UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

ARIANE FARIAS LEAL

Influência do fator de crescimento insulina-símile (“insulin-like growth factor” = IGF) -I no parasitismo de macrófagos peritoneais de camundongos por *Leishmania (L.) infantum*

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical 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
2016

ARIANE FARIAS LEAL

Influência do fator de crescimento insulina-símile (“insulin-like growth factor” = IGF-I) no parasitismo de macrófagos peritoneais de camundongos por *Leishmania (L.) infantum*

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical 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
2016

Ficha catalográfica

Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo

© Reprodução autorizada pelo autor

Leal, Ariane Farias

Influência do fator de crescimento insulina-símile (“insulin-like growth factor” = IGF-I) no parasitismo de macrófagos peritoneais de camundongos por *Leishmania (L.) infantum* / Ariane Farias Leal. – São Paulo, 2016.

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 INFANTUM. 2. FATOR DE CRESCIMENTO INSULIN-LIKE I. 3. PARASITISMO. 4. RNA. 5. ÓXIDO NÍTRICO. 6. EXPRESSÃO GÊNICA.

USP/IMTSP/BIB-20/2016.

Dedico ao meu pai, minha eterna fonte de inspiração.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Dra. Hiro Goto pela orientação no desenvolvimento desse projeto e pela oportunidade.

À Dra. Luiza Reis e ao Dr. Eduardo Ramos-Sanchez por sua competência e especial atenção nas revisões e sugestões, fatores fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Aos professores, funcionários e alunos do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

À Universidade Federal do Piauí (UFPI).

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

À Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro ao projeto e pela bolsa de mestrado (processo 2014/08340-8).

RESUMO

Leal AF. Influência do fator de crescimento insulina-símile (“insulin-like growth factor” = IGF-I) no parasitismo de macrófagos peritoneais de camundongos por *Leishmania (L.) infantum* (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2016.

Nas leishmanioses, sabe-se que tanto na resistência quanto na suscetibilidade à infecção, a resposta imune celular é considerada a mais importante. No entanto, na fase inicial, fatores inespecíficos estão sendo considerados fundamentais na determinação do curso da doença, como o fator de crescimento insulina-símile I (“insulin-like growth factor”-IGF-I). Em trabalhos anteriores realizados no grupo de pesquisa da Profa. Dra. Hiro Goto mostraram que IGF-I extrínseco favorece a proliferação do parasito e progressão da infecção, com diminuição na produção de óxido nítrico e ativação da arginase de macrófagos e do parasito. Sabendo que os macrófagos produzem intrinsecamente IGF-I, avaliamos o efeito do fator intrínseco no parasitismo em macrófagos de camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) infantum* silenciando a expressão do RNA mensageiro (mRNA) de IGF-I na célula pela técnica de RNA de interferência (siRNA). Iniciamos avaliando a expressão do mRNA de IGF-I e do seu receptor (IGF-IR). Foi observado uma diminuição de 1,4 vezes da expressão do mRNA de IGF-I em 24 horas e um aumento de 1,5 vezes em 48 horas quando comparado com o grupo controle. Também foi observado um aumento na expressão de mRNA do receptor de IGF-I em 24 como em 48 horas nos grupos infectados quando comparado com o grupo controle. Com o silenciamento do IGF-I por siRNA, houve diminuição da expressão de mRNA do IGF-I no macrófago em torno de 71% em 24 horas e de 51% em 48 hora. Na ausência ou diminuição do IGF-I no macrófago, observou-se uma diminuição do parasitismo na infecção com promastigotas, sendo o parasitismo recuperado com a reposição de IGF-I extrínseco no sistema, atestando a importância de IGF-I na proliferação do parasito. Esses resultados reforçam a importância do IGF-I na infecção por *L. infantum*, sugerindo que o IGF-I está diretamente relacionado ao parasitismo.

Descritores: *Leishmania infantum*; Fator de crescimento insulina símile I; Parasitismo; RNA; Óxido nítrico; Expressão gênica.

ABSTRACT

Leal AF. Influence of Insulin-like growth factor (IGF) -I on the parasitism of mice peritoneal macrophages by *Leishmania (L.) infantum* (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2016.

In leishmaniasis, it is known that in both resistance and susceptibility to infection, the cellular immune response is considered the most important. However, in the initial phase, nonspecific factors are being considered as fundamental in determining the course of the disease, such as insulin-like growth factor I (IGF-I). Studies carried out in the research group of Profa. Dr. Hiro Goto showed that extrinsic IGF-I favors parasite proliferation and infection progression, with decrease in nitric oxide production and activation of arginase of macrophages and parasite. It is known that macrophages produced IGF-I (intrinsic IGF-I), thus, in the present study we have investigated the effect of the intrinsic factor in the parasitism on macrophages of BALB/c mice infected with *L. (L.) infantum* by silencing the expression of messenger RNA (IGF-I mRNA) in the cell by the interference RNA technique (siRNA). We started evaluating the expression of IGF-I mRNA and its receptor (IGF-IR). A 1.4-fold decrease in IGF-I mRNA expression was observed in 24 hours and a 1.5-fold increase in 48 hours as compared to the control group. An increase in mRNA expression of the IGF-IR was also observed in 24 as well as in 48 hours in the infected groups as compared to the control group. With IGF-I silencing by siRNA, there was a decrease in IGF-I mRNA expression in the macrophage around 71% in 24 hours and 51% in 48 hours. In the absence or decrease of IGF-I in the macrophage, a decrease in the parasitism in the infection with promastigotes was observed, and the parasitism recovered with the replacement of extrinsic IGF-I in the system, confirming the importance of IGF-I in the proliferation of the parasite. These results reinforce the importance of IGF-I in *L. infantum* infection, suggesting that IGF-I is directly related to the parasitism.

Descriptors: *Leishmania infantum*; Insulin-like growth factor I; Parasitism; RNA; Nitric oxide; Gene Expression.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral:	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 Animais	14
3.2 Cepa de <i>Leishmania</i>	14
3.3 Manutenção de cepa de <i>L. (L.) infantum</i>	14
3.4 Obtenção de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i>	14
3.5 Obtenção de macrófagos do peritônio de camundongos	15
3.6 Obtenção de células de medula óssea de camundongos	15
3.7 Diferenciação das células provenientes da medula óssea em macrófagos	15
3.8 Crescimento parasitário sob estímulo de IGF-I	16
3.9 Teste de viabilidade de macrófagos sob efeito de IGF-I	16
3.10 Infecção de macrófagos de BALB/c com promastigotas de <i>Leishmania</i>	16
3.11 Avaliação do parasitismo celular	17
3.12 Dosagem de óxido nítrico (NO)	17
3.13 Detecção e quantificação de IGF-I	18
3.13.1 Purificação de RNA	18
3.13.2 Obtenção do cDNA (RT-PCR)	18
3.13.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)	18
3.14 Silenciamento de expressão de mRNA de IGF-I por siRNA	19
3.15 Análise Estatística	20
4 RESULTADOS	21
4.1 Efeito do IGF-I na <i>Leishmania</i>	21
4.2 Padronização da infecção de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c com promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i>	22

4.3 Análise da viabilidade celular	24
4.4 Efeito do IGF-I no parasitismo em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c com promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i>	27
4.5 Padronização da infecção de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c com promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> testando diferentes períodos de incubação e tempos de infecção.	28
4.6 Avaliação da expressão de IGF-I na infecção de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c com <i>Leishmania (L.) infantum</i>	34
4.7 Avaliação da expressão do receptor de IGF-I na infecção de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c com <i>Leishmania (L.) infantum</i>	35
4.8 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) na infecção de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c infectados com <i>Leishmania (L.) infantum</i>	36
4.9 Análise do efeito do silenciamento (siRNA) da expressão do IGF-I por PCR em tempo Real	37
4.10 Efeito do silenciamento da expressão de mRNA de IGF-I por siRNA sobre o parasitismo de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c infectados com <i>Leishmania (L.) infantum</i>	39
4.11 Efeito do silenciamento da expressão de mRNA de IGF-I por siRNA sobre a produção de óxido nítrico em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c infectados com <i>Leishmania (L.) infantum</i>	41
5 DISCUSSÃO.....	42
6 CONCLUSÕES.....	47
REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças endêmicas com altos índices de morbidade e mortalidade e são consideradas um dos principais problemas de saúde pública, com uma incidência mundial de 12 milhões de casos/ano. Atualmente, as leishmanioses têm uma larga distribuição geográfica e são agora relatadas em áreas consideradas anteriormente não endêmicas (1).

O protozoário causador da leishmaniose visceral (LV) nas Américas é um parasito intracelular obrigatório, da família Trypanosomatidae, gênero e subgênero *Leishmania* e espécie *Leishmania (Leishmania) infantum* (2). A LV ou calazar é a forma mais severa das leishmanioses, uma enfermidade generalizada crônica e infecciosa, que acomete preferencialmente órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear, podendo ser fatal ao hospedeiro (3).

Sabe-se que nas leishmanioses a resposta imune celular é considerada a mais importante tanto na resistência quanto na suscetibilidade à infecção (4). No entanto, na fase inicial, fatores inespecíficos estão sendo considerados fundamentais na determinação do curso da doença (5, 6). Além do sistema complemento, produtos reativos de oxigênio e nitrogênio de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos (7) e outros fatores estão sendo considerados importantes nessa fase, dentre eles, o fator de crescimento insulina-símile (“insulin-like growth factor”-IGF)-I. O IGF-I está despertando grande interesse no estudo da imunidade nas leishmanioses a partir de estudos do grupo da Profa. Dra. Hiro Goto (8).

IGFs são polipeptídeos, filogeneticamente bem preservados, presentes na circulação e em macrófagos, com massa molecular de aproximadamente 7,5 kDa, sendo conhecidas duas formas principais, IGF-I e IGF-II (9). Apesar da grande semelhança do IGF-II ao IGF-I, estudos *in vitro* realizados anteriormente pelo grupo da Profa. Hiro demonstraram que somente o IGF-I extrínseco em concentrações fisiológicas induz um aumento na proliferação de promastigotas e amastigotas axênicas de diferentes espécies de *Leishmania*, efeito não observado com o uso de IGF-II (8, 10).

A pré-incubação do parasito com IGF-I, em estudos utilizando modelo experimental, demonstrou promover um aumento significativo do tamanho da lesão e no número de parasitos viáveis no sítio da lesão. Esses resultados sugerem que no interior dos macrófagos o IGF-I favorece o crescimento do parasito, e que tenha uma importante

participação na resposta imune inata da infecção (11). Os macrófagos dependendo de como eles vão ser ativados podem destruir o parasito ou favorecer sua proliferação, pelos produtos da L-arginina. As duas vias principais que influenciam na infecção por leishmânia são: 1) a L-arginina no macrófago pode ser catabolizada pela indução do óxido nítrico sintase (iNOS) para produzir NO; 2) a L-arginina, pela ativação da arginase, pode resultar na síntese de poliaminas (putrescina, espermidina, espermina). Ambas as vias depende do tipo de estímulo extracelular (12).

Em trabalhos anteriores foi observado 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 na interação de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* em macrófago *in vitro* (13). Todos esses resultados foram observados com IGF-I extrínseco, ou seja com adição de IGF-I recombinante. No entanto, macrófagos expressam constitutivamente IGF-I no seu interior (14-16). Recentemente foi analisado pelo nosso grupo o efeito de IGF-I produzido pelo macrófago na interação *Leishmania major*-macrófago e sua participação na modulação do efeito de citocinas, utilizando célula de linhagem macrofágica RAW 264.7 e macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Os resultados apontam a importância do IGF-I na suscetibilidade à infecção além de demonstrar que o IGF-I está distribuído por toda região citoplasmática e co-localiza com o parasito (17).

No entanto, as espécies de *Leishmania* têm comportamentos diferentes na interação com o hospedeiro (8), e principalmente com o tipo de resposta desenvolvida pelo hospedeiro. A participação de células T e da subpopulação de linfócitos T $CD4^+$ no processo para cura ou agravamento da doença, não é observada com *L. amazonensis* nem com outras espécies, e observa-se que a resistência ou suscetibilidade em camundongos infectados relacionada com o balanço Th1 versus Th2 é bem caracterizada para *L. major* (18). Embora suscetível, a linhagem de camundongos BALB/c, modelo mais estudado na leishmaniose visceral, desenvolve uma infecção progressiva somente durante as duas primeiras semanas e depois a infecção é controlada pela resposta imune do hospedeiro. Neste modelo, suscetibilidade envolve a IL-10, mas não é clara a participação da citocina IL-4. Em animais imunes, com a reinfeção, os elementos envolvidos na resistência são diferentes, isto é, participam células T $CD8^+$ e IL-2 (18) enquanto que na resistência envolve tanto células T $CD4^+$ e $CD8^+$, e interleucina (IL) -2, IFN- γ e IL-12, esta última em um mecanismo independente de IFN- γ e ligada à produção do fator de transformação do crescimento (“transforming growth factor” =TGF)- β . Este modelo animal é comparável aos casos oligossintomáticos auto-

controlados e, portanto, é útil para o estudo da resposta imune protetora.

Além da avaliação do efeito da adição de IGF-I, sabendo que os macrófagos produzem intrinsecamente IGF-I (17), avaliamos o efeito do fator intrínseco silenciando a expressão do RNA mensageiro (mRNA) de IGF-I na célula. A técnica de RNA de interferência (RNAi) conhecida como uma técnica “knock-down”, é um silenciamento pós-transcricional, temporária, que é iniciada quando uma longa dupla fita de RNA (dsRNA) é inserido na célula. Essa dsRNA é reconhecida pela enzima Dicer, uma ribonuclease do tipo III (RnaseIII), que cliva essa longa dsRNA em pequenos duplexes de nucleotídeos conhecidos como pequenos RNA de interferência (small interfering RNA – siRNA) de aproximadamente, 21-25 nucleotídeos. Os siRNAs apresentam 2 nucleotídeos livres (*overhang*) na extremidade 3' OH que vão ser importantes no reconhecimento do complexo RISC (complexo de silenciamento induzido por RNA). Os siRNAs produzidos pela Dicer são reconhecidos pelo complexo RISC, que é um conjunto de nucleases da família das Argonautas, que separam essa dupla fita e uma das fitas é incorporada nesse complexo, sendo chamada de fita guia. Essa fita guia quando encontra sua sequência complementar no RNA mensageiro, através da ribonuclease *Slicer* presente no RISC, cliva esse mRNA e essa sequência não vai ser traduzida (19).

Embora o silenciamento gênico em macrófagos peritoneais e de medula óssea de camundongos seja considerado uma técnica difícil, alguns trabalhos já mostraram que é possível (20-23). Essa técnica do RNA de interferência já vem sendo utilizada no nosso grupo no modelo de infecção com *L. major*. Nesse estudo foi demonstrado que na ausência ou diminuição do IGF-I no macrófago, por esta abordagem, observou-se uma diminuição do parasitismo na infecção com promastigotas, sendo o parasitismo recuperado com a reposição de IGF-I extrínseco no sistema, atestando a importância de IGF-I na proliferação do parasito (17).

Diante da existência de diferenças consideráveis em relação a resposta do hospedeiro a diferentes espécies de *Leishmania*, como demonstrado por nosso grupo com *L. (L.) major* e em andamento com *L. (L.) amazonensis*, desenvolvemos neste projeto, o estudo para avaliar o efeito de IGF-I na interação *Leishmania (L.) infantum*-macrófago, através da adição de IGF-I recombinante e pelo silenciamento da expressão do RNA mensageiro de IGF-I na célula pela técnica de RNA de interferência.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Investigar o efeito de IGF-I no parasitismo em macrófagos de camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) infantum*.

2.2 Objetivos Específicos:

- a) Avaliar o efeito de IGF-I extrínseco na proliferação de promastigotas de *L. (L.) infantum* em cultura;
- b) Avaliar o parasitismo, em macrófagos peritoneais e de medula óssea de camundongos BALB/c, sob estímulo do IGF-I extrínseco;
- c) Avaliar a produção de óxido nítrico, em macrófagos peritoneais e de medula óssea de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) infantum*, sob estímulo do IGF-I extrínseco;
- d) Avaliar a expressão de IGF-I intrínseco na infecção de macrófagos de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) infantum*;
- e) Avaliar a expressão do receptor de IGF-I (IGF-IR) na infecção de macrófagos de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) infantum*;
- f) Analisar o efeito da inibição de IGF-I intrínseco no parasitismo na infecção de macrófagos com *Leishmania (L.) infantum* após silenciamento do IGF-I por RNA de interferência.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos BALB/c de 45 a 60 dias de idade, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP, na quantidade de 15 animais mensais, e hamsteres, 10 animais a cada 4 meses, e que foram mantidos no Biotério de Experimentação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, USP, sob temperatura controlada, alimentados com ração balanceada e água a vontade. Todo protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animal do IMT (nº 086/14 e 087/14).

3.2 Cepa de *Leishmania*

A cepa de *Leishmania* utilizada nesse projeto foi a *Leishmania (Leishmania) infantum* (MHOM/72/cepa46).

3.3 Manutenção da cepa de *L. (L.) infantum*

Para manutenção da cepa foram infectados hamsters a cada 4 meses. Os animais foram anestesiados com isoflurano (BaxterHealthcare, EUA), por via inalatória (concentração alveolar mínima de 1,5%), e posteriormente foram inoculados intraperitonealmente com homogeneizado de baço contendo amastigotas de *L. (L.) infantum* proveniente de baço de animal infectado.

3.4 Obtenção de promastigotas de *L. (L.) infantum*

As formas promastigotas foram obtidas a partir de cultura de amastigotas em meio 199 (Invitrogen, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cripion, Brasil) inativado a 56° C por 30 minutos, 2% de urina humana filtrada, acrescido de penicilina 100UI/mL, gentamicina 10µg/mL, L-glutamina 2mM, Hepes 10 mM e Hemina 20mg/mL e mantidas em estufa a 26°C. Promastigotas em fase estacionária de crescimento foram utilizadas nos ensaios de infecção de macrófago.

3.5 Obtenção de macrófagos do peritônio de camundongos

Os macrófagos foram obtidos do peritônio de camundongos pela injeção de 5mL de solução salina tamponada com fosfato 0,01M PH 7,0 (PBS). Após suave massagem do abdômen, o líquido foi aspirado e as células foram recuperadas por centrifugação 250 x g por 10 minutos a 4°C. O botão celular foi ressuspensão em meio RPMI 1640 (LGC, Brasil) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e, após análise da viabilidade pela exclusão de azul de Trypan 0,4% e contagem em câmara de Neubauer, a concentração celular foi acertada de acordo com o protocolo.

3.6 Obtenção de células de medula óssea de camundongos

Os fêmures foram obtidos de camundongos machos BALB/c. Após a eutanásia, os camundongos foram pulverizados com álcool iodado e os fêmures foram dissecados com uma tesoura, liberando o seguimento ósseo com um corte na tíbia abaixo das articulações do joelho e, no outro extremo, no osso pélvico perto da articulação do quadril. Os músculos ligados ao osso foram removidos usando gaze limpa e os fêmures foram colocados em um tubo contendo PBS estéril. Os ossos foram lavados com uma seringa de 10 mL com meio RPMI 1640 (LGC, Brasil), para fazer a extrusão de medula óssea em um tubo de 15 mL. A suspensão de células gerada posteriormente é chamada de células de medula óssea frescos.

3.7 Diferenciação das células provenientes da medula óssea em macrófagos

Células da medula óssea fresca foram obtidas para gerar macrófagos derivados da medula óssea, utilizando sobrenadante de células L929 de meio condicionado (LCCM) como uma fonte de fator estimulador de colônias de granulócito/macrófago (24). As células foram ressuspensas em 10 ml de RPMI1640 suplementado com 20% de soro fetal de bovino, 30% LCCM, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina, e glutamina 2 mM. As células foram semeadas em placas de Petri (BD Biosciences) e incubadas a 37°C em 5% de CO₂. Quatro dias após a semeadura das células, um adicional de 10 ml de sobrenadante de células L929 de meio condicionado (LCCM) foram adicionados por placa e incubando-se por mais 3 dias. Para obter macrófagos derivados da medula óssea, os sobrenadantes foram descartados e as células

aderidas foram lavadas com 10 ml de solução salina tamponada com fosfato 0,01M PH 7,0 (PBS) gelado estéril e incubado por 10min a 4°C. As células foram centrifugadas a 250 x g durante 5 minutos, contadas e o cálculo ajustado para cada procedimento experimental.

3.8 Crescimento parasitário sob estímulo de IGF-I

Promastigotas em início de fase estacionária foram lavadas com meio RPMI 1640 (LGC, Brasil), e centrifugadas por 2100 x g 30 minutos a 4°C. Parasitos foram ressuspensos em meio M199 e a concentração foi acertada após contagem em câmara de Neubauer para 2×10^6 parasitos/mL e colocados em placa de 24 poços em incubadora climatizada a 26°C, onde os parasitos foram estimulados ou não com diferentes concentrações de IGF-I recombinante (100, 50, 25 e 12,5 ng/ml) (R&D Systems, EUA). A contagem dos parasitos foi feita diariamente em microscópio óptico (Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha). O resultado da proliferação de promastigotas de *L. (L.) infantum* foi expresso como a quantidade de parasito por mL.

3.9 Teste de viabilidade de macrófagos sob efeito de IGF-I

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram lavados em meio RPMI 1640 (LGC, Brasil), e acertada a concentração para 2×10^6 células/mL. A seguir 2×10^5 foram colocadas em cada poço de placas de 24 poços (COSTAR) com meio RPMI 1640 (LGC, Brasil), com diferentes concentrações de albumina bovina sérica livre de insulina (BSA insulin-free, A-7888 Sigma, EUA) (0,5, 1 e 2%) e fetal bovine serum/soro fetal bovino (FBS – SFB) (1, 2 e 5%). Macrófagos foram estimulados com IGF-I recombinante (R&D Systems, EUA) nas concentrações de 100 e 50 ng/mL. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis. A viabilidade foi avaliada por teste de exclusão do corante azul de Trypan, após 24 e 48 horas de incubação.

3.10 Infecção de macrófagos de BALB/c com promastigotas de *Leishmania*.

Da suspensão de macrófago com 2×10^6 céls/mL em meio RPMI 1640 (LGC, Brasil), 100µL foram colocados sobre lamínulas redondas estéreis dentro dos poços de

cultura de placas de 24 poços (COSTAR) e foram mantidos em atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C por 2 horas para adesão dos macrófagos nas lamínulas. Após incubação, células não aderidas foram retiradas por lavagem com 1 mL de solução salina tamponada com fosfato 0,01M PH 7,0 (PBS) a 37°C. Após este procedimento, foram adicionados aos poços quantidades variadas de promastigotas na fase estacionária de crescimento em meio RPMI 1640 (LGC, Brasil), acrescido de penicilina 100UI/mL, gentamicina 10µg/mL, L-glutamina 2mM, Hepes 10 mM e BSA livre de insulina (RPMI 1640 completo (LGC, Brasil) nas proporções de parasitos/macrófagos (2:1, 5:1 e 8:1). Nos experimentos, IGF-I recombinante (R&D Systems, EUA) (100, 50 e 25ng/ml) foi adicionado diretamente na cultura de macrófagos infectados e mantidos durante todo o experimento em meio RPMI 1640 completo (LGC, Brasil). Controles só com macrófagos ou macrófagos infectados, sem o estímulo de IGF-I foram mantidos em todos os experimentos. A infecção ocorreu por 2, 4 e 6 horas em incubadora úmida a 37°C com 5% de CO₂ (25). Após este período as placas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato 0,01M PH 7,0 (PBS) a 37°C para retirada dos parasitos não internalizados e a seguir reposto nos poços meio RPMI 1640 completo (LGC, Brasil). As culturas foram mantidas por diferentes períodos de tempo de acordo com o protocolo em incubadora úmida a 37°C com 5% de CO₂. Experimentos foram realizados em triplicatas e os sobrenadantes foram coletados para dosagem do óxido nítrico e as lamínulas foram processadas para avaliação do parasitismo.

3.11 Avaliação do parasitismo celular

As lamínulas foram coradas utilizando Panótico rápido (New Prov), fixadas em lâminas com Entellan (Fisher Scientific). Para avaliação do parasitismo, por microscopia óptica, foram contadas, cegando para as condições experimentais, 200 células por lamínula, totalizando 600 células por experimento, e o resultado final expresso em número de parasitos por 100 células.

3.12 Dosagem de óxido nítrico (NO)

A produção de NO pelas células foi avaliada pela geração de nitrito e suas concentrações foram determinadas por ensaio em microplacas de poliestireno segundo Green et al. (26) modificado. Após a incubação, foi coletado o sobrenadante de cultura.

100 μ L do sobrenadante da cultura foram distribuídos em placas de 96 poços e 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 usando nitrito de sódio (NaNO_2) como padrão e meio RPMI 1640 (LGC, Brasil). Os resultados foram avaliados por leitura espectrofotométrica a 540 nm em aparelho Multiskan MCC/340 P versão 2.20 (Labsystems, Finlândia).

3.13 Detecção e quantificação de IGF-I

3.13.1 Purificação de RNA

Para obtenção de RNA total, 2×10^6 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-1000UV-Vis espectrofotômetro (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE), com a integridade das amostras demonstrada pelo “score” 260/280 (1,8-2,0 foram considerados aceitáveis).

3.13.2 Obtenção do cDNA (RT-PCR)

Aproximadamente 1 μ g de RNA total obtido como supra descrito foi misturado com 12 μ L de uma solução constituída por tampão 5x (Fermentas, EUA), dNTP 10mM (Fermentas, EUA), random primers (Invitrogen, EUA), OLigoDT primers (Invitrogen, EUA), RNase inhibitor cloned 10U/ μ L (Fermentas, EUA), RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase 200U/ μ L (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.

3.13.3 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, 1 μ g de cDNA foram misturados com 12.5 μ L do reagente SYBR®Green (2X) (AppliedBiosystems, EUA), 1 μ L de cada primer a 5.0 pMol e 9.5 μ L de água MilliQ autoclavada.

A quantificação relativa da expressão do RNA mensageiro foi realizada utilizando a comparação do *Thresholdcycle* (C_T) dos genes alvo (IGF-I e IGF-IR) com o gene constitutivo β -actina. Para a análise da expressão normalizaremos 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, calculamos a razão entre o gene alvo e o constitutivo (27).

3.14 Silenciamento de expressão de mRNA de IGF-I por siRNA

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)*. Foi dada preferência para oligonucleotídeos que apresentassem na sua estrutura a porcentagem de GC entre 30% e 55%, o que reduz a formação de estruturas secundárias, além da presença de dinucleotídeos de timina na extremidade 3', o que proporciona maior estabilidade ao siRNA. 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'.

O método de transfecção utilizado foi o de 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 50 μ L de meio DMEM (Sigma, EUA) sem soro fetal bovino (SFB) e 3 μ L de lipofectamina 2000 (Invitrogen, EUA) em 50 μ L de meio DMEM sem SFB foram mantidas a temperatura ambiente por 10 min, homogeneizadas e mantidas durante 30 min a temperatura ambiente para a formação dos complexos lipossomo-siRNA. Após incubação, os complexos foram adicionados aos poços das placas contendo as células. 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 para retirada do complexo siRNA-lipossomo não internalizado. Após este período, foi adicionado meio DMEM acrescido de 1% de BSA livre de insulina e as placas foram incubadas por 24 e 48 horas para avaliação do parasitismo e expressão de mRNA de IGF-I. A porcentagem de inibição (%KD) do IGF-I foi calculada pela fórmula $\%KD = ([1 - 2^{-\Delta\Delta Ct}] \times 100)$, com base na fórmula de quantificação relativa supradescrita.

3.15 Análise Estatística

Os dados foram analisados por métodos paramétricos ou não paramétricos, na dependência da natureza dos resultados. Os resultados foram submetidos ao teste ANOVA ou equivalente e pós-testes. As análises foram realizadas pelo Programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Um erro alfa de 5% ($p = 0,05$) foi considerado para avaliar as diferenças significantes.

4 RESULTADOS

Como o objetivo principal deste projeto foi investigar o efeito do IGF-I no parasitismo em macrófagos de camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) infantum*, avaliamos a expressão do IGF-I e de seu receptor (IGF-IR) na interação macrófago-*Leishmania (L.) infantum*, além da sua correlação com o parasitismo e produção de óxido nítrico. Para poder comprovar com segurança o papel de IGF-I, avaliaram-se esses mesmos efeitos na ausência/diminuição de IGF-I na célula, ou seja, pelo silenciamento do IGF-I por RNA de interferência.

4.1 Efeito do IGF-I na *Leishmania*

Iniciamos nossos experimentos avaliando o comportamento do crescimento da cepa em estudo e o efeito do IGF-I nos parasitos. A infecção de macrófagos só é possível se for conhecida a fase estacionária do crescimento das formas promastigotas de *L. (L.) infantum* para que se tenha uma boa infecção e um resultado satisfatório. Para isso foi feito uma curva de crescimento por um período de onze dias e estabelecida a fase estacionária no 6º dia de crescimento (Figura 1).

Figura 1- Curva de crescimento em duplicata das culturas de promastigotas de *L.(L.) infantum* em meio 199 Hanks, acrescido de 10% de soro fetal bovino.

Para avaliar o efeito de IGF-I sobre a leishmânia, estudamos a proliferação de promastigotas de *L. (L.) infantum* cultivadas na presença deste fator (100, 50, 25 e 12,5 ng/mL) em meio 199 contendo 2% de soro fetal bovino. As formas promastigotas de *L. (L.) infantum* mostraram uma resposta proliferativa na presença de IGF-I. Observamos que as culturas que receberam o IGF-I apresentaram uma maior concentração de parasitos e alcançaram mais rapidamente a fase estacionária em comparação com as culturas não estimuladas (Figura 2). Dessa maneira, optamos pelo uso da concentração de 50 e 100ng/mL de IGF-I para posterior utilização nos ensaios de infecção por serem estas as concentrações fisiológicas e anteriormente padronizadas em trabalhos realizados pelo grupo (10).

Figura 2- Efeito do IGF-I em diferentes concentrações (100, 50, 25 e 12,5 ng/ml) na proliferação de promastigotas de *L. (L.) infantum* em meio 199 suplementado com 2% de soro fetal bovino sem urina. Concentração inicial de parasitos 2×10^5 parasitos/mL.

4.2 Padronização da infecção de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c com promastigotas de *L. (L.) infantum*

Em seguida, padronizamos a melhor proporção de parasito por macrófago a ser utilizada nos experimentos seguintes, testando as proporções 2:1, 5:1 e 8:1 parasitos por

células. Também foi padronizado o tempo de infecção com 2, 4 e 6 horas e o tempo de incubação de 24, 48 e 72 horas para avaliar o parasitismo em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) infantum*. Foram utilizadas duas diferentes fontes de suplementação nutricional, o soro fetal bovino (SFB) e albumina bovina sérica livre de insulina (BSA insulín-free, A-7888 Sigma, EUA) (Figura 3).

De acordo com a figura 3, padronizamos a infecção com 2 horas de infecção, na proporção de 5:1 (parasitos:macrófagos) e os períodos de incubação de 24, 48 e 72 horas para avaliação do IGF-I na infecção. Em relação a comparação feita com SFB 5% e BSA 0,5% livre de insulina, BSA 0,5% se mostrou eficiente em todos os experimentos, dando boas condições de estabilidade para as células, e os resultados obtidos com BSA 0,5% seguiram a mesma tendência dos resultados obtidos com SFB 5% .

Figura 3- Média do parasitismo de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com promastigotas de *L. infantum* em meio RPMI 1640 suplementado com BSA 0,5% (A, B, C) ou SFB 5% (D, E, F) por 2 horas de infecção e com período de incubação de 24 (A, D), 48 (B, E) e 72 horas (C, F) em diferentes proporções de parasitos:macrófagos: 2:1, 5:1 e 8:1. Resultados representados como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ (ANOVA e teste de Tukey's).

4.3 Análise da viabilidade celular

Avaliamos também a viabilidade celular utilizando BSA livre de insulina (0,5%, 1% e 2%) e SFB (1%, 2% e 5%). Utilizando a suplementação do meio RPMI com BSA, podemos observar que com as diferentes concentrações, houve a manutenção da viabilidade dessas células após 24 e 48 horas de incubação (Tabela 1).

Tabela 1- Viabilidade do macrófago sem o efeito de IGF-I

	24 HORAS	48 HORAS
MACRÓFAGO + 0,5% BSA	100%	100%
MACRÓFAGO + 1% BSA	100%	100%
MACRÓFAGO + 2% BSA	100%	100%

Tabela 1- Avaliação da viabilidade de macrófagos (%) em meio enriquecido com BSA livre de insulina. 5×10^5 macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram cultivados em garrafas de culturas com meio RPMI. A viabilidade foi avaliada por teste de exclusão do corante azul de Trypan, após 24 e 48 horas de incubação.

Na análise da viabilidade celular utilizando SFB em diferentes concentrações (1%, 2% e 5%), observamos uma viabilidade celular um pouco menor quando comparado com as células suplementadas com BSA tanto em 24 quanto em 48 horas de incubação (Tabela 2).

Tabela 2- Viabilidade do macrófago sem o efeito de IGF-I

	24 HORAS	48 HORAS
MACRÓFAGO + 1% SFB	80 %	70 %
MACRÓFAGO + 2% SFB	90 %	90 %
MACRÓFAGO + 5% SFB	100 %	100 %

Tabela 2- Avaliação da viabilidade de macrófagos (%) em meio enriquecido com SFB. 5×10^5 macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram cultivados em garrafas de culturas com meio RPMI. A viabilidade foi avaliada por teste de exclusão do corante azul de Trypan, após 24 e 48 horas de incubação.

Em seguida, avaliamos a viabilidade de macrófagos sob efeito de IGF-I utilizando BSA (0,5%, 1%) e SFB (2% e 5%) para afastarmos um possível efeito tóxico do IGF-I sobre o macrófago, utilizando IGF-I na concentração de 50 e 100 ng/mL, pelo teste de exclusão do corante utilizando-se a solução de azul de trypan.

Utilizando a suplementação do meio RPMI com BSA, podemos observar que com as diferentes concentrações, houve a manutenção da viabilidade dessas células após 24 e 48 horas de incubação (Tabela 3).

Tabela 3 - Viabilidade do macrófago com o efeito de IGF-I

	24 HORAS	48 HORAS
MACRÓFAGO + 100ng IGF-I + 0,5% BSA	80,33%	79%
MACRÓFAGO + 50ng IGF-I + 0,5% BSA	74,33%	70%
MACRÓFAGO + 100ng IGF-I + 1% BSA	95,67%	78%
MACRÓFAGO + 50ng IGF-I + 1% BSA	94,67	79%

Tabela 3- Avaliação da viabilidade de macrófagos (%) sob efeito de IGF-I em meio enriquecido com BSA. 5×10^5 macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram cultivados em garrafas de culturas com meio RPMI. A viabilidade foi avaliada por teste de exclusão do corante azul de Trypan, após 24 e 48 horas de incubação.

Na análise da viabilidade celular utilizando SFB nas concentrações 2% e 5%, houve a manutenção da viabilidade dessas células após 24 e 48 horas de incubação (Tabela 4).

Tabela 4 - Viabilidade do macrófago com o efeito de IGF-I

	24 HORAS	48 HORAS
MACRÓFAGO + 100ng IGF-I + 2% SFB	90%	71,67%
MACRÓFAGO + 50ng IGF-I + 2% SFB	91,67%	92,33%
MACRÓFAGO + 100ng IGF-I + 5% SFB	94,67%	91%
MACRÓFAGO + 50ng IGF-I + 5% SFB	92,33	92,667%

Tabela 4- Avaliação da viabilidade de macrófagos (%) sob efeito de IGF-I em meio enriquecido com SFB. 5×10^5 macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram cultivados em garrafas de culturas com meio RPMI. A viabilidade foi avaliada por teste de exclusão do corante azul de Trypan, após 24 e 48 horas de incubação.

4.4 Efeito do IGF-I no parasitismo em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c com promastigotas de *L. (L.) infantum*

Na análise do efeito de IGF-I no parasitismo, observamos que com 24 horas de incubação na proporção de 2 parasitos por macrófago tanto no controle como nos grupos suplementados com 25ng/ml e 50ng/ml de IGF-I não houve diferença no número de parasitos, no entanto, houve um leve aumento no grupo com 100ng/ml de IGF-I (Figura 4).

Na proporção de 5 e 8 parasitos por macrófago, houve um grande aumento no parasitismo quando comparados a proporção anterior de 2 parasitos por macrófago tanto no controle como nos grupos de 25 e 50 ng/ml de IGF-I, e esse aumento foi consideravelmente maior no grupo com 100ng/ml de IGF-I (Figura 4).

Figura 4- Média do parasitismo sob efeito do IGF-I (25, 50 ou 100 ng/ml) em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c com promastigotas de *L. (L.) infantum* em meio RPMI 1640 suplementado com BSA 0,5% por 2 horas de infecção no período de incubação de 24 horas, em diferentes proporções de parasito/macrófago: 2:1 (A) 5:1 (B) e 8:1 (C).

Devido a necessidade de um grande número de animais para se obter grandes quantidades de células peritoneais ao realizar os experimentos, o número total de animais liberados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) foi esgotado, não sendo possível renovação. Dessa forma, células da medula óssea fresca de camundongos BALB/c foram utilizadas nos ensaios posteriores procedendo-se a diferenciação dessas células em macrófagos. Desta forma, novas padronizações foram necessárias. Uma das vantagens de se trabalhar com esse tipo de célula é a necessidade de um número reduzido de animais bem como obtenção de um maior número de células cultivadas em cultura.

4.5 Padronização da infecção de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c com promastigotas de *L. (L.) infantum* testando diferentes períodos de incubação e tempos de infecção

Realizamos a padronização da infecção de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos com promastigotas de *L. (L.) infantum*, para avaliar a melhor proporção de parasito por macrófago a ser utilizada nos experimentos seguintes. Foram utilizadas as proporções 2:1, 5:1 e 10:1 parasitos por células e os tempos de incubação de 24, 48 e 72 horas para avaliação do parasitismo.

Os experimentos foram testados com 2, 4 e 6 horas de infecção e também com duas diferentes fontes de suplementação nutricional: soro fetal bovino (SFB) e albumina bovina sérica livre de insulina (BSA insulín-free, A-7888 Sigma, EUA).

Na avaliação do parasitismo, padronizamos a infecção utilizando BSA (0,5%, 1% e 2%). BSA 1% se mostrou eficiente em todos os experimentos e por isso foi a concentração escolhida. Nos experimentos utilizando BSA 1% como fonte de suplementação observamos um aumento gradual no número de parasitos nos períodos de incubação de 24 (Figura 5A) e 48 horas (Figura 5B). Com 2 horas de infecção, a proporção de 10 parasitos por macrófago (10:1) apresentou um maior parasitismo quando comparado com as outras proporções utilizadas. Não foi possível a análise do parasitismo em 72 horas de infecção.

Figura 5- Média do parasitismo de macrófagos derivados de medula óssea provenientes de camundongos BALB/c com promastigotas de *L. infantum* em meio RPMI 1640 suplementado com BSA 1% em 2 horas de infecção, no período de incubação de 24 (A) e 48 (B) horas em diferentes proporções de parasito/macrófago: 2:1, 5:1 e 10:1. Resultados representados como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ (ANOVA e teste de Tukey's).

Com 4 horas de infecção, observamos um aumento do parasitismo proporcional em relação às proporções parasitos:células (Figuras 6 A, B e C). Como observado com 2 horas de infecção, a proporção de 10 parasitos por macrófago (10:1) apresentou um maior parasitismo quando comparado com as outras proporções utilizadas, tanto em 24 quanto em 48 horas. No período de incubação de 72 horas observamos um pequeno número de parasitos em virtude da maioria das células estarem estouradas.

Figura 6- Média do parasitismo de macrófagos derivados de medula óssea provenientes de camundongos BALB/c com promastigotas de *L. infantum* em meio RPMI 1640 suplementado com BSA 1% em 4 horas de infecção no período de incubação de 24, 48 e 72 horas (A, B e C) em diferentes proporções de parasito/macrófago: 2:1, 5:1 e 10:1. Resultados representados como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ (ANOVA e teste de Tukey's).

Em 6 horas de infecção, a proporção 10:1 apresentou também um maior número de parasitos quando comparado com as outras proporções em todos os períodos de incubação (Figura 7 A, B e C).

Figura 7-Média do parasitismo de macrófagos derivados de medula óssea provenientes de camundongos BALB/c com promastigotas de *L. infantum* em meio RPMI 1640 suplementado com BSA 1% em 6 horas de infecção no período de incubação de 24, 48 e 72 horas (A, B e C) em diferentes proporções de parasito:macrófago: 2:1, 5:1 e 10:1. Resultados representados como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ (ANOVA e teste de Tukey's).

Na avaliação do parasitismo nos experimentos utilizando SFB 5% como fonte de suplementação, observou um aumento gradual no número de parasitos nos períodos de incubação de 24, 48 e 72 horas. Com 2 horas de infecção, a proporção de 10 parasitos por macrófago (10:1) apresentou um maior parasitismo quando comparado com as outras proporções utilizadas (Figura 8 A, B e C). Esses valores se mantiveram próximos quando comparados aos resultados nos grupos suplementados com BSA 1%.

Figura 8- Média do parasitismo de macrófagos derivados de medula óssea provenientes de camundongos BALB/c infectados com promastigotas de *L. infantum* em meio RPMI 1640 suplementado com SFB 5% em 2 horas de infecção no período de incubação de 24, 48 e 72 horas (A, B e C) em diferentes proporções de parasito:macrófago: 2:1, 5:1 e 10:1. Resultados representados como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ (ANOVA e teste de Tukey's).

Com 4 horas de infecção, observamos um aumento do parasitismo proporcional em relação às proporções parasito:célula (Figura 9 A, B e C). A proporção de 5 e 10 parasitos por macrófago (5:1 e 10:1) apresentaram um maior parasitismo no período de incubação de 24 e 48 horas. Já em 72 horas não foi possível fazer a contagem dos parasitos na proporção 10:1 devido as células estarem estouradas. No entanto, esses valores do parasitismo se mantiveram próximos aos resultados encontrados com BSA.

Figura 9- Média do parasitismo de macrófagos derivados de medula óssea provenientes de camundongos BALB/c infectados com promastigotas de *L. infantum* em meio RPMI 1640 suplementado com SFB 5% em 4 horas de infecção no período de incubação de 24, 48 e 72 horas (A, B e C) em diferentes proporções de parasito:macrófago: 2:1, 5:1 e 10:1. Resultados representados como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ (ANOVA e teste de Tukey's).

Em 6 horas de infecção, a proporção 10:1 também apresentou um maior número de parasitos quando comparado com as outras proporções (Figura 10 A, B e C). No período de 72 horas de incubação nos 3 tempos de infecção a maioria das células estava estourada, inviabilizando a contagem do parasitismo principalmente na proporção de 10:1 e por isso esse período foi retirado dos experimentos posteriores

Figura 10- Média do parasitismo de macrófagos derivados de medula óssea provenientes de camundongos BALB/c infectados com promastigotas de *L. infantum* em meio RPMI 1640 suplementado com SFB 5% em 6 horas de infecção no período de incubação de 24, 48 e 72 horas (A, B e C) em diferentes proporções de parasito:macrófago: 2:1, 5:1 e 10:1. Resultados representados como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ (ANOVA e teste de Tukey's).

4.6 Avaliação da expressão de IGF-I na infecção de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c com *Leishmania (L.) infantum*

Inicialmente, analisamos a expressão do RNA mensageiro para o fator de crescimento IGF-I em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c infectados ou não com *Leishmania (L.) infantum*, e estimulados ou não com IGF-I recombinante (rIGF-I).

Em 24 horas, observamos uma diminuição da expressão do IGF-I nos grupos infectados quando comparado com o controle não infectado (Figura 11A). Podemos observar uma diminuição de 1,4 vezes na expressão de IGF-I quando as células foram infectadas comparada com o grupo controle. No grupo estimulado com 100ng/ml de

rIGF-I foi observado uma diminuição de 1,5 vezes, mostrando que o efeito do rIGF-I não está alterando a expressão do mRNA para esse fator produzido pela célula. Em 48 horas, observamos um discreto aumento nos grupos infectados quando comparados com o grupo controle não infectado (Figura 11B). Podemos observar um aumento de 1,5 vezes na expressão de IGF-I quando as células foram infectadas comparada com o grupo controle. No grupo estimulado com 100ng/ml de rIGF-I foi observado um aumento de 1,1 vezes.

Figura 11- Perfil de expressão gênica de IGF-I em macrófagos derivados de medula óssea provenientes de camundongos BALB/c infectadas com promastigotas de *L. infantum* em meio RPMI suplementado com 1% BSA livre de insulina após estímulo ou não com 100 ng/ml IGF-I recombinante (rIGF-I) no período de incubação de 24 horas (A) e no período de incubação de 48 horas (B). As barras representam os níveis de expressão de IGF-I (razão IGF-I/β-actina). Experimento representativo de 3 ensaios independentes.

4.7 Avaliação da expressão do receptor de IGF-I na infecção de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c com *Leishmania (L.) infantum*

Em seguida, analisamos a expressão do RNA mensageiro para o receptor do IGF-I (IGF-IR) em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c infectados ou não com *Leishmania (L.) infantum*, e estimulados ou não com IGF-I recombinante (rIGF-I).

Em 24 horas, observamos um discreto aumento da expressão do receptor de IGF-I nos grupos infectados quando comparado com o controle não infectado (Figura

12A). Podemos observar um aumento de 1,1 vezes na expressão de IGF-IR quando as células foram infectadas comparada com o grupo controle. No grupo estimulado com 100ng/ml de rIGF-I foi observado resultado semelhante com um aumento de 1 vez. Em 48 horas, observamos um significativo aumento nos grupos infectados quando comparados com o grupo controle não infectado (Figura 12B). Podemos observar um aumento de 5,5 vezes na expressão do receptor (IGF-IR) quando as células foram infectadas comparada com o grupo controle. No grupo estimulado com 100ng/ml de rIGF-I foi observado um aumento de 2,7 vezes.

Figura 12- Perfil de expressão gênica do receptor de IGF-I (IGF-IR) em macrófagos derivados de medula óssea provenientes de camundongos BALB/c infectadas com promastigotas de *L. infantum* em meio RPMI suplementado com 1% BSA livre de insulina após estímulo ou não com 100 ng/ml IGF-I recombinante (rIGF-I) no período de incubação de 24 horas (A) e no período de incubação de 48 horas (B). As barras representam os níveis de expressão de IGF-IR (razão IGF-IR/β-actina). Experimento representativo de 3 ensaios independentes.

4.8 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) na infecção de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L.) infantum*

Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* na proporção de 10 parasitos:células por 4 horas de infecção e estimuladas com diferentes concentrações de IGF-I, por um período de incubação de 24, 48 e 72 horas. Após os períodos de incubações, os sobrenadantes foram colhidos para dosagem do óxido nítrico.

No período de incubação de 24h observamos uma redução na produção de óxido nítrico nos grupos estimulados com 50 e 100ng/ml de IGF-I (Figura 13A) em relação ao controle infectado sem IGF-I. A partir de 48h de incubação a produção de óxido nítrico aumentou em relação ao controle e essa produção foi maior nos grupos estimulados com 50 e 100ng/ml de IGF-I (Figura 13B). Em 72 horas de incubação a produção de óxido nítrico foi maior quando comparado com o de 48h (Figura 13C).

Figura 13- Produção de óxido nítrico (média $\pm$ desvio padrão) de macrófagos derivados de medula óssea provenientes de camundongos BALB/c infectadas com promastigotas de *L. infantum* em meio RPM1640 suplementado com 1% BSA, por 4 horas de infecção, na proporção de 10 parasitos:macrófago, no período de incubação de 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C).

4.9 Análise do efeito do silenciamento (siRNA) da expressão do IGF-I por PCR em tempo Real (qPCR)

Visando esclarecer de forma consistente o papel do IGF-I intrínseco no parasitismo, partimos para silenciar a expressão do RNA mensageiro do IGF-I do macrófago, pelo silenciamento pós-transcricional, recorrendo á técnica do RNA de

interferência (siRNA). Essa técnica permite silenciar temporariamente a expressão do IGF-I pela degradação do seu RNA mensageiro.

O protocolo da técnica de silenciamento foi padronizada com o estabelecimento da melhor concentração do siRNA (150 μ M) e do lipossomo (3 μ l) como também do período de incubação de 6 horas do complexo siRNA-Lipossomo. Uma vez estabelecido o protocolo, macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L.) infantum* foram tratadas com siRNA. Após esse período de incubação, as células foram coletadas, o RNA extraído, obtido o cDNA e submetido a qPCR para visualização do silenciamento.

Conforme observado na Figura 14A, o silenciamento do IGF-I por siRNA em 24 horas resultou em inibição da expressão do mRNA em torno de 71%. Também podemos observar que só a infecção com promastigotas de *L. infantum* acarreta uma inibição da expressão do IGF-I, resultados que corroboram os nossos resultados anteriores. Avaliando o silenciamento do IGF-I por siRNA em 48 horas, observamos a inibição da expressão do mRNA em torno de 51% (Figura 14B). Não foi observado silenciamento no grupo infectado com *L. infantum*, diferente do encontrado em 24 horas, no entanto esses resultados corroboram os nossos resultados anteriores.

Figura 14- Porcentagem de inibição da expressão do RNA mensageiro de IGF-I com RNA de interferência (siRNA) em 24 horas (A) e 48 horas (B). Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L.) infantum* e tratadas com a concentração de 150 μ M de siRNA e 3 μ l de Lipossomo. Experimento representativo de 3 ensaios independentes.

4.10 Efeito do silenciamento da expressão de mRNA de IGF-I por siRNA sobre o parasitismo de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L.) infantum*

Após a padronização das condições de cultura e da infecção por *L. (L.) infantum* para avaliar o efeito de IGF-I no parasitismo, realizamos o silenciamento da expressão de mRNA de IGF-I utilizando siRNA.

Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L.) infantum* (10:1) foram transfectadas após a infecção com 150 μ M do IGF-I-siRNA e 3 μ l de Lipossomo por 6 horas em atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C. Após o período de incubação, as células foram mantidas por 24 e 48 horas para avaliação do parasitismo.

Em 24 horas de incubação, foram observados 96 parasitos/100 células (mediana) no grupo controle sem siRNA tendo atingido nível semelhante com o grupo com lipossomo. No grupo tratado com siRNA, observamos uma tendência à diminuição para 62 parasitos/100 células. Esse número aumentou para 145 ao fazer a reposição do rIGF-I com estímulo de 100ng/ml de IGF-I recombinante. Em células estimuladas com lipossomo, a reposição com rIGF-I levou uma diminuição do parasitismo (Figura 15A).

Em 48 horas de incubação, foram observados 127 parasitos/100 células no grupo controle sem siRNA. No grupo estimulado somente com lipossomo o parasitismo teve tendência à queda quando comparado com o controle. No grupo tratado com siRNA, observamos uma diminuição significativa para 40 parasitos/100 células comparado com o grupo controle. Esse número tendeu a aumento para 79 ao fazer a reposição do IGF-I com estímulo de 100ng/ml de rIGF-I. O grupo tratado apenas com lipossomo apresentou tendência ao aumento quando estimulado com rIGF-I quando comparado com seu respectivo controle (Figura 15B).

Figura 15-Parasitismo de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L.) infantum* e tratados com RNA de interferência (siRNA) para IGF-I em 24 horas (A) e 48 horas (B). O resultado é representado pelo número de parasitos por 100 células. Experimento representativo de 2 ensaios independentes. *= $p < 0,05$ (ANOVA e teste de Tukey's).

A Figura 16 mostra os resultados da porcentagem de infecção. No período de 24 horas de incubação, observamos uma porcentagem de infecção de 28,5% (mediana) no grupo silenciado com siRNA, 47,6% de infecção no grupo controle sem siRNA mas 45% no grupo com lipossomo. A infecção tendeu a aumento para 54,5% ao se fazer a reposição com IGF-I recombinante (100 ng/ml) (Figura 16A). No período de 48 horas de incubação, observamos uma porcentagem de infecção de 25,3% no grupo silenciado com siRNA, quando comparado com 59,6% de infecção no grupo controle sem siRNA e com 32,8% no grupo com lipossomo. A infecção aumentou para 46,5% ao se fazer a reposição com IGF-I recombinante (100 ng/ml) (Figura 16B).

Figura 16. Porcentagem de infecção de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L.) infantum* e tratados com RNA de interferência (siRNA) para IGF-I em 24 horas (A) e 48 horas (B). Experimento representativo de 2 ensaios independentes. *= $p < 0,05$ (ANOVA e teste de Tukey's).

4.11 Efeito do silenciamento da expressão de mRNA de IGF-I por siRNA sobre a produção de óxido nítrico em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L.) infantum*

Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L.) infantum* (10:1) foram transfectadas após a infecção com 150 μ M do IGF-I-siRNA e 3 μ l de Lipossomo por 6 horas em atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C. Após o período de incubação, o sobrenadante foi colhido para dosagem do óxido nítrico (NO).

Com 24 horas de incubação, nos grupos tratados com siRNA e com lipossomo observamos uma produção de NO. No grupo controle representado só pelo macrófago, observamos uma produção de NO e quando este mesmo grupo foi estimulado com IGF-I, houve uma tendência a diminuição na produção de óxido nítrico (Figura 17A).

No período de incubação de 48 horas, observamos um aumento da produção de óxido nítrico no grupo controle representado só pelo macrófago em relação a 24 horas. Nos grupos tratados com siRNA observamos uma tendência à aumento na produção de NO quando comparado com o grupo do macrófago infectado e sem estímulo (Figura 17B).

Figura 17- Produção de óxido nítrico (média $\pm$ desvio padrão) de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L.) infantum* e tratados com RNA de interferência (siRNA) para IGF-I em 24 horas (A) e 48 horas (B).

5 DISCUSSÃO

Nas leishmanioses, os eventos que ocorrem imediatamente após a transmissão de promastigotas pelo inseto vetor são cruciais no estabelecimento ou não da infecção. Muitos fatores de crescimento participam nessa interação parasito-hospedeiro e no nosso grupo há dados mostrando o efeito de IGF-I na infecção com *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis* (13, 17).

No entanto, as espécies de *Leishmania* têm comportamentos diferentes nessa interação com o hospedeiro (8), e principalmente com o tipo de resposta desenvolvida pelo hospedeiro. Diante da existência de diferenças consideráveis em relação à resposta do hospedeiro a diferentes espécies de *Leishmania*, desenvolvemos, neste projeto, o estudo para avaliar o efeito de IGF-I na interação *Leishmania (L.) infantum*-macrófago.

Iniciamos analisando o papel do IGF-I extrínseco, adicionando IGF-I recombinante (rIGF-I), no crescimento do parasito. Foi observado que as formas promastigotas de *L. (L.) infantum* apresentaram uma maior resposta proliferativa na presença de rIGF-I. Esse resultado confirma o efeito do IGF-I extrínseco na indução do crescimento de promastigotas *in vitro*, como já demonstrado anteriormente com a mesma espécie de *Leishmania*, bem como com outras espécies como *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major* (8, 10, 13, 17). A seguir, ao avaliar o efeito do IGF-I recombinante adicionado à cultura celular, observamos que as culturas que receberam o IGF-I apresentaram uma maior concentração de parasitos e alcançaram mais rapidamente a fase estacionária em comparação com as culturas não estimuladas.

Como o IGF-I está presente constitutivamente em diversas células, mas principalmente em macrófagos que é o habitat da *Leishmania*, tendo sido confirmado no estudo com *L. (L.) major* (17), neste estudo avaliamos o efeito do IGF-I intrínseco (constitutivo) na infecção de macrófagos infectados com promastigotas de *L. infantum*. Inicialmente avaliamos esse efeito em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, no entanto, foi necessário substituir essas células por macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c. Novas padronizações foram realizadas e observamos que a infecção de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos com promastigotas de *L. (L.) infantum*, tende a ser menor quando comparadas com infecções de células peritoneais.

Os macrófagos desempenham um papel importante no curso da infecção causada por *Leishmania*. Essas células representam uma população celular altamente heterogênea, refletida tanto nos aspectos morfológicos e fenotípicos como metabólicos e funcionais. Diversos estudos com *Leishmania* têm sido realizados preferencialmente em macrófagos derivados de medula óssea por representar uma população celular mais pura e homogênea em relação aos macrófagos obtidos do peritônio. Em um mesmo microambiente podemos encontrar diferentes tipos de macrófagos que podem assumir perfis funcionais distintos de acordo com o estímulo recebido. Na cavidade peritoneal estão presentes além de macrófagos e linfócitos B, que são populações majoritárias, linfócitos CD4, CD8, natural killers (NK), natural killers T (NKT), células dendríticas e granulócitos (eosinófilos e mastócitos). Essa grande variedade de tipos celulares dificulta o direcionamento do estudo para avaliar o papel específico dos macrófagos (28, 29) e por esta razão predominam os estudos utilizando macrófagos derivados de células da medula óssea.

Apesar das diferenças encontradas, os dois tipos celulares são permissivos à infecção por *L. (L.) infantum*, e conseguimos ver o efeito do IGF-I no parasitismo tanto na infecção de macrófagos derivados de medula óssea como na infecção de macrófagos peritoneais mostrando que há aumento do parasitismo nos dois tipos celulares. É possível encontrar na literatura vários experimentos *in vitro* utilizando macrófagos derivados de medula óssea na infecção com várias espécies de *Leishmania*, inclusive na infecção de macrófagos humanos *in vitro*, por diferentes espécies de *Leishmania* (*L. panamensis*, *L. major*, *L. infantum*) mostrando que estas células são permissivas à infecção por estes parasitos (30-32).

Em seguida, avaliamos o papel do IGF-I intrínseco na infecção de macrófagos derivados de medula óssea de camundongo BALB/c com *L. infantum*. Analisamos a expressão do RNA mensageiro para o fator de crescimento IGF-I e observamos uma diminuição de 1,4 vezes na expressão de IGF-I quando as células foram infectadas comparada com o grupo controle, e no grupo estimulado com 100ng/ml de rIGF-I observamos uma diminuição de 1,5 vezes, mostrando que o efeito do rIGF-I não está alterando a expressão do mRNA para esse fator produzido pela célula nas primeiras 24 horas de infecção.

Recentemente nosso grupo avaliou a expressão do mRNA de IGF-I após a infecção de macrófagos por diferentes espécies de *Leishmania*, e observamos uma tendência a diminuição na expressão de mRNA de IGF-I nas primeiras 24hs de

incubação na infecção com *L. infantum*, resultados semelhante ao encontrado com *L. major* (17). Na infecção com *L. amazonensis*, um resultado oposto foi observado com aumento na expressão de mRNA de IGF-I. (dados não publicados). Em 48 horas de infecção, a expressão de mRNA de IGF-I em macrófagos infectados com *L. infantum* teve uma tendência a aumento. Enquanto que a expressão de mRNA de IGF-I em macrófagos infectados com *L. major* e *L. amazonensis* foi diminuída em comparação com o controle (dados não publicados). Em seguida, avaliamos a expressão do mRNA do receptor de IGF-I (IGF-IR). Observamos um aumento do mRNA de IGF-IR nos grupos infectados comparados com o grupo controle tanto em 24 quanto em 48 horas, sendo esse aumento significativo em 48h.

Vários fatores podem controlar a expressão de IGF-I e do seu receptor em macrófagos: fator de necrose tumoral- α (TNF- α) na ausência de IFN- γ (33), prostaglandina E2 citocinas Th2, IL-4 e IL-13 (34) estimulam a produção de IGF-I, enquanto que IFN- γ a inibe (35). Além disso, outros fatores importantes na modulação de expressão de IGF-I são as glicoproteínas e açúcares na membrana do parasita. No contato inicial de promastigotas com o macrófago, ocorrem várias interações entre moléculas de superfície e outras moléculas ligantes do parasita com papel fundamental na interação parasito/macrófago (36-38). O mecanismo que a célula usa para diminuir ou aumentar a expressão de IGF-I na interação com promastigotas precisa ser melhor esclarecido nas diferentes espécies de *Leishmania*.

Para verificar o papel do IGF-I intrínseco na infecção propomos silenciar o IGF-I do macrófago pelo silenciamento pós-transcricional utilizando a técnica de RNA de interferência. O silenciamento do IGF-I por siRNA em 24 horas resultou em inibição da expressão do mRNA em torno de 71% índice considerado ótimo nesta técnica, e em 48 horas, observamos a inibição da expressão do mRNA em torno de 51%. Também podemos observar que só a infecção com promastigotas de *L. infantum* acarreta uma inibição da expressão do IGF-I, resultados que corroboram os nossos resultados anteriores. O papel do IGF-I intrínseco na infecção por *Leishmania* foi também realizado em nosso grupo de pesquisa com *L. major* que atingiu inibição do IGF-I em torno de 70% e confirmado por microscopia confocal onde foi observada uma diminuição significativa da proteína (17).

Ao verificar o efeito biológico do silenciamento do mRNA de IGF-I, avaliando o grau de parasitismo em 24 horas, observamos uma tendência a diminuição do parasitismo no grupo tratado com siRNA quando comparado ao grupo controle sem

siRNA e lipossomo na infecção com promastigotas. Ao repor o IGF-I extrínseco, recombinante, no grupo tratado com siRNA foi observado um aumento no número de parasitos. Achados semelhante foram encontrados por nosso grupo ao verificar o efeito biológico do silenciamento do mRNA de IGF-I em *L. major* (17). Esse resultado sugere o papel do IGF-I no aumento do parasitismo, mostrando que na ausência desse fator a proliferação de parasitos é prejudicada.

Avaliando o grau de parasitismo em 48 horas, observamos uma diminuição do parasitismo no grupo tratado com siRNA e no grupo tratado apenas com lipossomo quando comparado ao grupo controle sem siRNA na infecção com promastigotas. Ao repor o IGF-I extrínseco, recombinante, no grupo tratado com siRNA foi observado uma tendência à aumento no número de parasitos. Esses resultados sugerem que ao repor o IGF-I extrínseco, no grupo tratado com siRNA, ocorra uma indução da ativação do macrófago pela via alternativa, resultando na síntese de poliaminas.

Os macrófagos dependendo de como eles vão ser ativados podem destruir o parasito ou favorecer sua proliferação, pelos produtos da L-arginina. As duas vias principais que influenciam na infecção por leishmânia são: 1) a L-arginina no macrófago pode ser catabolizada pela indução do óxido nítrico sintase (iNOS) para produzir NO que é um potente produto leishmanicida; 2) a L-arginina, pela ativação da arginase, pode resultar na síntese de poliaminas (putrescina, espermidina, espermina) que são nutrientes para *Leishmania* (39, 40). Ambas as vias depende do tipo de estímulo extracelular (12).

Os resultados encontrados com o grupo estimulado apenas com Lipossomo, apresentando um aumento no número de parasitos é um dado novo e interessante, sugerindo que há diferenças no metabolismo da L-arginina com as diferentes espécies de *Leishmania*. Foi demonstrado em ensaios com *L. donovani*, por exemplo, que amastigotas nocaute para arginase conseguiam sobreviver dentro da célula sem suplementação de poliaminas, enquanto promastigotas necessitavam da suplementação de poliaminas para sua proliferação (41), reforçando as diferenças nesse metabolismo. Outro fato que poderia explicar esse aumento no parasitismo seria que o lipossomo apresenta em sua composição análogos de espermina que é uma fonte de poliaminas, influenciando no efeito biológico pelo aumento do parasitismo no nosso experimento. No entanto, novos estudos deverão ser realizados para explicarmos esses resultados.

Recentemente nosso grupo avaliou a produção de NO que é o elemento parasiticida na célula após a infecção de macrófagos por diferentes espécies de

Leishmania. Observamos produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos infectados com *L. infantum* semelhante ao encontrado com *L. major* (17), enquanto que na infecção com *L. amazonensis*, há uma baixa produção de NO comparado com as demais espécies de *Leishmania* nas primeiras 24 horas de infecção (dados não publicados).

IGF-I leva uma diminuição das concentrações de NO em macrófagos infectados por *Leishmania* em 24 horas e aumento das concentrações de NO em 48 horas, sugerindo que em 48h o parasito ainda não conseguiu criar estratégias de evasão para controlar mudanças no metabolismo celular para favorecer sua proliferação. Resultados semelhantes foram encontrados com macrófagos infectados com *L. major* e *L. amazonensis* (dados não publicados).

Ao analisar o efeito do silenciamento da expressão de mRNA de IGF-I por siRNA sobre a produção de óxido nítrico, em 24 horas de incubação, nos grupos tratados com siRNA, lipossomo e grupo controle representado só pelo macrófago, observamos uma produção de NO e quando este último grupo foi estimulado com IGF-I, houve uma tendência a diminuição na produção de óxido nítrico, paralelo a um aumento do parasitismo. Em 48 horas, observamos um aumento da produção de óxido nítrico no grupo controle representado só pelo macrófago em relação a 24 horas. Nos grupos tratados com siRNA e lipossoma, observamos uma tendência à aumento na produção de NO quando comparado com o grupo do macrófago infectado e sem estímulo. No grupo estimulado com IGF-I, houve uma tendência a aumento das concentrações de NO em relação ao controle paralelo a uma diminuição do parasitismo no mesmo grupo. A indução da ativação do macrófago pela via alternativa conforme verificamos em trabalhos anteriores do grupo pode ser uma justificativa para o aumento no número de parasitos com a adição do IGF-I recombinante, bem como diminuição das concentrações de NO (13).

O conjunto de resultados abre uma nova perspectiva na área de pesquisa em doenças tropicais sobretudo na imunologia das leishmanioses, reforçando a importância do IGF-I na infecção por *Leishmania*. Neste estudo mostramos que IGF-I promove um aumento da infecção em macrófagos *in vitro*, como em toda pesquisa, apontamos vários possíveis mecanismo de atuação, mas, ao mesmo tempo levantamos muitas interrogações que esperamos esclarecer com futuras pesquisas do nosso grupo. Um melhor conhecimento sobre os mecanismos pelos quais este patógeno pode escapar da resposta imune inata, bem como estudos sobre as vias de sinalização intracelular, podem ajudar a desenvolver novas terapias anti- *Leishmania*.

6 CONCLUSÕES

Em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c infectados com promastigotas de *L. (L) infantum* observamos:

- a) Aumento do parasitismo no período de incubação de 24 e 48 horas;
- b) Uma diminuição de 1,4 vezes da expressão do mRNA de IGF-I em 24 horas e um aumento de 1,5 vezes em 48 horas;
- c) Um aumento na expressão de mRNA do receptor de IGF-I em 24 como em 48 horas nos infectados quando comparado com o grupo controle.
- d) Com o silenciamento do IGF-I por siRNA, houve diminuição da expressão de mRNA do IGF-I no macrófago em torno de 71% em 24 horas e de 51% em 48 horas; e, concomitantemente, uma diminuição do parasitismo;
- e) O parasitismo foi recuperado no grupo tratado com siRNA quando o IGF-I recombinante foi repostado no sistema;
- f) A produção de óxido nítrico acompanhou o efeito sobre o parasitismo.

Esses resultados reforçam a importância do IGF-I na infecção por *L. infantum*, sugerindo que o IGF-I está diretamente relacionado ao parasitismo.

REFERÊNCIAS

1. WHO. World Health Organization www.who.int/entity/vaccine_research 2010.
2. Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*. 2000 May;16(5):188-9.
3. Duarte MIS. Patologia das principais doenças tropicais no Brasil. *Leishmania* (calazar). 6ed ed. Bogliolo Patologia Guanabara koogan; 2000. 1275 p.
4. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*. 2002 Nov;2(11):845-58.
5. Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:151-77.
6. Shankar AH, Titus RG. T cell and non-T cell compartments can independently determine resistance to *Leishmania major*. *J Exp Med*. 1995 Mar 01;181(3):845-55.
7. Laurenti MD, Corbett CE, Sotito MN, Sinhorini IL, Goto H. The role of complement in the acute inflammatory process in the skin and in host-parasite interaction in hamsters inoculated with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Int J Exp Pathol*. 1996 Feb;77(1):15-24.
8. Goto H, Gomes CM, Corbett CE, Monteiro HP, Gidlund M. Insulin-like growth factor I is a growth-promoting factor for *Leishmania* promastigotes and amastigotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Oct 27;95(22):13211-6.
9. Jones JJ, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev*. 1995 Feb;16(1):3-34.
10. Gomes CM, Goto H, Corbett CE, Gidlund M. Insulin-like growth factor-1 is a growth promoting factor for *Leishmania* promastigotes. *Acta Trop*. 1997 Apr 15;64(3-4):225-8.
11. Gomes CM, Goto H, Ribeiro Da Matta VL, Laurenti MD, Gidlund M, Corbett CE. Insulin-like growth factor (IGF)-I affects parasite growth and host cell migration in experimental cutaneous leishmaniasis. *Int J Exp Pathol*. 2000 Aug;81(4):249-55.

12. Wanasen N, Soong L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. *Immunol Res.* 2008;41(1):15-25.
13. Vendrame CM, Carvalho MD, Rios FJ, Manuli ER, Petitto-Assis F, Goto H. Effect of insulin-like growth factor-I on *Leishmania amazonensis* promastigote arginase activation and reciprocal inhibition of NOS2 pathway in macrophage in vitro. *Scand J Immunol.* 2007 Aug-Sep;66(2-3):287-96.
14. Arkins S, Rebeiz N, Biragyn A, Reese DL, Kelley KW. Murine macrophages express abundant insulin-like growth factor-I class I Ea and Eb transcripts. *Endocrinology.* 1993 Nov;133(5):2334-43.
15. Nagaoka I, Someya A, Iwabuchi K, Yamashita T. Expression of insulin-like growth factor-IA and factor-IB mRNA in human liver, hepatoma cells, macrophage-like cells and fibroblasts. *FEBS letters.* 1991 Mar 11;280(1):79-83.
16. Oberlin D, Fellbaum C, Eppler E. Insulin-like growth factor I messenger RNA and protein are expressed in the human lymph node and distinctly confined to subtypes of macrophages, antigen-presenting cells, lymphocytes and endothelial cells. *Immunology.* 2009 Nov;128(3):342-50.
17. Reis LC. Influência do fator de crescimento insulín-símil I no efeito de citocinas na resistência e suscetibilidade na leishmaniose cutânea murina por *Leishmania (Leishmania) major*: Universidade de São Paulo; 2013.
18. Goto H, Lindoso JA. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 2004 Apr;37(4):615-23.
19. Chiu YL, Rana TM. RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol cell.* 2002 Sep;10(3):549-61.
20. ZHANG X GL, COLLAGE RD, STRIPAY JL, TSUNG A, LEE JS, ROSENGART MR. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) I{alpha} mediates the macrophage inflammatory response to sepsis. *J Leukoc Biol* 2011:10.
21. Zhang X, Wheeler D, Tang Y, Guo L, Shapiro RA, Ribar TJ, et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) IV mediates nucleocytoplasmic shuttling and release of HMGB1 during lipopolysaccharide stimulation of macrophages. *J Immunol.* 2008 Oct 01;181(7):5015-23.

22. Shi Y, Porter K, Parameswaran N, Bae HK, Pestka JJ. Role of GRP78/BiP degradation and ER stress in deoxynivalenol-induced interleukin-6 upregulation in the macrophage. *Toxicol Sci. an official journal of the Society of Toxicology*. 2009 Jun;109(2):247-55.
23. Wiese M, Castiglione K, Hensel M, Schleicher U, Bogdan C, Jantsch J. Small interfering RNA (siRNA) delivery into murine bone marrow-derived macrophages by electroporation. *J Immunol Methods*. 2010 Feb 28;353(1-2):102-10.
24. Englen MD, Valdez YE, Lehnert NM, Lehnert BE. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is expressed and secreted in cultures of murine L929 cells. *J Immunol Methods*. 1995 Aug 18;184(2):281-3.
25. Callahan HL, Portal IF, Bensinger SJ, Grogl M. *Leishmania* spp: temperature sensitivity of promastigotes in vitro as a model for tropism in vivo. *Exp parasitol*. 1996 Dec;84(3):400-9.
26. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982 Oct;126(1):131-8.
27. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 01;29(9):e45.
28. Maia C, Rolao N, Nunes M, Goncalves L, Campino L. Infectivity of five different types of macrophages by *Leishmania infantum*. *Acta Trop*. 2007 Aug;103(2):150-5.
29. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med*. 1992 Jun;119(6):598-620.
30. Vouldoukis I, Riveros-Moreno V, Dugas B, Ouaz F, Becherel P, Debre P, et al. The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the Fc epsilon RII/CD23 surface antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Aug 15;92(17):7804-8.
31. Bosque F, Milon G, Valderrama L, Saravia NG. Permissiveness of human monocytes and monocyte-derived macrophages to infection by promastigotes of *Leishmania (Viannia) panamensis*. *J Parasitol*. 1998 Dec;84(6):1250-6.

32. Panaro MA, Acquafredda A, Lisi S, Lofrumento DD, Trotta T, Satalino R, et al. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in *Leishmania infantum*-infected human macrophages stimulated with interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. *Int J Clin Lab Res*. 1999;29(3):122-7.
33. Winston BW, Krein PM, Mowat C, Huang Y. Cytokine-induced macrophage differentiation: a tale of 2 genes. *Clin Invest Med*. 1999 Dec;22(6):236-55.
34. Wynes MW, Riches DW. Induction of macrophage insulin-like growth factor-I expression by the Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J Immunol*. 2003 Oct 01;171(7):3550-9.
35. Arkins S, Rebeiz N, Brunke-Reese DL, Biragyn A, Kelley KW. Interferon-gamma inhibits macrophage insulin-like growth factor-I synthesis at the transcriptional level. *Mol Endocrinol*. 1995 Mar;9(3):350-60.
36. Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol*. 2000 Feb;12(1):64-76.
37. Bogdan C, Rollinghoff M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol*. 1998 Jan;28(1):121-34.
38. Mosser DM, Rosenthal LA. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Semin Cell Biol*. 1993 Oct;4(5):315-22.
39. Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RM, Moncada S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol*. (Baltimore, Md : 1950). 1990 Jun 15;144(12):4794-7.
40. Roberts SC, Tancer MJ, Polinsky MR, Gibson KM, Heby O, Ullman B. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants. *J Biol Chem*. 2004 May 28;279(22):23668-78.
41. Boitz JM, Gilroy CA, Olenyik TD, Paradis D, Perdeh J, Dearman K, et al. Arginase is Essential for Survival of *Leishmania donovani* Promastigotes but not Intracellular Amastigotes. *Infect Immun*. 2016 Oct 24.

ANEXO A

A **CEUA** da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 17/07/2014, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **086/14** intitulado: **“Influência do fator de crescimento insulina-símile (“insulin-like growth factor” = IGF)-I no parasitismo de macrófagos peritoneais de camundongos infectados por Leishmania (L.) infantum”** que utilizará **44** animais da espécie **hamster**, apresentado pelo Instituto de Medicina Tropical.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Hiro Goto

Pesquisador (a) Executante: Ariane Farias Leal

CEUA-FMUSP, 17 de Julho de 2014

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

ANEXO B

A **CEUA** da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 17/07/2014, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **087/14** intitulado: **“Influência do fator de crescimento insulina-símile (“insulin-like growth factor” = IGF)-I no parasitismo de macrófagos peritoneais de camundongos infectados por Leishmania (L.) infantum”** que utilizará **131** animais da espécie **camundongo**, apresentado pelo Instituto de Medicina Tropical.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Hiro Goto

Pesquisador (a) Executante: Ariane Farias Leal

CEUA-FMUSP, 17 de Julho de 2014

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais