UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

LABORATÓRIO DE SOROEPIDEMIOLOGIA E IMUNOBIOLOGIA

FERNANDA NARANGEIRA DE ARAÚJO

INTERAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO INSULINA SÍMILE-I E CITOCINAS Th1 E Th2 NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGO MURINO POR *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

SÃO PAULO

2019

Universidade de São Paulo

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia

Fernanda Narangeira de Araújo

Interação do fator de crescimento insulina símile-I e citocinas Th1 e Th2 na infecção de macrófago murino por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Profª Drª Hiro Goto

São Paulo

2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo – Bibliotecário Carlos José Quinteiro, CRB-8 5538

© Reprodução autorizada pelo autor

Araújo, Fernanda Narangeira de

Interação do fator de crescimento insulina símile-I e citocinas Th1 e Th2 na infecção de macrófago murino por Leishmania (Leishmania) amazonensis / Fernanda Narangeira de Araújo. – São Paulo, 2019.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Hiro Goto

Descritores: 1. LEISHMANIA. 2. CITOCINAS. 3. FATOR DE CRESCIMENTO INSULIN-LIKE I.

USP/IMTSP/BIB-20/2019.

Dedico esse trabalho aos meus pais, avós e minha irmã que me apoiaram em todos os momentos, além de me darem todo carinho, amor e compreensão nos dias difíceis desse ciclo.

AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa de minha vida se finda, e o sentimento mais expresso no momento é a gratidão. Sem as pessoas ao meu redor seria impossível a conclusão desse trabalho, deixo aqui, portanto, meus sinceros agradecimentos.

Primeiramente, gostaria de agradecer à Deus, por ter iluminado meu caminho, me dando forças sempre que necessário, me mantendo firme mesmo em meio as tribulações.

Agradeço a Profª Drª Hiro Goto, por tornar todo esse trabalho possível e a Drª Luiza Campos Reis, por toda paciência e dedicação a mim. Agradeço a oportunidade que me deram de fazer parte do grupo, por todo ensinamento de técnicas e da teoria.

Aos meus professores, todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para minha formação desde o primário até aqui, que são a base de quem sou hoje. Agradeço por mostrarem que esse caminho não seria fácil, mas que no final, valeria à pena.

Aos colegas do laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia que se propuseram a me ajudar em todos os conhecimentos práticos e teóricos.

Aos professores e funcionários do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia pela ajuda sempre que precisei.

Aos funcionários do Instituto de Medicina Tropical que sempre fazem suas funções de forma coerente, nos auxiliando em todos os momentos necessários.

Ao programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais e Saúde Internacional e ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro com a bolsa de mestrado (processo 2017/02959-4).

À CAPES, FINEP, CNPq e LIM-38 por todo o apoio financeiro.

Aos meus familiares, de modo especial, meus pais Rogério e Márcia, minha irmã Amanda e meus avós Uzzias e Neusa, que acompanharam de perto, todos os dias, cada passo que foi dado durante essa jornada, sempre me incentivando e me apoiando. À minha avó Maria que mesmo longe não mede esforços para demonstrar que se orgulha de mim. E àqueles que já não estão mais presentes fisicamente, mas sempre me fizeram acreditar em minha capacidade.

Ao meu companheiro e acima de tudo amigo, Luciano, presente em todos os momentos, paciente e com um apoio que não consigo mensurar. Obrigada por toda paciência e gentiliza comigo, pelo carinho e por todo amor.

Aos meus amigos de dentro e de fora do laboratório, que de todas as formas me incentivaram e incentivam a continuar, me apoiando nos momentos difíceis e não medindo esforços para acompanharem minha trajetória.

Meu muito obrigada a todos que contribuíram para o desenvolvimento e finalização desse trabalho.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito. ”

Chico Xavier

RESUMO

Araújo FN. Interação do fator de crescimento insulina símile-I e citocinas Th1 e Th2 na infecção de macrófago murino por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2019.

Citocinas definidoras do perfil Th1 e Th2 influenciam a evolução da infecção nas leishmanioses e também a expressão do fator de crescimento insulina-símile I (IGF-I) em macrófagos. Nosso grupo mostrou anteriormente que IGF-I constitui um fator efetor da citocina IL-4 durante a infecção por *Leishmania major*. No entanto, como a resposta pode ser diferente dependendo da espécie de *Leishmania*, propomos analisar os efeitos das citocinas IL-4, IL-13 e IFN-γ na expressão de IGF-I e seu receptor e sua correlação com o parasitismo na infecção de células RAW com *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. A linhagem macrofágica RAW 264.7 ($5x10^5$ células) foi infectada com promastigotas de *L.* (*L.*) *amazonensis* e tratadas com IL-4, IL-13 e IFN-γ por 24, 48 e 72 horas. Avaliamos a expressão de mRNA de *Igf-I* e seu receptor por RealTime PCR quantificação relativa, e também o parasitismo, a produção de óxido nítrico e a atividade da arginase. Em relação as citocinas do perfil Th2, IL-4 e IL-13, foi observado um aumento do parasitismo associado a um aumento da expressão do IGF-I e um aumento da atividade da arginase. Após estímulo com a citocina IFN-γ, observamos o aumento do parasitismo, com aumento da produção de óxido nítrico e uma diminuição da expressão de IGF-I. Na avaliação do receptor de IGF-I, observamos uma diminuição na expressão do mRNA de *Igf-IR* em todos os grupos avaliados. O silenciamento do IGF-I por RNA de interferência (siRNA) resultou na diminuição da expressão do mRNA em 90%. Observamos uma diminuição significativa do parasitismo nos grupos com siRNA quando comparado com o controle sem siRNA. Na avaliação das citocinas após silenciamento do IGF-I, todos os grupos tratados com siRNA e estimulados com citocinas apresentaram diminuição do parasitismo em relação aos seus controles sem siRNA. Na infecção por *L. amazonensis*, a citocina do perfil Th1, IFN-γ, apresenta um efeito diferente no parasitismo quando comparado com a infecção por *L. major*. Nossos resultados sugerem que o IGF-I tem efeito direto no parasitismo e que mesmo com os estímulos das citocinas, a presença do IGF-I é necessária para promover a suscetibilidade da infecção.

Descritores: *Leishmania*. Citocinas. Fator de crescimento Insulin-Like I.

ABSTRACT

Araújo, FN. Interaction of insulin-like growth factor I and Th1 and Th2 cytokines in murine macrophage infection by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2019.

Th1 and Th2 profile-defining cytokines influence the evolution of leishmaniasis infection and also the expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) in macrophages. Our group has previously shown that IGF-I is an effector factor of cytokine IL-4 during *Leishmania major* infection. However, as the response may differ depending on the species of *Leishmania*, we propose to analyze the effects of cytokines IL-4, IL-13 and IFN-γ on the expression of IGF-I and its receptor and its correlation with parasitism in the infection of RAW cells with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. The macrophage lineage RAW 264.7 ($5x10^5$ cells) was infected with *L. (L.) amazonensis* promastigotes and treated with IL-4, IL-13 and IFN-γ for 24, 48 and 72 hours. We evaluated the expression of *Igf-I* mRNA and its receptor by RealTime PCR relative quantification, parasitism, nitric oxide production and arginase activity. Regarding Th2 cytokines, IL-4 and IL-13, an increase in parasitism associated with increased IGF-I expression and increased arginase activity was observed. After stimulation with cytokine IFN-γ, observe a increase parasitism, increase nitric oxide production and decrease IGF-I expression. In the IGF-I receptor evaluation, we observed a decrease in *Igf-IR* mRNA expression in all discount groups. IGF-I silencing by interfering RNA (siRNA) resulted in decreased mRNA expression (> 90%). Regarding the parasitism of these cells, we observed a significant decrease in parasitism in the siRNA groups when compared to the control without siRNA at 24 and 48 hours. In assessing the participation of Th1 and Th2 cytokines in parasitism after IGF-I silencing, all siRNA-treated and cytokine-stimulated groups showed decreased parasitism relative to their controls without siRNA. In *L. amazonensis* infection, the Th1 profile cytokine, IFN-γ, has a different effect on parasitism when compared to *L. major* infection. Our results suggest that IGF-I has a direct effect on parasitism and that even with cytokine stimuli, the presence of IGF-I is necessary to promote susceptibility of infection.

Descriptors: *Leishmania.* Cytokines. Insulin-like Growth factor I.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de transmissão da *Leishmania*.....14

Figura 2 - Casos de leishmaniose tegumentar por município, Brasil.....15

Figura 3 - Resposta imune a infecção por *Leishmania*.....19

Figura 4 - Funcionamento do RNA de Interferência (RNAi).....24

Figura 5 - Porcentagem de infecção de linhagem macrofágica RAW 264.7 infectada com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*.....35

Figura 6 - Parasitismo de linhagem macrofágica RAW 264.7 infectada com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*.....36

Figura 7 - Parasitismo de linhagem macrofágica RAW 264.7 infectada com promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* sob estímulo de IFN-γ, IL-4 e IL-13.....37

Figura 8 - Porcentagem de infecção da linhagem macrofágica RAW 264.7 infectada com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* sob estímulo de IFN-γ, IL-4 e IL-13.....38

Figura 9 - Produção de óxido nítrico da linhagem macrofágica RAW 264.7 infectada com promastigota de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* sob estímulo de IFN-γ, IL-4 e IL-13.....39

Figura 10 - Expressão relativa de mRNA de *Igf-I* sob estímulo de IFN-γ, IL-4 e IL-13 em 24 horas.....40

Figura 11 - Expressão relativa de mRNA de *Igf-I* sob estímulo de IFN-γ, IL-4 e IL-13 em 48 horas.....41

Figura 12 - Expressão relativa de mRNA de *Igf-I* sob estímulo de IFN-γ, IL-4 e IL-13 em 72 horas.....42

Figura 13 - Expressão de mRNA do receptor de *Igf-I* (*Igf-iR*) sob estímulo de IFN-γ, IL-4 e IL-13.....43

Figura 14 - Efeito das citocinas sobre a atividade da arginase em células de linhagem RAW 264.7 infectadas ou não com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* sob estímulo de IFN-γ, IL-4 e IL-13.....45

Figura 15 - Porcentagem de inibição da expressão de mRNA de *Igf-I* na presença de RNA de interferência (siRNA).....47

Figura 16 - Parasitismo de células RAW 264.7 infectadas com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e tratadas com RNA de interferência (siRNA).....48

Figura 17 - Parasitismo de células RAW 264.7 infectadas com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e tratadas com RNA de interferência (siRNA).....48

Figura 18 - Produção de óxido nítrico da linhagem macrofágica RAW 264.7 infectadas ou não com promastigota de *Leishmania (L.) amazonensis*.....49

Figura 19 - Parasitismo de células RAW 264.7 infectadas com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e tratadas com RNA de interferência (siRNA) sob estímulo de IFN-γ, IL-4 e IL-13 em 24 horas 51

Figura 20 - Parasitismo de células RAW 264.7 infectadas com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e tratadas com RNA de interferência (siRNA sob estímulo de IFN-γ, IL-4 e IL-13 em 48 horas.....52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13
1.1 Leishmaniose: aspectos gerais 13
1.2 Leishmaniose Tegumentar americana 15
1.3 Resposta imune 16
1.4 Fator de Crescimento Insulina Símile-I 21
1.5 RNA de interferência 23
2 JUSTIFICATIVA 26
3 OBJETIVOS 27
3.1 Objetivo Geral 27
3.2 Objetivos específicos 27
4 MATERIAL E MÉTODOS 28
4.1 Animais 28
4.2 Obtenção de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* 28
4.3 Macrófagos de linhagem macrofágica RAW 264.7 28
4.4 Infecção de macrófagos de linhagem macrofágica RAW 264.7 por promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* 29
4.5 Dosagem de Óxido nítrico 29
4.6 Detecção e quantificação de RNA mensageiro (mRNA) de *Igf-I* 30
4.6.1 Extração de RNA 30
4.6.2 Obtenção do cDNA (RT-PCR) 30
4.6.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) 30
4.7 Silenciamento da expressão de mRNA de *Igf-I* por siRNA 31
4.7.1 siRNA de IGF-I 31
4.7.2 Transfecção Transiente 31
4.8 Atividade da arginase pela produção de ureia 32
4.9 Forma de análise dos resultados 33
5 RESULTADOS 34
5.1 Padronização da infecção da linhagem macrofágica com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* 34
5.2 Análise dos efeitos de citocinas definidoras do perfil Th1 e Th2 no parasitismo na infecção de macrófagos com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* 36

5.3 Análise dos efeitos de citocinas definidoras do perfil Th1 e Th2 na produção de óxido nítrico na infecção de macrófagos com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* 38

5.4 Análise dos efeitos de citocinas definidoras do perfil Th1 e Th2 na expressão de IGF-I na infecção de macrófagos com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* 40

5.5 Análise dos efeitos de citocinas definidoras do perfil Th1 e Th2 na expressão do receptor de IGF-I na infecção de macrófagos com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* 42

5.6 Análise dos efeitos de citocinas definidoras do perfil Th1 e Th2 na atividade da enzima arginase na infecção de macrófagos com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* 44

5.7 Análise dos efeitos do silenciamento gênico na expressão de IGF-I na infecção de macrófagos com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* 46

5.8 Análise dos efeitos do silenciamento gênico na produção de óxido nítrico na infecção de macrófagos com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* 49

5.9 Análise dos efeitos das citocinas definidoras do perfil Th1 e Th2 no parasitismo de macrófagos com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* após silenciamento gênico do IGF-I por RNA de interferência 50

6 DISCUSSÃO 53

7 CONCLUSÕES 62

REFERÊNCIAS 64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose: aspectos gerais

A leishmaniose é uma doença causada por protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*[1] de transmissão vetorial, e que é classificada na forma visceral e tegumentar. Essa patologia está associada comumente a regiões tropicais e subtropicais, e afeta cerca de 12 milhões de pessoas ao redor do mundo, sendo que aproximadamente 350 milhões de pessoas vivem em áreas consideradas de risco. Sendo endêmica em cerca de 90 países, muito dos quais são considerados países em desenvolvimento, a leishmaniose é considerada um problema de saúde pública e umas das principais infecções parasitárias, perdendo em número de mortes apenas para a malária[2].

A forma clínica da doença depende da espécie de *Leishmania* e dos fatores imunológicos do hospedeiro. A infecção pode ser, portanto, assintomática ou apresentar um espectro de manifestações clínicas que variam desde lesões cutâneas localizadas, disseminadas ou difusas, lesões mucosas e acometimento de órgãos como fígado e baço[3].

O ciclo de vida desses parasitos consiste em dois diferentes estágios de desenvolvimento, as formas amastigotas e promastigotas[1]. As amastigotas são intracelulares obrigatórias nos vertebrados, com flagelo interno, imóveis, ovaladas ou arredondadas, apresentam vacúolos no citoplasma, enquanto as promastigotas são alongadas, móveis, com flagelo livre que imerge da região anterior e são encontradas no tubo digestivo de flebótomos[4,5].

Para que ocorra a infecção no hospedeiro vertebrado os parasitos são inoculados na pele na forma de promastigotas durante o repasto sanguíneo da fêmea do flebótomo do subgênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo[6], e são rapidamente fagocitados pelos macrófagos dando origem as formas amastigotas dentro dessas células. Uma vez dentro da célula hospedeira, esses parasitos se replicam até que o macrófago se rompa, liberando as amastigotas na corrente sanguínea. Uma vez que o flebótomo faz o repasto sanguíneo em um

hospedeiro vertebrado infectado, ingere as formas amastigotas que darão origem a promastigotas no interior do vetor, recomeçando assim o ciclo[7] (Figura 1).

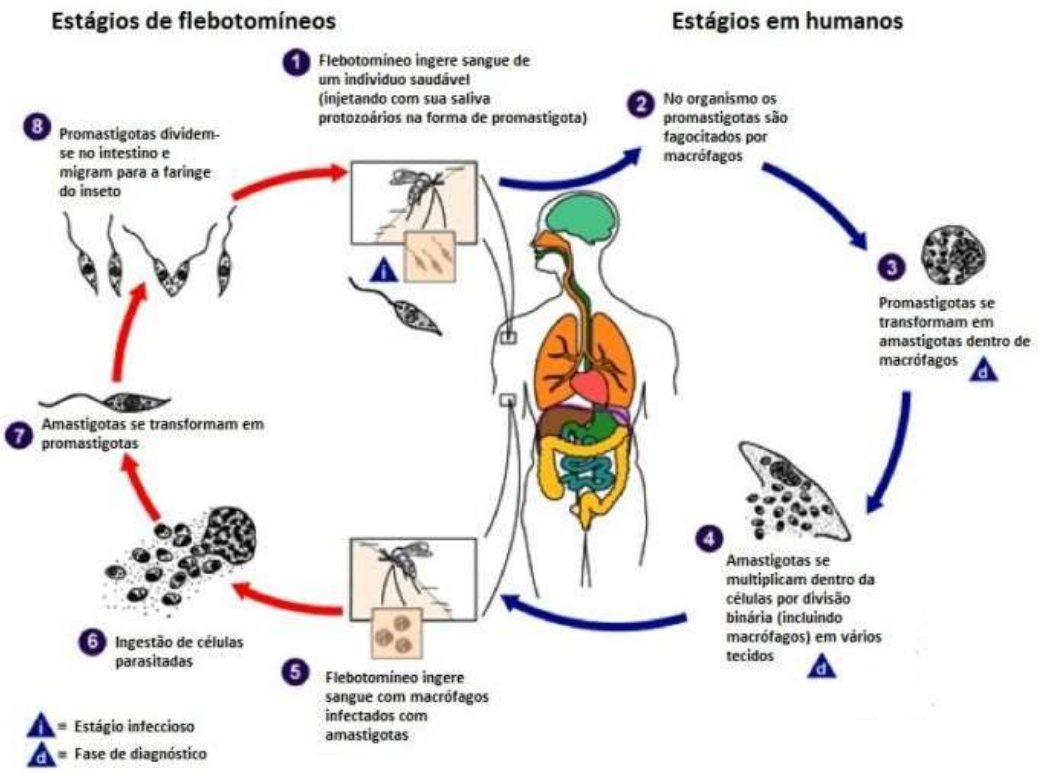

Figura 1- Ciclo de transmissão da *Leishmania*. Adaptado de *Center for Disease Control* [8].

Por apresentar formas clínicas e epidemiológicas distintas entre si, a doença foi dividida de acordo com a ação patogênica e o tipo de lesão que causa. No Brasil, as principais espécies envolvidas nas leishmanioses tegumentares são *Leishmania (Viannia) braziliensis* (cerca de 90% dos casos), *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, nosso objeto de estudo. Já na forma visceral da doença a principal espécie relacionada é a *Leishmania (Leishmania) infantum*[9,10].

1.2 Leishmaniose Tegumentar americana

Nas Américas, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) apresenta registros de casos que vão desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, tendo como exceção apenas o Chile e Uruguai. No Brasil, a LTA distribui-se por todas as unidades federativas (Figura 2). Análise de dados de anos anteriores tem demonstrado uma mudança no perfil de transmissão da doença, provavelmente relacionada a transformações no cenário ambiental dessas áreas de transmissão[11].

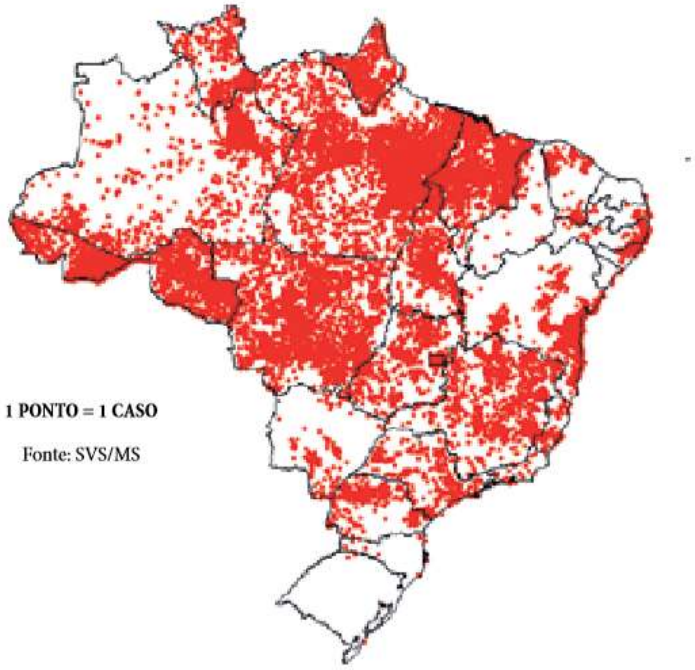

Figura 2 - Casos de leishmaniose tegumentar por município, Brasil – 2015 (Fonte: SVS/MS)[12]

Dada a diversidade de fatores envolvidos nas leishmanioses, a infecção pode se manter assintomática em indivíduos resistentes naturalmente ou resultar em uma alta gama de manifestações clínicas na pele e/ou mucosas conhecidas pela forma cutânea localizada, muco-cutânea e difusa[13].

O ciclo da *L. amazonensis* ocorre em áreas de vegetação primária e secundária da floresta amazônica, incluindo Estados como Pará, Rondônia, Tocantins, Maranhão e Amazônia. Também são descritos casos extra-amazônicos na Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Paraná[14]. Apesar dos relatos em demais regiões do país, a

ocorrência dessa espécie está fortemente relacionada a ecologia da região Amazônica[3]. Os vetores responsáveis pela transmissão são as fêmeas infectadas dos flebótomos *Lutzomyia flaviscutellata* e *Lutzomyia olmeca nociva* (Amazônia e Rondônia)[14].

Responsável normalmente pela manifestação cutânea e ocasionalmente, pela forma difusa, faz parte do complexo *L. mexicana*[15]. Dentro do espectro clínico, a *L. amazonensis* apresenta grande potencial patogênico para o ser humano, uma vez que pode levar a lesões clínicas graves, de longa duração e com lesões bastante destrutivas e de difícil manejo terapêutico[3].

A lesão cutânea localizada se manifesta em forma de lesão ulcerada, indolor e de borda regular elevada, geralmente rica em parasitos, pouco exsudativa e normalmente não sangra, além de apresentar fundo granulomatoso. Não é comum que essa espécie de *Leishmania* dê origem a lesões na mucosa, porém a hipótese não pode ser totalmente descartada[16].

Em raros casos, a *L. amazonensis* causa a forma difusa da doença, na qual as lesões se apresentam espalhadas por todo o corpo do indivíduo, sendo semelhantes a nódulos e sua disseminação pelo corpo é facilitada pela imunossupressão ocasionada pelo protozoário. Normalmente não ulceram e tendem a cronicidade, podendo o paciente conviver com as lesões por toda a vida. Em casos muito raros, com avançado desenvolvimento da doença, pode ocorrer o estiramento da epiderme, levando à ulceração dessas lesões de forma mecânica, diferente da ulceração imunológica encontrada em outras formas da doença. No Brasil, essa espécie de *Leishmania* é a única conhecida com potencial imunopatogênico para determinar essa forma da doença[3].

Sabe-se que o desenvolvimento das lesões é diferente para cada hospedeiro, podendo variar entre lesões crônicas e sem cura clínica até lesões autolimitadas de cura espontânea[2]. Determina-se, portanto, que a infecção é dependente de diversos fatores relacionados tanto ao hospedeiro quanto ao parasito[17].

1.3 Resposta imune

A partir do momento em que as formas promastigotas são inoculadas, o parasito precisa desenvolver mecanismos próprios que o defendam da resposta imune

exercida pelo hospedeiro vertebrado[18]. Dentre esses mecanismos de defesa pode-se citar as barreiras epiteliais da pele, ativação do sistema complemento, espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, células *Natural Killers* (NK) e entre outros fatores[19].

No hospedeiro, o parasito desenvolve um complexo e específico mecanismo para replicação e crescimento[20]. Os principais fatores envolvidos no contato inicial de promastigotas com os macrófagos estão relacionados a proteínas de superfície do parasito, como o lipofosfoglicano, que o protege da lise pelo sistema complemento e possibilita a inibição da fusão entre o fagossomo e o endossomo, de modo que o parasito resista as enzimas lissosomais[21,22]. Além disso, a glicoproteína de 63kDa (gp63), uma metaloprotease presente em todas as espécies de *Leishmania* (principalmente nas promastigotas) e que é responsável por clivar o componente C3b do sistema complemento na forma C3bi, facilita a fixação do parasito na célula hospedeira e a ligação de células NK de modo que essas não se proliferam facilitando, portanto, a infecção[23].

Os neutrófilos são as primeiras células a chegarem ao local da infecção e morrem posteriormente por apoptose. Consequentemente os fragmentos celulares são fagocitados por células dendríticas e pelos próprios macrófagos[24].

Depois do processo de fagocitose esses macrófagos podem sofrer alterações no seu metabolismo como mecanismo de defesa, de modo que a infecção pode ser controlada[18], portanto, o modo como essas células são ativadas podem definir a progressão ou não da doença. Além disso essas células apresentam mecanismos que podem destruir esses parasitos por produto do metabolismo da L-arginina, que além de ser um importante aminoácido na síntese de proteínas, também é a precursora da síntese de óxido nítrico (NO)[25].

O óxido nítrico é sintetizado pela ativação da sintase induzível do NO (NOS2), uma isoenzima altamente induzida por endotoxinas e citocinas inflamatórias nos macrófagos que hidrolisa o aminoácido L-arginina para a produção do NO. Por outro lado, L-arginina pode sofrer hidrólise diretamente pela arginase, gerando-se poliaminas, substâncias consideradas nutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento do parasito[26,27] uma vez que, atuam na regulação do crescimento celular e funcionam como substrato para a tripanotiona redutase na síntese da tripanotiona. Os tripanosomatídeos utilizam a via tripanotiona/tripanotiona redutase

para realizar o balanço redox de fundamental importância, em que há uma interação entre cátions e DNA, levando a estabilização do material genético e consequente replicação do parasito[28].

Acredita-se que essas duas vias não são ativadas juntas, de modo que haja um provável sistema de competição entre ambas. Uma vez que o substrato é desviado para via da arginase, ocorre uma consequente diminuição de arginina disponível para a produção de NO. O mesmo acontece com a via do NO por NOS2, que diminui consideravelmente a produção de poliaminas nessas células[29,30].

Após a transmissão da *Leishmania*, fatores do sistema imune inato e adaptativo do hospedeiro estão envolvidos no controle ou progressão da infecção (Figura 3). Muitos dos estudos nesta área são voltados para a resposta adaptativa do hospedeiro.

A importância da resposta imune celular desempenhada por células T no controle da infecção vem sendo demonstrada em diversos estudos experimentais em camundongos de diferentes linhagens e com diferentes espécies do parasito[31].

Um dos principais modelos experimentais estudados atualmente na resistência e suscetibilidade a infecção são com camundongos BALB/c infectados com promastigota de *L. major*. A predisposição genética para um perfil suscetível ou de resistência é muito bem definido nesse modelo. Foram identificadas, neste sistema, subpopulações de células T CD4+, de acordo com citocinas que produzem, sendo denominada de subpopulação Th1 a que produz IFN-γ e de Th2 a que produz IL-4[32].

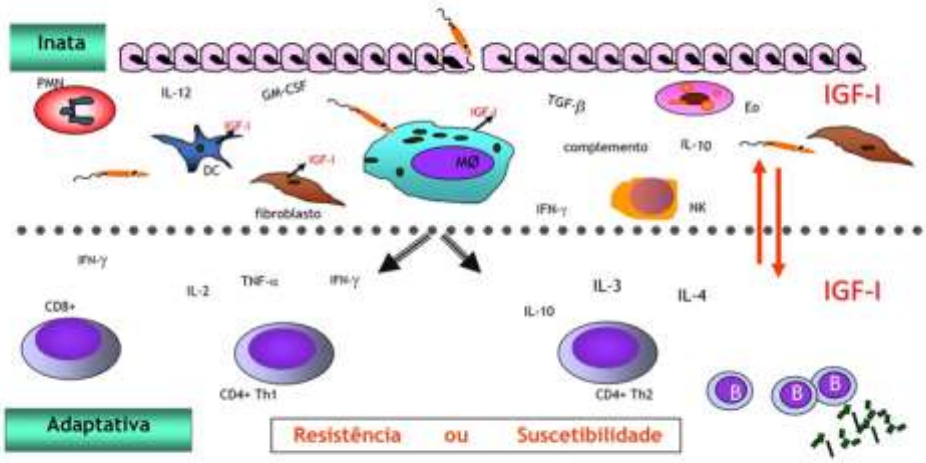

Figura 3 - Resposta imune a infecção por *Leishmania*.

Observou-se que os camundongos C57BL/6 que ativavam preferencialmente a subpopulação Th1 eram resistentes a infecção por *L. major* enquanto os BALB/c que ativavam preferencialmente a subpopulação Th2 eram suscetíveis a infecção. Entretanto, para outros modelos experimentais de leishmaniose tegumentar, com outras espécies de *Leishmania*, essa dicotomia não é observada, demonstrando diferenças importantes entre o comportamento biológico do parasito e do comportamento das células além de ações diferenciadas das diversas citocinas[33].

Uma das principais diferenças encontrada entre *L. amazonensis* e *L. major* está no desenvolvimento de lesões em camundongos C57BL/6 infectados com baixa e alta dose de parasitos. Nesses animais a infecção por *L. major* resulta em lesões auto-limitadas que tendem para cura espontânea. Já na infecção por *L. amazonensis*, as lesões são progressivas e crônicas[34]. O parasito *L. amazonensis* desencadeia uma infecção crônica, sem cura espontânea, em linhagens de camundongos resistentes a outras espécies de *Leishmania*[35].

Quando ocorre a predominância das células do tipo Th1 durante a infecção, citocinas como IL-2, IFN-γ, TNF-α e IL-12 serão produzidas, ativando os macrófagos a produzirem H_2O_2 e NO e, consequentemente, levando a destruição dos parasitos. Mas, se predominarem as células do tipo Th2, serão produzidas principalmente IL-4 e

IL-13, que ativam os macrófagos de forma alternativa e os parasitos não só não são eliminados, mas continuam se proliferando[36].

Um dos mecanismos de escape utilizados pelo parasito é o direcionamento da resposta imune do hospedeiro para um perfil Th2[36]. No entanto, alguns estudos apontam mudanças na simplicidade desse modelo, sugerindo que a regulação da resistência adquirida é bem mais complexa, envolvendo não só a produção de citocinas como também de outros fatores incluindo, elementos da resposta imune inata[31,37]. Essa ideia foi bem justificada em um ensaio utilizando camundongos quiméricos, na qual camundongos com background genético para o perfil resistente C57BL/6, receberam células de camundongos suscetíveis BALB/c e se mantiveram resistentes a infecção[38].

Quando camundongos BALB/c que são suscetíveis e camundongos C57BL/6 que são resistentes, são infectados por espécies diferentes de *Leishmania*, as diferenças entre o desenvolvimento das lesões também são nítidas, uma vez que, ambas as linhagens são resistentes a *L. braziliensis* e susceptíveis a *L. amazonensis.* Acredita-se, portanto, que o desenvolvimento das lesões nos camundongos quando infectados por *L. amazonensis* não seja exclusivamente dependente da resposta imune do tipo Th2, mas também da presença de células T $CD4^+$ produtoras de IFN-γ[33].

Sabe-se que a *L. amazonensis* apresenta peculiaridades quando comparadas a outras espécies do gênero. Alguns estudos vêm apontando que IFN-γ tende ao efeito contrário, do observado com *L. major*, na infecção por amastigotas com implicação na patogênese das lesões. Acredita-se que IFN-γ propicia o desenvolvimento do parasito[33,39], já que provoca um aumento do crescimento de amastigotas de *L. amazonensis in vivo*[39].

Além disso, foi demonstrado que esse aumento no número de amastigotas em macrófagos infectados e estimulados com IFN-γ está relacionado com um aumento do transportador da L-arginina (CAT-2B) na membrana da célula, ocasionando um aumento no influxo da L-arginina, substrato para a produção de NO ou poliaminas, para dentro da célula[39].

Sabe-se que alguns fatores de crescimento têm efeito nessa interação como elementos inatos ou como coadjuvante da resposta adaptativa, o que favorece a proliferação do parasito. Um desses fatores que vem sendo bem estudado pelo grupo

da professora Hiro Goto, é o fator de crescimento insulina símile I (IGF-I) que aparentemente modula o crescimento de diferentes espécies de *Leishmania.*

1.4 Fator de Crescimento Insulina Símile-I

É descrito na literatura que alguns fatores de crescimento participam dos eventos iniciais e são cruciais no estabelecimento da infecção. Como exemplo dessa situação pode-se citar o fator estimulador de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e TGF-β. Sabe-se que o GM-CSF atua como protetor das promastigotas, uma vez que as protege do choque térmico[40] enquanto TGF-β impede a ativação dos macrófagos, de modo que a produção de óxido nítrico (principal agente leishmanicida dessas células) seja diminuída, levando consequentemente ao aumento da carga parasitária[41].

Tendo em vista, portanto, que fatores de crescimento apresentam papeis importantes para o desenvolvimento da doença, iniciaram-se estudos no grupo da Professora Hiro Goto sobre os efeitos do Fator de Crescimento Insulina Símile-I (IGF-I) sob as leishmanioses e diretamente sob o parasito, já que esse vem chamando atenção por suas diferentes ações e sua capacidade pleiotrópica.

O IGF-I é um membro da família dos hormônios da insulina, são polipeptídios filogeneticamente bem conservados, com massa molecular de aproximadamente 7,5 kDa[42] podendo apresentar-se nas formas IGF-I e IGF-II com similaridade de 60% na sequência de aminoácidos. Estudos desenvolvidos no grupo demonstram o efeito de IGF-I sobre o aumento do parasitismo em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis,* e apesar da grande similaridade entre as duas formas, IGF-II não apresentou o mesmo efeito. Acredita-se que apenas a isoforma I apresenta papel sobre as leishmanioses, um dado de suma importância nas parasitoses já que até então se conhecia apenas o efeito de IGF-II sobre *Giardia lamblia*[43].

Os IGFs são produzidos por diversos tipos celulares, incluindo os macrófagos e são encontrados também na circulação. Sendo produzido principalmente no fígado, as funções do IGF-I incluem diferenciação e proliferação celular, regeneração e cicatrização tecidual, além de ativar resposta imune e inflamação, podendo regular também o mecanismo de apoptose[44,45].

No soro e nos tecidos, grande parte do IGF-I encontra-se ligado a um complexo de proteínas ligantes (IGFBPs) de alta afinidade[42]. IGF-I liga-se a seis IGFBPs e esse complexo é considerado o estoque circulante desse hormônio. Para que IGF-I exerça então suas funções ele necessita obrigatoriamente se ligar a um receptor específico denominado IGF-IR[46].

O receptor de IGF-I medeia grande parte das ações biológicas de IGF-I, estando presente em uma ampla variedade de tecidos e linhagens celulares. IGF-IR foi identificado em células *NK*, linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$), além de células B, neutrófilos e os monócitos. IGF-I apresenta diferenças quanto a ação no crescimento dependendo do tipo celular em que se encontra[47].

Foi demonstrado *in vitro* que IGF-I extrínseco em concentrações fisiológicas, induz um aumento na proliferação de promastigotas e amastigotas axênicas de *L. (V.) panamensis* e *L. (L.) mexicana*[43,48]. Estudos *in vivo* com camundongos BALB/c demonstraram que a pré-incubação do parasito com IGF-I promove um aumento significativo do tamanho da lesão e no número de parasitos viáveis de *L. amazonensis* no sítio da lesão. Esses resultados sugerem que IGF-I tenha uma importante participação na resposta imune inata da infecção, favorecendo o crescimento do parasito no interior dos macrófagos[49].

Esses resultados direcionaram para o estudo do efeito de IGF-I extrínseco na interação *L. amazonensis* – macrófago *in vitro.* Foi demonstrado que a produção de H_2O_2 não é afetada na presença de IGF-I, mas por outro lado, a produção de NO era diminuída. Neste estudo, o efeito do IGF-I sobre o aumento do parasitismo de macrófagos foi atribuído ao seu efeito no metabolismo de L-arginina, promovendo principalmente o aumento da expressão e ativação da arginase do parasito e do macrófago infectado levando a produção de poliaminas, que favorecem o seu crescimento[50].

Neste ínterim, foram identificados dados na literatura que demonstravam o IGF-I participando da resposta imune específica, já que as citocinas Th1 e Th2 possuem diferentes efeitos na produção do IGF-I nos macrófagos. Sabe-se que citocinas Th2 como IL-4 e IL-13 são fatores estimulatórios para produção de IGF-I no macrófago[51] enquanto IFN-γ inibe essa produção[52]. A mais, dados na literatura indicam concentrações aumentadas de IGF-I em soro e tecidos de camundongos

suscetíveis à leishmaniose, como C3H e diminuídas nas linhagens resistentes como o C57BL/6[53]. Desse modo seria possível explanar as diferenças de resistência ou suscetibilidade que não podem ser explicadas com base apenas no perfil de citocinas que são produzidas.

Ao realizar a infecção de células RAW 264.7 *com L. major* observou-se que o parasitismo aumentava na presença do IGF-I. Para a comprovação da importância desse fator na infecção decidiu-se silenciar o IGF-I da célula. Ao silenciar o IGF-I do macrófago pelo silenciamento pós-transcricional utilizando a técnica de RNA de interferência (siRNA), ocorreu uma diminuição significante do parasitismo no grupo tratado com siRNA quando comparado ao grupo controle sem siRNA. Também foi observado que nos grupos tratados com siRNA e estimulados com as citocinas do tipo Th2 (IL-4, IL-13 e ambas simultaneamente), o grau do parasitismo não aumentou como esperado em resposta a essas citocinas. No entanto, o parasitismo aumentou em resposta a citocinas Th2 mediante a reposição utilizando IGF-I recombinante (rIGF-I). Esses resultados sugeriram que a presença do IGF-I é necessária para promover a proliferação de *L. major*[54].

Os dados reforçam que cada espécie de *Leishmania* apresenta uma característica diferenciada em relação ao seu hospedeiro, sugerindo que o papel do IGF-I na interação com a resposta imune e as citocinas envolvidas durante essa resposta também podem ser influenciadas de forma diferente por outras espécies de *Leishmania*. Dessa maneira propomos neste trabalho analisar o efeito do IGF-I intrínseco e sua interação com citocinas Th1 e Th2 durante a infecção de macrófago murino por *Leishmania amazonensis*, silenciando temporariamente o gene de IGF-I por meio da técnica de RNA de interferência.

1.5 RNA de interferência

Embora incompreendido no momento da descoberta,o sistema de RNA de interferência foi primeiramente observado em plantas: pesquisadores tentavam fazer petúnias transgênicas de modo que essas flores expressassem um fenótipo de coloração violeta, aumentando assim o valor comercial das plantas. Para isso foi inserido uma cópia extra do gene *chalcone synthase* (enzima responsável pelo pigmento floral) e

contrariamente do esperado, as flores nasciam brancas e o mecanismo foi então, descrito como uma co-supressão. Anos mais tarde, os pesquisadores descreveram que provavelmente o transgene utilizado, gerou intermediários de RNA dupla fita que foram reconhecidos pelo RNA endógeno, sendo, degradados[55,56,57].

Somente em 1998, foi descrito o mecanismo de RNA de interferência (RNAi). O estudo foi realizado com nematóides *Caenorhabditis elegans* em que moléculas de uma dupla fita de RNA foram injetadas silenciando uma proteína homóloga à sequência injetada[58].

Essa técnica é um silenciamento pós-transcricional que ocorre de modo temporário (*knock-down)* e é iniciada através de um RNA de dupla fita (dsRNA). Esse RNA dupla fita é reconhecido e clivado por uma nucleasse conhecida como *Dicer* em fragmentos menores de aproximadamente 21 a 25 nucleotídeos. Esses trechos menores (siRNA) se associam a proteínas celulares formando um complexo proteico denominado *RNA Interference Specificity Complex* (RISC). Uma helicase presente no complexo abre a dupla-fita dos siRNAs, de modo que a fita antisense do duplex guia o complexo RISC até o mRNA alvo e então a endorribonuclease *Slicer*, também presente no complexo, cliva o referido mRNA, degradando-o de forma que a sequência não é mais traduzida[59] (Figura 4).

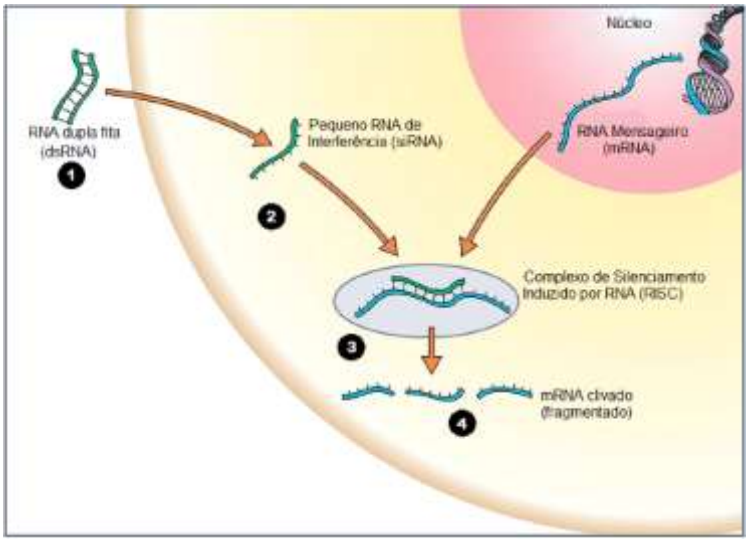

Figura 4 - Funcionamento do RNA de Interferência (RNAi) (Fonte: Adaptado de Faramiglio L[60]).

O sistema de RNAi está presente em diversas espécies como plantas, insetos, nematelmintos e mamíferos, sendo conservado em eucariotos como método de defesa contra agentes invasores como vírus[59]. Entretanto esse sistema de longas fitas de RNA não era utilizado em células de mamíferos, porque longas fitas dsRNA ativam diretamente a via de interferon levando a apoptose da célula pela via de proteína quinase R (PKR)[61,62]. Porém em 2001 foi demonstrado que duplex sintéticos de até 21 nucleotídeos promoviam o silenciamento em mamíferos sem ativar a via PKR, o que tornava a técnica possível nesse tipo celular[63]. Dessa maneira propomos utilizar essa técnica no nosso estudo para avaliar o papel do IGF-I e sua interação com citocinas na infecção por *L. amazonensis*.

2 JUSTIFICATIVA

Sabendo, portanto, que IGF-I participa da resposta imune específica, já que as citocinas Th1 e Th2 possuem diferentes efeitos na produção desse fator nos macrófagos, foi iniciado um estudo no grupo do papel do IGF-I e sua interação com as citocinas Th1 e Th2.

Na infecção com *L. major*, macrófagos estimulados com IFN-γ levaram a uma redução do parasitismo acompanhada de uma redução na expressão de mRNA de IGF-I. Quando as células foram estimuladas com IL-4 e IL-13 ocorreu um aumento tanto do parasitismo quanto da expressão de mRNA de IGF-I. Esses dados comprovaram a importância desse fator de crescimento na infecção por *L. major*. Foi então proposto, estudar o efeito dessas citocinas na infecção sem a presença do IGF-I através da técnica de RNA de interferência (siRNA). Ao silenciar o IGF-I do macrófago, ocorreu uma diminuição significante do parasitismo no grupo tratado com siRNA quando comparado ao grupo controle sem siRNA. E o mesmo ocorreu quando houve o estímulo de citocinas Th1 e Th2. Esses resultados sugeriram que a presença do IGF-I é necessária para promover a proliferação de *L. major*[54].

Sabendo que *Leishmanias* apresentam comportamento diferente na infecção com ativação da resposta imune de forma específica para cada espécie do parasito, propomos nesse trabalho avaliar o papel do IGF-I constitutivo na infecção de macrófagos por *L. amazonensis*, bem como sua participação no efeito de citocinas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar a interação do IGF-I por células de linhagem macrofágica RAW 264.7 infectadas por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e sua interação com citocinas definidoras do perfil Th1 e Th2.

3.2 Objetivos específicos:

a) Avaliar os efeitos de IFN-γ, IL-4 e IL-13, sobre o parasitismo;
b) Avaliar a expressão de IGF-I e seu receptor sob estímulo IFN-γ, IL-4 e IL-13;
c) Avaliar a produção de óxido nítrico com estímulo de IFN-γ, IL-4 e IL-13;
d) Avaliar a atividade da arginase com estímulo de IFN-γ, IL-4 e IL-13;
e) Analisar a influência de IGF-I nos efeitos das citocinas IFN-γ, IL-4 e IL-13 e no parasitismo após silenciamento do IGF-I por RNA de interferência.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Utilizamos camundongos machos BALB/c de 45 a 60 dias de idade para manutenção da cepa de *L. amazonensis*, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP e mantidos no Biotério de Experimentação do Instituto de Medicina Tropical da USP, sob temperatura controlada, alimentados com ração balanceada e água a vontade. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em uso de animais do IMT (Nº de registro: 353/16).

4.2 Obtenção de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Utilizamos a cepa referência de *L. amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269). A obtenção de amastigotas foi feita a partir da lesão da pata de um animal infectado. As formas promastigotas foram obtidas a partir de cultura de amastigotas em meio 199 (Invitrogen, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil) inativado a 56º C por 30 minutos, acrescido de penicilina (100 UI/mL), gentamicina (10 µg/mL), L-glutamina (2 mM), Hepes (10 mM) e Hemina (20 mg/mL), mantidas em estufa a 26ºC. Promastigotas em fase estacionária de crescimento foram utilizadas nos ensaios de infecção de macrófagos.

4.3 Macrófagos de linhagem macrofágica RAW 264.7

Utilizamos células de linhagem macrofágica RAW 264.7 provenientes de camundongos BALB/c obtidas pela ATCC (*American Type Culture Collection*). A linhagem macrofágica RAW 264.7 foi mantida em cultura em meio RPMI 1640, acrescido de penicilina (100 UI/mL), gentamicina (10 µg/mL) e L-glutamina (2 mM) e suplementado com 5% de soro fetal bovino em atmosfera úmida com 5% CO_2 a 37ºC e o meio trocado a cada 3 dias.

4.4 Infecção de macrófagos de linhagem macrofágica RAW 264.7 por promastigotas de *Leishmania*

Os macrófagos RAW 264.7 ($5x10^5$) foram colocados sobre lamínulas redondas estéreis dentro dos poços de placas de cultura de 24 poços (COSTAR) em meio RPMI 1640 (LGC, Brasil) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) inativado pelo calor e incubadas em estufa úmida com CO_2 (5%) a 37ºC por 30 minutos para adesão dos macrófagos nas lamínulas. Após incubação, os poços das placas foram lavados com PBS estéril morno para retirada das células não aderidas. Em seguida, promastigotas foram colocadas na proporção de 8 parasitos por macrófagos (8:1) e o período de infecção foi de 6 horas. Após esse período, os poços das placas foram lavados com PBS estéril morno para retirada dos parasitos não internalizados e foram adicionados 500µL de meio de cultura RPMI 1640 (LGC, Brasil) suplementado com 5% de SFB inativado pelo calor, 100 UI/mL de penicilina e 10 µg/ml de gentamicina. Esses macrófagos infectados foram então tratados com citocinas Th2, IL-4 (2 ng/ml), IL-13 (5 ng/mL) e ambas simultaneamente, e com citocina Th1, IFN-γ (200 U/mL) nos poços correspondentes. Os experimentos foram feitos pelo menos em triplicatas. Para avaliação do parasitismo por microscopia óptica, foram contadas às cegas 300 células por lamínula, atingindo 900 células por condição de experimento, e o resultado expresso pela porcentagem de infecção e pelo número de parasitos por 100 células.

4.5 Dosagem de Óxido nítrico

Concentrações de nitrito foram determinadas por ensaio em microplacas de poliestireno, segundo Green *et al* [64] modificado. O sobrenadante de cultura de macrófagos em diferentes tempos de cultivo foi coletado sendo distribuídos 100 µL em placas de 96 poços, acrescido de igual volume do reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de diamino naftaleno diidroclorado e 2% de ácido fosfórico) e incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. O valor do nitrito foi determinado utilizando uma curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio ($NaNO_2$) em meio RPMI 1640 (LGC, Brasil). Os resultados foram avaliados por

leitura espectrofotométrica a 540 nm em leitora de microplaca Multiskan MCC/340 P versão 2.20 (Labsystems, Finlândia).

4.6 Detecção e quantificação de RNA mensageiro (mRNA) de IGF-I

4.6.1 Extração de RNA

Para obtenção de RNA total, 2 x 10^6 células/mL foram ressuspensas em 1 mL de reagente TRIZOL (Invitrogen, EUA) segundo as recomendações do fabricante. O RNA foi ressuspenso em água livre de RNAse e feita a dosagem por NanoDrop ND-1000 UV-Vis espectrofotômetro (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE), com a integridade das amostras demonstrada pelo "score" 260/280 (1,8-2,0 foram considerados aceitáveis).

4.6.2 Obtenção do cDNA (RT-PCR)

Aproximadamente 1 µg de RNA total obtidos como supra descrito foi misturado com 12 µL de uma solução constituída por: tampão 5x (Fermentas, EUA), dNTP 10mM (Fermentas, EUA), random primers (Invitrogen, EUA), OLigoDT primers (Invitrogen, EUA), RNase inhibitor cloned 10 U/µL (Fermentas, EUA), RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase 200 U/µL (Fermentas, EUA) em água MilliQ tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e autoclavada, incubados por 60 minutos a 37°C e 15 minutos a 75°C. As amostras foram conservadas em freezer a -20°C até o uso.

4.6.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

Foram utilizados iniciadores ("primers") de amplificação para detecção de *Igf-I* construídos a partir do Gene Bank (número de acesso: NM_010512), Forward 5´ TAC TTC AAC AAG CCC ACA GG 3´ e Reward 5´AGT CTT GGG CAT GTC AGT GT 3´ do RNA mensageiro de camundongos para esse fator de crescimento. Para

a detecção do receptor de *Igf-I (Igf-IR*) (número de acesso: NM_010513.2) foram utilizados os primers Forward 5' AGC AGC TGG AAG GGA ACT ACT CCT 3' e Reward 5' GCA AAG TAC ATC TTT CCG GAC CTG 3'. Como gene referência foi utilizado primers específicos para β-actina (número de acesso: NM_00739), Forward 5` GCC TTC CTT CTT GGG TAT GGA ATC 3´ e Reward 5´ ACG GAT GTC AAC GTC ACA CTT CAT 3´. Resumidamente, 1µg de cDNA foi misturado com 12,5 µL do reagente SYBR®Green (2X) (Applied Biosystems, EUA), 1 µL de cada primer a 5 pMol e 9,5 µL de água MilliQ autoclavada.

A quantificação relativa da expressão do RNA mensageiro foi mensurada utilizando a comparação do *Threshold cycle* (C_T) dos genes alvos (*Igf-I* e *Igf-IR*) com o gene constitutivo *β-actina*. Para a análise da expressão normalizamos os resultados, ou seja, descontamos o C_T obtido do gene constitutivo do C_T do gene alvo de cada amostra (ΔC_T). Em seguida, para as comparações dos resultados entre os diferentes grupos, foram calculados em relação ao valor de ΔC_T somente da célula, isto é, sem infecção e sem estímulo ($\Delta\Delta C_T$) e o valor final foi obtido da equação: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [65].

4.7 Silenciamento da expressão de mRNA de IGF-I por siRNA

4.7.1 siRNA de IGF-I

A construção dos *small interfering* RNAs (siRNAs) tomou como base a sequência do IGF-I do *GenBank* (número de acesso: NM_010512), usando o software IDTSciTools RNAiDesign (*Integrated DNA technologies*). As sequências escolhidas foram: *sense* 5´ AAA GGA GAA GGA AAG GAA GUA CAT T 3´ e antisense 5´AAU GUA CUU CCU UUC CUU CUC CUU U 3´.

4.7.2 Transfecção Transiente

O método de transfecção foi feito pela transferência mediada por lipídeos catiônicos, que encapsula o siRNA de interesse em vesículas membranosas

(lipossomos artificiais) seguida da fusão destes complexos com a membrana plasmática da célula hospedeira.

Para realizar a transfecção, 150 pM de siRNA em 50µL de meio DMEN sem soro fetal bovino (SFB) e 3µL de lipofectamine 2000 (Invitrogen) em 50µL de meio DMEN sem SFB foram mantidas a temperatura ambiente por 10 min, homogeneizadas e mantidas por 30 min a temperatura ambiente para a formação dos complexos lipossomo-siRNA. Após incubação, os complexos foram adicionados às placas contendo macrófagos infectados ou não por *L. amazonensis*. Durante 6 horas, as células foram incubadas em DMEM sem SFB para possibilitar a entrada do complexo siRNA-lipossomo na célula hospedeira. Após incubação, os poços das placas foram lavados com PBS estéril morno para retirada do complexo siRNA-lipossomo não internalizado. Após este período, foi adicionado meio DMEM acrescido de 0,5% de BSA e as placas foram incubadas por 24 e 48 horas para avaliação do parasitismo e expressão de mRNA de *Igf-I*.

4.8 Atividade da arginase pela produção de ureia

Os macrófagos foram infectados conforme supradescritos (item 4.4) e após o período de incubação as células foram lisadas com tampão de lise (NaCl 150 Mn, Tris HCL 10 mM, Nonidet® P40substitute 2%, leupeptina 5 µM, 10 µL do coquetel inibidor de proteases Sigma (P8340). A atividade da arginase no lisado foi avaliada pela produção de ureia, segundo Corraliza *et al*[66]. Em 25 µL do lisado celular foi induzida a ativação da enzima com 25µL de solução contendo $MnCl_2$ 10mM, Tris-HCl 50mM, pH7,5 a 56ºC por 10 minutos. Em seguida foram adicionados 50µL de L-arginina 0,5, pH 9,7 no lisado ativado. A incubação para hidrólise da arginina ocorreu a 37ºC por 60 minutos; após esse tempo a reação foi bloqueada pela adição de 400 µL de uma solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido fosfórico (H_3PO_4) e H_2O a 1:3:7 (vol:vol:vol). A seguir, foram adicionados 25µL de 1-fenil-1,2-propanodione-2-oxime 9% dissolvidos em metanol e a solução incubada em banho a 100ºC por 45 minutos. Após esse período, a reação foi deixada 10 minutos no escuro. Uma curva padrão de ureia foi realizada para cálculo da atividade. A ureia formada foi avaliada por leitura espectrofotométrica 540nm em aparelho Multiskan MCC/340 P versão 2.20

(Labsystems, Finlândia). Uma unidade da atividade da enzima foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1µmol de ureia por minuto.

4.9 Forma de análise dos resultados

A análise estatística foi realizada empregando-se os testes ANOVA e Tukey e todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%. Foi realizada uma análise descritiva para expor os resultados e a apresentação das variáveis mensuradas foi feita em tabelas e gráficos utilizando os softwares Excel 2000 e GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software, USA).

5 RESULTADOS

Para apresentar nossos resultados seguimos a seguinte sequência: Iniciamos com a padronização da infecção das células de linhagem macrofágica RAW com promastigotas de *L. amazonensis* de modo que pudéssemos atingir a melhor proporção e tempo de infecção para nossos resultados. Em seguida, analisamos os efeitos das citocinas definidoras do perfil Th1 e Th2 sobre a infecção e avaliamos a produção de óxido nítrico e arginase. Para finalizar, partirmos para a padronização do silenciamento gênico, na qual pudemos avaliar o efeito do IGF-I sobre a infecção e sua participação no efeito das citocinas.

5.1 Padronização da infecção da linhagem macrofágica com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*

Iniciamos nossos estudos com a padronização da infecção da linhagem celular RAW 264.7 com promastigotas de *L. amazonensis*. Utilizamos duas diferentes proporções de parasitos:macrófagos (5:1 e 8:1), períodos de infecção (4 e 6 horas) e incubações de 24, 48 e 72 horas. Os resultados foram expressos pela porcentagem de infecção e pelo número de parasitos por 100 células.

Avaliando os períodos de infecção, observamos que a infecção em 6 horas apresentou uma maior porcentagem de infecção quando comparado com 4 horas em 24 e 48 horas de incubação (Figura 5).

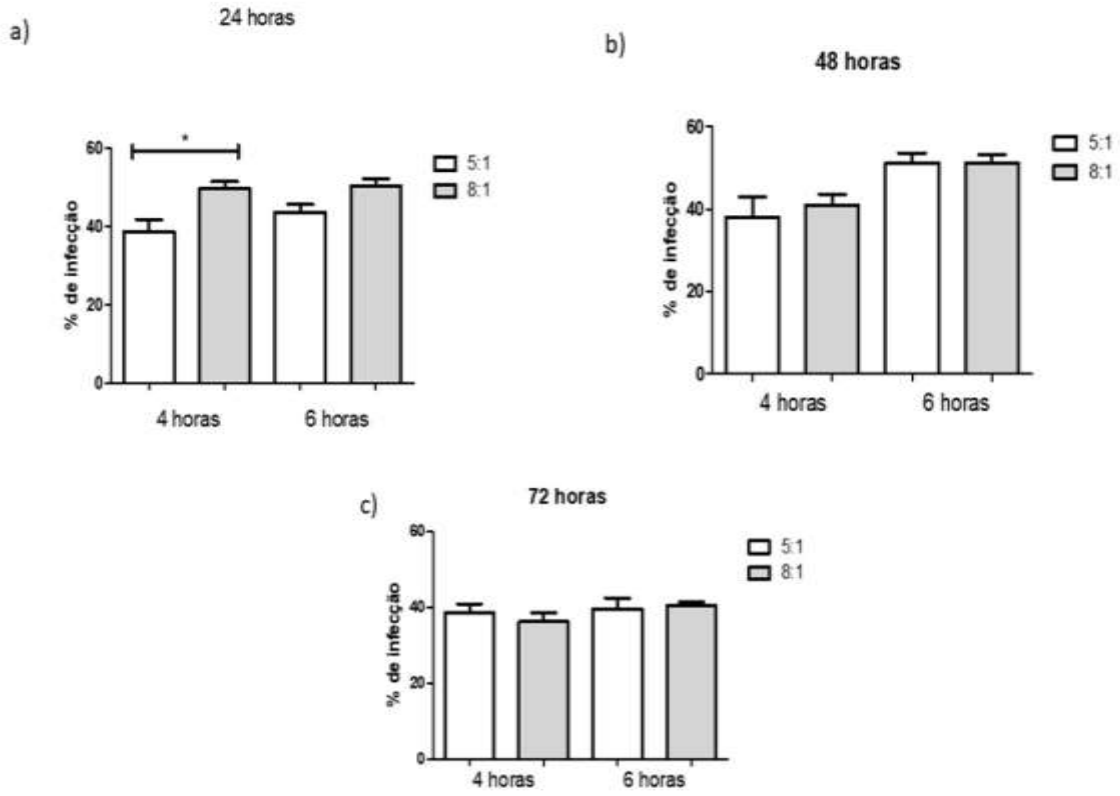

Figura 5 - Porcentagem de infecção de linhagem macrofágica RAW 264.7 infectada com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* em duas diferentes proporções (5:1 e 8:1) por 4 e 6 horas de infecção e períodos de incubação de 24 (a),48 (b) e 72 horas (c). O resultado é representado como média ± desvio-padrão. Resultado representativo de três experimentos realizados. * = P< 0,05 (Testes de ANOVA e Tukey).

Na proporção parasito:macrófagos, observamos que a proporção 8:1 apresentou um maior parasitismo do que a proporção 5:1, apesar de os dados não serem significantes, com uma diminuição no número de parasitos no decorrer da infecção (72 horas) (Figura 6). Portanto, foi escolhido o período de infecção de 6 horas e a proporção 8:1 para dar continuidade aos experimentos.

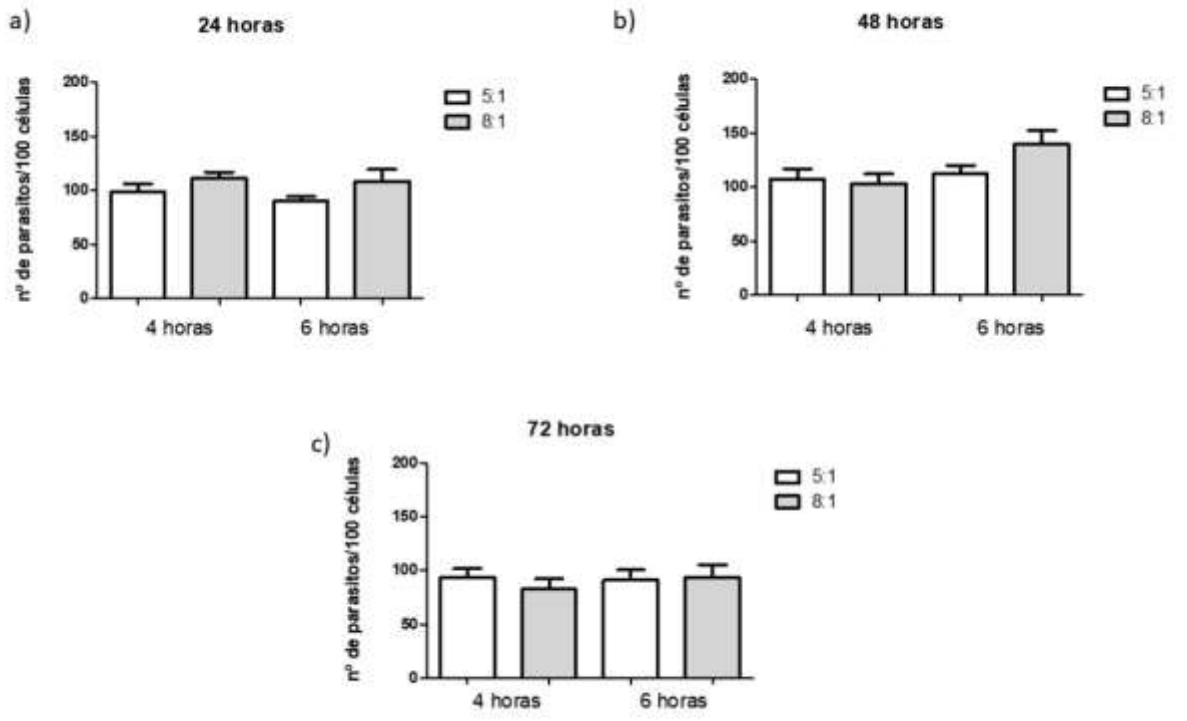

Figura 6 - Parasitismo de linhagem macrofágica RAW 264.7 infectada com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* em duas diferentes proporções (5:1 e 8:1) por 4 e 6 horas de infecção no período de incubação de 24 (a), 48 (b) e 72 horas (c). O resultado é representado pelo número de parasitos por 100 células (média ± desvio-padrão). Resultado representativo de três experimentos realizados.

5.2 Análise dos efeitos de citocinas definidoras do perfil Th1 e Th2 no parasitismo na infecção de macrófagos com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

A partir do momento que estipulamos o melhor tempo e a melhor proporção parasito-célula, iniciamos os ensaios de infecção dos macrófagos com promastigotas de *L. amazonensis* sob o efeito das citocinas definidoras do perfil Th1 (IFN-γ) e Th2 (IL-4 e IL-13).

Observamos um aumento do parasitismo no grupo de macrófagos tratados com as citocinas IFN-γ, IL-4, IL-13 e ambas simultaneamente em relação aos respectivos controles (células infectadas sem estímulo de citocinas) (Figura 7).

Na avaliação do parasitismo, observamos em 24 horas, 157 parasitos/100 células (mediana) no grupo controle, 173 parasitos sob estímulo de IFN-γ e 166 com IL-4 e IL-13 simultaneamente, 188 com IL-4 e 164 com IL-13 (Figura 7a).

Em 48h, observamos 149 parasitos no grupo controle, apresentando aumento para 189 parasitos sob estímulo de IFN-γ e 190 parasitos com IL-4. Observamos 176 parasitos com IL-13 e quando estimulado com IL-4 e IL-13 simultaneamente observamos 158 parasitos (Figura 7b).

Em 72 horas foi observado 108 parasitos no grupo controle, aumentando o número para 153 parasitos com estímulo de IFN-γ, e para 152 sob estímulo de IL-4 e IL-13 simultaneamente. Observamos que sob o efeito de IL-4 e sob estímulo de IL-13 o número de parasitos aumentou para 155 (Figura 7c).

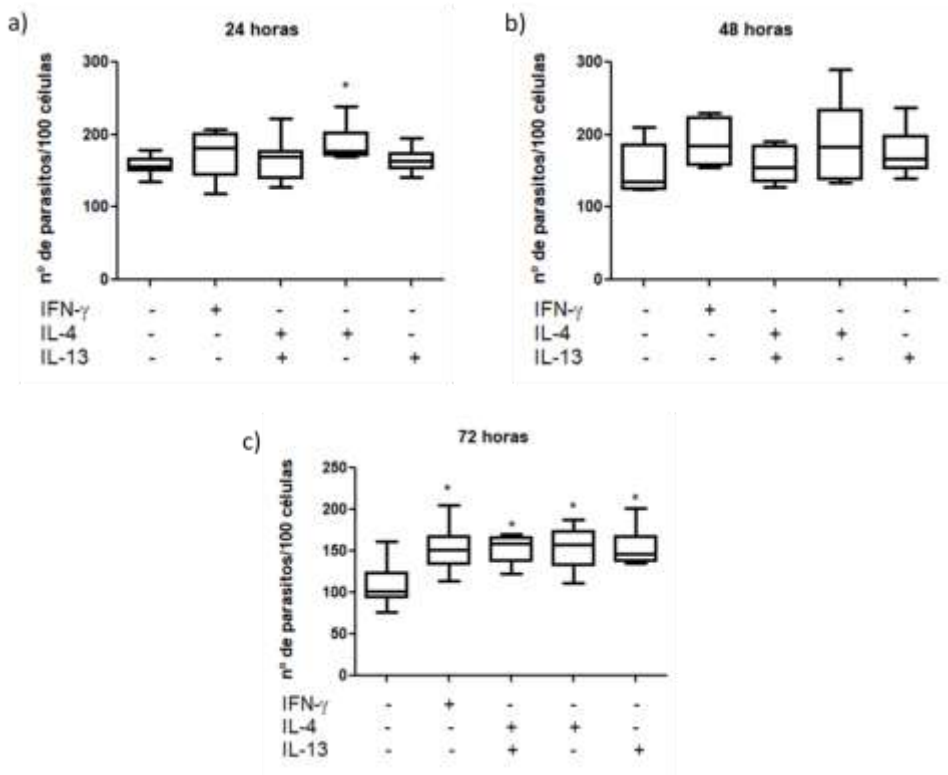

Figura 7 - Parasitismo (mediana e intervalo entre percentis 25 e 75) de linhagem macrofágica RAW 264.7 proveniente de camundongos BALB/c infectada com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* na proporção 8:1 por 6 horas de infecção sob estímulo de IFN-γ (200 U/ml), IL-4 (2 ng/ml) e IL-13 (5 ng/ml) no período de incubação de 24 (a), 48 (b) e 72 horas (c). Resultado representativo de três experimentos realizados. O resultado é representado pelo número de parasitos por 100 células. *= P<0,05 (Testes de ANOVA e Tukey) em relação ao grupo controle sem estímulo.

Em relação a porcentagem de infecção, observamos uma maior porcentagem nos grupos com 48 horas de incubação. No entanto, todos os grupos apresentaram porcentagem de infecção semelhante (Figura 8).

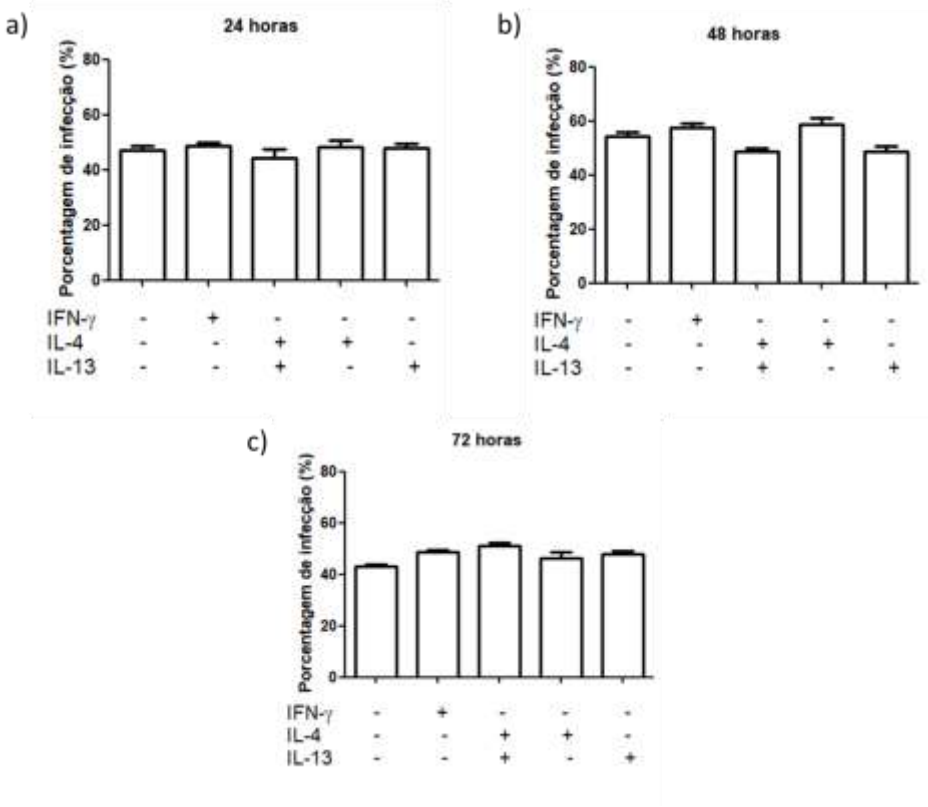

Figura 8 - Porcentagem de infecção da linhagem macrofágica RAW 264.7 proveniente de camundongos BALB/c infectados com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* na proporção 8:1 por 6 horas de infecção sob estímulo de IFN-γ (200 U/ml), IL-4 (2 ng/ml) e IL-13 (5 ng/ml) no período de incubação de 24 (a), 48 (b) e 72 horas (c). Resultado representativo de três experimentos realizados.

5.3 Análise dos efeitos de citocinas definidoras do perfil Th1 e Th2 na produção de óxido nítrico na infecção de macrófagos com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

A partir do momento que avaliamos os efeitos de citocinas definidoras do perfil Th1 e Th2 no parasitismo partimos para a análise dos efeitos das citocinas na produção de óxido nítrico (NO).

Observamos um aumento significativo na produção de NO pelas células RAW, após estímulo com IFN-γ, enquanto as citocinas definidoras do perfil Th2 mantiveram-se muito semelhantes aos seus controles (células não infectadas e sem estímulo de citocinas) nos períodos de 24, 48 e 72 horas.

Em relação aos grupos estimulados com citocinas IL-4 e IL-13 não observamos diferenças significativas em relação ao controle (Figura 9).

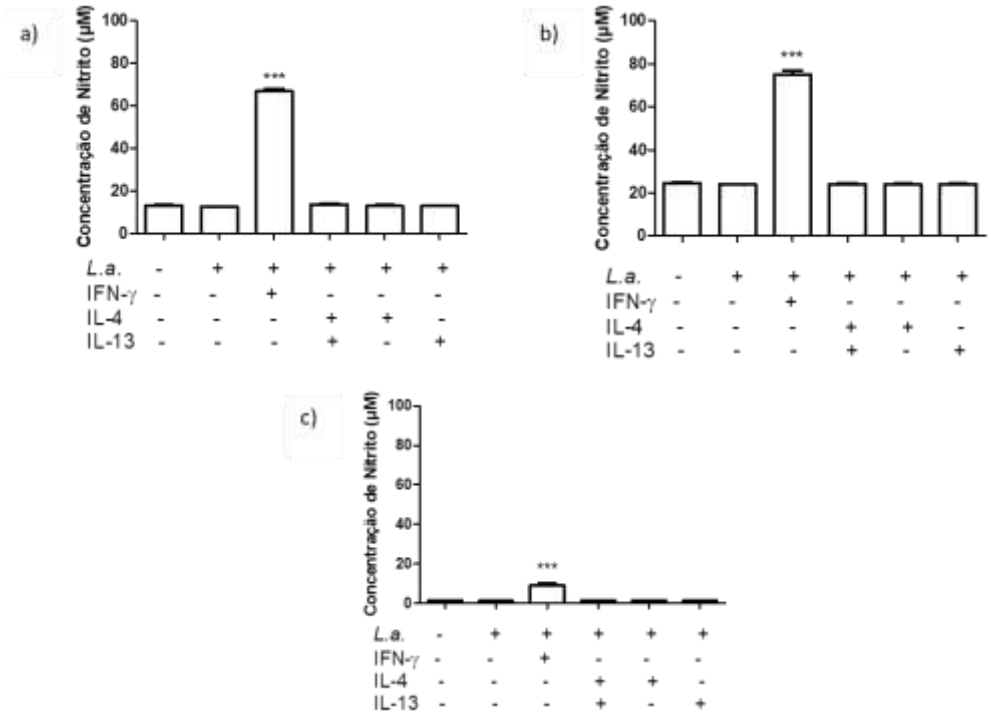

Figura 9 - Produção de óxido nítrico (média ± desvio padrão) da linhagem macrofágica RAW 264.7 infectada com promastigota de *Leishmania (L.) amazonensis* sob estímulo de IFN-γ (200 U/ml), IL-4 (2 ng/ml) e IL-13 (5 ng/ml) nos períodos de 24 (a), 48 (b) e 72 (c) horas. Representação de três experimentos realizados. * = P< 0,05 em relação a todos os grupos (Testes ANOVA e Tukey).

5.4 Análise dos efeitos de citocinas definidoras do perfil Th1 e Th2 na expressão de IGF-I na infecção de macrófagos com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Avaliamos os efeitos das citocinas definidoras dos perfis Th1 e Th2 na expressão do RNA mensageiro para o fator de crescimento *Igf-I*. Macrófagos ($2x10^6$ células por poço) foram infectados ou não com promastigotas de *L. amazonensis* e estimulados ou não com citocinas e incubados por 24, 48 e 72 horas.

Em 24 horas, observamos uma diminuição da expressão do mRNA de *Igf-I* nos grupos infectados quando comparados com controles não infectados. Em relação as citocinas, observou-se uma diminuição de 5,5 vezes na expressão de mRNA de *Igf-I* quando as células foram estimuladas com IFN-γ e um aumento de 3,4 vezes na expressão quando estimulados com IL-4 e IL-13 simultaneamente, um aumento de 2,7 vezes com apenas IL-4 e um aumento de 3 vezes com IL-13 (Figura 10).

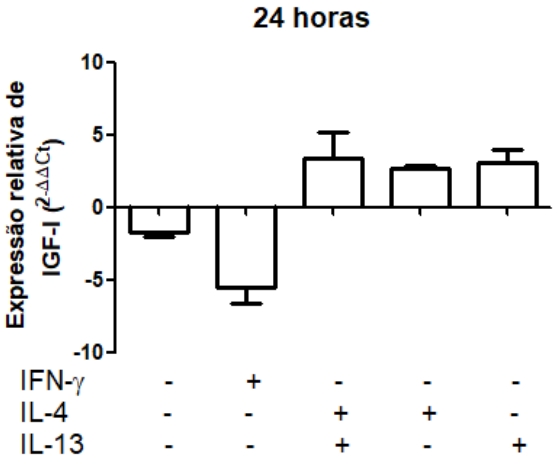

Figura 10 - Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de mRNA de *Igf-I*. A expressão de mRNA de *Igf-I* foi calculada em relação a expressão de mRNA de β-actina (ΔCt) em células RAW 264.7 infectadas ou não com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, sob estímulo de IFN-γ (200 U/ml), IL-4 (2 ng/ml) e IL-13 (5 ng/ml) no período de incubação de 24 horas. Os dados apresentados são de níveis de expressão de IGF-I em relação aos níveis de expressão de células controle sem infecção e sem estímulo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)[65]. Resultado representativo de três experimentos realizados.

Em 48 horas, podemos observar um discreto aumento da expressão do mRNA de *Igf-I* nos grupos infectados quando comparados com controles não infectados, diferente do observado em 24 horas. Em relação as citocinas, foi observado uma diminuição de 1,7 vezes quando as células foram estimuladas com IFN-γ e um aumento de 2,5 vezes quando tratadas simultaneamente com IL-4 e IL-13. Com as citocinas IL-4 e IL-13 separadamente, observou-se um aumento de 3,6 e 2 vezes respectivamente (Figura 11).

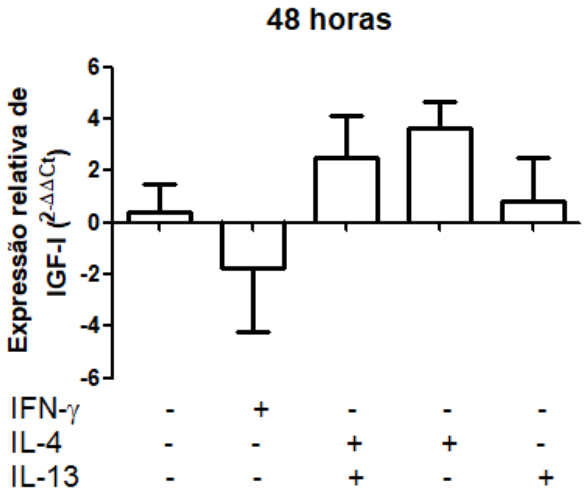

Figura 11 - Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de mRNA de *Igf-I*. A expressão de mRNA de *Igf-I* foi calculada em relação a expressão de mRNA de β-actina (ΔCt) em células RAW 264.7 infectadas ou não com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, sob estímulo de IFN-γ (200 U/ml), IL-4 (2 ng/ml) e IL-13 (5 ng/ml) no período de incubação de 48 horas. Os dados apresentados são de níveis de expressão de IGF-I em relação aos níveis de expressão de células controle sem infecção e sem estímulo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)[65]. Resultado representativo de três experimentos realizados.

Em 72 horas, podemos observar um aumento da expressão do IGF-I em todos os grupos infectados tratados com citocinas quando comparado com o grupo controle (Figura 12). O grupo tratado com IFN-γ apresentou um aumento de 4,7 vezes, enquanto o grupo tratado com IL-4 e IL-13 simultaneamente apresentou um aumento de 20 vezes comparado ao controle. O grupo estimulado com IL-4 e IL-13 separadamente apresentou um aumento de 17 vezes e 15 vezes, respectivamente.

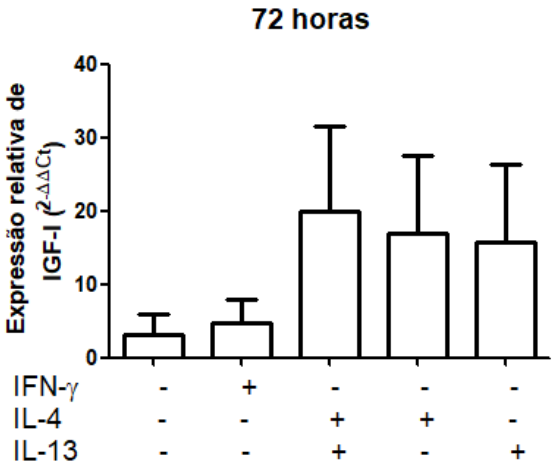

Figura 12 - Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de mRNA de *Igf-I*. A expressão de mRNA de *Igf-I* foi calculada em relação a expressão de mRNA de β-actina (ΔCt) em células RAW 264.7 infectadas ou não com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, sob estímulo de IFN-γ (200 U/ml), IL-4 (2 ng/ml) e IL-13 (5 ng/ml) no período de incubação de 72 horas. Os dados apresentados são de níveis de expressão de IGF-I em relação aos níveis de expressão de células controle sem infecção e sem estímulo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)[65]. Resultado representativo de três experimentos realizados.

Esses resultados iniciais corroboram o descrito na literatura[51,52] reafirmando a participação das citocinas na modulação da expressão do IGF-I.

5.5 Análise dos efeitos de citocinas definidoras do perfil Th1 e Th2 na expressão do receptor de IGF-I na infecção de macrófagos com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Em seguida, analisamos os efeitos das citocinas definidoras do perfil Th1 e Th2 na expressão do RNA mensageiro para o receptor do IGF-I (*Igf-IR*). Macrófagos ($2x10^6$ células por poço) foram infectados ou não com promastigotas de *L. amazonensis* e estimulados ou não com citocinas, por 24, 48 e 72 horas.

Em todos os grupos avaliados pudemos observar que a infecção por *L. amazonensis* levou a uma diminuição na expressão do mRNA de *Igf-IR* (Figura 13). Esse resultado se tornou inesperado uma vez que, observamos o aumento da expressão do mRNA de IGF-I em alguns grupos.

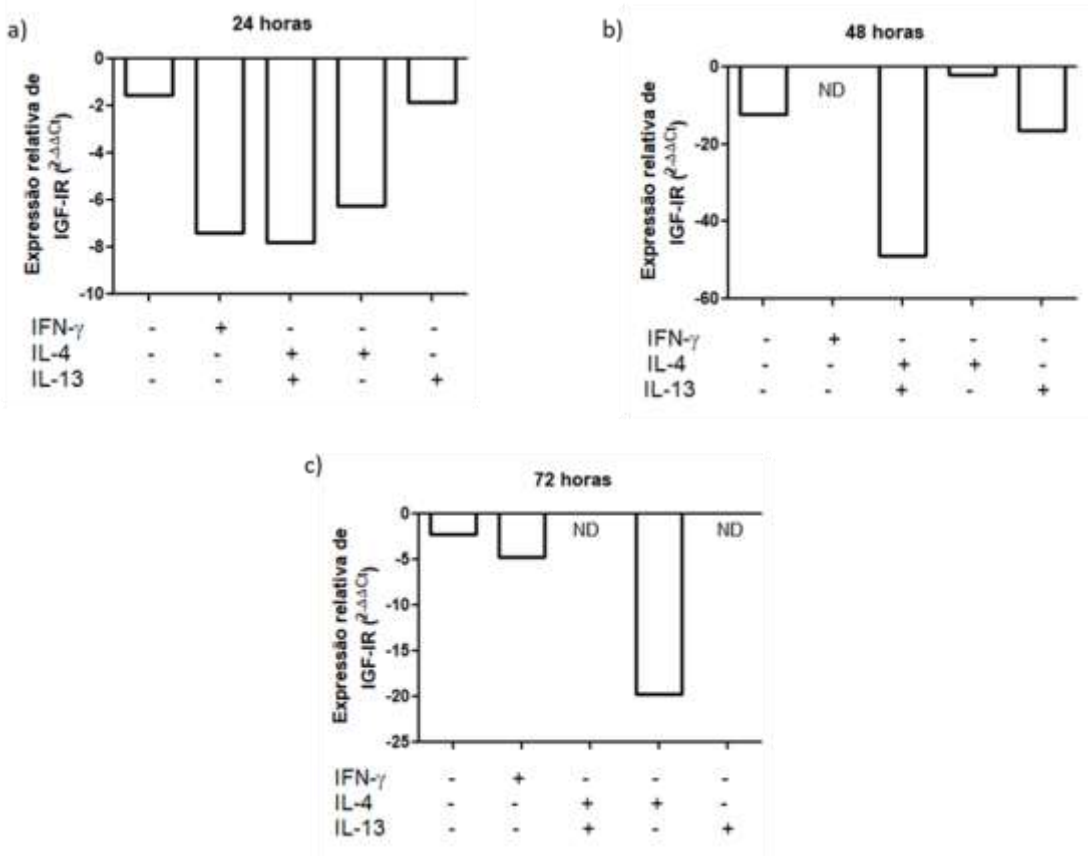

Figura 13 - Expressão de mRNA do receptor de IGF-I (IGF-IR). A expressão de mRNA de *Igf-IR* foi calculada em relação a expressão de mRNA de β-actina (ΔCt) em células RAW 264.7 infectadas ou não com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, sob estímulo de IFN-γ (200 U/ml), IL-4 (2 ng/ml) e IL-13 (5 ng/ml) no período de incubação de 24 (a), 48 (b) e 72 horas (c). Os dados apresentados são de níveis de expressão de IGF-IR em relação aos níveis de expressão de células controle sem infecção e sem estímulo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) [65]. ND=não detectado. Resultado representativo de três experimentos realizados.

5.6 Análise dos efeitos de citocinas definidoras do perfil Th1 e Th2 na atividade da enzima arginase na infecção de macrófagos com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Foi avaliada a atividade da arginase pela produção de ureia dos macrófagos infectados na presença de IL-4, IL-13 e IFN-γ. Observamos que os macrófagos não infectados (grupo controle), não mostrou diferença significativa quando comparado ao grupo infectado por promastigotas. Nos grupos estimulados com citocinas, observamos uma alta atividade da enzima nos grupos que foram estimulados com IL-4 e nos grupos com estímulo concomitante de IL-4 e IL-13. Observamos resultados semelhantes nos três tempos avaliados (Figura 14).

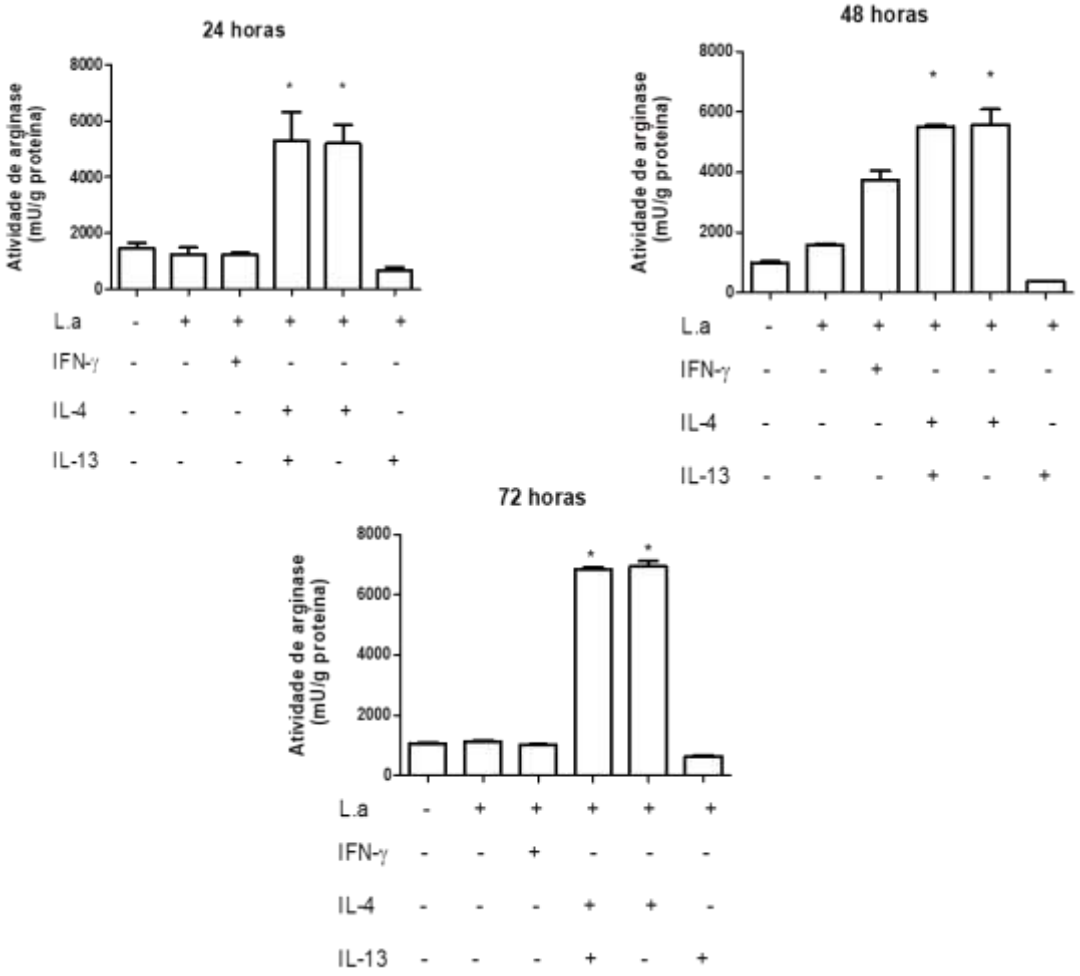

Figura 14 - Efeito das citocinas sobre a atividade da arginase em células de linhagem RAW 264.7 infectadas ou não com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (L.a) sob estímulo de IFN-γ (200 U/ml), IL-4 (2 ng/ml) e IL-13 (5 ng/ml) no período de incubação de 24, 48 e 72 horas. Resultado apresentado pelo mU de arginase em 10^5 células (média ± desvio-padrão). *=p<0,05 em relação ao grupo controle (Testes ANOVA e Tukey). Resultado representativo de três experimentos realizados.

Sumarizamos nossos dados no seguinte quadro:

	PARASITISMO	IGF-I	IGF-IR	NO	ARGINASE
IFN-γ	aumento	diminuição	diminuição	aumento	aumento
IL-4+IL-13	aumento	aumento	diminuição	diminuição	aumento
IL-4	aumento	aumento	diminuição	diminuição	aumento
IL-13	aumento	aumento	diminuição	diminuição	aumento

Quadro 1 – Resumo dos dados analisados em relação a parasitismo, expressão de IGF-I e IGF-IR, produção de óxido nítrico e expressão de arginase.

5.7 Análise dos efeitos do silenciamento gênico na expressão de IGF-I na infecção de macrófagos com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Visando o esclarecimento do papel do IGF-I na infecção por *L. amazonensis*, partimos para a padronização da técnica de silenciamento gênico por RNA de interferência. As células de linhagem macrofágica RAW 264.7 infectadas ou não com promastigotas de *L. amazonensis* foram transfectadas com siRNA e a porcentagem de inibição do IGF-I foi avaliada por PCR em tempo real utilizando primers específicos para IGF-I. O silenciamento do IGF-I por siRNA resultou na inibição de 91% nas células não infectadas e 84% nas células infectadas em 24 horas. Já em 48 horas obtivemos um silenciamento de 88% nas células não infectadas e de 92% nas células infectadas (Figura 15).

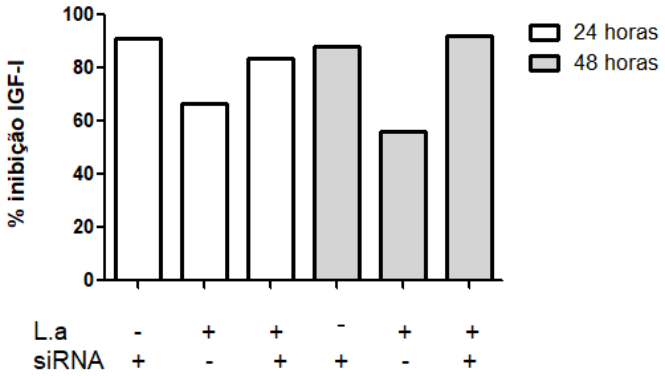

Figura 15 - Porcentagem de inibição da expressão de mRNA de IGF-I na presença de RNA de interferência (siRNA). Células RAW 264.7 infectadas ou não com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (L.a), tratadas com 150 µM de siRNA e 3 µl do lipossomo.

Uma vez que estabelecemos a funcionalidade do RNA de interferência, partimos para a padronização da técnica em nosso sistema. Iniciamos testando se o sistema de silenciamento funcionaria melhor em células silenciadas e depois infectadas ou em células primeiramente infectadas e depois silenciadas em 24 e 48 horas.

Avaliamos o parasitismo das células infectadas e depois tratadas ou não com siRNA e os resultados foram expressos em número de parasitos por 100 células. Observamos uma diminuição significativa do parasitismo nos grupos que apresentavam o complexo de siRNA. Observamos 210 parasitos no grupo sem siRNA e 178 parasitos no grupo com siRNA em 24 horas. Em 48 horas pudemos observar 198 parasitos no grupo sem siRNA e de 151 com a presença do complexo (Figura 16).

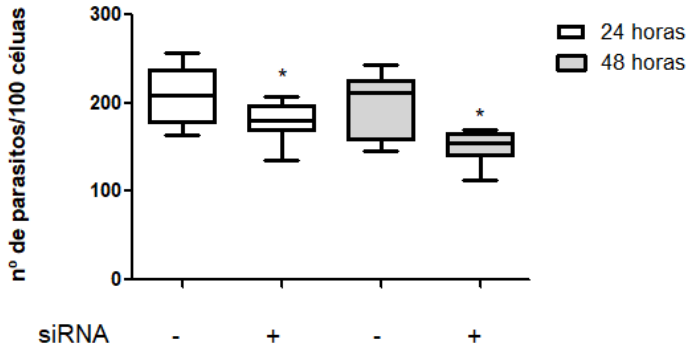

Figura 16 - Parasitismo (mediana e intervalo entre percentis 25 e 75) de células RAW 264.7 infectadas com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e tratadas com RNA de interferência (siRNA) após período de infecção em 24 e 48 horas. Resultado representativo de três experimentos realizados. O resultado é representado pelo número de parasitos por 100 células. *=p<0,05 em relação ao seu respectivo controle sem siRNA (Testes ANOVA e Tukey).

Em seguida testamos silenciar e só depois infectar. Nesse sistema, observamos 205 parasitos no grupo sem siRNA e 204 parasitos no grupo com siRNA em 24 horas. Em 48 horas pudemos observar 207 parasitos no grupo sem siRNA e de 179 com a presença do complexo (Figura 17).

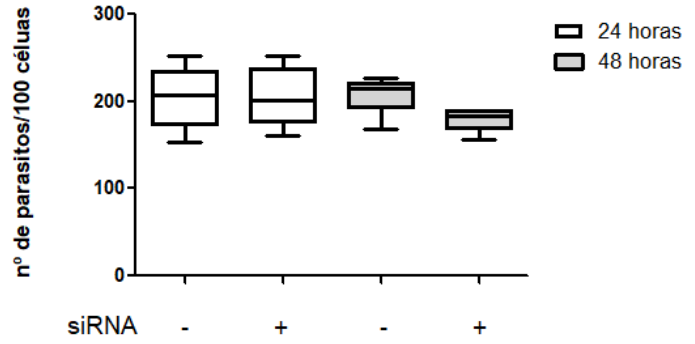

Figura 17 - Parasitismo (mediana e intervalo entre percentis 25 e 75) de células RAW 264.7 infectadas com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e tratadas com RNA de interferência (siRNA) antes de serem infectadas em 24 e 48 horas. Resultado representativo de três experimentos realizados. O resultado é representado pelo número de parasitos por 100 células.

Como observamos uma diminuição significativa no parasitismo quando as células foram infectadas e, posteriormente, tratadas com IGF-I-siRNA, optamos por utilizar essa metodologia para o ensaio de siRNA e citocinas.

5.8 Análise dos efeitos do silenciamento gênico na produção de óxido nítrico na infecção de macrófagos com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Após avaliação do parasitismo, partimos para analisar o efeito na produção de NO na infecção das células RAW 264.7 com promastigotas de *L. amazonensis* após silenciamento gênico do IGF-I por RNA de interferência. Pudemos observar que todos os tempos de ensaio se mostraram muito semelhantes entre si. Notamos que a maior produção de oxido nítrico ocorre nos grupos em que há o complexo siRNA-Lipossomo em células infectadas. Em 72 horas, porém, o aumento foi encontrado no grupo em que há apenas o lipossomo, acreditamos que esse resultado seja devido ao fator transitório da técnica de RNA de interferência, que já não estaria mais tendo efeito sobre esse período de incubação (Figura 18).

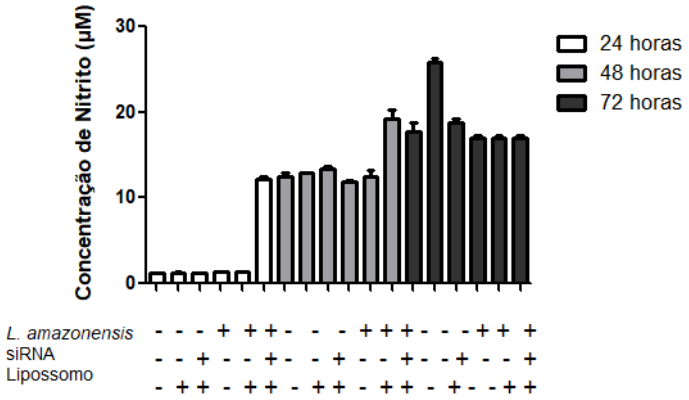

Figura 18 - Produção de óxido nítrico (média ± desvio padrão) da linhagem macrofágica RAW 264.7 infectadas ou não com promastigota de *Leishmania (L.) amazonensis*, na presença de lipossomo e RNA de interferência (siRNA) nos períodos de 24, 48 e 72 horas.

5.9 Análise dos efeitos das citocinas definidoras do perfil Th1 e Th2 no parasitismo de macrófagos com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* após silenciamento gênico do IGF-I por RNA de interferência

Em seguida avaliamos o efeito das citocinas sobre o parasitismo na infecção das células RAW 264.7 com promastigotas de *L. amazonensis,* após silenciamento gênico do IGF-I por RNA de interferência.

Após a infecção e o período de incubação do siRNA, as células foram estimuladas com as citocinas Th2, IL-4 (2 ng/ml), IL-13 (5 ng/mL) e ambas simultaneamente, ou com citocina Th1, IFN-γ (200 U/mL), sendo mantidas por 24 e 48 horas.

Na avaliação do parasitismo após 24h, podemos observar uma diminuição significante do parasitismo no grupo com siRNA (198 parasitos/100células) quando comparado ao grupo controle sem siRNA (235 parasitos/100 células, P<0,05). Quando avaliamos o parasitismo nos grupos estimulados com citocinas foi observada uma diminuição significante em todos os grupos tratados com siRNA, quando comparado com seus respectivos controles nesse período estudado (Figura 19).

Foi observada uma diminuição significante no número de parasitos para 194 quando as células foram tratadas com siRNA e estimuladas com IFN-γ (P<0,05) quando comparado com 246 do seu respectivo controle (células estimuladas com IFN-γ sem siRNA). Quando as células foram tratadas com siRNA, o estímulo com IL-4 e IL-13 concomitantemente não induziu aumento, mas uma diminuição no número de parasitos para 190 (P<0,05), quando comparado com 249 do seu respectivo controle (células estimuladas com IL-4 e IL-13 sem siRNA). Nas células sem siRNA e estimuladas com IL-4 foram observados 269 parasitos. Quando as células foram tratadas com siRNA e estimuladas com a citocina observamos 176 parasitos (P<0,05). Também foi observada uma diminuição no número de parasitos, observando 192 parasitos (P<0,05) nas células tratadas com siRNA e estimuladas com IL-13, quando comparado com 261 parasitos do seu respectivo controle (células estimuladas com IL-13 sem siRNA) (Figura 19).

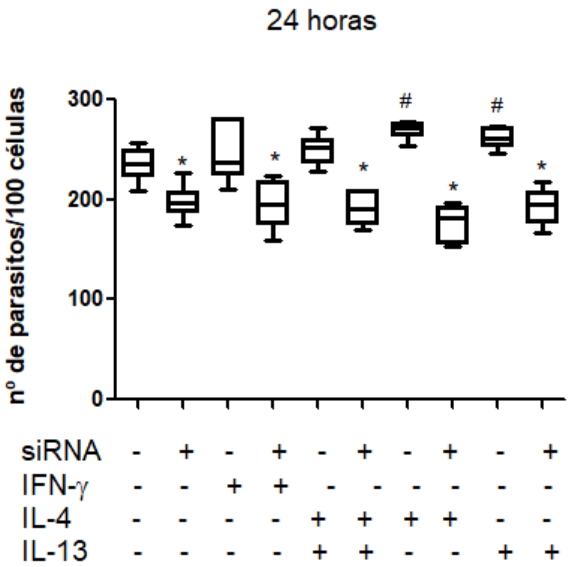

Figura 19 - Parasitismo (mediana e intervalo entre percentis 25 e 75) de células RAW 264.7 infectadas com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e tratadas com RNA de interferência (siRNA) e sob estímulo das citocinas Th2, IL-4 (2 ng/ml), IL-13 (5 ng/mL) e ambas simultaneamente, ou com citocina Th1, IFN-γ (200 U/mL) em 24 horas. Resultado representativo de três experimentos realizados. *= P<0,05 (Testes de ANOVA e Tukey) em relação ao seu respectivo controle sem siRNA. #= P<0,05 (Testes de ANOVA e Tukey) em relação ao controle sem estímulo.

Em 48 horas observamos uma diminuição mais acentuada entre os grupos não tratado e tratado com siRNA. O grupo controle sem siRNA e não estimulado com citocinas apresentou 223 parasitos/100 células, ocorrendo uma queda nesse número para 158 quando esse mesmo grupo foi tratado com siRNA (P<0,05).

Em relação aos estímulos com as citocinas, todos os grupos tratados com siRNA apresentaram uma diminuição em relação aos seus controles sem siRNA. Foi observada uma diminuição significante para 179 parasitos nas células tratadas com siRNA e estimuladas com IL-4 e IL-13 concomitantemente (P<0,05) quando comparado com 215 do seu respectivo controle (células estimuladas com IL-4 e IL-13 sem siRNA).

Nas células sem siRNA e estimuladas com IL-4 foram observados 190 parasitos. Já as células tratadas com siRNA e estimuladas com a citocina observamos 175 parasitos. Também foi observada uma diminuição para 163 parasitos nas células

tratadas com siRNA e estimuladas com IL-13 (P<0,05), quando comparado com 215 do seu respectivo controle (células estimuladas com IL-13 sem siRNA) (Figura 20).

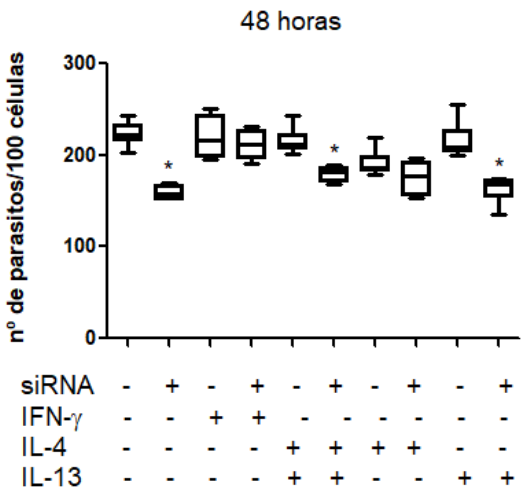

Figura 20 - Parasitismo (mediana e intervalo entre percentis 25 e 75) de células RAW 264.7 infectadas com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e tratadas com RNA de interferência (siRNA) e sob estímulo das citocinas Th2, IL-4 (2 ng/ml), IL-13 (5 ng/mL) e ambas simultaneamente, ou com citocina Th1, IFN-γ (200 U/mL) em 48 horas. Resultado representativo de três experimentos realizados. *= P<0,05 (Testes de ANOVA e Tukey) em relação ao seu respectivo controle sem siRNA.

Tendo em vista esses resultados, pudemos demonstrar o IGF-I como um importante fator de proliferação parasitária na infecção por *L. amazonensis* já que na ausência do IGF-I, mesmo estimulando as células com as citocinas determinantes do perfil Th1 e Th2, o grau do parasitismo não aumenta. Sugerimos, portanto, que IGF-I sofre influência das citocinas durante a infecção e está diretamente relacionado com o parasitismo, mostrando que a presença desse fator de crescimento é necessária para gerar a suscetibilidade a infecção

6 DISCUSSÃO

O paradigma estabelecido em que citocinas da resposta Th1 conferem um perfil resistente e citocinas Th2 um perfil suscetível no modelo da infecção por *L. major* parece diferir em relação as outras espécies de *Leishmania*. Nesse sentindo, o papel das citocinas vem sendo muito estudado e questionado por diferenças apresentadas pelas espécies do parasito, que apresentam comportamentos diferentes no desenvolvimento da infecção. Sendo assim, esse projeto tentou elucidar a participação do IGF-I e os efeitos das citocinas do perfil Th1 (IFN-γ) e Th2 (IL-4 e IL-13) na infecção *in vitro* por *L. amazonensis.*

No modelo experimental utilizando *L. major,* citocinas como IFN-γ, TNF-α e IL-12 levam a um perfil de resistência através da ativação clássica dos macrófagos, enquanto citocinas IL-4, lL-10 e IL-13 levam a uma ativação alternativa dessas células, conferindo suscetibilidade a infecção[31]. No modelo de infecção por *L. amazonensis,* o papel dessas citocinas parece ser diferente, como foi observado com a citocina IFN-γ que aparenta ter um efeito crucial para o crescimento do parasito[33], caracterizando que a resposta imune envolvida nas leishmanioses não é tão simples quanto se imaginava.

Devido a divergências encontradas entre as respostas Th1 e Th2, iniciamos nossos experimentos avaliando os efeitos de citocinas definidoras de perfil Th1 e Th2 no parasitismo, produção de óxido nítrico e arginase, em células RAW 264.7 infectadas com promastigotas de *L. amazonensis.* As citocinas escolhidas para o estímulo das células infectadas foram IFN-γ, IL-4 e IL-13 uma vez que essas já foram utilizadas em outros trabalhos do nosso grupo e são as citocinas descritas que atuam sobre a expressão de IGF-I[51,52].

Na análise do parasitismo, observamos nos ensaios com as citocinas do perfil Th2, IL-4 e IL-13, um aumento do parasitismo associado a um aumento da expressão do IGF-I e um aumento da atividade da arginase. Nossos resultados são semelhantes ao encontrado na infecção por *L. major,* em que citocinas Th2 induzem a expressão da enzima arginase que leva à produção de poliaminas que são nutrientes para o parasito, com consequente aumento do parasitismo[36].

O papel da IL-4 na suscetibilidade da infecção por *L. major* foi demonstrado em trabalhos anteriores com camundongos BALB/c nocautes para IL-4 que

desenvolveram pequenas lesões, enquanto os camundongos selvagens apresentaram grandes lesões demostrando o efeito dessa citocina como promotora do crescimento parasitário[67].

Resultados semelhantes também foram encontrados em camundongos nocautes para IL-4 infectados com *L. mexicana*, em que os animais não desenvolveram lesão[29,68]. A citocina IL-4 apresenta um papel de grande importância no aumento do parasitismo nas infecções por *L. mexicana*[27], e no nosso modelo com *L. amazonensis* também encontramos um aumento significativo no parasitismo quando o grupo foi estimulado com IL-4.

O papel de IL-13 nas infecções cutâneas por outras espécies de *Leishmania*, diferentes da *L. major*, ainda é muito controverso e assim como a IL-4, demonstra ser um fator importante, porém não primordial para a suscetibilidade a infecção[69].

Nossos dados sugerem um aumento no parasitismo quando as células são estimuladas com a citocina IL-13, apesar de os valores não serem significativos, com exceção da infecção em 72 horas, o que nos sugere que essa citocina teria efeitos mais tardios na infecção por *L. amazonensis*.

Alguns trabalhos descrevem uma ação diferenciada dessa citocina dependendo da fase em que a doença se encontra, sendo encontrado um papel potencialmente promissor nas fases crônicas da infecção[70]. Jones *et al*[71] sugeriram que IL-13 não teria papel na suscetibilidade da doença durante a infecção por *L. amazonensis*, diferentemente do encontrado com outras espécies, já na infecção por *L. mexicana* essa citocina aparenta ter papel crucial para o desenvolvimento do parasito, apesar de ambas as espécies pertencerem ao mesmo complexo[72].

As citocinas IL-4 e IL-13 vêm sendo descritas como as principais citocinas associadas à resposta celular do tipo Th2. Essas citocinas compartilham uma mesma via de sinalização por meio de um receptor específico (IL-4Rα), e a deleção desse receptor leva a desregulação na sinalização de ambas as citocinas. Os estudos foram realizados com *L. major* e camundongos BALB/c nocauteados para IL-4, IL-13 e IL-4Rα, mostrando que esse receptor poderia ser um importante fator para suscetibilidade relacionado diretamente a essa espécie de *Leishmania*[69]. A ativação alternativa dos macrófagos é dependente da expressão do receptor IL-4Rα, e um dos marcadores

relacionados a esse receptor é a arginase-1 que vem sendo usada em muitos estudos para comprovar a presença de uma ativação de perfil M2 dessas células[73].

Em relação a citocina IFN-γ, representante da reposta Th1, nossos resultados mostraram que essa citocina apresentou um aumento do parasitismo, diferente do observado no clássico modelo da infecção por *L. major*. Vale destacar que também foi observado um aumento da produção de óxido nítrico e uma diminuição da expressão de IGF-I, sem correlação com o aumento do parasitismo.

Nossos resultados corroboram os poucos trabalhos descritos na literatura na infecção por *L. amazonensis*, em que IFN-γ promove um aumento do crescimento de amastigotas de *L. amazonensis in vivo*[39] associado a um maior nível de expressão de slc7A2, gene responsável pela infecção na célula hospedeira[33,39].

Sabe-se que essa citocina é responsável por levar o macrófago a produzir óxido nítrico, catalisado pela enzima óxido nítrico sintase induzível (NOS2) e consequentemente levar a morte do parasito intracelular[34]. No entanto, acredita-se que os mecanismos pelos quais IFN-γ medeia o crescimento de *L. amazonensis* pode estar relacionado com o transportador de L-arginina (CAT-2B) encontrado nos macrófagos[39].

Além disso, Qi *et al*[33] sugerem que IFN-γ tenha uma via própria que acelere a replicação do parasito ou até mesmo que essa citocina facilite a maturação das amastigotas nos fagossomos, independentes da atividade de NOS2 e arginase. Outra hipótese é que IFN-γ poderia mediar o número de receptores Fc ativos, aumentando, portanto, a fagocitose. Além disso, foi demonstrado que o aumento da carga parasitária relacionado com o estímulo de IFN-γ é independente de IL-10 e TGF-β[39].

Apesar desses dados encontrados na literatura, os estudos relacionados ao papel de IFN-γ na infecção por *L. amazonensis* ainda são muito escassos, necessitando maiores considerações a respeito das vias envolvidas na replicação do parasito quando há a presença dessa citocina.

Vale ressaltar que o estabelecimento da infecção por *Leishmania* é dependente de como os macrófagos vão ser ativados e os produtos metabólicos da L-arginina estão implicadas nessa função. L-arginina é um dos mais versáteis aminoácidos e está implicado na síntese de NO, ureia, ornitina, citrulina, prolina, poliaminas e entre outros. Em relação a infecção por *Leishmania*, a ativação da via nas

células depende de duas principais enzimas: NOS2, relacionada com a produção de NO que leva a morte do parasito, e a arginase, relacionada com a produção das poliaminas que leva a proliferação do mesmo[74].

Modelos murinos têm ilustrado bem que macrófagos infectados produzem IL-12 e essa citocina induz células T $CD4^+$ a produzirem IFN-γ que por sua vez, polarizam a célula para um perfil do tipo 1 (Th1), responsável por ativar a óxido nítrico sintase induzível (NOS2) a produzirem óxido nítrico (NO)[75]. Além disso, os macrófagos apresentam uma defesa induzida pela fagocitose denominado burst oxidativo, levando a acidificação do meio intracelular[74].

Sabe-se que altos níveis de espécies reativas do nitrogênio, como o NO, levam ao estresse oxidativo que resulta na morte dessas células saudáveis. As células cancerígenas por outro lado, requerem níveis mais elevados dessas espécies do que as células saudáveis[76].

Células RAW 264.7 são provenientes de uma linhagem tumoral de camundongos BALB/c, fato que poderia explicar nossas células controles apresentarem uma elevada produção de NO mesmo sem nenhum tipo de estímulo, sendo muito semelhante em relação ao grupo apenas infectado e os grupos estimulados com citocinas definidoras de perfil Th2. Esses resultados em relação a citocinas pertencentes ao perfil Th2 já eram esperados, uma vez que esse perfil está relacionado a produção de poliaminas e, portanto, não teriam nenhuma ação sobre a produção de NO, mantendo apenas o nível basal das células.

Nossos dados apresentam por outro lado, um aumento significativo na produção de óxido nítrico quando os grupos são estimulados com a citocina IFN-γ, apesar disso, não foi observado diminuição no parasitismo como esperado. Giudice *et al.* [75] descrevem que alguns isolados de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* são resistentes a morte por NO, sugerindo que esses parasitos podem apresentar mecanismos diferentes das demais espécies para a sobrevivência dentro do macrófago hospedeiro. Essa resistência ao NO pode levar a formas mais agressivas das lesões, o que poderia justificar as formas mais graves da doença como as formas difusa e mucosa, relacionadas diretamente a essas espécies. Entre essas cepas, *L. braziliensis* apresenta 31% de resistência ao óxido nítrico, enquanto isolados de *L. amazonensis* apresentam 73% de resistência, levando ao aumento de macrófagos infectados. A mesma diferença

foi observada entre outras espécies do parasito, sugerindo que há muito mais variações intra e interespécies do que já é descrito.

A diminuição da produção de NO em 72 horas em todos os grupos do nosso estudo, pode ser explicado pelos trabalhos de Vespa e Silva[77], que descrevem que o pico de ativação de NOS2 ocorre 12 horas após a infecção e que diminui consideravelmente após 72 horas, corroborando com os dados que encontramos.

Já é descrito que *Leishmanias* expressam enzimas que estão envolvidas no metabolismo de L-arginina. A arginase é compartimentalizada no glicossomo (organelas especificas de tripanosomatídeos) de promastigotas e amastigotas e já foram identificadas em *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. donovani* na qual o parasito apresenta transportadores específicos em sua superfície[20]. A ausência de arginase ou a localização incorreta do glicossomo implica diretamente na infectividade desses parasitos[78].

Nossos dados demonstram uma ativação significativa da enzima arginase nos grupos estimulados com IL-4 e com o estímulo concomitante de IL-4 e IL-13, o que confirmaria os dados já descrito na literatura sobre as possíveis ações de citocinas Th2 estarem envolvidas na ativação dessa enzima e consequentemente desviarem a via para a produção de poliaminas e aumentar o parasitismo. Apesar disso o aumento da atividade da arginase com estímulo da citocina IL-13 não foi tão importante, demonstrando que essa citocina sozinha provavelmente não tem um efeito exacerbado na infecção.

Já com IFN-γ, observamos um aumento na atividade da arginase, um dado inesperado já que essa citocina produziu significantemente NO, confirmando que são necessários maiores estudos durante a infecção *por L. amazonensis* e que provavelmente mecanismos ainda não descritos estão relacionados a essa espécie de *Leishmania.*

É conhecido que células tumorais produzem ATP principalmente por via glicolítica[79] e que um dos produtos produzidos por essa via é o lactato[80]. Em macrófagos tumorais o lactato está associado a promoção de um fenótipo do tipo M2 que leva a um aumento na expressão de arginase da célula[81]. Esses dados poderiam explicar nossos resultados em que apenas as células RAW 264.7 sem nenhum tipo de

estímulo tenham uma atividade de arginase, podendo ser comparada com as células infectadas.

Alguns estudos alertam que a resistência e suscetibilidade a infecção por *Leishmania* não está relacionada apenas com a participação de citocinas, mas que outros fatores também participem nesse processo. Neste contexto, o IGF-I, sendo um dos primeiros fatores da resposta imune inata que o parasito encontra após ser inoculado no hospedeiro, pode ter participação no desenvolvimento da infecção.

Foi demonstrado *in vitro* que IGF-I extrínseco em concentrações fisiológicas induz um aumento na proliferação de promastigotas e amastigotas axênicas de diferentes espécies do parasito[43,48,49]. *In vivo*, utilizando camundongos BALB/c foi demonstrada que a pré-incubação do parasito com IGF-I promove o aumento significativo do tamanho da lesão desses animais[82].

Esses resultados direcionaram nosso grupo ao estudo do IGF-I extrínseco na interação com *L. amazonensis* e sua interação com macrófago *in vitro*. Os resultados demonstraram que o IGF-I aumenta a atividade da arginase do macrófago e dos parasitos, sugerindo que o IGF-I tem um efeito sobre o metabolismo da L-arginina aumentando a atividade da arginase e em consequência uma diminuição da produção de óxido nítrico[83].

Em seguida, foi proposto a participação do IGF-I na resposta imune específica, já que as citocinas Th1 e Th2 possuem diferentes efeitos na produção do IGF-I nos macrófagos[84]. No estudo de Reis *et al.* [54] foi avaliado o papel intrínseco do IGF-I utilizando células de linhagem macrofágica RAW 264.7 infectadas com promastigotas e amastigotas de *L. major* através do silenciamento do IGF-I pela técnica de RNA de interferência (siRNA). Foi observado uma diminuição significante do parasitismo no grupo tratado com siRNA quando comparado ao grupo controle sem siRNA. Também foi observado que nos grupos tratados com siRNA e estimulados com as citocinas do tipo Th2 (IL-4, IL-13 e ambas simultaneamente), o grau do parasitismo não aumentou como esperado em resposta a essas citocinas. No entanto, o parasitismo aumentou em resposta as citocinas mediante a reposição utilizando IGF-I recombinante (rIGF-I). Esses resultados sugeriram que a presença do IGF-I é necessária para promover a proliferação de *L. major*. Também foi demonstrado que IL-4 e IGF-I compartilham a mesma via de sinalização celular e que o silenciamento

de IGF-I levou a inefetividade dessas citocinas durante a infecção, concluindo que o IGF-I é um fator efetor de IL-4, levando a um perfil M2 de ativação dos macrófagos envolvendo a via PI3K/AKT durante a infecção por *L. (L.) major*[54].

A partir desses resultados encontrados no grupo, propusemos utilizar esse mesmo sistema na infecção por *L. amazonensis*, para saber se o comportamento entre diferentes espécies seria semelhante. Nossos dados mostraram uma relação com os dados encontrados com *L. major* na qual há uma maior expressão do mRNA de *Igf-I* nos grupos estimulados com citocinas Th2 e diminuição da expressão no grupo estimulado com citocinas Th1 nos períodos de 24 e 48 horas. Em 72 horas observamos um perfil diferente com um aumento da expressão do IGF-I em todos os grupos que foram estimulados com citocinas. Esse aumento da expressão de IGF-I em 72h foi semelhante ao encontrado na infecção com amastigotas no modelo *in vitro* de *L. major*[54].

Para que o IGF-I exerça suas funções biológicas, é necessária a interação com seu receptor específico, o IGF-IR. Esses receptores são transmembranares, mediados por seis famílias de proteínas ligantes que circulam pelo sangue controlando a expressão do IGF-I[44]. Os receptores de IGF-IR são formados por duas subunidades α e duas subunidades β. Para que se inicie a cascata de ativação da via do IGF-I ocorre a fosforilação das subunidades β que recrutam outras proteínas. A sinalização consiste em duas vias principais: da MAPK e PI3K[85,86].

Foi descrito que em culturas de promastigotas *in vitro* sem a presença de macrófagos, não foi observada a imunomarcação para IGF-I, comprovando que o parasito não produz esse hormônio[84]. Entretanto, o parasito possui o receptor para IGF-I (IGF-IR) que poderia ser usado na proliferação e sobrevivência desses durante a infecção[83].

Nossos dados não mostraram um aumento na expressão do receptor de IGF-I na análise por PCR em tempo real. Apesar de observarmos o aumento na expressão do IGF-I, o aumento não se manteve proporcional à expressão do receptor. Esse resultado pode ser explicado por um mecanismo de *feedback* negativo, demonstrado em células endoteliais e linfoides, em que o aumento da concentração de IGF-I está diretamente relacionado com a diminuição do número de seu receptor[87,88].

Esses resultados demonstram a participação das citocinas Th1 e Th2 na modulação da expressão do IGF-I e sugerem sua possível influência na ação das citocinas na interação macrófago-*Leishmania*.

Para verificar o papel do IGF-I intrínseco na infecção por *L. amazonensis*, propomos silenciar o IGF-I do macrófago pelo silenciamento pós-transcricional utilizando a técnica de RNA de interferência. A inibição do IGF-I atingiu cerca de 90%, índice considerado excelente nesta técnica.

A partir desses dados partimos para verificar o efeito biológico do silenciamento do mRNA de *Igf-I*, avaliando o grau de parasitismo. Observamos uma diminuição significante do parasitismo no grupo tratado com siRNA quando comparado ao grupo controle sem siRNA em 24 e 48 horas. Esses dados corroboram com dados anteriores encontrados por nosso grupo e que demostram que o IGF-I é um importante fator de crescimento para o parasito[50,54].

Na presença de citocinas definidoras do perfil Th1 e Th2, constatamos a diminuição significativa do parasitismo quando os grupos são silenciados para IGF-I e estimulados com as respectivas citocinas em 24 e 48 horas. Esses dados confirmam o papel do IGF-I na infecção por *L. amazonensis* assim como em *L. major*, na qual foi demonstrado componentes comuns entre as vias de sinalização intracelular do IGF-I e de citocinas, concluindo que é necessária a presença do IGF-I para que as citocinas exerçam suas funções, principalmente a citocina IL-4[54].

O conjunto desses resultados abrem novas perspectivas sobre o IGF-I e os efeitos das citocinas no desenvolvimento das leishmanioses. Apontamos mais uma vez a importância do fator de crescimento insulina símile I em células RAW 264.7 infectadas com promastigotas de *L. amazonensis*, resultado muito semelhante ao encontrado anteriormente por nosso grupo com a mesma linhagem celular, porém infectada com promastigotas de *L. major*.

Muito se tem pensado a respeito do possível papel do IGF-I como alvo terapêutico dado suas ações pleiotrópicas. Entretanto, muitos pontos ainda precisam ser elucidados, principalmente em relação ao papel do IGF-I no estabelecimento das leishmanioses *in vivo*. Por exemplo, pacientes com lesão difusa ou cutânea ativa o IGF-I pode ter um efeito tanto benéfico como deletério, dependendo da espécie de *Leishmania*, e do tipo de lesão desses pacientes[88]. No entanto, como se trata de uma

doença multifatorial, alguns pontos ainda precisam ser investigados nas leishmanioses principalmente no que diz respeito ao estudo das vias de sinalização intracelular.

7 CONCLUSÕES

Nesse estudo com células da linhagem macrofágica RAW 264.7 *in vitro* infectadas com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, sob estímulos de citocinas IFN-γ, IL-4 e IL-13, chegamos às seguintes conclusões:

a) Na avaliação do parasitismo, citocinas Th2 levam a um aumento do parasitismo associado a um aumento da atividade da arginase, corroborando com os dados da infecção com *L. major*;
b) Sob estímulo de IFN-γ, foi observado um aumento do parasitismo e um aumento da produção de óxido nítrico, diferente do observado com outras espécies de *Leishmania*;
c) Quando analisamos a expressão de IGF-I sob efeito de citocinas, foi observada uma diminuição da expressão de mRNA de *Igf-I* quando as células são estimuladas com IFN-γ, e um aumento da expressão quando as células são estimuladas com IL-4 e IL-13, corroborando com os dados da infecção com *L. major*;
d) A expressão de mRNA de *Igf-IR* não acompanhou o aumento na expressão do IGF-I em todos os grupos avaliados;
e) A participação de IGF-I foi analisada silenciando o mRNA de *Igf-I* do macrófago por RNA de interferência. Na ausência do IGF-I foi observado uma diminuição do parasitismo nos períodos avaliados;
f) Em relação ao estímulo com citocinas definidoras do perfil Th1 e Th2 mostramos a diminuição do parasitismo nos grupos silenciados e estimulados com as citocinas, reforçando que independente da citocina, IGF-I é um fator importante para o desenvolvimento do parasito *in vitro*.

Nossos resultados indicam que espécies diferentes de *Leishmania* sofrem ações diversificadas das citocinas relacionadas a resposta imune do hospedeiro. E que nossos resultados reafirmam os dados anteriores encontrados por nosso grupo, salientando além da importância do fator de crescimento, a premissa de que não apenas

as citocinas são importantes para o desenvolvimento do parasito e estabelecimento da doença.

REFERÊNCIAS

1- Sacks DL, Louis JA, Wirth DF. Leishamaniasis. In: Warren KS, editor. Immunology and molecular biology of parasitic infections. Boston: Blackwell Scientific Publications. Boston. 1993; p.237-68.

2- WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniases & World Health Organization. Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Commitee on the Control of Leishmaniases. Geneva, 22-26 March 2010.

3- Silveira FT. Imunopathogenic compentences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *Leishmania (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. Parasite Imunol. 2009; 31:423-31.

4- Sacks DL. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. Exp Parasite. 1989; 69(1):100-3.

5- Walters LL. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sandfly hosts. J Eukaryotic Microbiol. 1993; 40(2):196-206.

6- Lewis DJ, Ward RD. Transmission and vectors. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editores. The leishmaniasis in biology and medicine. London: Acad Press; 1987. p. 235-62.

7- Lindoso JA, Goto H. Leishmaniose Visceral. In: Lopes AC, organizador. Tratado de Clínica Médica. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016; p.3172-82.

8- Center for disease control. Leishmaniasis. 2017. Disponível em: https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html

9- Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editores. The leishmaniasis in biology and medicine. London: Academic Press; 1987. p.1-12.

10- Reis AB, Gontijo CMF. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Neves DP, Melo AL, Linardi, PM, Vitor, RW, organizadores. Parasitologia humana, 12ª edição. São Paulo: Atheneu, 2012; p.49-65.

11- Brasil. BVS/MS. Leishmaniose tegumentar. 2017. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/leishmaniose_tegumentar.pdf

12- Brasil. Ministério da Saúde. Manual da vigilância da leishmaniose tegumentar. Brasília: Ministério da Saúde; 2017.

13- Silveira F. Leishmaniose cutânea difusa (LCD) na Amazônia, Brasil: aspectos clínicos e epidemiológicos. Gaz Médica da Bahia. 2009; 79(3):25-29.

14- Brasil. Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde. 2017. Disponível em: http://saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-tegumentar

15- Thomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux JA, Pratlong F. Martini-Dumas A, Serres E. Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. Ann Parasitol Hum Comp. 1993; 68(2):107-8.

16- Rey L. Parasitologia. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; Leishmanioses cutâneas e mucocutâneas do novo mundo. 2001; p.62-74.

17- Sacks DL, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. Nat Rev Immunol. 2002; 2:845-58.

18- Lainson R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. Rev. Pan-Amaz Saúde. 2010; 1(2):1-20.

19- Ritting MG, Bogdan C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. Parasitol Today. 2000; 16(7):292-7.

20- Muxel SM, Aoki JI, Fernandes JC, Laranjeira-Silva MF, Zampieri RA, Acuña SM, *et al*. Arginine and polyamines fate in *Leishmania* infection. Front Microbiol. 2018 Jan 15;8:2682.

21- Sacks DL, Pimenta PF. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sandy fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosglycan. J Exp Mes. 1995; 181(2): 685-97.

22- Descouteaux A, Turco SJ. Glycoconjulgates in *Leishmania* infectivity. Biochim biophys Actc. 1999; 1455(3):341-52.

23- Silva-López RE. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. 2010. Quim Nova. 33(7):1541-8.

24- Van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, *et al*. Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages. J Immunol. 2004; 173(11):6521-5.

25- Assis FP. Participação do fator de crescimento insulina simili-I na imunidade específica na infecção por *Leishmania (L.) major* (Dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo; 2008.

26- Hibbs JB, Taintor RR. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. Biochem Biophys Res Commun. 1987; 157(1):87-94.

27- Reczkowski RS, Ash EP. Evidence for Binuclear Mn(II) Centers in Rat Liver Arginase. J Am Chem Soc. 1992; 114:10992-4.

28- Melos JL, Echevarria A. Sistemas Enzimáticos de Tripanossomatídeos como Potenciais Alvos Quimioterápicos. Rev Virtual Quim. 2012; 4(4):374-92.

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

30- Wanasen N, Xin L, Soong L. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. Int J Parasitol. 2008; 38(4): 417-29.

31- Sacks D, Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. Nat Immunol. 2002; 3(11):1041-7.

32- Locksley RM, Heinzel FP, Saddick MD, Holaday BJ, Gardner Jr KD. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. Immunol. 1987; 138(5):744-9.

33- Qi H, Ji J, Wanasen N, Soong L. Enhanced Replication of *Leishmania amazonensis* Amastigotes in Gamma Interferon-Stimulated Murine Macrophages: Implications for the Pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis. Infec Immun. 2004; 72(2):988–95.

34- Côrtes DF, Carneiro MBH, Santos LM, Souza TCO, Maioli TU, Duz AL, *et al.* Low and high-dose intradermal infection with *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* in C57BL/6 mice. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010; 105(6):736-45.

35- Soong L, Chang CH, Sun J. Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. J Immunol. 1997; 158(11): 5374–83.

36- Bogdan, C, Rollinghoff M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. Inter J Parasitol. 1998; 8:121-34.

37- Gumy A, Louis JA, Pascal L. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. Inter J Parasitol. 2004; 34:433–44.

38- Shankar AH, Titus RG. T-cell and non-T-cell compartments can independently determine resistance to *Leishmania major*. J Exp Med. 1995; 181:845-55.

39- Wanasen N, MacLeod CL, Ellies LG, Soong L. L-Arginine and Cationic Amino Acid Transporter 2B Regulate Growth and Survival of *Leishmania amazonensis* Amastigotes in Macrophages. Infect and Immun. 2007; 75(6):2802-10.

40- Charlab R, Blaineau C, Schetman D, Barcinski MA. Granulocyte-macrophage colony-stimulant factor is a growth factor for promastigotas of *Leishmania Mexicana amazonensis*. J Protozool. 1990; 37(5):352-7.

41- Barral A, Teixeira M, Reis P, Vinhas V, Costa J, Lessa H, *et al*. Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis. Am J Pathol. 1995; 147(4):947-54.

42- Custodio RJ, Oliveira MHA. Fisiologia do Eixo GH-System IGF. Arq Bras Endrocrinol Metab. 2008; 52(5):717-25.

43- 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.

44- Jones JI, Clemmons DR. Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins: Biological Actions. Endoc Reviews. 1995; 16(1):30-4.

45- Smith, TJ. Insulin-Like Growth Factor-I Regulation of Immune Function: A potential therapeutic target in autoimmune diseases. Pharmacol Rev. 2010; 62: 199-236.

46- Leroith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts AT. Molecular and Cellular Aspects of the Insulin-Like Growth Factor I Receptor. Endoc Rev. 1995; 16(2):143–63.

47- Yu H, Rohan T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. J Natl Cancer Inst. 2000; 92(18):1472-89.

48- Goto H, Gomes CM, Corbett CEP, Monteiro HP, Gidlund M. Insulin-like growth factor I is a growth-promoting factor for *Leishmania* promastigotes and amastigotes. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95:1321-16.

49- 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.

50- Vendrame CM, Carvalho M, Rios FJO, Manuli ER, Assis FP, 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*. Scand J of immunol. 2007; 66:287-96.

51- Wynes MW, Riches DW. Induction of macrophage insulin-like growth factor-I expression by the Th2 cytokines IL-4 and IL-13. J Imunnol. 2003; 17:3550-9.

52- Arkins S, Rebeiz N, Biragyn A, Reese DL, Biragyn A, Kelley KW. Interferon-gamma inhibits macrophage insulin-like growth factor I synthesis at the transcriptional level. Mol Endocrinol. 1995; 9:350-60.

53- Bouxsein ML, Rosen CJ, Turner CH, Ackert CL, Shultz KL, Dnahue LR, *et al*. Generation of a new congenic mouse strain to test the relationships among serum insulin-like growth factor I, bone mineral density, and skeletal morphology in vivo. J Bone Miner Res. 2002; 17(4):570-9.

54- Reis LC, Ramos-Sanches EM, Nerland, AH, Valladares MH, Selhein F, Winter LM, *et al*. Insulin-Like Growth Factor-I as an Effector Element f the cytokine IL-4 in the development of a *Leishmania major* infection. Mediators Inflamm, 2018 Jul 29;2018:9787128.

55- Van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN, Stuitje AR. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. Plant Cell. 1990; 2(4):291-9.

56- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression on homologous genes in trans. Plant Cell. 1990; 2(4):279-89.

57- Baulcombe D. RNA silencing. Curr Biol. 2002; 12(3):82-4.

58- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas AS, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-standed RNA in *Caenorhabditis elegans.* Nature. 1998; 391:806-11.

59- Hannon GJ. RNA interference. Nature. 2002; 418(6894):244-51.

60- Faramiglio L. Uma possível ferramenta genética contra o câncer: o RNA de interferência.2007.Disponívelem:http://www.temasbio.ufscar.br/?q=artigos/uma-poss%C3%ADvel-ferramenta-gen%C3%A9tica-contra-oc%C3%A2ncer-o-rna-de-interfer%C3%AAncia

61- Gil J, Esteban M. Induction of apoptosis by the dsRNA dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. Apoptosis. 2000; 5(2):107-14.

62- Paddison PJ, Caudy AA, Hannon GJ. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99(3):1443-8.

63- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotides RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature. 2001; 411(6836):494-8.

64- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids. Anal Biochem. 1982; 126:131-8.

65- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in Real-Time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001; 29:2002-7.

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

67- Guimarães ET, Santos LA, dos Santos RR, Teixeira MM, Santos WLC, Soares MPB. Role of interleukin-4 and prostaglandin E2 in *Leishmania amazonensis* infection of BALB/c mice. Microbes Infect. 2005; 8:1219-26.

68- Jones DE, Buxbaum LU, Scott P. IL-4-Independent Inhibition of IL-12 Responsiveness During *Leishmania amazonensis* Infection. J Immunol. 2000; 165:364-72.

69- Hurddayal R, Brombacher F. The role of IL-4 and IL-13 in cutaneous leishmaniasis. Immunol Lett. 2004; 161:179-83.

70- Mohrs M, Ledermann B, Köhler G, Dorfmüller A, Gessner A, Brombacher F. Differences Between IL-4- and IL-4 Receptor α-Deficient Mice in Chronic Leishmaniasis Reveal a Protective Role for IL-13 Receptor Signaling. J Immunol. 1999; 162:7302-8.

71- Jones DE, Buxbaum LU, Scott P. IL-4-Independent Inhibition of IL-12 Responsiveness During *Leishmania amazonensis* Infection. J Immunol. 2015; 165:364-72.

72- Alexander J, Brombacher F, McGachy HA, McKenzie AN, Walker W, Carter KC. An essential role for IL-13 in maintaining a non-healing response following *Leishmania mexicana* infection. Eur J Immunol. 2002; 32:2923-33.

73- Ferrante CJ, Pinhal-Enfield G, Elson G, Haski G, Outram S, Leibovich SJ. The Adenosine-Dependent Angiogenic Switch of Macrophages to an M2-Like Phenotype is Independent of Interleukin-4 Receptor Alpha (IL-4Rα) Signaling. Inflammation. 2013; 36:921–31.

74- Laranjeira-Silva MF, Floeter-Winter LM. Arginase in *Leishmania*. Subcell Biochem. 2014; 74:103-14.

75- Giudice A, Camada I, Leopoldo PTG, Pereira MBJ, Riley LW, Wilson ME, *et al*. Resistence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in tegumentary leishmaniasis. BMC Infec Dis. 2007; 7(7):1-12.

76- Costa MT, Fabeni RC, Aptekmann KP, Machado RR. Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias. Cienc Rural. 2003; 33(5):967-74.

77- Vespa GN, Silva JS. Oxido nítrico (NO): produção e significado fisiológico durante as infecções. 1994. Rev Pat Trop. 23(1):1-23.

78- Laranjeira-Silva MF, Zampieri RA, Muxel SM, Beverley SM, Floeter-Winter LM. *Leishmania amazonensis* arginase compartmentalization in glycosome is important for parasite infectivity. Plos One. 2012;7(3):e34022.

79- DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. Cell Metab. 2008; 7:11-20.

80- Walenta S, Salameh A, Lyng H, Evensen JF, Mitze M, Rofstad EK, *et al*. Correlation of High Lactate Levels in Head and Neck Tumors with Incidence of Metastasis. Am J Pathol. 1997; 150(2): 409-15.

81- Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, *et al*. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. Nature. 2014; 513:559-63.

82- Gomes CM, Goto H, Ribeiro da Mata, VL, Laurenti MD, Gidlund M, Corbett CE. Insulin like growth factor-I affects parasite growth and host cell migration in experimental cutaneous leishmaniasis. Int J Exp Pathol, 2000; 81:249-55.

83- Reis LC. Influência do fator de crescimento insulina-símile I no efeito de citocinas na resistência e suscetibilidade na leishmaniose cutânea murina por *Leishmania (Leishmania) major* (Tese). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo; 2013.

84- Carvalheira JB, Zecchin HG, Saad MJ. Vias de sinalização da insulina. Arq Bras Endocrinol Metab. 2002; 46:419-25.

85- Laviola L, Natalicchio A, Perrini S, Giorgio F. Abnormalities of IGF-I signaling in the pathogenesis of diseases of the bone, brain and fetoplacental unit in humans. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2008; 295(5):991-9.

86- Rosenfeld RG. Characterization of the somatomedin-c/insulin-like growth factor I (SM-C/IGF-I) receptor on cultured human fibroblast monolayers: regulation of receptor concentration by SMC/IGF-I and insulin. J Clin Endocrinol Metab. 1982; 55:434-40.

87- Yamamoto H, Prager D, Yamasaki H, Melmed S. Rat pituitary GC cell insulin-like growth factor I receptor regulation. Endocrinology. 1993; 133:1420-5.

88- Souza LD, Vendrame CM, de Jesus AR, Carvalho MD, Magalhães AS, Schriefer A, *et al*. Insulin-like growth fator-I sérum levels and their biological effects on *Leishmania* isolates from different clinical forms of American Tegumentary leishmaniasis. Parasit Vectors. 2016 Jun 11;9(1):335.