Invitrogen, EUA), dNTP (Invitrogen, EUA) 1,25mM, 10mM, cloreto de magnésio (Invitrogen, EUA) 50mM, *Taq DNA polimerase* 5UI/µL (Invitrogen, EUA) em água destilada e deionizada. As amostras são submetidas à amplificação de DNA em termociclador (Eppendorf, Germany). A amplificação das amostras foi demonstrada por eletroforese em gel de agarose 1%.

Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR): Utilizando os *primers* acima citados, um microlitro das amostras de cDNA foram misturados com 10µL do reagente SYBER®Green (2X) (Applied Biosystems, EUA), 0,5µL de cada *primer* a 10 pMol (Fermentas, BRA) e 8µL de água destilada e deionizada autoclavada. As amostras foram submetidas à amplificação de DNA em termociclador (Corbett, Austrália). Os resultados foram expressos pela diferença na expressão de IGF-I em comparação à expressão do controle β -actina.

RESULTADOS

---

4 – Resultados

4.1.1 Efeito do IGF-I no crescimento de promastigotas de *Leishmania (L.) major*

Para analisarmos, inicialmente, o efeito do IGF-I nos parasitos realizamos cultura de promastigotas de *Leishmania (L.) major* acrescidas ou não de 50ng/ml do fator de crescimento. Foi feita contagem diária do número de parasitos e observamos que as culturas que receberam o IGF-I apresentaram número maior de parasitos no quinto e sextos dias e alcançaram mais rapidamente a fase estacionária em comparação com as culturas sem o fator de crescimento (Figura 1).

Figura 1. Efeito do IGF-I no crescimento de promastigotas de *Leishmania (L.) major*. Total de quatro culturas sem estímulo e 4 culturas estimuladas com 50ng/mL do fator de crescimento. Os pontos representam a média das quatro culturas com respectivo desvio padrão. * $P < 0,05$ em relação à cultura sem estímulo por IGF-I. Resultado de um experimento representativo de três realizados.

4.1.2 Efeito do IGF-I na evolução da lesão em camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com promastigotas de *Leishmania (L.) major*

Na análise do efeito de IGF-I no desenvolvimento da lesão em animais BALB/c observamos lesão maior nos animais que foram infectados com promastigotas pré-incubadas com 50ng/mL de IGF-I por 5 minutos em comparação com os animais infectados com promastigotas sem estímulo (Figura 2). Nos animais C57BL/6 ocorreu progressão da lesão apenas nos animais onde os parasitos foram pré-estimulados, havendo controle da lesão nos animais onde os parasitos não tinham estímulo (Figura 3). Mesmo desenvolvendo lesão, o tamanho desta ao final do período experimental é menor em comparação aos animais BALB/c, mesmo com parasitos pré-incubados com IGF-I.

Figura 2. Evolução do tamanho da lesão (média e desvio padrão) de pata em animais BALB/c inoculados com 1×10^6 promastigotas pré-incubadas ou não com IGF-I (50ng/mL). * $P < 0,05$ em relação aos animais infectados por parasitos sem prévia incubação com IGF-I. Resultado de um experimento representativo de três realizados.

Figura 3. Evolução do tamanho da lesão de pata em animais C57BL/6 inoculados com 1×10^6 promastigotas pré-incubadas ou não com IGF-I (50ng/mL). * $P < 0,05$ em relação aos animais infectados por parasitos sem prévia incubação com IGF-I. Resultado de um experimento representativo de três realizados.

4.1.3 Efeito de IGF-I no parasitismo em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6

Uma vez observado o efeito de IGF-I no aumento da lesão dos animais infectados, fomos avaliar a capacidade do fator de crescimento em aumentar ou diminuir o parasitismo de macrófagos peritoneais infectados por amastigotas ou promastigotas de *Leishmania (L.) major* “in vitro”. Observamos um aumento no parasitismo, em relação aos respectivos controles nas situações onde o fator de crescimento esteve presente, com pré-incubação de macrófagos ou com pré-incubação de parasitos ou ainda com o fator presente no sistema durante todo o período do experimento (Figuras 4 e 5).

Figura 4. Efeito do IGF-I no parasitismo de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com promastigotas ou amastigotas de *Leishmania (L.) major*. Promastigotas, amastigotas ou macrófagos foram pré-incubados com IGF-I ou o fator foi mantido no sistema durante toda incubação de 48 horas. O resultado é apresentado como n° total de parasitos/100 células. Macrófago = mcf, promastigota = pro, amastigota = ama, sistema = sist. * P < 0,05 em relação ao controle de macrófago infectado com leishmânia sem estímulo. Resultado de um experimento representativo de três realizados.

Figura 5. Efeito do IGF-I no parasitismo de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados com promastigotas ou amastigotas de *Leishmania (L.) major*. Promastigotas, amastigotas ou macrófagos foram pré-incubados com IGF-I ou o fator foi mantido no sistema durante toda incubação de 48 horas. O resultado é apresentado como n° total de parasitos/100 células. Macrófago = mcf, promastigota = pro, amastigota = ama, sistema = sist. * P < 0,05 em relação ao controle de macrófago infectado com leishmânia sem estímulo. Resultado de um experimento representativo de três realizados.

4.1.4 Efeito de IGF-I na produção de óxido nítrico no sobrenadante de cultura de macrófagos

Outro aspecto que analisamos foram os efeitos do IGF-I na produção de NO. Houve redução na produção de NO nos dois modelos adotados e em todas as situações onde o fator de crescimento foi adicionado, seja pré-incubando macrófagos, parasitos ou quando o fator foi mantido no sistema durante todo o período de cultura quando comparado aos macrófagos ou parasitos não tratados com IGF-I. No modelo BALB/c a redução foi homogênea, não havendo diferença significativa entre os experimentos que receberam o fator de crescimento, mas sim em relação ao controle onde havia apenas as células e promastigotas (Figura 6 A) ou amastigotas (Figura 6 B). Ainda testamos a cultura de macrófagos acrescidos do fator de crescimento a fim de avaliar se esse por si só não levaria ao aumento ou redução da produção de óxido nítrico, onde observamos que sem a presença do parasito essa modulação não ocorre, mantendo-se os níveis basais de NO. Essa situação foi testada tanto em células de BALB/c quanto de C57BL/6.

Figura 6. Efeito de IGF-I na produção de óxido nítrico no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com promastigotas (**A**) ou amastigotas (**B**) de *Leishmania (L.) major*. Promastigotas, amastigotas ou macrófagos foram pré-incubados com IGF-I ou o fator foi mantido no sistema durante toda incubação de 48 horas (— = mediana, mcf = macrófago, pro = promastigota, ama = amastigota, sist = sistema). * $P < 0,05$ em relação ao controle de macrófago infectado com leishmania sem IGF-I.

No modelo C57BL/6 a redução foi mais evidente uma vez que a produção de NO é maior em comparação ao modelo BALB/c na situação onde se têm macrófagos e parasitos. Em comparação às situações onde IGF-I foi adicionado, houve uma redução homogênea quando comparados com o controle sem estímulo tanto na infecção com promastigotas (Figura 7 A) quanto com amastigotas (Figura 7 B).

Figura 7. Efeito de IGF-I na produção de óxido nítrico no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados com promastigotas (A) ou amastigotas (B) de *Leishmania (L.) major*. Promastigotas, amastigotas ou macrófagos foram pré-incubados com IGF-I ou o fator foi mantido no sistema durante toda incubação de 48 horas (— = mediana, mcf = macrófago, pro = promastigota, ama = amastigota, sist = sistema). * P < 0,05 em relação ao controle de macrófago infectado com leishmânia sem IGF-I.

4.1.5 Efeito de citocinas Th1 e Th2 no parasitismo em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6

Foram observados efeitos diferentes de citocinas Th1 e Th2 nas linhagens distintas de camundongos. Na análise do efeito de citocinas na infecção “in vitro” de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c observamos aumento significativo do parasitismo no grupo de macrófagos tratados com citocinas Th2, IL-4 (2ng/ml) e IL-13 (5ng/mL) simultaneamente, tanto na infecção por amastigotas quanto por promastigotas em relação aos respectivos controles. Quando tratado com citocina Th1, IFN- γ (200U/mL), observamos diminuição no parasitismo por amastigotas, porém apenas tendência a diminuição no parasitismo por promastigotas em comparação aos respectivos controles (Figura 8).

Figura 8. Efeito de citocinas no parasitismo de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com promastigotas ou amastigotas de *Leishmania (L.) major*. Macrófagos foram estimulados com IFN- γ ou IL-4 e IL-13. O resultado é representado pelo número de parasitos por 100 células. * P < 0,05 em relação ao controle de macrófago infectado com leishmânia sem estímulo.

Nos animais C57BL/6 observamos diminuição significativa do parasitismo no grupo de macrófagos tratados com citocina Th1 IFN- γ (200U/mL), tanto na infecção por amastigotas quanto por promastigotas em relação aos respectivos controles. Quando tratado com citocina Th2, IL-4 (2ng/ml) e IL-13 (5ng/mL) simultaneamente, observamos aumento significativo no parasitismo quando infectado com amastigotas, porém apenas tendência ao aumento no parasitismo quando infectado por promastigotas em comparação aos respectivos controles (Figura 9).

Figura 9. Efeito de citocinas no parasitismo de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados com promastigotas ou amastigotas de *Leishmania (L.) major*. Macrófagos foram estimulados com IFN- γ ou IL-4 e IL-13. O resultado é representado pelo número de parasitos por 100 células. * P < 0,05 em relação ao controle de macrófago infectado com leishmânia sem estímulo.

4.1.6 Efeito de citocinas Th1 e Th2 na produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais de camundongos infectados por *L. (L.) major*

Analizamos também os efeitos das citocinas Th1 e Th2 na produção de óxido nítrico (NO). Macrófagos foram infectados com amastigotas ou promastigotas na presença das citocinas e mantidas em cultura por 48 horas. A avaliação da produção de NO foi feita pela dosagem do nitrito formado pelo óxido nítrico produzido pelas células.

Observamos um aumento na produção de NO pelos macrófagos de camundongos BALB/c infectados que receberam estímulo de IFN- γ (200U/mL) em comparação aos macrófagos infectados tanto por promastigotas (Figura 10A) quanto por amastigotas (Figura 10B) sem estímulo. A estimulação por IL-4 (2ng/ml) e IL-13 (5ng/mL) simultaneamente, apresentou níveis similares aos encontrados na infecção pelo parasito, com tendência a diminuição.

Esses resultados foram semelhantes no modelo C57BL/6 (Figura 11A e B). Como controle dessas reações foram feitas estimulações apenas dos macrófagos em cultura pelas citocinas, onde se observou que não há aumento ou diminuição na produção de NO na ausência do parasito.

Figura 10. Efeito de citocinas na produção de óxido nítrico no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com promastigotas (A) ou amastigotas (B) de *Leishmania (L.) major*. Macrófagos foram estimulados com IFN- γ ou IL-4 e IL-13 durante toda incubação de 48 horas. Macrófago = mcf, promastigota = pro, amastigota = ama, sistema = sist. * $P < 0,05$ em relação ao controle de macrófago com estímulo por citocinas Th1 ou Th2.

Figura 11. Efeito de citocinas na produção de óxido nítrico no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados com promastigotas (A) ou amastigotas (B) de *Leishmania (L.) major*. Macrófagos foram estimulados com IFN- γ ou IL-4 e IL-13 durante toda incubação de 48 horas. Macrófago = mcf, promastigota = pro, amastigota = ama, sistema = sist. * $P < 0,05$ em relação ao controle de macrófago com estímulo por citocinas Th1 ou Th2.

4.1.7 Efeito de citocinas Th1 e Th2 na expressão de RNA de IGF-I em macrófagos peritoneais de camundongos infectados por *L. (L.) major*

Para a construção dos *primers* fizemos o alinhamento da sequência do RNA mensageiro do fator de crescimento IGF-I com a sequência do RNA mensageiro da isoforma 1Ea desse mesmo fator, descrita por W.-W.Lin et. al. (1998) que é formada pelos exons 1, 3, 4 e 6 o que nos permitiu identificar os exons 3 e 4 que são comuns às isoformas do IGF-I e que nos permitiria detectar todas essas isoformas (Figura 12).

```

RNAm IGF-I
144 GACTTCTTGAAGATAAAGATACACATCATGTCGTCTTCACACCTCTTCTACCTGGCGCTC 203
    |||||||
1   GACTTCTTGAAGATAAAGATACACATCATGTCGTCTTCACACCTCTTCTACCTGGCGCTC 60
RNAm IGF-I isoforma 1Ea

RNAm IGF-I
204 TGCTTGCTCACCTTCACCAGCTCCACCACAGCTGGACCAGAGACCCTTTGCGGGGCTGAG 263
    |||||||
61  TGCTTGCTCACCTTCACCAGCTCCACCACAGCTGGACCAGAGACCCTTTGCGGGGCTGAG 120
RNAm IGF-I isoforma 1Ea

RNAm IGF-I
264 CTGGTGATGCTCTTCAGTTCGTGTGTGGACCGAGGGGCTTTTACTTCAACAAGCCCACA 323
    |||||||
121 CTGGTGATGCTCTTCAGTTCGTGTGTGGACCGAGGGGCTTTTACTTCAACAAGCCCACA 180
RNAm IGF-I isoforma 1Ea

RNAm IGF-I
324 GGCTATGGCTCCAGCATTTCGAGGGCACCTCAGACAGGCATTGTGGATGAGTGTGCTTC 383
    |||||||
181 GGCTATGGCTCCAGCATTTCGAGGGCACCTCAGACAGGCATTGTGGATGAGTGTGCTTC 240
RNAm IGF-I isoforma 1Ea

RNAm IGF-I
384 CGGAGCTGTGATCTGAGGAGACTGGAGATGTACTGTGCCCCACTGAAGCCTACAAAAGCA 443
    |||||||
241 CGGAGCTGTGATCTGAGGAGACTGGAGATGTACTGTGCCCCACTGAAGCCTACAAAAGCA 300
RNAm IGF-I isoforma 1Ea

RNAm IGF-I
444 GCCCGCTCTATCCGTGCCAGCGCCACACTGACATGCCCAAGACTCAGAAGGAAGTACAT 503
    |||||||
301 GCCCGCTCTATCCGTGCCAGCGCCACACTGACATGCCCAAGACTCAGAAGGAAGTACAT 360
RNAm IGF-I isoforma 1Ea

```

Figura 12. Alinhamento da sequência do RNA mensageiro do fator de crescimento IGF-I com o RNA mensageiro da isoforma 1Ea para detecção dos exons 3 (em vermelho) e 4 (em azul). A sequência dos *primers* sintetizados para IGF-I está sublinhada, sendo: forward – TACTTCAACAAGCCCACAGG e reverse – AACTGACATGCCCAAGACT, respectivamente.

Analizamos os efeitos das citocinas Th1 e Th2 na expressão do RNA mensageiro para o fator de crescimento IGF-I, utilizando como controle positivo a expressão constitutiva de β -actina. Macrófagos foram infectados ou não com amastigotas ou promastigotas, na presença ou não das citocinas, e mantidas em cultura por 48 horas. A integridade do RNA total, bem como a amplificação dos fragmentos do fator de crescimento e do controle positivo foram demonstradas por eletroforese das amostras em gel de agarose 1% (Figura 13, 14 e 15).

Figura 13. Análise da integridade do RNA total das amostras de macrófagos de animais BALB/c (colunas 1 a 9) e C57BL/6 (colunas 10 a 18) estimulados ou não por citocinas Th1 ou Th2 e infectados ou não por parasitos.

Figura 14. PCR qualitativa para β -actina de macrófagos de animais BALB/c (2 a 10) e C57BL/6 (11 a 19) estimulados ou não por citocinas Th1 ou Th2 e infectados ou não por parasitos. Banda com 120 pares de base. Amostra **1**: controle negativo (ausência da amostra). **PM**: padrão de peso molecular de 100bp.

Figura 15. PCR qualitativa para IGF-I de macrófagos de animais BALB/c (2 a 10) e C57BL/6 (11 a 19) estimulados ou não por citocinas Th1 ou Th2 e infectados ou não por parasitos. Banda com 98 pares de base. Amostra **1**: controle negativo (ausência da amostra). **PM**: padrão de peso molecular de 100bp.

A análise quantitativa dos efeitos das citocinas Th1 e Th2 na expressão do RNA mensageiro para o fator de crescimento IGF-I mostrou que já a infecção de macrófagos com promastigotas ou amastigotas levavam à expressão de um número maior de cópias de cDNA quando comparados com controles não infectados, excetuando C57BL/6 infectado com amastigotas onde observamos menor número de cópias em relação ao controle não infectado.

Em relação ao efeito de citocinas, observamos diferenças na resposta nas duas linhagens de camundongos estudadas. Com BALB/c, na presença de IFN- γ , não observamos alteração na expressão de RNA de IGF-I, tanto na infecção por promastigotas e amastigotas, quando comparados com as células infectadas, sem a presença da citocina. Na presença de IL-4 e IL-13, observa-se tendência ao aumento na sua expressão nas células infectadas por promastigotas, mas um aumento evidente na sua expressão em células infectadas por amastigotas quando comparadas às células infectadas, sem a presença de citocinas (Figura 16).

Em camundongo C57BL/6 observa-se aumento na expressão de RNA de IGF-I nos experimentos onde se tem infecção por promastigotas, sendo semelhante ao observado com animais BALB/c. Ainda nessas condições vemos que IFN- γ diminui a expressão do fator de crescimento nos grupos infectados pelo parasito. As citocinas Th2 promovem o aumento na expressão de IGF-I somente no experimento com infecção por amastigotas (Figura 17).

Figura 16. PCR quantitativa para IGF-I de amostras de macrófagos de animais BALB/c e estimulados ou não por citocinas Th1 ou Th2 e infectados ou não por parasitos. Valores expressos em múltiplas vezes as cópias do DNA complementar inicial do respectivo controle em potência de dez. * $P < 0,5$ em relação aos demais grupos infectados com parasitos e # $P < 0,5$ em relação aos controles sem parasitos.

Figura 17. PCR quantitativa para IGF-I de amostras de macrófagos de animais e C57BL/6 estimulados ou não por citocinas Th1 ou Th2 e infectados ou não por parasitos. Valores expressos em múltiplas vezes as cópias do DNA complementar inicial do respectivo controle em potência de dez. * $P < 0,5$ em relação aos demais grupos infectados com parasitos e # $P < 0,5$ em relação aos controles sem parasitos.

5 – Discussão

Nas leishmanioses muito se tem estudado a resposta imune específica e não específica, onde o modelo murino infectado por *Leishmania (L.) major* tem grande importância uma vez que a literatura demonstra que a resposta imune mediada por células T desempenha um papel importante no processo de cura ou agravamento da doença e que a predisposição genética para resistência ou suscetibilidade em camundongos infectados com *L. major* está relacionada com o balanço Th1 x Th2, respectivamente. (Scott & Farrel, 1998, Sacks & Noben-Trauth, 2002). Os camundongos BALB/c tidos como susceptíveis a infecção por *L. major* apresentam um fenótipo Th2, com produção de citocinas como IL-4, IL-10 e IL-13, fenótipo esse induzido pelos parasitos logo após a infecção e que são fundamentais para a sobrevivência desse (Noben-Trauth et al., 1996; Matthews et al., 2000). Em contrapartida, camundongos C57BL/6 tidos como resistentes a infecção por *L. major* apresentam fenótipo Th1 com destaque na produção de IFN- γ que confere um aumento na produção de radicais livre pelas células favorecendo a eliminação do parasito (Iniesta et al., 2002).

Fatores de crescimento também estão relacionados à modulação da infecção por leishmânia, onde em trabalhos anteriores realizados por nosso grupo foi observado que o fator de crescimento IGF-I promove aumento no parasitismo em camundongos BALB/c com aumento do infiltrado inflamatório e, como fator estimulador, promove aumento no crescimento de promastigotas em cultura de diferentes espécies de leishmania (GOTO et al., 1998; GOMES et al., 2000). Vendrame et al (2007) demonstrou no modelo *in vitro* utilizando macrófagos peritoneais de BALB/c infectado por *Leishmania (L.) amazonensis* que o parasitismo

aumenta sob efeito de IGF-I. Ao mesmo tempo, a produção de H_2O_2 não sofre alteração, porém, a produção de NO apresenta-se reduzida em culturas de macrófagos peritoneais de camundongo BABL/c infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* estimuladas com IGF-I em relação a culturas não estimuladas, sugerindo efeito desse fator na ativação da arginase e redução recíproca da produção de NO.

A literatura mostra que citocinas como IFN- γ inibe a expressão de IGF-I (Arkins et al., 1995) enquanto IL-4 e IL13 aumentam essa expressão (Wynes et al., 2003). A fim de entendermos melhor a relação entre os fenótipos Th1 e Th2 e os efeitos de IGF-I na cura ou progressão das leishmanioses, adotamos o modelo clássico experimental de animais susceptíveis e resistentes à infecção por *Leishmania (L.) major* (Sacks & Noben-Trauth 2002). Iniciamos os estudos avaliando se IGF-I influenciava a infecção desses animais. Observamos que animais BALB/c infectados com promastigotas de *L.major* pré-incubadas com IGF-I apresentam aumento maior na lesão quando comparados ao grupo sem o fator de crescimento. Esse achado corrobora com estudos realizados anteriormente com o mesmo modelo animal, porém utilizando *Leishmania (L.) amazonensis* (Vendrame et al., 2005). Com o modelo resistente houve progressão da lesão nos animais infectados com parasitos pré-incubados ao contrário do que ocorreu no grupo controle sem interferência de IGF-I. Esse achado demonstra que IGF-I tem papel importante na infecção e desenvolvimento da lesão, não atribuindo somente ao perfil de citocinas o controle ou progressão da infecção. Devemos ressaltar a importância dos nossos achados uma vez que Hondowicz et al., (1997) mostraram que camundongos resistentes tratados com IL-4 desenvolvem uma resposta Th2 temporária que não promove mudança em

seu fenótipo Th1 original. Em outro estudo, transferência de células de BALB/c expressando citocinas Th2 para camundongos quiméricos com background de linhagem resistente de camundongos C57BL/6 não conferiram suscetibilidade (Shankar & Titus, 1995). Nos camundongos resistentes, IGF-I levou à progressão da lesão o que não pôde ser induzida com IL-4.

Uma vez que observamos aumento na lesão dos animais e a fim de entendermos melhor o efeito de IGF-I partimos para os estudos *in-vitro*, onde poderíamos acrescentar o fator de crescimento em diferentes situações e observar sua ação. Experimentos semelhantes já haviam sido feitos em trabalhos anteriores (Vendrame et al., 2007), porém com espécie diferente. Iniciamos com a cultura de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ou C57BL/6 em cultura, infectados com promastigotas ou amastigotas de *L. (L.) major* com 48 horas de cultura. Semelhante ao ocorrido no trabalho com *L.(L.) amazonensis*, observamos aumento no parasitismo quando macrófagos ou parasitos foram pré-incubados com IGF-I por cinco minutos ou ainda quando o fator de crescimento foi mantido no sistema durante todo o período de cultura. Esses resultados foram semelhantes nos dois modelos e indica que o fator de crescimento estimula os receptores celulares e, estando presente ou não durante toda a infecção, já é suficiente para promover aumento no parasitismo. O fato dos parasitos pré-incubados também promoverem esse aumento confirma os dados anteriores mostrando que o parasito possui um receptor homólogo a IGF-I (Gomes et al., 2001) não só se beneficiando do fator como carreando o mesmo em sua membrana.

Uma vez que IGF-I promoveu aumento no parasitismo tanto *in-vivo* quanto *in-vitro* em diferentes espécies estudadas, provavelmente este deva interferir nos

mecanismos leishmanicidas do macrófagos. Vendrame et al (2007) demonstra que IGF-I não altera a produção de peróxido de hidrogênio, importante mecanismo microbicida, mas alterava significativamente a produção de óxido nítrico, fundamental para o controle da infecção (Augusto et al., 1996 e Bogdan et al., 2000). Com base nessas informações fomos avaliar se ocorria alteração na produção de óxido nítrico nos modelos BALB/c e C57BL/6 infectados por *L. (L.) major*.

Para avaliar a produção de óxido nítrico utilizamos o sobrenadante da cultura dos macrófagos nas mesmas situações testadas no experimento de carga parasitária, onde a concentração de nitritos presentes na amostra reflete essa produção. Observamos que ocorre significante redução nos níveis de NO em todas as situações testadas, quer seja nos experimentos onde os macrófagos foram pré-incubados, quer seja onde os parasitos foram pré-incubados ou ainda quando o fator de crescimento permaneceu no sistema durante as 48 horas de cultura. Em ambos os modelos esse resultado pode ser correlacionado com o aumento do parasitismo uma vez que, como citado anteriormente, a produção de óxido nítrico tem papel importante na eliminação do parasito. Interessantemente, observamos que a produção de NO nos macrófagos infectados no modelo C57BL/6 é maior que a encontrada no modelo BALB/c, fazendo com que essa redução tenha maior significado quando pensamos no controle da infecção e relacionamos a progressão da lesão, neste modelo resistente, à diminuição desse mecanismo leishmanicida. Nos trabalhos anteriores onde à infecção foi feita com a espécie *L. (L.) amazonensis*, foi observado o mesmo padrão de redução coincidindo com o aumento no parasitismo, porém, foi utilizado apenas o modelo BALB/c. Ainda com *L. (L.) amazonensis*, Vendrame (2005) e Vendrame et al. (2007) avaliaram a expressão das enzimas sintase induzível do NO

(iNOS) e arginase a fim de entender a redução de NO e o aumento do parasitismo, onde foi observado que ocorre redução na expressão de iNOS, o que leva a diminuição de NO, e aumento da arginase que leva a produção de uréia e poliaminas relacionadas ao crescimento parasitário (Corraliza et al., 1995 e Iniesta et al., 2002). Acreditamos que essa redução do óxido nítrico e aumento do parasitismo no presente trabalho se devam, em parte, a essa modulação das enzimas bem como os processos metabólicos descritos nesses estudos.

Uma vez estabelecido os efeitos de IGF-I nos modelos adotados, partimos para a avaliação dos efeitos das citocinas Th1 ou Th2. Avaliamos os mesmos parâmetros pesquisados com estimulação do fator de crescimento, observando o grau de parasitismo e a produção de óxido nítrico quando INF- γ ou IL-4 e IL-13 foram mantidos em cultura de macrófagos infectados ou não por amastigotas ou promastigotas de *L. (L.) major*. Existem muitos trabalhos relacionando IFN- γ a resistência ou IL-4 a susceptibilidade à infecção em modelos *in-vivo*, porém são menos comuns os trabalhos que relacionam essa modulação *in-vitro*, sendo essas muitas vezes estudadas em tecidos ou células retiradas dos animais sem que haja cultura destas. Uma vez que utilizamos macrófagos peritoneais, fez-se necessário o estudo dessas citocinas não só no macrófago como na interação entre o parasito e a célula frente ao estímulo destas citocinas.

Iniciamos os estudos infectando macrófagos com formas amastigotas ou promastigotas na presença ou ausência de IFN- γ ou IL-4 e IL-13 onde observamos no modelo BALB/c que as citocinas de perfil Th2 possuem maior ação, elevando significativamente o parasitismo em comparação ao controle infectado sem citocinas. A adição de IFN- γ foi capaz de diminuir o parasitismo apenas na situação onde os

macrófagos foram infectados com amastigotas, onde acreditamos que essa diminuição esteja relacionada, em partes, à produção de óxido nítrico, melhor discutida posteriormente. No modelo resistente observamos efeito inverso, onde as citocinas IL-4 e IL-3 foram capazes de aumentar o parasitismo apenas nos MO infectados por amastigotas. Esse aumento ressalta a importância do estímulo precoce na produção de IFN- γ , observado nos animais resistentes, e que faz com que estes suprimam parte da produção de IL-4 desenvolvendo e mantendo o padrão Th1 durante a evolução da infecção (Heinzel et al., 1989; Kaye et al., 1991). A adição de IFN- γ levou a diminuição do parasitismo em relação aos respectivos controles, reforçando a importância desta citocina no controle da infecção.

Uma vez observado a interação das citocinas com o parasitismo, fomos avaliar a produção de NO frente ao estímulo destas nas mesmas situações descritas anteriormente. Sabidamente, IFN- γ leva ao aumento na produção de NO por promover aumento na ativação da enzima iNOS (Ding, AH et al., 1988; Deng, W. et al., 1993). Tanto no modelo BALB/c quanto no C57BL/6 observamos aumento significativo apenas na situação onde IFN- γ estava presente, não havendo alteração na produção de NO quando citocinas Th2 foram adicionadas.

De posse dos resultados envolvendo IGF-I e citocinas Th1 ou Th2 na modulação do parasitismo e na produção de óxido nítrico fomos avaliar a relação entre as citocinas e a expressão do fator de crescimento. Na literatura, encontramos trabalhos que relacionam a modulação na expressão de IGF-I com citocinas Th1, em especial IFN- γ e Th2, sendo essa IL-4 e IL-13, porém, nenhum relacionando essa modulação a infecção por parasitas do gênero leishmânia. Sabidamente, IFN- γ inibe a síntese de IGF-I em macrófagos de medula óssea cultivados na presença dessa

citocina (Arkins et al., 1995), fenômeno esse observado em nossos experimentos onde houve tendência a redução da expressão do fator de crescimento quando em cultura incubado com IFN- γ na linhagem BALB/c. Sabe-se também que citocinas de perfil Th2, como IL-4 e IL-13 promovem indução da expressão de IGF-I, sendo que essa indução se torna mais evidente quando as citocinas estão juntas no sistema, onde o autor relaciona IL-13 como co-estimulante de IL-4 (Wyne et al., 2003).

Ainda no modelo susceptível, uma vez introduzido o parasito no sistema, observamos aumento significativo na expressão do fator de crescimento em todas as situações testadas. Esses resultados são interessantes quanto avaliamos o aumento do parasitismo nos animais inoculados com *L. (L.) major* acrescido de IGF-I, onde observamos aumento da lesão em comparação aos animais controle sem estímulo. Isso sugere que o parasito por si só promove aumento na expressão de IGF-I e, por consequência, aumento da infecção. Quando adicionamos IFN- γ ao sistema macrófago/parasito não observamos aumento em comparação ao controle infectado sem estímulo, sugerindo que essa citocina perde seu efeito modulador quando a célula está infectada. Por outro lado, ao adicionarmos IL-4 e IL-13 ao sistema observamos aumento significativo na expressão de IGF-I o que, relacionado aos experimentos de infecção *in-vitro* com essas citocinas, corrobora com o aumento da infectividade. Isso nos permite relacionar a modulação positiva na expressão de IGF-I frente ao estímulo por essas citocinas com esse aumento no parasitismo *in-vivo* e *in-vitro*, sugerindo que a suscetibilidade desse modelo pode ser, em parte, causada pela modulação do fator de crescimento.

No modelo C57BL/6 não observamos modulação do fator de crescimento nos experimentos onde apenas as citocinas foram acrescidas, porém quando formas

promastigotas foram introduzidas observamos aumento significativo na expressão de IGF-I nas situações onde somente o parasito ou este acrescido das citocinas IL-4 e IL-13 estavam presentes. Olhando a primeira situação podemos relacionar esse aumento ao desenvolvimento da lesão nos animais resistentes, onde a presença das formas promastigotas aumenta a expressão do fator de crescimento, promovendo a infecção nos períodos iniciais. Quando acrescentamos aos macrófagos infectados por promastigotas observamos diminuição significativa na produção de IGF-I o que explicaria o controle da lesão nos animais resistentes. Estes, por possuem alta produção de IFN- γ podem, através da modulação negativa de IGF-I, controlar a infecção uma vez que ocorre aumento na produção de NO como mostrado anteriormente.

Ao avaliarmos os experimentos onde formas amastigotas foram utilizadas para infectar os macrófagos tivemos uma surpresa ao constatar que a expressão de IGF-I encontra-se diminuída nas situações onde só os parasitos foram utilizados ou quando IFN- γ foi introduzido no sistema em comparação aos respectivos controles sem infecção. Por se tratar de formas amastigotas esse achado se torna ainda mais interessante, onde podemos sugerir que o controle da infecção no modelo resistente se dá pela baixa produção de IGF-I, que por sua vez aumentaria a produção de NO e a eliminação do parasito. A expressão do fator de crescimento ainda é mais baixa quando comparamos os experimentos que receberam IFN- γ em comparação a infecção por amastigotas somente. Relacionando esse resultado a infectividade *in-vivo*, podemos sugerir que a falha no controle da lesão nos animais resistentes se deu, em partes, pela presença de IGF-I exógeno, onde mesmo com a atuação de IFN- γ modulando sua expressão o animal não foi capaz de controlar a infecção.

Ainda no modelo resistente podemos relacionar a modulação negativa na expressão de IGF-I em comparação ao respectivo controle, ambos sem estímulo porém infectados com amastigotas, ao controle natural da infecção que ocorre em C57BL/6. Ao contrário do modelo suscetível onde só a presença das formas amastigotas eleva a produção de IGF-I, com aumento na infectividade e redução na produção de NO observados *in-vitro*, os macrófagos peritoneais de C57BL/6 infectados pelas mesmas formas do parasito não apresentam aumento natural na expressão do fator de crescimento. Com isso, a via de produção do óxido nítrico não é afetada pelos efeitos de IGF-I, uma vez que este está inibido e o parasitismo diminui havendo controle da infecção.

Os pontos levantados por nós neste trabalho são mecanismos que podem estar envolvidos no controle ou desenvolvimento da infecção, onde sabemos que ainda existem pontos a serem esclarecidos em futuros trabalhos envolvendo esse tema.

CONCLUSÕES

---

6 – Conclusões

- À semelhança do efeito de IGF-I em *Leishmania (L.) amazonensis*, o fator induz maior crescimento de promastigotas de *Leishmania (L.) major* in vitro, maior parasitismo e redução na produção de óxido nítrico em macrófagos infectados por *L. (L.) major*.
- IGF-I promove maior crescimento na lesão da pata de camundongos BALB/c infectados por *Leishmania (L.) major* e interfere no mecanismo que controla a infecção em animais C57BL/6, resultando em aumento progressivo da lesão enquanto o grupo não estimulado controla a infecção.
- O efeito de citocinas Th1 e Th2 sobre o parasitismo em macrófagos foi distinto em BALB/c e C57BL/6. Quando infectados por amastigotas, o parasitismo aumentou sob estímulo com IL-4 mais IL-13 e diminuiu com IFN- γ como era esperado. No entanto, quando infectado por promastigota, o parasitismo aumentou com IL-4 mais IL-13 somente em células BALB/c. Por outro lado, o parasitismo diminuiu com IFN- γ somente em células C57BL/6.
- Quanto ao efeito de citocinas Th1 e Th2 na produção de óxido nítrico, somente IFN- γ resultou na alteração do seu nível, observando-se aumento no seu nível na interação macrófago-*L. (L.) major*.
- Mesmo na ausência do estímulo por citocinas, observou-se aumento na expressão de RNA de IGF-I nos macrófagos de animais BALB/c infectados por formas amastigotas ou promastigotas de *L. (L.) major* e de C57BL/6 infectados por promastigotas em comparação ao controle não infectado. Um

resultado destoante foi a diminuição da expressão de IGF-I em macrófagos C57BL/6 infectados por amastigotas.

- Em células BALB/c, essa expressão aumentada de IGF-I ocorrida em função da infecção, somente se alterou com IL-4 mais IL-13 quando infectadas por amastigotas. Em células C57BL/6, a expressão aumentada de IGF-I com a infecção por promastigota, sofreu diminuição sob estímulo com IFN- γ , não se alterando com citocinas TH2. A expressão diminuída de IGF-I com a infecção por amastigotas diminuiu ainda mais com IFN- γ e aumentou com citocinas TH2.
- Os dados sugerem a possibilidade de modulação do efeito de citocinas pela expressão diferenciada de IGF-I em macrófagos infectados por *L. (L.) major*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

7 – Referências Bibliográficas

- Antoine, J.C.; Prina, E.; Jouanne, C.; Bongrand, P. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain acidic pH. *Infect. Immunol.*, v. 58, n. 3, p. 779-787, 1990.
- Arkins, S., Rebeiz, N., Brunke-Reese, D.L., Biragyn, A., Kelley, K.W. (1995). Interferon-gamma inhibits macrophage insulin-like growth factor-I synthesis at the transcriptional level. *Mol. Endocrinol.* 9: 350-360.
- Augusto O, Linares E, Giorgio S. Possible roles of nitric oxide and peroxynitrite in murine leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 1996 Jul;29(7):853-62. Review.
- Barral, A., Barral-Netto, M, Yong, E.C., Brownell, C.E., Twardzik, D.R., Reed, S.G. (1993). Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3442-3446.
- Barral-Netto M, Barral A, Brownell CE et al. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science* 1992;257-545–8.
- Blackwel, J.M. Receptors and recognition mechanisms of *Leishmania species*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 79, n. 5, p. 606-612, 1985.
- Bogdan C, Rollinghoff, M. Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 2000;12:64–76.
- Bogdan C, Rollinghoff, M. The immune response to *Leishmania* mechanisms of parasite control and evasion. *Intern. J.Paras.*, v. 28, n. 1, p. 121-134, 1998.

- Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2001;2:907–16.
- Boussein, M.L.; Clifford J. Rosen; Charles H. Turner; Cheryl L. Ackert; Kathryn L. Shultz; Leah Rae Donahue; Gary Churchill; Martin L. Adamo; David R. Powell; Russell T. Turner; Ralph Muller and Wesley G. Beamer. Generation of a new congenic mouse strain to test the relationship among serum Insulin-like growth factor I, bone mineral density, and skeletal morphology in vivo. *Journal of Bone and Mineral Research*, volume 17, number 4, pg.570-579, 2002.
- Chang, K.P. (1981). Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30: 322-333.
- Chang, K.P. *Leishmania donovani*: promastigote-macrophage surface interactions in vitro. *Exp. Parasitol.*, v. 48, n. 2, p. 175-189, 1979.
- Charlab, R., Blaineau, C., Schechtman, D., Barcinski, M.A. (1990). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a growth-factor for promastigotes of *Leishmania mexicana amazonensis*. *J. Protozool.* 37: 352-357.
- Cohick, W.S., Clemmons, D.R. (1993). The insulin-like growth factors. *Annu. Rev. Physiol.* 55: 131-153
- Coler, R.N.; Reed, S.G. Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol.*, v. 21, n. 5, p. 244-249, 2005.
- Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods* 1995; 174:231–5.
- Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol* 2002;72:132–41.

- Deng W, Thiel B, Tannenbaum CS, Hamilton TA, Stuehr DJ. Synergistic cooperation between T cell lymphokines for induction of the nitric oxide synthase gene in murine peritoneal macrophages. *J Immunol*. 1993 Jul 1;151(1):322-9.
- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004;27:305–18.
- Diefenbach A, Schindler H, Donhauser N et al. Type 1 interferon (IFN α /beta) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity* 1998;8:77–87.
- Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol*. 1988 Oct 1;141(7):2407-12.
- FUNASA. (2003). Leishmaniose visceral. Situação atual da doença. www.funasa.gov.br/guia_epi/
- Gomes CM, Goto H, Corbett CE, Gidlund M. Insulin-like growth factor-1 is a growth promoting factor for *Leishmania* promastigotes. *Acta Trop* 1997; 64:225–8.
- Gomes CM, Goto H, Ribeiro da Matta VL, Laurenti MD, Gidlund M, Corbett CE. Insulin-like growth factor (IGF)-I affects parasite growth and host cell migration in experimental cutaneous leishmaniasis. *Int J Exp Pathol* 2000;81:249–55.

- Gomes CM, Monteiro HP, Gidlund M, Corbett CE, Goto H. Insulin- like growth factor-I induces phosphorylation in Leishmania (Leishmania) mexicana promastigotes and amastigotes. J Eukaryot Microbiol 1998;45:352–5.
- Gomes CM, Goto H, Magnanelli AC, Monteiro HP, Soares RP, Corbett CE, Gidlund M. Characterization of the receptor for insulin-like growth factor on Leishmania promastigotes. Exp Parasitol. 2001 Dec; 99(4):190-7.
- Goto H, Gomes CM, Corbett CE, Monteiro HP, Gidlund M. Insulin-like growth factor I is a growth-promoting factor for Leishmania promastigotes and amastigotes. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95:13211–6.
- Goto, H.; Lindoso, J.A. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. Braz. J. Med. Boil. Res., v. 37, n. 4, p. 615-623, 2004.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. Anal Biochem 1982;126:131–8.
- Green, S.J., Scheller, L.F., Marletta, M.A., Seguin, M.C., Klotz, F.W., Slayter, M., Nelson, B.J., Nacy, C.A. (1994). Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunol. Lett.* 43: 87-94.
- Greil, J.; bodendorfer, B.; Rollinghoff, M.; Solbach, W. Application of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor has a detrimental effect in experimental murine leishmaniasis. Eur. J. Immunol., v. 18, n.10, p. 1527-1533, 1988.
- Guevara-Aguirre J. Insulin-like growth factor I – an important intrauterine growth factor. N Engl J Med 1996;335:1389–91.

- Hall, L.R.; Titus, R.G. Sand fly vector saliva selectively modulation macrophage functions that inhibit killing of *leishmania major* and nitric oxide production. J. Immunol., v. 155, n. 7, p. 3501-3506, 1995.
- Hill, J.; North, j. & Collins, F.M. Advantages of measuring changes in the number of viable parasites in murine models of experimental cutaneous leishmaniasis. Infect. Immunol., 39, n. 3, p. 1087-1094, 1983.
- Hondowicz BD, Scharton-Kersten TM, Jones DE, Scott P. *Leishmania major*-infected C3H mice treated with anti-IL-12 mAb develop but do not maintain a TH2 response. J Immunol 1997; 159:5024–5031.
- Iniesta V, Gomez-Nieto LC, Molano I et al. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. Parasite Immunol 2002; 24:113–8.
- Noben-Trauth N, Kropf P, Müller I. Susceptibility to *Leishmania major* infection in interleukin-4-deficient mice. Science 1996; 271(5251):987-990.
- Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. Endocr Rev 1995;16:3–34.
- Kratz G, Lake M, Gidlund M. Insulin like growth factor-1 and -2 and their role in the re-epithelialisation of wounds; interactions with insulin like growth factor binding protein type 1. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg 1994;28:107–12.
- Lainson, R., Shaw, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W. and Killich-Kendrick, R. eds. The leishmaniasis in Biology and Medicine. Academic Press, London. 1987. p. 1-120.

- Laskay, T., Diefenbach, A., Rollinghoff, M., Solbach, W. (1995). Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. *Eur. J. Immunol.* 25: 2220-2227.
- Laskay, T., Rollinghoff, M., Solbach, W. (1993). Natural killer cells participate in the early defense against *Leishmania major* infection in mice. *Eur. J. Immunol.* 23: 2237-2241.
- Lewis, D.J.; Ward, R.D. Transmission and Vectors. In: Peters, W., Killick-Kendrick, R. eds. The leishmaniasis in Biology and Medicine. Academic Press, London. 1987. p. 235-262.
- Li, J., Hunter, C.A., Farrell, J.P. (1999). Anti-TGF-beta treatment promotes rapid healing of *Leishmania major* infection in mice by enhancing in vivo nitric oxide production. *J. Immunol.* 162: 974-979.
- Matthews DJ. IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection. *J Immunol* 2000; 164:1458–1462.
- Morris SM Jr, Kepka-Lenhart D, Chen LC. Differential regulation of arginases and inducible nitric oxide synthase in murine macrophage cells. *Am J Physiol* 1998;275:E740–7.
- Mosser, D.M., Burke, S.K., Coutavas, E.E., Wedgwood, J.F., Edelson, P.J. (1986). *Leishmania species*: mechanisms of complement activation by five strains of promastigotes. *Exp. Parasitol.* 62: 394-404.
- Mosser, D.M.; Brittingham, A. Leishmania, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology*, v. 115. Suppl: S9-23, 1997.

- Mosser, D.M.; Rosenthal, L.A. *Leishmania*-macrophage interaction: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Semin. Cell. Biol.*, v. 4, n. 5, p. 315-325, 1993.
- Munder M, Eichmann K, Modolell M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4⁺ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol* 1998;160:5347-54.
- Murray, H.W., Natan, C.F. (1999). Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J. Exp. Med.* 189: 741-746.
- Nelson, B.J., Ralph, P., Green, S.J., Nacy, C.A. (1991). Differential susceptibility of activated macrophage cytotoxic effector reactions to the suppressive effects of transforming growth factor-beta 1. *J. Immunol.* 146: 1849-1857.
- Pearson, R.D., Steigbigel, R.T. (1980). Mechanism of lethal effect of human serum upon *Leishmania donovani*. *J. Immunol.* 125: 2195-2201.
- Pearson, R.D., Steigbigel, R.T. (1981). Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* 127: 1438-1443.
- Pearson, R.D. pathology of leishmaniasis. In: Kenneth S. Warren ed. *Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections*. 3 ed., Blackwell Scientific, Oxford. Publications. 1993. p. 71-86.

- Qi, H.; Ji, J.; Wanasen, N.; Soong, I. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immunol.*, v. 72, n. 2, p. 988-995, 2004.
- Sacks, D., Noben-Trauth, N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 845-858.
- Sacks, D.L.; Louis, J.A.; Wirth, D.F. Immunology and molecular biology of parasitic infections. In; Warren, K.S. eds. *Leishmaniasis*. Blackwell Scientific Publications. Boston. 1993. p. 237-268.
- Shankar AH, Titus RG. T-cell and non-T-cell compartments can independently determine resistance to *Leishmania major*. *J Exp Med* 1995; 181:845–855.
- Scott P.; Farrel JP. Experimental Cutaneous Leishmaniasis: Induction and Regulation of T Cells following Infection of Mice with *Leishmania major*. *Chem Immunol* 1998; 70:60-80.
- Scott CL, Roe L, Curtis J et al. Mice unresponsive to GM-CSF are unexpectedly resistant to cutaneous *Leishmania major* infection. *Microb Infect* 2000;2:1131–8.
- Stenger, S., Thuring, H., Rollinghoff, M., Bogdan, C. (1994). Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *J Exp Med.* 180: 783-793.
- Stuehr DJ, Kwon NS, Nathan CF, Griffith OW, Feldman PL, Wiseman J. N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem* 1991;266:6259–63.

- Vendrame, C.M.V; Carvalho, M.D.T.; Manuli, E.R.; Rios, F.J.O.; Gidlund, M.; Goto, H. Insulin like growth factor (IGF-I) affects L-arginine metabolism in macrophage and its leishmanicidal mechanism. Third World Congress on Leishmaniosis; 10-15 April 2005; pg. 283.
- Vendrame, C.M.V; Carvalho, M.D; Rios, F.J.O; Manuli, E.R; Petitto-Assis, F; Goto,H. Effect of Insulin-like Growth Factor-I on *Leishmania amazonensis* Promastigote Arginase Activation and Reciprocal Inhibition of NOS2 Pathway in Macrophage In vitro. Scandinavian Journal of Immunology, 2007; 66: 287-296.
- Walters, L.L. (1993). *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sandfly hosts. *J. Eukaryotic Microbiol.* 40: 196-206.
- WHO (2001). WORLD HEALTH ORGANIZATION. Division of control of tropical disease. Leishmaniasis control. Geographical distribution. WHO/CTD. Disponível em: <http://www.who.int/ctd/html/leisgeo.html>
- Wilson, M.E., Young, B.M., Davidson, B.L., Mente, K.A., McGowan, S.E. (1998). The importance of TGF-beta in murine visceral leishmaniasis. *J. Immunol.* 161: 6148-6155.
- Wynes, M.W., Riches, D.W. (2003). Induction of macrophage insulin-like growth factor-I expression by the Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J. Immunol.* 171: 3550-3559.
- Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med.* 1989 Jan 1;169(1):59-72.

- Kaye PM, Curry AJ, Blackwell JM. Differential production of Th1 and Th2 derived cytokines does not determine the genetically controlled or vaccine-induced rate of cure in murine visceral leishmaniasis. *J Immunol.* 1991 Apr 15;146(8):2763-70.

8 – Apêndices

8.1 Artigo Publicado:

- Vendrame, C.M.V; Carvalho, M.D; Rios, F.J.O; Manuli, E.R; **Petitto-Assis**, F; Goto,H. Effect of Insulin-like Growth Factor-I on *Leishmania amazonensis* Promastigote Arginase Activation and Reciprocal Inhibition of NOS2 Pathway in Macrophage In vitro. Scandinavian Journal of Immunology, 2007; 66: 287-296.

Effect of Insulin-like Growth Factor-I on *Leishmania amazonensis* Promastigote Arginase Activation and Reciprocal Inhibition of NOS2 Pathway in Macrophage *In vitro*

C. M. V. Vendrame*, M. D. T. Carvalho†, F. J. O. Rios†, E. R. Manu†, F. Pettito-Assis* & H. Goto*,†

*Laboratório de Soroprevalência e Imunobiologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo; †Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; ‡Departamento de Medicina Preventiva, Faculdade de Medicina de Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Received: 30 April 2007; Accepted: in revised form: 28 April 2007

Correspondence to: Prof. Dr H. Goto, Laboratório de Soroprevalência e Imunobiologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, USP, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, prédio 11, 4º andar, 05403-000 São Paulo, SP, Brazil. E-mail: hgoto@unip.br

Abstract

We showed previously that insulin-like growth factor (IGF)-I induces an exacerbation of the lesion development in experimental congenital leishmaniasis favouring parasite growth within host macrophages. Here we studied the effect of IGF-I *in vitro* in BALB/c mouse peritoneal macrophages infected with stationary phase *Leishmania amazonensis* promastigotes. IGF-I was used to pre-incubate either macrophage or parasite before infection of the macrophages or adding it at the start of the *Leishmania*-macrophage culture and maintaining it throughout the experimental period. Independent of stimulation pattern, IGF-I induced significantly increased parasite growth within macrophages. Arginase activation considered as a key factor in *Leishmania* growth was studied, and its expression and activity were increased in *Leishmania*-infected macrophages but significantly more in infected cells upon IGF-I stimulus, an effect specifically inhibited by NOHA. Arginase known to be present on *Leishmania* was also studied, and its expression and activity were seen in the absence of any stimulus but significantly increased after 5 min of incubation with IGF-I. In addition, *Leishmania* was pre-incubated with NOHA for 5 min, washed, then macrophages infected observing a significantly reduced parasite burden in both IGF-I-stimulated and non-stimulated macrophages. Reciprocal decrease in the nitric oxide (NO) level and inhibition of nitric oxide synthase (NOS2) expression were also observed in IGF-I-stimulated infected macrophages. Our data strongly suggest that IGF-I induces preferential expression and activation of *Leishmania* promastigote arginase, contributes to the alternative activation of macrophages in the context of innate immunity and interferes with NOS pathway in infected macrophages probably as a reciprocal effect.

Introduction

Leishmaniasis are diseases caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) that affect more than 12 million people mainly in tropical and subtropical areas of the world. In humans *Leishmania* infections range from self-healing cutaneous lesions to non-healing disseminated and diffuse cutaneous, mucocutaneous or visceral diseases [1].

Control or progression of leishmaniasis in the vertebrate host involves both non-specific and specific factors of the immune response, and the parasite survival depends

on their evasion ability [2]. Some growth factors are known to favour parasite proliferation in the host such as GM-CSF [3, 4] and TGF- β [5]. Insulin-like growth factor (IGF)-I is another growth factor present in the circulation [6] and also in macrophages [7] that affects *Leishmania*. We have shown that IGF-I in physiological concentrations induces a rapid growth of *Leishmania* promastigotes and axenic amastigotes and induces phosphorylation of intracellular molecules upon stimulation *in vitro* [8–10]. Further, it induces a significant increase in the lesion size and in the number of viable parasites in the skin in mice infected with *Leishmania* promastigotes pre-incubated

with IGF-I indicating an important participation in the innate response early in the infection with repercussions in the late phase [10, 11]. Data further suggest that these effects are probably related to the IGF-I-induced growth of the parasites within macrophages [11].

Macrophages play a central role in the parasite-host interaction, and depending on how they are activated may either shelter or kill *Leishmania*, and the metabolic production of L-arginine exert these diverse functions. Nitric oxide (NO) [12, 13], a main leishmanicidal element, is generated through the oxidation of L-arginine catalysed by the inducible nitric oxide synthase (NOS2). On the other hand, polyamines, essential nutrients for the growth of *Leishmania*, are generated when L-arginine is hydrolysed by arginase [14]. Further, arginase activation and generation of polyamines have been considered key factors in the development of leishmaniasis [15, 16]. Activation of these enzymes are mainly related to adaptive immune response, but the role of NOS2 [17, 18] and arginase [19, 20] is also known in the innate response.

As IGF-I induced the increased *Leishmania* growth within macrophages in experimental cutaneous leishmaniasis [11] and it might be due to the effect of IGF-I on the pathway that result in the production of polyamines, thus favouring parasite growth, here we studied *in vitro* its effect on arginase expression and activation in *Leishmania*-infected macrophages. In addition, as we have observed induction of parasite proliferation upon stimulus in previous studies, and it is known that *Leishmania* itself expresses arginase [21] with an important role in parasite proliferation [14], we also studied the effect of IGF-I on arginase expression and activation in *Leishmania*. To focus the study on the effect at the start of the infection during innate response, promastigotes were used to infect macrophages.

In the present study, we have shown that IGF-I favoured the parasite growth within macrophages *in vitro*, affecting L-arginine metabolism within macrophages, possibly promoting mainly the expression and activation of parasite arginase but not discarding its effect on macrophage arginase, and also affecting the NOS2 pathway shown by low NO levels after IGF-I stimulus.

Materials and methods

Mice. Six- to 8-week-old, inbred, BALB/c strain mice of both sexes were obtained from the Animal Facility of Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo and were maintained in the Animal Facility of the Instituto de Medicina Tropical de São Paulo for the experiments. All procedures were approved by the institutional guidelines for animal care and use and by ethics committees.

Parasite. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/73/M269) strain was kindly provided by Prof. Clara Lucia Barbieri from Universidade Federal de São Paulo, and was maintained through regular passage in BALB/c

mice. Promastigotes were derived from amastigotes purified from the foetal lesions of BALB/c mice and were expanded and maintained in 199 medium (Gibco, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) at 26 °C. Promastigotes used in experiments were in the stationary phase of growth and had no more than four passages in culture.

Macrophage culture, infection and stimulation. Peritoneal resident cells were obtained from the peritoneal cavity, suspended in RPMI-1640 medium (Gibco) supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2% heat-inactivated BALB/c mice serum (complete medium) and the concentration adjusted to 4×10^6 cells/ml and plated in different amounts either on round 13-mm² glass cover slips placed in the wells of a 24-well plate (Corning Costar Co., Cambridge, MA, USA) or directly into the well, and incubated for 2 h to adhere in the plate, at 37 °C in humid atmosphere with 5% CO₂. Thereafter, the wells were washed twice with RPMI-1640 medium to remove non-adherent cells. Then, either adherent cells (macrophages) or *Leishmania* promastigotes were pre-incubated for 5 min with 50 ng/ml of recombinant human IGF-I or IGF-II (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and then washed out. Parasite suspension (two parasites per cell ratio) was dispensed in the wells, allowed to infect for 2 h at 33 °C in humid atmosphere with 5% CO₂, the non-internalized parasites were washed out and the culture was maintained at 33 °C in humid atmosphere containing 5% CO₂. In some cases the IGF-I and IGF-II were maintained throughout the experimental period. Control was maintained without IGF-I. In some experiments, 100 µM *N*^G-hydroxy-L-arginine acetate salt [NOHA] (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA) [22] was added in the culture or used to pre-incubate promastigotes for 5 min and washed out. Tests were run in sextuplicate, and incubated for 2, 24, 48 or 72 h, then cover slips, supernatants or cell lysates were recovered for different evaluations.

Parasite stimulation by IGF-I. Stationary phase promastigotes (1×10^7) were stimulated with 50 ng/ml IGF-I in complete medium for 5 min, washed and lysed or washed and subsequently cultured for 24 h. One set of parasites were maintained in culture with complete medium with 50 ng/ml IGF-I. After culture, the parasites were lysed and processed for arginase expression analysis by Western blotting or for arginase activity determination as described below.

Parasite burden in macrophages. Cover slips were removed from the plates, mounted and dyed with Giemsa staining and processed for the evaluation of parasitism under light microscope (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) counting 600 cells per each treatment condition. The data were presented as the number of parasites per 100 cells from the formula: [number of parasites/number of

infected cells) $\times$ (number of infected cells/total number of cells) $\times$ 100].

Arginine and inducible nitric oxide synthase expression (NO2) – sample preparation. A total of 2×10^6 cells in 500 μ l were plated in 24-well culture plate (Corning Costar Co.) and infected and treated with IGF-I as described before. Some sets were stimulated with IFN- γ (10 ng/ml), LPS (1 μ g/ml) or NOHA (100 μ M). After 24 h of incubation the cells were washed twice with ice-cold 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) and then lysed for 10 min with ice-cold lysis buffer [10 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 2% NP-40 substrate (octylphenoxypolyethoxyethanol), 1 mM 4-(2-aminethyl)-benzamidoethyl fluoride and 5 μ M leupeptin]. The lysed cell preparation was centrifuged at $10,000 \times g$ for 5 min at 4 °C and the protein concentration determined in the supernatant by Lowry protein assay [23] to adjust the concentration before analysis by Western blot. For analysis of arginine expression by *Leishmania* promastigotes upon IGF-I stimulation, promastigotes were submitted to the same lysis protocol.

SDS-PAGE and Western blot. Cell lysates (20 μ g of protein in 20 μ l) were run in sodium dodecyl sulphate–10% polyacrylamide continuous gel in the presence of 2-mercaptoethanol. The separated proteins were electrotransferred onto 0.2-mm pore size nitrocellulose membranes using trans-blot® SD-semidry Transfer cells (Bio-Rad, Hercules, CA, USA; 30 min at 15 mV). The membranes were blocked with 150 mM NaCl, 20 mM Tris, 0.01% Tween 20, pH 7.4 buffer (TBS-T buffer) containing 5% fat-free milk for 1 h. Membranes were reacted with either mouse monoclonal anti-arginase-I antibody (1:1000 in PBS) or mouse monoclonal anti-NOS2 antibody (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) (1:2500 in PBS) for 2 h at room temperature, were washed three times with TBS-T and incubated with peroxidase-conjugated polyclonal anti-mouse IgG (1:1000) for 1 h at room temperature. Rainbow™ protein molecular weight marker (Bio-Rad Laboratories) were used. Bound antibodies were detected by an ECL chemiluminescence kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) following manufacturer's instruction. Subsequently, the protein bands were quantified by densitometric analysis with AlphaEaseFC™ software 3.2 beta version (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA), and the results were expressed in arbitrary units, which were calculated by integration of the intensity of each pixel over the spot area and normalized for the gel background.

Arginase activity. Cells and promastigotes were taken from the culture, lysed and submitted to determine arginase activity [24]. Briefly, to activate the arginase, 50 μ l of lysates were treated with the same volume of 10 mM MnCl_2 , 90 mM Tris-HCl pH 7.4 at 56 °C for 10 min. Then to 25 μ l of the activated lysate, 25 μ l of 0.5 M L-arginine pH 9.7 was added and incubated at

37 °C for 60 min. The reaction was stopped with 400 μ l of $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{O}$ (1/3/7, v/v/v). The urea concentration was measured at 540 nm, in a spectrophotometer Multiskan MCC/340 P version 2.20 plate reader (Labosystems, Vantaa, Finland), after the addition of 25 μ l of 9% α -ketonitrosopropiophenone in 100% methanol and submitted to 100 °C for 45 min. One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme that catalyses the formation of 1 μ mol of urea per minute.

Detection of nitrite. Nitrite (NO_2^-) accumulation in the supernatants of cell culture was used as an indicator of NO production and was determined by a standard Griess reaction [25]. Fifty microlitres of the culture supernatant was mixed with 50 μ l of Griess reagent (1% sulphanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride, 2.5% phosphoric acid in bidistilled water) for 10 min at room temperature. The absorbance was measured at 540 nm using a Multiskan MCC/340 P version 2.20 plate reader (Labosystems) and the nitrite concentration was calculated using a standard curve of sodium nitrite. Tests were run in triplicate.

Detection of H_2O_2 . A total of 5×10^7 cells were cultured in 96-well flat-bottomed tissue culture plates in complete medium without phenol red, and parasite infection and IGF-I stimulation proceeded in similar conditions described above [26]. After the infection period, 100 μ l of the phenol red solution (140 mM NaCl, 10 mM potassium phosphate buffer pH 7.0, 55 mM dextrose, 0.28 mM phenol red, and 8.5 U/ml horseradish peroxidase) was added, maintained at 33 °C in humid atmosphere with 5% CO_2 for 3 h, and the reaction was stopped by the addition of 1 M NaOH and read at 610 nm in a spectrophotometer Multiskan MCC/340 P version 2.20 plate reader (Labosystems). Standard curve was established using H_2O_2 solution of known concentration. Phenol myristate acetate (PMA, 2 μ M) was used as positive control stimulus. Tests were run in triplicate.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism3 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). The data were submitted to an ANOVA test with the Student Newman-Keuls contrast post-test and considered significant when $P < 0.05$.

Results

Effect of IGF-I and IGF-II on parasite burden in *Leishmania (L.) amazonensis* promastigote-infected BALB/c macrophages

Effect of IGF-I was assayed in one of three different ways: (1) stationary phase promastigotes or (2) macrophages were pre-incubated with the factor for 5 min and washed out; and (3) it was maintained in the culture medium throughout the experimental period.

Figure 1 Effect of IGF-I on parasite burden in *Leishmania* promastigote-infected macrophages. BALB/c mouse peritoneal macrophages were infected with *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* promastigotes and the parasite burden evaluated after 1, 2, 24 or 48 h of culture. Promastigotes (pre) or macrophages (mac) were pre-stimulated for 5 min with IGF-I (50 ng/ml) (A) or IGF-II (50 ng/ml) (B) before interaction or the factors were maintained in the culture system (mac) throughout the experimental period. Results from one representative from 6 similar experiments. The results were expressed as mean $\pm$ standard deviation of total number of amastigotes per 100 cells. See Materials and Methods for further details. * $P < 0.05$ in relation to culture without IGF-I stimulus.

Initially, different concentrations of IGF-I from 12.5 to 100 ng/ml were assayed but the expected effect was seen with 50 and 100 ng/ml (data not shown); thus 50 ng/ml was chosen for subsequent experiments. The results presented in Fig. 1A clearly show significant increments in the number of parasites within macrophages with IGF-I stimulation after 48 h of *Leishmania*-macrophage interaction when compared with infected macrophage without any stimulus, independent of the

Figure 2 Effect of IGF-I on arginase expression in *Leishmania* promastigote-infected macrophages. BALB/c mouse peritoneal macrophages were infected with *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* promastigotes and arginase expression was evaluated after 24 h of culture. Promastigotes (pre) or macrophages (mac) were pre-stimulated for 5 min with IGF-I (50 ng/ml) before interaction or the factor was maintained in the culture system (mac) throughout the experimental period. Alternatively, non-infected macrophages were stimulated by IFN- γ (10 ng/ml) and LPS (1 μ g/ml). Cells from culture were lysed, subjected to 10% SDS-PAGE and subsequently to Western-blotting using anti-arginase-1 antibody (A). Protein bands corresponding to arginase expression were subjected to densitometric analysis, and the data expressed in arbitrary units (B). See Materials and Methods for further details.

pre-stimulated element. When IGF-II was used in the same way (Fig. 1B), we did not observe any effect, although its similarity to IGF-I is very high [8], showing a specificity of the effect of IGF-I.

Arginase-1 expression in the *Leishmania*-macrophage interaction and on *Leishmania* promastigotes

To investigate if IGF-I stimulates arginase pathway, that may explain IGF-I-induced parasite growth in macrophages, we analysed arginase expression by Western blotting during experiments with different ways of IGF-I stimulus (Fig. 2). IGF-I did not increase arginase expression in non-infected macrophages. However, its increased expression was seen in infected macrophages, and even more upon IGF-I stimuli, independent of the way the factor was introduced with different elements.

In addition as *Leishmania* is known to express arginase [14, 21], IGF-I-induced arginase expression was analysed

Figure 3 Effect of IGF-I on arginase expression in *Leishmania* promastigotes. Stationary phase *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes were stimulated with 50 ng/mL IGF-I for 5 min, washed and lysed or washed and subsequently cultured for 24 h and then lysed. Some parasites were maintained in culture with 50 ng/mL IGF-I for 24 h and then lysed. Protein lysates were subjected to 10% SDS-PAGE and subsequently to Western blotting using anti-arginase-1 antibody (A). Protein bands corresponding to arginase expression were subjected to densitometric analysis, and the data expressed in arbitrary units (B). See Material and Methods for further details.

on *Leishmania* (Fig. 3). Promastigotes in culture showed substantial increase in the expression of arginase upon 5 min of incubation with IGF-I. These treated parasites subjected to washing and then maintained in culture for 24 h in medium without the factor still presented increased arginase expression.

Arginase activity in the *Leishmania*-macrophage interaction and in *Leishmania* promastigote

Besides expression, to demonstrate that the enzyme activity was present upon IGF-I stimulus, we measured its activity by urea determination. Non-infected macrophages presented arginase activity that increased when infected with promastigotes. Upon IGF-I treatment, the activity was much higher. To confirm that urea was derived from arginase activity a specific arginase inhibitor (NOHA) was used that inhibited the generation of urea (Fig. 4A). Similar study was done measuring the direct effect of IGF-I on promastigote arginase activity. Arginase activity was present in non-stimulated parasite but showed increased activity in IGF-I stimulation compared with non-stimulated parasites. This activity was inhibited by NOHA (Fig. 4B).

Figure 4 Effect of IGF-I on the activity of arginase in *Leishmania* promastigotes infected macrophages and in *Leishmania* promastigotes. BALB/c mouse peritoneal macrophages were infected with *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes and arginase activity was evaluated after 24 h of culture (A). Promastigotes (pro) or macrophages (mac) were pre-stimulated for 5 min with IGF-I (50 ng/mL) before infection or the factor was maintained in the culture system (iso) throughout the experimental period. For analysis of arginase activity in parasite (B), stationary phase *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes were stimulated directly with 50 ng/mL IGF-I for 24 h. Arginase inhibitor NOHA (100 μ M) was maintained throughout the experimental period in some cases. Macrophages or parasites were lysed and the activity of arginase was determined measuring urea level. Assay run in triplicate. Data were presented as mean $\pm$ standard deviation of enzyme activity units = amount of enzyme that catalyses the formation of 1 μ mol urea/min. Results from one representative from two similar experiments. * $P < 0.05$ in relation to culture without IGF-I stimulus. ** $P < 0.05$ in relation to control without NOHA. † $P < 0.05$ between indicated conditions. ‡ $P < 0.05$ in relation to non-stimulated parasite.

Effect of inhibition of arginase activity by NOHA on the parasite burden in macrophages

In an experiment using IGF-I and inhibition of arginase activity by NOHA, parasite burden was evaluated.

NOHA led to decreased parasite burden in macrophages, in IGF-I-stimulated infected macrophages (Fig. 5A).

As both macrophage and parasite have arginase that were activated by IGF-I, to evaluate the isolated effect of IGF-I on parasite arginase and its reflex on parasite-macrophage interaction, promastigotes were pre-incubated with NOHA for 5 min, washed and then used to infect macrophages (Fig. 5B). This treatment was efficient in further reducing parasite burden. Additionally, maintaining NOHA during the whole period in the culture medium further decreased the parasite burden in macrophages.

Figure 5 Effect of inhibition of arginase activity by NOHA on the parasite burden in *Leishmania* promastigote-infected macrophages under IGF-I effect. BALB/c mouse peritoneal macrophages were infected with *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes without (A) or with pre-incubation for 5 min with 100 μ M NOHA (B) and parasite burden (mean $\pm$ standard deviation of number of amastigotes/100 cells) evaluated after 48 h of culture in the presence of IGF-I (50 ng/mL). In some cases arginase inhibitor NOHA was maintained throughout the experimental period. Experiments (A) and (B) were run simultaneously. * $P < 0.05$ in relation to the conditions. # $P < 0.05$ between indicated conditions.

Effect of IGF-I on the production of NO and H_2O_2 by macrophages

Arginase activity favors parasite growth providing polyamines, but it is also suggested that it constitutes an evading mechanism of the parasites as it depletes L-arginine and then lowers the NO level within macrophages [27]. Thus, during *Leishmania*-macrophage interaction, we investigated the NO level in the culture supernatant. In *Leishmania*-infected macrophages without any stimulus, NO level was higher than in non-infected macrophages. We observed significantly diminished levels of NO with IGF-I used to pre-stimulate different elements compared with infected macrophages without stimulus (Fig. 6A). However, upon IGF-I stimulus no alteration was seen in H_2O_2 levels, another leishmanicidal element that is not

Figure 6 Effect of IGF-I on nitric oxide (NO) and hydrogen peroxide production in *Leishmania* promastigote-infected macrophages. BALB/c mouse peritoneal macrophages were infected with *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes and NO (A) and H_2O_2 (B) levels evaluated in culture supernatants after 48 h of culture. Promastigotes (pro) or macrophages (mac) were pre-stimulated for 5 min with IGF-I (50 ng/mL) before interaction or the time was maintained in the culture system (typ) throughout the experimental period. PMA 0.5 μ M was used as positive stimulus for H_2O_2 production. See Material and Methods for further details. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation of μ M of culture or H_2O_2 . * $P < 0.05$ in relation to culture without IGF-I stimuli. # $P < 0.05$ between indicated conditions. ** $P < 0.05$ in relation to other conditions.

related to L-arginine metabolism (Fig. 6B), while PMA used as a positive control induced increased H_2O_2 production.

Inducible NO synthase (NOS2) expression in the *Leishmania*-macrophage interaction

We analysed by Western blotting the NOS2 expression related to NO generation during *Leishmania*-macrophage interaction under the effect of IGF-I. Fig. 7 shows in non-infected macrophage an increased NOS2 expression upon both IFN- γ and LPS stimuli (positive control), but no expression with IGF-I stimulus as well as the control macrophages without any stimulus. In *Leishmania*-infected macrophages without any stimulus, NOS2 was expressed. However, IGF-I affected the NOS2 expression during *Leishmania*-macrophage interaction but in a different way depending on the stimulation protocol. We observed the absence of NOS2 expression when promastigotes were pre-incubated with IGF-I or when IGF-I was maintained in the culture medium throughout the experimental period. By contrast, NOS2 expression was detected when macrophages were pre-incubated with IGF-I.

Discussion

In the present study, using peritoneal-derived macrophages infected with *L. (L.) amazonensis* promastigotes *in vitro* we show that IGF-I but not IGF-II increases the growth of *Leishmania* parasite within macrophages. We suggest that this result is related to the effect of IGF-I on L-arginine metabolism in *Leishmania*-infected macrophages, increasing preferentially the expression and activation of parasite arginase, not discussing its effect on

macrophage arginase, but affecting also the NOS2 pathway shown by the low NO level after IGF-I stimulation.

The effect of IGF-I was analysed *in vitro* pre-incubating either macrophage or parasite before infection of the macrophages or adding it at the start of the *Leishmania*-infected macrophage culture and maintaining it in the culture system throughout the experimental period. IGF-I stimulation significantly increased parasite growth in *Leishmania (L.) amazonensis* promastigote-infected macrophages. This result further substantiates our previous finding showing a significant increase in the lesion size in experimental cutaneous leishmaniasis with IGF-I [10, 11]. In this, as in the previous studies, we used IGF-II as an internal specificity control [10]. Even though having 70% similarity [28] they display different biological activities and receptor specificity [6, 29]. The present data showing the effect of IGF-I but not IGF-II are in line with our previous observation when the factors were assayed directly on promastigotes and amastigotes [8, 10].

After 2 h of culture with macrophages pre-incubated with IGF-I a tendency to have higher parasite burden suggested a direct effect of IGF-I on macrophages. However, very similar data after 48 h among cultures submitted to different ways of stimulation suggested an IGF-I-mediated mechanism affecting both the macrophage and parasite. On the other hand, a significant greater parasite growth when promastigotes were pre-incubated for only 3 min strongly indicated the importance of the effect on promastigotes in this interaction.

An arginase activation that results in the hydrolysis of L-arginine and in the generation of polyamines, essential for the growth of trypanosomatidae, has been considered a key factor in *Leishmania* growth within macrophages [15] and in the development of leishmaniasis [16, 30]. We studied arginase expression and activity in our system. Arginase expression and activity were increased in *Leishmania*-infected macrophages but significantly more in infected cells where IGF-I stimulus was present; the arginase activity was proved by the use of a strong specific inhibitor NOHA [12]. No increase in the arginase expression and also in the activity (data not shown) with the use of IGF-I on macrophage in the absence of parasite infection was somehow unexpected at that point.

These latter data and that finding showing higher expression and activity of arginase still in the absence of any stimulus in infected than in uninfected macrophages directed us to study the arginase activity of the parasite, considering also that *Leishmania* is known to express arginase with a key role in its growth [14, 21]. The expression and activity of arginase were seen even in the absence of any stimulus but they increased significantly with IGF-I stimulus. The expression of arginase increased with 5 min of incubation with IGF-I, and this increased expression was still detected after 24 h of culture without

Figure 7 Effect of IGF-I on inducible NO synthase (NOS2) expression in *Leishmania* promastigote-infected macrophages. BALB/c mouse peritoneal macrophages were infected with *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes and NOS2 expression was evaluated after 24 h of culture. Promastigotes (pre) or macrophages (inf) were pre-stimulated for 5 min with IGF-I (50 ng/ml) before infection or the factor was maintained in the culture system (pre) throughout the experimental period. Alternatively, non-infected macrophages were stimulated by IFN-gamma (10 ng/ml) and LPS (1 µg/ml). Cells from culture were lysed, submitted to 10% SDS-PAGE and subsequently to Western blotting using anti-NOS2 antibody. See Material and Methods for further details.

any additional stimulus. This sustained increase of arginase expression explains better our previous finding, an apparently unusual bigger lesion in experimental cutaneous leishmaniasis in animals infected with promastigotes incubated with IGF-1 for only 5 min [11]. *Leishmania* promastigote is known to express constitutive arginase [21] but the almost immediate IGF-1-induced increase in its expression and activity suggests a mechanism independent of transcription and translation similar to that seen in *Saccharomyces* [31].

IGF-1 stimulus increased the expression and activity of arginase in *Leishmania*-infected macrophages that was accompanied by an increase in the parasite burden in macrophages. Conversely, inhibition of the arginase activity by NOHA resulted in a decrease in the parasite burden in macrophages, although NOHA may propitiate NO production functioning as its precursor [32]. Knowing that *Leishmania* itself express arginase that is activated by IGF-1, an increase in the arginase expression and activity seen in the infected macrophages may be attributed solely to the parasite or to both parasite and macrophage. It is noteworthy that in the literature the possibility of participation of parasite and/or macrophage is not usually considered separately in the studies of arginase in *Leishmania*-infected macrophages [15, 16]. To clarify this aspect and also to discard the interference on NO production we pre-incubated promastigotes with NOHA for 5 min, washed and then used to infect macrophages. With this inhibition of parasite arginase we observed significantly reduced parasite burden both in IGF-1-stimulated and non-stimulated infected macrophages. The effect was more pronounced than the use of NOHA in the culture system only probably because of the immediate availability and higher concentration than that inside macrophages. NOHA as a strong competitor has probably blocked the already expressed arginase at very beginning of the infection of macrophages showing its importance in the establishment of the infection. However, NOHA has not inhibited the arginase activity permanently as we saw the effect of IGF-1 on its activation. In addition, this procedure using promastigotes pre-incubated with NOHA showed clearly the effect of parasite arginase without the generation of NO as most of NOHA was probably washed out before the infection of macrophages. When NOHA was used to pre-incubate promastigotes and also maintained in the culture system, the parasite burden was even more decreased suggesting participation also of the arginase/NO generation within macrophage in this interaction, an aspect to future studies.

Arginase I induction in macrophage is attributed to Th2 cytokines IL-4 and IL-10 [15] therefore in the context of adaptive immune response. Arginase I gene expression was also shown during an inflammatory process in the context of innate immunity but still under

IL-4 stimulus [33]. In the present study, some other contaminant cells may be present in the culture but we consider unlikely the presence of cells in an amount sufficient to produce IL-4 to stimulate arginase expression and activity in such a high degree observed. Therefore, our data suggest that IGF-1 is an important factor for arginase I expression and activation during innate response contributing to an alternative macrophage activation. IGF-1 was shown in an alternative macrophage activation in immunopathological process in lung fibrosis but still related to Th2 cytokines [34]. In our system, cytokines and mechanisms that mediate this IGF-1-induced alternative activation mechanism as a part of innate immunity will be further studied.

The substrate of arginase L-arginine is also that of another enzyme NOS2 that oxidize it to L-citulline and NO [35]. Thus, arginase I appears to have an important role in the downregulation of NO synthesis in murine macrophages by decreasing the availability of L-arginine [35] reciprocally regulating NOS2 activity. This aspect was addressed evaluating the NO production in the experiments of cultures with promastigote-infected macrophages upon IGF-1 stimulation. NO production was increased in promastigote-infected macrophage than in non-infected macrophages. This finding argues against the fact that either reciprocal effect or the arginase activation decreased in this situation is still too low to provoke such an effect. However, when IGF-1 was present we observed diminished levels of nitric oxide in every situation of its use. It may be due to the strong activation of arginase, although a direct effect of IGF-1 on this pathway cannot be discarded. Diminished production of NO with IGF-1 use is a possible additive fact that contribute to the parasite growth in IGF-1-stimulated macrophages. No effect of IGF-1 on hydrogen peroxide production was known [36] and in the present study a specificity of the effect on L-arginine metabolism is shown. When the expression of NOS2 was analyzed, it was present in *Leishmania*-infected macrophages without IGF-1 stimulus. It, however, disappeared when promastigotes were pre-incubated with IGF-1 or when IGF-1 was maintained in the culture medium throughout the experimental period. By contrast, NOS2 expression was detected when macrophages were pre-incubated with IGF-1 suggesting that on NOS2 expression might be a consequence of arginase activity related to parasite presence and under IGF-1 stimulation. The effect on NOS2 may derive from either pre- or post-transcriptional interfering on the enzyme synthesis [37] or degradation of formed enzyme by TGF- β , for instance [38].

Our data strongly suggest that IGF-1 induces preferential expression and activation of *Leishmania* promastigote arginase even though activation of macrophage arginase may not be completely discarded. The activation of arginase favour parasite growth within macrophages

supplying with polyamines. Further, arginine was shown to modulate the extracellular concentration of L-arginine [39], and recently the use of L-arginine directly by amastigotes of *L. (L.) amazonensis* was also shown [40]. These findings that may intensify the depletion of L-arginine leading to the inactivation of NOS2 pathway during *Leishmania*-macrophage interaction should also be addressed in future studies. IGF-I-induced arginase activity further contributes to an alternative activation of macrophages and interferes with NOS2 pathway in infected macrophages probably as a reciprocal effect.

Acknowledgment

Supported by FAPESP (01/13009-9 and 01/08799-0), CNPq (fellowships 304064/2005-0 to HG and EM and grant 484499/2006-8, FINEP (01040258/00 and LIM/38 (HG-FMLSP). We acknowledge Lucile Florino-Winter for constructive suggestions and Magnus Gidlund for the critical review of the manuscript.

References

1. Desjardis P. *Leishmaniasis: current situation and new perspectives*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004;27:305-18.
2. Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Med* 2002;72:132-41.
3. Baricinski MA, Schachner D, Quiroz LG et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor increases the infectivity of *Leishmania amazonensis* by protecting promastigotes from host-induced death. *Infect Immun* 1992;60:5523-7.
4. Sosa CL, Roe L, Curic J et al. Mice unresponsive to GM-CSF are unresponsive to infection with numerous *Leishmania major* isolates. *Microb Infect* 2000;2:113-8.
5. Baral-Nieto M, Baral A, Brownel CE et al. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Immun* 1992;2375-85.
6. Jones JL, Greenhouse EB. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1993;16:3-34.
7. Nagata T, Tzipori BC, Coyne BG. Regulation of insulin-like growth factor I gene expression in the human macrophage-like cell line U937. *J Clin Invest* 1990;85:448-55.
8. Gomes CM, Goto H, Corbett CE, Gidlund M. Insulin-like growth factor-1 is a growth promoting factor for *Leishmania promastigotes*. *Arch Trop* 1997;64:225-8.
9. Gomes CM, Morrison HF, Gidlund M, Corbett CE, Goto H. Insulin-like growth factor-2 induces phosphorylation in *Leishmania (Leishmania) mexicana* promastigotes and amastigotes. *J Eukaryot Microbiol* 1998;45:352-5.
10. Goto H, Gomes CM, Corbett CE, Morrison HF, Gidlund M. Insulin-like growth factor I is a growth promoting factor for *Leishmania promastigotes* and amastigotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:15211-6.
11. Gomes CM, Goto H, Ribeiro da Silva VL, Lauretti MD, Gidlund M, Corbett CE. Insulin-like growth factor I affects parasite growth and host cell migration in experimental murine leishmaniasis. *Am J Exp Med* 2000;81:249-55.
12. Green SJ, Milose M, Higgs JB Jr, Noy CA. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol* 1990;144:278-85.
13. Liew FY, Milose S, Faldutson C, Palmer RM, Monack S. Macrophage killing of *Leishmania parasite in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol* 1990;144:4798-7.
14. Roberts SC, Tancik MJ, Polinsky MS, Gibson EM, Hobb Q, Elman B. Arginine plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants. *J Biol Chem* 2004;279:23668-78.
15. Isenra V, Gomes-Nieto LC, Milano I et al. Arginine L induction in macrophages, triggered by Th2 type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania parasites*. *Parasit Immunol* 2002;24:113-8.
16. Knapf F, Bannas JM, Eberhardt S et al. Arginine and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in mice. *Mol Med J* 2005;19:1000-2.
17. Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. Inactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 2000;12:64-70.
18. Diefenbach A, Schindler H, Diefenbach N et al. Type 1 interferon (IFN α /IFN β) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity* 1998;8:77-87.
19. Cabelacan SD, Yu H, Girdy WB, Kim BM, Yoo P, Iyer RK. Arginase 1 and 2: do their functions overlap? *Mol Gene Metab* 2004;81 (Suppl. 1):S38-44.
20. Morris SM Jr, Kephart-Kohane D, Chen LC. Differential regulation of arginase and inducible nitric oxide synthase in murine macrophage cells. *Am J Physiol* 1998;275:R740-7.
21. Canavese BB, Coelho JA, Moraes G, Tiquetolo EN. Trypanosoma spp., *Leishmania* spp. and *Leptomonas* spp.: synthesis of ornithine-arginine metabolism. *Exp Parasitol* 1978;46:141-4.
22. Isenra V, Gomes-Nieto LC, Corralia L. The inhibition of arginase by N-methyl-D-glucosyl-L-arginine controls the growth of *Leishmania inside macrophages*. *J Exp Med* 2001;193:773-84.
23. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
24. Corralia LM, Campo ML, Soto G, Mordohai M. Determination of arginase activity in macrophages: a microassay. *J Immunol Methods* 1994;174:231-5.
25. Green LC, Wagoner DA, Glagovska J, Skipper PL, Winkless JB, Tannenbaum SB. Analysis of oxime, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982;126:151-8.
26. Pick E, Kahan Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980;38:161-70.
27. Wiersma P, Cohen AF, Chakravarti S, Meyer D, Mordohai MD. Arginase in parasitic diseases. *Trends Parasitol* 2003;19:9-12.
28. Greenhouse-Argente J. Insulin-like growth factor-1 - an important immunoregulatory growth factor. *N Engl J Med* 1996;335:1388-91.
29. Kato G, Take M, Gidlund M. Insulin like growth factor-1 and -2 and their role in the re-epithelialization of wounds: interactions with insulin like growth factor binding proteins rgs 1. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1994;28:107-12.
30. Isenra V, Cavotto J, Milano I et al. Arginine L induction during *Leishmania major* infection modulates the development of disease. *Infect Immun* 2005;73:6885-90.
31. Rosinger J, Cooper TG. Molecular events associated with induction of arginase in *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol* 1977;13:1163-75.
32. Smith DJ, Kwon NS, Nathan CF, Griffith OW, Feldman PL, Whisman J. N-methyl-D-glucosyl-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem* 1991;266:6259-63.
33. Munder M, Eichmann K, Mollath M. Alternative metabolic routes in murine macrophages referred by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4 $^{+}$ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol* 1998;160:5547-54.

34. Moss AJ, Torres-Gonzales R, Rook M *et al*. Activation of alveolar macrophages via the alternative pathway in hepatitis-induced lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;35:466–73.
35. Gebert AB, Dandekar S, Lepoint M *et al*. L-Arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental leishmaniasis. *PLoS One* 2000;5:14655–7.
36. Wainwright-Davies J, Lewis DB, Cole PJ. Growth hormone is a human macrophage activating factor. Priming of human monocytes for enhanced release of H_2O_2 . *J Immunol* 1995;154:1909–18.
37. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2001;2:907–16.
38. Vlodavets Y, Bogdan C, Pak J, Xu QW, Nathan C. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. *J Exp Med* 1995;178:605–15.
39. Wu G, Morris SM Jr. Arginine metabolism, nitric oxide and beyond. *Nature J* 1998;356:27:161–17.
40. Watson M, Marlow CL, Ellis LG, Seong L. L-Arginine and carboxylic amino acid transporter-2B regulate growth and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes in macrophages. *PLoS One* 2007;7:e2002–10.

8.2 Aprovação da comissão de ética:

RECEBIDO SPG. 610,05

ASS: [assinatura]

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 29.09.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **801/05**, intitulado: "Participação do fator de crescimento insulina-símile (IGF-I) na imunidades específicas a infecção por Leishmania (L.) major" apresentado pela **ÁREA DE FISIOPATOLOGIA EXPERIMENTAL**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Profa. Dra. Hiro Goto**

Pesquisador (a) Executante: **Sr. Fabrício Petitto de Assis**

CAPPesq, 29 de Setembro de 2005.

Encaminhe-se à CPG-FMUSP
para as devidas providências.
S.P., 06/10/05

[assinatura]
PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

[assinatura]
Profa. Dra. Elia Garcia Caldini
Vice Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Fisiopatologia Experimental

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Ófício do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo