UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

ORLANDO RAUL SEVILLANO ACUÑA

Contribuição da expressão do fator de crescimento insulina-símile I (IGF-I) e do seu receptor no parasitismo de macrófagos humanos por *Leishmania (L.) infantum*

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

2018

ORLANDO RAUL SEVILLANO ACUÑA

Contribuição da expressão do fator de crescimento insulina-símile I (IGF-I) e do seu receptor no parasitismo de macrófagos humanos por *Leishmania (L.) infantum*

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

Orientadora: Profa. Dra. Hiro Goto

São Paulo

2018

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

Sevillano Acuña, Orlando Raúl

Contribuição da expressão do fator de crescimento insulina-símile I (IGF-I) e do seu receptor no parasitismo de macrófagos humanos por Leishmania (L.) infantum / Orlando Raúl Sevillano Acuña. – São Paulo, 2017.

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. LEISHMANIOSE VISCERAL. 2. FATORES DE CRESCIMENTO. 3. MACRÓFAGOS. 4. LEISHMANIA INFANTUM. 5. CITOCINAS. 6. FATOR DE CRESCIMENTO INSULIN-LIKE I.

USP/IMTSP/BIB-27/2017.

“Somente aqueles que nada esperam
do acaso são donos do destino”

Matthew Arnold

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Hiro Goto pela orientação e pela oportunidade.

Ao Dr. Eduardo Ramos-Sanchez co-orientador do trabalho.

À Dra. Luiza Reis pela guia e sugestões.

À MSc. Christiane Ozaky pela ajuda no laboratório.

Ao Dr. Fernando de Souza, Dra. Telma Oshiro e Dra. Maria Sato pelo apoio.

A Mariane, Ariane, Alline, Renata e Daiane pelo companheirismo.

Ao Dr. Angelo Lindoso, Dra. Carmen Arroyo, MSc. Edite Kanashiro, Dra. Marina Souza, Dra. Thelma Okay, Dra. Kelly Kanunfre e MSc. Beatriz Celeste.

À Universidade Nacional Federico Villarreal.

À Universidade de São Paulo.

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

Ao LIM-38 pelo auxílio financeiro ao projeto.

Ao *Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica - Perú* (CONCYTEC) pela bolsa de estagio internacional

Ao *Programa Nacional de Becas y Crédito Educativo - Perú* (PRONABEC) pela bolsa de mestrado internacional.

RESUMO

SEVILLANO, OR. Contribuição da expressão do fator de crescimento insulina-símile I (IGF-I) e do seu receptor no parasitismo de macrófagos humanos por *Leishmania (L.) infantum*. (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2018.

Leishmaniose visceral (LV) é uma doença causada por *Leishmania (Leishmania) infantum* no Brasil. Na infecção ao lado da reposta imune específica, fatores inespecíficos do hospedeiro podem desempenhar um papel importante. Em trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo observou-se na infecção in vitro de macrófagos murinos por *L. (L.). major* o papel de IGF-I como efetor da resposta a IL-4, demonstrando que o IGF-I é um fator importante envolvido na interação parasito-hospedeiro no modelo de *Leishmania (L.) major*. Observou-se que os fatores envolvidos na interação mudam dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção, desta forma, procuramos o papel do IL-4 e sua relação com o IGF-I na infecção de macrófagos humanos THP-1 por *L. (L.) infantum*. Macrófagos THP-1 foram infectados com *L. (L.) infantum*, sob o estimulo de IL-4 e IGF-I recombinante. Nossa análise do parasitismo não revelou um aumento após 24 e nem 48 horas e sim após 72 horas sob estimulo de IL-4 e o parasitismo sob estimulo de IGF-I não aumento após 24 e nem 72 horas e sim uma diminuição após 48 horas. Enquanto a produção de NO e a atividade da arginase se mantiveram constantes em todos os períodos avaliados a expressão de arginase 1 aumenta na infecção, mas os estímulos de IL-4 e IGF-I não tem efeito sobre a expressão. A expressão de IGF-I aumenta na infecção e os estímulos de IL-4 e IGF-I não tem efeito sobre a expressão. Já a expressão do receptor apresentou uma diminuição durante a infecção nos tempos avaliados. Considerando os nossos achados, onde a infecção de macrófago humano por *L. (L.) infantum* não estimulou a produção de NO e nem a atividade da arginase e os estímulos de IL-4 e IGF-I nas células infectadas não provocou um aumento significativo da atividade da arginase, os dados sugerem que a arginase tanto da célula quanto do parasita não sejam fundamentais para o desenvolvimento do parasita e onde a produção de NO na célula não seja danosa para o parasita.

Descritores: Leishmaniose visceral, Fatores de crescimento, Macrófagos humanos, *Leishmania (L.) infantum*, Citocinas, Fator de crescimento insulin-like I.

ABSTRACT

SEVILLANO, OR. Contribution of the expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) and its receptor in the parasitism of human macrophages by *Leishmania (L.) infantum*. (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2018.

Visceral leishmaniasis (LV) is a disease caused by *Leishmania (Leishmania) infantum* in Brazil. During infection the specific immune response, nonspecific host factors may play an important role. In studies developed by our group we observed the role of IGF-I as an effector of the IL-4 response in the in vitro infection of murine macrophages by *L. (L.). major*, demonstrating that IGF-I is an important factor involved in the parasite-host interaction in the *Leishmania (L.) major* model. It was observed that the factors involved in the interaction depend on the species of *Leishmania* involved in the infection. In this way, we look for the role of IL-4 and its relationship with IGF-I in *L. (L.) infantum* infected human THP-1 macrophages. THP-1 macrophages were infected with *L. (L.) infantum* under stimulation of recombinant IL-4 and recombinant IGF-I. Parasitism analysis did not show an increase after 24 and 48 hours, but after 72 hours under IL-4 stimulation and parasitism under IGF-I stimulation did not increase after 24 nor 72 hours but a decrease after 48 hours. While NO production and arginase activity remained constant at all evaluated periods, arginase 1 mRNA expression increased in infection, but the IL-4 and IGF-I stimuli had no effect on expression. Expression of IGF-I mRNA increases in infection and the IL-4 and IGF-I stimuli have no effect on expression. Already the expression of the receptor presented a decrease of mRNA during the infection in the evaluated times. The expression of the receptor showed a decrease in expression during infection at the times evaluated. Considering our findings, where human macrophage infection by *L. (L.) infantum* did not stimulate NO production and neither arginase activity nor the IL-4 and IGF-I stimuli in infected cells did not induce a significant increase of the arginase activity, the data suggest that neither cell nor parasite arginase are critical to parasite development and where NO production in the cell is not harmful to the parasite.

Key words: Visceral leishmaniasis, Growth factors, Human macrophages, *Leishmania (L.) infantum*, Cytokines, Insulin-like grow factor I.

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
IFNγ	Interferon gama
IGF-I	*Insulin-like growth fator-I*
IGF-IR	*Insulin-like growth fator-I receptor*
NOS2	Óxido nítrico sintetase
LC	Leishmaniose cutânea
LV	Leishmaniose visceral
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NO	Óxido Nítrico
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
PMA	*Phorbol-Myristate Acetate*
RNA	Ácido ribonucleico
SFB	Soro Fetal Bovino
THP-1	Célula de linhagem monocítica humana
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral

LISTA DE TABELAS

Pag.

Tabela 1.- Sequências de iniciadores, utilizados na qPCR 29

LISTA DE FIGURAS

Pag.

Figura 1. Efeito do IGF-I no crescimento de promastigotas de *Leishmania (L) infantum in vitro*. 31

Figura 2. Avaliação da viabilidade de monócitos THP-1 com concentrações diferentes de suplementos SFB e BSA. 33

Figura 3. Diferenciação de monócitos em macrófagos THP-1. 35

Figura 4. Viabilidade de macrófagos THP-1. 36

Figura 5. Parasitismo de macrófagos infectados com diferentes proporções de parasito/célula. 38

Figura 6. Expressão de mRNA de IGF-I e IGF-IR em macrófagos THP-1 41

Figura 7. Efeito do IL-4 sobre o parasitismo de macrófagos THP-1. 42

Figura 8. Efeito do IL-4 sobre a produção de óxido nítrico em macrófagos THP-1. 43

Figura 9. Efeito do IL-4 sobre a atividade da arginase em macrófagos THP-1. 44

Figura 10. Efeito do IL-4 sobre a expressão de mRNA de Arginase 1 em macrófagos THP-1. 46

Figura 11. Efeito do IL-4 sobre a expressão de mRNA de IGF-I e IGF-IR em macrófagos THP-1. 49

Figura 12. Efeito do IGF-I sobre o parasitismo de macrófagos THP-1. 50

Figura 13. Efeito do IGF-I sobre a produção de óxido nítrico em macrófagos THP-1. 52

Figura 14. Efeito do IGF-I sobre a atividade da arginase em macrófagos THP-1. 53

Figura 15. Efeito do IGF-I sobre a expressão de mRNA de Arginase 1 em macrófagos THP-1. 56

Figura 16. Efeito do IGF-I sobre a expressão de mRNA de IGF-I e IGF-IR em macrófagos THP-1. 59

SUMÁRIO

	Pag.
1.- INTRODUÇÃO	12
2. – OBJETIVOS	22
2.1.- Objetivo geral	22
2.2. - Objetivos específicos	22
3.- MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1.- Animais	23
3.2.- Células THP-1	23
3.2.1.- Diferenciação de monócitos THP-1	24
3.3.- Parasitos	24
3.3.1.- Manutenção da cepa de *Leishmania (L.) infantum*	24
3.4.- Infecção de macrófagos THP-1 in vitro	25
3.5.- Tratamento de IGF-I nas infecções	25
3.6.- Tratamento de IL4 nas infecções	26
3.7.- Atividade da arginase	26
3.8.- Dosagem de óxido nítrico	27
3.9.- Parasitismo	28
3.10.- Extração do RNA	28
3.11.- Obtenção do cDNA	29
3.12.- Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)	29
3.13.- Tratamento de IGF-I sobre os promastigotas	30
3.14.- Análise estatística	30
4.- RESULTADOS	62
5.- DISCUSSÃO	64
6.- CONCLUSSÕES	68
7.- REFERENCIAS	69
ANEXO Comitê de ética do IMTSP-USP	70

1.- INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um grupo de doenças que afetam o homem e diversos mamíferos, são causadas por protozoário do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), um parasito digenético, que se encontra distribuído em zonas tropicais e subtropicais no mundo. As manifestações clínicas das leishmanioses variam em relação com a espécie de *Leishmania* e a resposta imune do hospedeiro, podendo variar desde acometimento de pele e mucosa até a doença visceral (1).

A leishmaniose visceral (LV) está presente em 98 países, é prevalente em 88 países e endêmica em 65 deles, de acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde. Cerca de 90% dos casos registrados acontecem na Índia, Sudão, Bangladesh, Nepal e Brasil com uma incidência anual de 500.000 casos (2). Entre 20.000 e 40.000 pessoas morrem por LV anualmente. A leishmaniose se propagou principalmente por migração das populações e atualmente os dados mostram um processo de urbanização da doença (3).

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença sistêmica, que afeta células do sistema fagocítico mononuclear, apresenta hepatomegalia, esplenomegalia, pancitopenia e hipergamaglobulinemia e pode provocar a morte do hospedeiro quando sem tratamento (4). A LV é causada por espécies de *Leishmania* do complexo *donovani*: *Leishmania (L.) donovani* na Índia e leste da África, e por *Leishmania (L.) infantum* em outras partes da Ásia, Europa, África e América (5).

Brasil registra o maior número de casos de LV que ocorrem na América, a doença está distribuída nas 27 unidades federativas, sendo o Nordeste a região com maior incidência 58.6% dos casos. No Brasil, registraram-se 3.453 casos de LV em 2014. A letalidade estava em torno de 6.9% em 2014 (6).

O parasito se transmite pela picada das fêmeas dos flebotomíneos da família Psychodidae: o gênero *Phlebotomus* na África, Europa, e o gênero *Lutzomyia* na América (7). *Lutzomyia longipalpis* é o vetor da *Leishmania (L.) infantum* agente causal de LV na América.

Os flebotomíneos ingerem macrófagos infectados com parasitos, na forma amastigota, quando se alimentam com sangue e linfa de um hospedeiro mamífero. Na transferência do parasito do hospedeiro mamífero para o flebotomíneo, ocorre

alteração do microambiente: diminui a temperatura e aumenta o pH, o que desencadeia mudanças de amastigotas para outra forma móvel, com flagelo no extremo anterior, denominada promastigota, que se desenvolve no tubo digestivo (intestino médio) do inseto e migra ao aparelho bucal (8) (9).

Ao picar o hospedeiro, as promastigotas metaciclicas da *Leishmania* são introduzidas na pele, logo são fagocitadas pelas células do sistema fagocítico mononuclear. Durante a fusão do vacúolo parasitóforo com o lisossomo, o parasito diferencia-se em amastigota, que é mais resistente ao pH ácido, às lisozimas hidrolases, ao óxido nítrico (NO) e ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (10). As amastigotas de *L. amazonensis* se multiplicam por divisão binária dentro dos macrófagos e são transferidas célula-célula dentro de estruturas denominadas "zeiotic" (vesículas membranosas próprias da apoptose) quando a célula hospedeira doadora expressa sinais de apoptose iminente; assim se transferem sem exposição total ao meio ambiente extracelular, evadindo do sistema imune do hospedeiro e mantendo o ciclo infeccioso (11) .

A imunidade inata tem um papel importante na leishmaniose, inicia-se imediatamente depois do ingresso do promastigota no hospedeiro, sendo que acontecimentos iniciais são cruciais no estabelecimento da infecção. Nesta fase, encontramos a participação do sistema do complemento, células polimorfonucleares neutrófilos, células ¨*natural killer*¨ (NK), macrófagos e fatores de crescimento. Estes elementos formam a primeira barreira contra a infecção, dificultando sua instalação e ao mesmo tempo são elementos que podem ajudar a evadir da resposta protetora do hospedeiro (12).

Na sequência, a resposta imune específica e particularmente a resposta celular é importante no controle da leishmaniose e foi demonstrada nas infecções experimentais em camundongos. Um dos modelos mais estudados são os camundongos de linhagens isogênicas infectados com *Leishmania (Leishmania) major*, onde se observou que os linfócitos T helper $CD4^+$ têm duas sub-populações funcionalmente diferentes com secreção de citocinas diretamente correlacionadas com a resistência, IFN-γ, que é produzida em maior proporção pelos camundongos C57BL/6 ou a susceptibilidade, IL-4 e IL-13, que são produzidas em maior proporção pelos camundongos BALB/c (13). A atividade

destas citocinas direcionam o metabolismo da L-arginina. INF-γ gera radicais de nitrogênio que são microbicidas e induz nos macrófagos a expressão do gene de sintase induzível do óxido nítrico (NOS2). Alternativamente, pode levar à produção de poliaminas sob estimulo por IL-4 e IL-13 que induzem a expressão da enzima arginase.

As diferentes manifestações clínicas nas leishmanioses são o resultado da interação entre as características imunológicas do hospedeiro e da espécie de *Leishmania* envolvida. Modelos experimentais em camundongos mostraram uma diferença marcante na evolução da infecção e na resposta imune por espécies viscerotropicas como *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* quando comparados em modelos com a infecção por *L. (L.) major*.

Nos modelos experimentais de LV *in vivo*, o camundongo BALB/c infectado com *L. (L.) infantum* é suscetível nos primeiros quinze dias, mas, no período subsequente, a infecção é controlada pelo hospedeiro (14). Estudos da resposta imune mostram a importância dos linfócitos T na resistência contra *L. (L.) donovani,* com a participação de citocinas, IFN-γ e IL-2, que controlam a infeção nas primeiras semanas da infecção. Estudos da IL-10 sugerem um papel importante desta na suscetibilidade, independentemente da expressão de IFN-γ. Ao contrário do que acontece com *L. (L.) major* os estudos mostraram que o IL-4 não tem influência na suscetibilidade na infeção por *L. donovani* (14).

Além do papel de citocinas na evolução da infecção por *Leishmania*, as citocinas IL-4, IL-13 e IFN-γ modulam a expressão do fator de crescimento insulina-símile (IGF)-I (15) (16), fator que está presente na pele e, portanto, um dos primeiros fatores com que os parasitos, na sua forma promastigota, tem contato ao ingressar no hospede. Além da presença do IGF-I nos tecidos os macrófagos expressam constitutivamente o fator, de modo que as formas amastigotas no interior dos macrófagos poderiam ter contato com o fator também. Foi por essa razão que as pesquisas sobre o papel do IGF-I e sua relação com as citocinas Th1 e Th2, nas infecções por *Leishmania,* começaram no grupo da Profª Hiro Goto.

IGF-I é um peptídeo monocatenario de 70 aminoácidos, masa molecular de 7,649 kDa. Sua produção é estimulada pelo hormônio de crescimento (*growth*

hormone = GH) e o IGF-I inibe a secreção de GH, estabelecendo-se um circuito de retroalimentação negativa GH/IGF-I (17) (18). IGF-I é expresso no tecido cutâneo normal, macrófagos humanos, células T humanas e por leucócitos de camundongos, mas 90% do IGF-I circulante é sintetizado no fígado. O IGF-I circula no sangue, unido às proteínas transportadoras (IGFBP) e interage com seu receptor (IGF-IR) nos órgãos alvo tais como cérebro, rim, coração, músculos, ossos, intestinos e testículos. Também se expressa nas células "natural killer" (NK), monócitos, células B, células T ($CD4^+$ e $CD8^+$) e macrófagos (19). O IGF-I é um polipeptídeo com ação endócrina, parácrina e autócrina (20) e regula o crescimento, proliferação, desenvolvimento normal, diferenciação, migração e apoptose, tendo papel importante na inflamação e regeneração celular.

Em estudos de nosso grupo se observou que o IGF-I produz diferentes efeitos sobre *Leishmania* e leishmanioses. Em concentrações fisiológicas (1-50 ng/ml) induz um crescimento acelerado de amastigotas axênicas e promastigotas, assim como a fosforilação de moléculas intracelulares (20) (21). Em cães com LV se observou uma discrepância: níveis altos de mRNA do IGF-I no fígado e níveis baixos do IGF-I no soro, sugerindo a existência de um controle pós-transcripcional do IGF-I durante a LV (22).

Em estudos in vivo, os camundongos BALB/c foram infectados com *Leishmania* após pré-incubação com IGF-I recombinante, observou-se aumento do número dos parasitos, do tamanho das lesões e da inflamação, indicando que IGF-I favorece o desenvolvimento do parasito intracelular na leishmaniose (23).

Em macrófagos de camundongo BALB/c infectados com promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, o IGF-I recombinante adicionado à cultura induziu o aumento do parasitismo e ao mesmo tempo, aumento da expressão e a atividade da arginase do macrófago e do parasito. Observou-se também uma diminuição da produção do óxido nítrico (NO) e na expressão de NOS2 (24). NOS2 catalisa a produção de NO que tem efeito leishmanicida.

Como os macrófagos expressam IGF-I intrinsecamente, foi avaliada também a sua expressão em macrófagos infectados por *Leishmania (L.) major*. Observou-se a presença de IGF-I em macrófago e circundando o parasito fagocitado (25). Ao estimular com INF-γ e utilizando RNA de interferência

(siRNA) para mRNA do IGF-I, observou-se uma redução dos níveis de mRNA e proteínas de IGF-I, assim também redução da carga parasitária. Esta carga se recupera por completo com adição do IGF-I recombinante, sugerindo um papel essencial do IGF-I na proliferação de *Leishmania (L.) major* (26).

O receptor do fator de crescimento insulina-símile I (IGF-IR) é um receptor trans-membrana, altamente conservado, da família dos receptores tirosina quinase RTK (classe II). Seu gene se encontra no braço q26 do cromossoma 15, codifica uma proteína de 95 kDa em humanos (27). O receptor é composto por duas subunidades extracelulares alfa e duas subunidades intracelulares beta. Têm 70% de similaridade ao receptor de insulina (IR), especialmente no domínio tirosina quinase (84%) (28). A interação IGF-I/IGF-IR ativa vias de sinalização de proliferação celular e anti-apoptose. A união do IGF-I às subunidades alfa induz mudança estrutural e união de dois ou mais receptores e isto produz fosforilação de aminoácidos nos seus domínios. Estes processos de fosforilação recrutam as moléculas intermediárias da sinalização de IGF-IR, como os substratos do IR 1-4 (IRS 1-4) ou as proteínas Shc, produzindo sinais intracelulares das vias de quinase fosfatidiinositol 3 (PI3K) ou da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (29).

Estudos anteriores do grupo da Profª. Hiro Goto mostraram a expressão da molécula substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) em *Leishmania (L.) mexicana* como participante da via de sinalização intracelular de IGF-IR (21). Posteriormente, caracterizou-se o receptor do IGF-I (IGF-IR) em promastigotas de *Leishmania (L.) mexicana*, encontrando-se similaridade com a subunidade alfa do IGF-IR humano, possivelmente participando do efeito de IGF-I na proliferação do parasito (30).

Citocinas afetam a expressão de IGF-I. TNF-α, IL-1, IL-6 e IFN-γ inibem a expressão de IGF-I nos macrófagos com efeito negativo sobre o crescimento celular (15). Alguns fatores de crescimento como o TGF-β1 tem efeitos antagonistas ao de IGF, diminuindo o número de receptores do IGF-I. A insulina é outro regulador importante para o sistema IGF, influenciando na síntese e secreção do IGF-I e a expressão do IGF-IR (31). IL-4 e IL-13 também aumentam a expressão de IGF-I nos macrófagos (16).

Nos estudos anteriores demonstrou-se que, em general, o IGF-I favorece a proliferação da *Leishmania* e o desenvolvimento da leishmaniose com espécies de *Leishmania* dermotrópicas. Na espécie *Leishmania (L.) infantum (L. chagasi)*, embora a proliferação seja influenciada pelo IGF-I, a atividade da arginase diminuía nos promastigotas por efeito do IGF-I (32), mostrando indícios de que a via da arginase poderia não ser a via estimulada pelo IGF-I no caso da *L. (L.) infantum* e poderia não ser tão importante para o desenvolvimento da infecção.

O modelo de camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) donovani* mostra um perfil de expressão de citocinas diferente ao perfil visto no modelo de BALB/c infectado por *L. major* (33). Esta diferença na evolução da infecção em camundongos BALB/c, sendo suscetível à infecção por *L. (L.) major*, mas resistente com *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum*, levanta a necessidade de se estudar os mecanismos de interação *Leishmania*-macrófago em cada espécie de *Leishmania*.

Na interação *Leishmania (L.) major* e macrófago murino, IL-4 induz o aumento do parasitismo como esperado. No entanto, nos experimentos de silenciamento gênico do IGF-I por RNA de interferência, foi observado que o efeito do IL-4 era anulado, não se conseguindo aumentar o parasitismo quando o IGF-I era silenciado. Estudos foram aprofundados e concluiu-se que o IGF-I era o elemento efetor da ação da citocina IL-4 (26).

Observado o papel importante do IL-4 no modelo macrófago murino infectado por *L. (L.) major*, passamos a estudar o seu efeito nas infecções de macrófagos humanos por *L. infantum*. Visamos encontrar o papel do IL-4, sua relação à expressão e efeito de IGF-I, efetor putativo de IL-4, durante a infecção do macrófago humano por espécie viscerotropica, no modelo humano in vitro, na busca de fator ou mecanismo que explique a diferença nesse modelo. Como IL-4 tem efeito sobre o metabolismo de L-arginina no modelo murino aumentando a expressão e a atividade da arginase, diminuindo ao mesmo tempo a expressão do NOS2 e a produção do óxido nítrico, avaliamos, na sequência, os produtos finais destas duas vias do metabolismo da L-arginina e a expressão do mRNA da Arginase 1. A via de sinalização de IGF-I implica a expressão do seu receptor e, desta forma, focamos a expressão de mRNA de IGF-I e IGF-IR.

2. - OBJETIVOS

2.1.- Objetivo geral

Analisar a contribuição da expressão do fator de crescimento insulina-símile I (IGF-I) e do seu receptor no parasitismo de monócitos humanos por *Leishmania (L.) infantum* sob estímulos de IL-4 e IGF-I.

2.2. - Objetivos específicos

Em macrófagos derivados da linhagem monocítica humana THP-1 infectados por *L. (L.) infantum:*

- Avaliar o efeito de IL-4 no parasitismo, na produção de óxido nítrico (NO), atividade da arginase e expressão de mRNA de Arginase 1, de IGF-I e de IGF-IR.
- Avaliar o efeito de IGF-I no parasitismo, na produção de óxido nítrico (NO), atividade da arginase e expressão de mRNA de Arginase 1, de IGF-I e de IGF-IR.

3.- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.- Animais

Hamsteres (*Mesocricetus auratus*) machos, não isogênicos (45 a 60 dias), foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (São Paulo, Brasil).

O uso de animais foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT-USP), sob o número 2015/295A (Anexo).

Os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo em ambiente com temperatura controlada, água e ração (Purina Brasil) à vontade.

3.2.- Células THP-1

Foi utilizada a linhagem celular de monócitos humanos THP-1 (TIB-202 – ATCC – The Global Bioresource Center, USA) (34). As células foram cultivadas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, GIBCO, Life Technologies, Brasil) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO, Invitrogen, Life Technologies, Brasil) inativado a 56 °C por 30 minutos. A cultura foi realizada a temperatura de 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO_2 e o meio de cultura foi renovado a cada três dias.

3.2.1.- Diferenciação de monócitos THP-1

Macrófagos THP-1 foram obtidos incubando os monócitos com *Phorbol Myristate Acetate* (PMA) 20 ng/mL (Sigma, Brasil) em meio RPMI 1640 com 2% SFB, foram cultivados em placas de cultura de 24 poços (JetBioFil, China) durante 24 horas. Na sequência, o meio RPMI 1640 com 2% SFB inativado foi renovado e incubado por 48 horas para completar a sua adesão aos poços de cultura. A cultura foi realizada em atmosfera úmida com 5% de CO_2 a 37 ºC.

Foram colocados 5 x 10^5 células/poço em 1 mL de meio para avaliar o parasitismo e 10^6 células/poço para avaliar a concentração de óxido nítrico (NO), atividade da arginase e extração de mRNA.

3.3.- Parasitos

Nos experimentos, foi utilizada a cepa *Leishmania (Leishmania) infantum* MHOM/BR/72/LD.

Parasitos foram obtidos a partir de homogeneizado de baço de hamsters infectados. Cultivados em meio 199 (Invitrogen, USA) com penicilina (100UI/mL), gentamicina (10µg/mL), L-glutamina (2mM), Hepes (10 mM) e Hemina (20mg/mL), suplementado com 10% de SFB inativado (GIBCO, Invitrogen, Life Technologies, Brasil), e 5% de urina humana filtrada. As culturas foram mantidas a 26ºC.

Promastigotas em fase estacionária de crescimento foram utilizadas nos ensaios de infecção de macrófago.

3.3.1.- Manutenção da cepa de *Leishmania (L.) infantum*

Para manter a capacidade infectiva dos parasitos, hamsteres foram inoculados intraperitonealmente com uma suspensão do homogeneizado de baço de hamster infectado (a presença de amastigotas no tecido foi avaliada por microscopia de luz) em 1 mL de meio RPMI 1640. O procedimento foi realizado a cada 3 – 4 meses.

Os animais foram anestesiados com isoflurano (BaxterHealthcare, USA), por via inalatória (concentração alveolar mínima de 1,5%), para realização do procedimento.

3.4.- Infecção de macrófagos THP-1 *in vitro*

Macrófagos THP-1 cultivados em placas de cultura de 24 poços foram lavados uma vez com *Phosphate-buffered saline* (PBS) 0,01M, PH 7,0 a 37 ºC para retirar as células não aderidas. Suspensão de promastigotas em meio RPMI 1640 com 2% SFB inativado foi adicionada na proporção de 8 parasitos/macrófago e as placas foram incubadas em atmosfera úmida com 5% de CO_2 a 37 ºC durante 6 horas. A seguir, os poços foram lavados duas vezes com PBS a 37 ºC para retirar as promastigotas não internalizadas e o meio RPMI 1640 com 2% SFB inativado foi renovado e os cultivos mantidos por 24, 48 e 72 horas para as avaliações.

Foram infectados 5 x 10^5 células/poço em 1 mL de meio para avaliar o parasitismo e 10^6 células/poço para avaliar a concentração de óxido nítrico (NO), atividade da arginase e extração de mRNA.

3.5.- Tratamento de IGF-I nas infecções

Em alguns experimentos, os macrófagos THP-1 infectados por *Leishmania (L.) infantum* foram tratados com IGF-I recombinante humano (50 ng/mL) (R&D Systems, USA) em RPMI 1640 com 2% SFB inativado e mantidas por 24, 48 e 72 horas para avaliar seu efeito sobre o parasitismo, a produção de nitrito, atividade de arginase e a expressão dos genes Arginase 1, IGF-I e IGF-IR.

3.6.- Tratamento de IL4 nas infecções

Em alguns experimentos, os macrófagos THP-1 infectados por *Leishmania (L.) infantum* foram tratados com IL-4 recombinante humano (20 ng/mL) (Prepotech, USA) em meio RPMI 1640 com 2% SFB inativado e mantidas por 24, 48 e 72 horas para avaliar seu efeito sobre o parasitismo, a produção de nitrito, atividade de arginase e a expressão dos genes Arginase 1, IGF-I e IGF-IR.

3.7.- Atividade da arginase

Atividade da arginase foi medida pela produção de ureia, produto da hidrolise da L-arginina causada pela enzima arginase presente nos macrófagos infectados (35).

Placas de cultivo foram retiradas da estufa e imediatamente foram coletados e guardados os sobrenadantes, macrófagos infectados e não infectados no número de 10^6 celulas/poço, foram lisados com 100µL de Triton-100 a 0,01% com inibidor de proteases (Protease Inhibitor Mix G 39101, Serva) 10µL/mL.

Para ativação da enzima arginase, 50µL dos lisados foram misturados com 50 µL de 10 mM $MnCl_2$ e 50 mM Tris-Cl pH 7,4 e incubados a 55 ºC por 10 minutos.

Após a ativação da enzima, acrescentaram-se 25 µL de L-arginina (Sigma, Brasil) 0,5 M pH 9,7 e incubados a 37 ºC por 45 minutos. A reação foi parada com adição de 400µL de $H_2SO_4/H_3PO_4/H_2O$ (1/3/7 v/v/v).

Foram acrescentados 25 μL de 9% α-isonitrosopropiophenone (ISPF) (Sigma, Brasil) em etanol 100% e incubado a 95 ºC por 45 minutos. A concentração de ureia foi avaliada por espectrofotometria a 540 nm (Multiskan MCC/340 P versão 2,20 Labsystems, Finlândia), onde uma unidade da atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que forma 1 μmol de ureia por minuto.

3.8.- Dosagem de óxido nítrico

A produção do óxido nítrico foi avaliada pela concentração de nitrito (NO_2^-) presente nos sobrenadantes dos cultivos de 10^6 células/poço (36). As concentrações foram determinadas por ensaio em placas de poliestireno (Nunclon, Denmark) de 96 poços. As amostras (50μL) foram distribuídas nos poços, em triplicatas, e adicionados 50μL do reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de diamino naftaleno diidroclorado e 2% de ácido fosfórico em água bidestilada), incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos protegidos da luz. Foi utilizado nitrito de sódio ($NaNO_2$) em meio RPMI 1640 como referência. As amostras foram avaliadas por espectrofotometria a 540 nm (Multiskan MCC/340 P versão 2,20 Labsystems, Finlândia).

3.9.- Parasitismo

Para avaliação do parasitismo foram utilizadas lamínulas circulares de 13mm (Knittel Glasser, Germany) sobre as quais foram colocados 5 x 10^5 macrófagos/poço e infectados na proporção de 8:1 parasitos / celula. Foi avaliado após 24, 48 e 72 horas por microscopia óptica. Lamínulas foram coradas utilizando Panótico rápido (New Prov, Brasil), fixadas em lâminas com Permount (Fisher Scientific, USA). Foram contadas 900 células por experimento (300 células por lamínula), o resultado foi expresso em número de amastigotas por 100 células.

3.10.- Extração do RNA

RNA total foi extraído de 10^6 células/poço utilizando 1mL de TRIzol ® Reagent (Ambion, Life thecnologies, USA), foi adicionado 200 μL de clorofórmio. Centrifugou-se a 12000g por 20 minutos a 4°C, a fase aquosa foi separada e se adicionaram 500 μL de isopropanol. A mistura foi mantida por 30

minutos a temperatura ambiente, centrifugada à 14000g por 15 minutos para obter o pellet.

Removido o sobrenadante, foi adicionado 1 mL de etanol 75% à 4°C e centrifugado à 7600g por 10 minutos, após nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado. O pellet deixado a temperatura ambiente por 10 minutos foi ressuspendido em água livre de RNAse (DEPC) (Invitrogen, USA) 20 µL e dosado e analisado por espectrofotometria a 260/280 nm em espectrofotômetro UV-Vis NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington,DE), valores de 1,8 - 2,0 foram considerados aceitáveis.

3.11.- Obtenção do cDNA

Foi utilizado o reagente High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA), foi utilizado 1µg de RNA na obtenção de cDNA.

3.12.- Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

Foram misturados 4 µL de cDNA com 4 µL do reagente 5X HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne, Estonia), 0.5 µL de cada primer a 10µM (sequencias dos primers em Tabela 1), e 12 µL de água MilliQ autoclavada. As amplificações foram realizadas no equipamento StepOne (Ampplied Biosystems, USA), descrição dos ciclos na Tabela 1.

A quantificação relativa da expressão do RNA mensageiro foi mensurada utilizando a comparação do Threshold cycle (C_T) dos genes alvo (IGF-I, IGF-IR e Arginase 1) com o gene constitutivo GAPDH. Para a análise da expressão normalizamos os resultados, descontando o C_T obtido do gene constitutivo do C_T do gene alvo de cada amostra (ΔC_T). Para as comparações dos resultados entre os diferentes grupos, calculamos em relação ao valor de ΔCT da célula sem infecção e sem estimulo ($\Delta\Delta C_T$) e o valor final foi obtido da equação: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (37).

Tabela 1.- Sequências de iniciadores, utilizados na qPCR

Sequências		Ciclos: 40
IGF-I humano		
Forward	5` CTG AGC TGG TGG ATG CTC TTC A 3`	
Reward	5` GAC TGC TGG AGC CAT ACC CTG T 3`	95°C – 15 seg
IGF-IR humano		58°C – 30 seg
Forward	5`GGT CTC TGA GGC CAG AAA TGG A 3`	72°C – 30 seg
Reward	5` CAG CAA GGT CTC TGT GGA CGA A 3`	
GAPDH humano		
Forward	5` GTC GGA GTC AAC GGA TTT GGT C 3`	
Reward	5` TGC CAT GGG TGG AAT CAT ATT G 3`	
Arginase 1 humano		
Forward	5` ACC CTG GGG AAC ACT ACA TTT TGA 3`	
Reward	5` CCA TCA CCT TGC CAA TTC CTA GTC 3`	

3.13.- Tratamento de IGF-I sobre os promastigotas

Promastigotas 5 x 10^5 por mL foram tratados com IGF-I recombinante humano (R&D Systems, USA) nas concentrações de 25, 50 ou 100 ng/mL em frascos de 5 mL. As culturas foram mantidas a 26 °C por 11 dias e as contagens foram realizadas a cada 24 horas.

3.14.- Análise estatística

Todos os resultados apresentados são de tres experimentos independentes com triplicatas em cada experimento, resultados estes analisados juntando-se todos os dados. 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 dos resultados e a apresentação das variáveis mensuradas foi feita em tabelas e gráficos utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software, Inc., San Diego, CA, USA).

4.- RESULTADOS

4.1.- IGF-I induz aumento na proliferação de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum*

Foi avaliado o efeito do IGF-I, nas concentrações 25, 50 e 100 ng/mL, no crescimento de promastigotas de *L. (L.) infantum* (Fig. 1).

A fase logarítmica da curva de crescimento se desenvolve entre o dia três e o dia quatro atingindo a fase estacionária no dia seis, com diminuição do número de parasitos nos dias subsequentes.

Observamos um efeito doses resposta nas diferentes concentrações do IGF-I recombinante com o aumento do número de parasitos. Como no dia seis a cultura apresenta maior número de parasitos, escolhemos este dia como o dia adequado do cultivo para realizar as infecções.

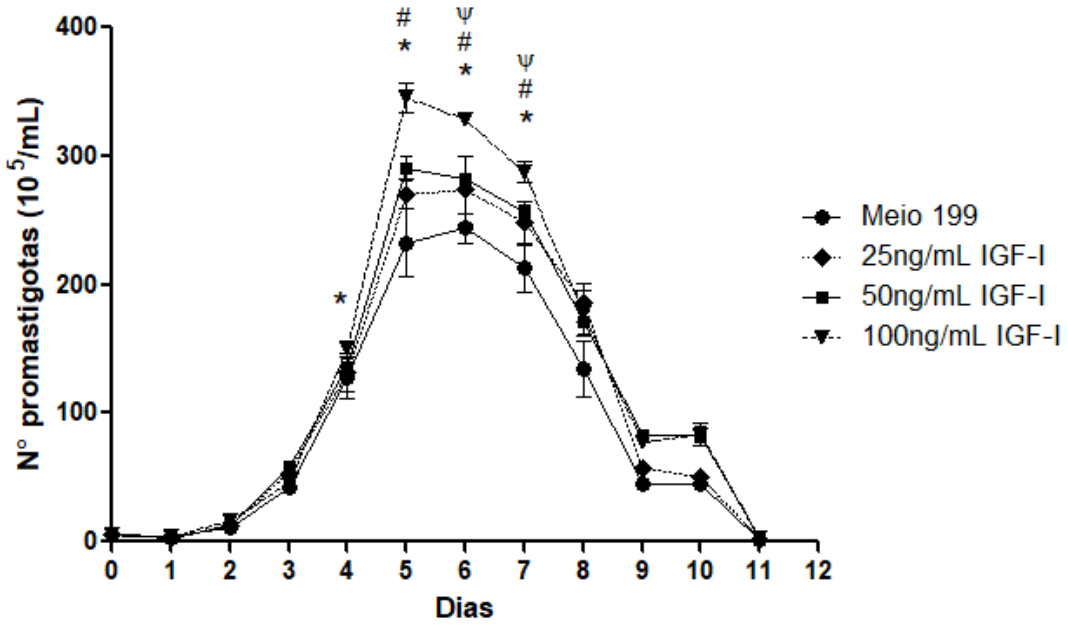

Figura 1. Efeito do IGF-I no crescimento de promastigotas de *Leishmania (L) infantum* *in vitro*. Curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* sob estimulo de IGF-I (25, 50 e 100 ng/mL) e cultivados por 11 dias em meio 199. Resultado representado pelo número de promastigotas x 10^5 (média ± desvio-padrão). *=P<0.05 (100ng/mL), #=P<0.0001 (50ng/mL), Ψ=P<0.0001 (25ng/mL) em relação ao grupo controle sem IGF-I (Meio 199). Testes de ANOVA e Tukey.

4.1.- Efeito do IGF-I nos macrófagos infectados por *Leishmania (L.) infantum*

O estudo teve início com o estabelecimento das condições experimentais.

4.1.1.- Viabilidade de monócitos THP-1

Como o soro fetal bovino (SFB) possui traços de IGF-I e insulina que poderiam estimular a via de sinalização IGF-I/IGF-IR, avaliamos o efeito da albumina sérica bovina, livre de insulina, como suplemento para o meio de cultura a ser utilizado no crescimento das células THP-1.

Para obter células em cultura com BSA livre de insulina, os meios de cultura foram suplementados com concentrações cada vez menores de SFB, passando de 20% para 10% (Fig.2A, 2B) ou 20% para 10% e para 5% (Fig. 2C, 2D). Logo após essa diminuição de SFB, foi avaliada a viabilidade das células quando suplementadas com BSA nas concentrações 1%, 0.5% e 0.25% (Fig. 2B, 2D). Utilizaram-se as mesmas concentrações de SFB como controle (Fig. 2A, 2C).

Observou-se que as células suplementadas com BSA apresentavam menor viabilidade celular quando comparadas com as células suplementadas com SFB. Desta forma, optamos por continuar os experimentos mantendo os monócitos THP-1 em cultura com meio suplementado com 10% de SFB para obter maior número de células viáveis e testar concentrações menores de SFB nas etapas seguintes.

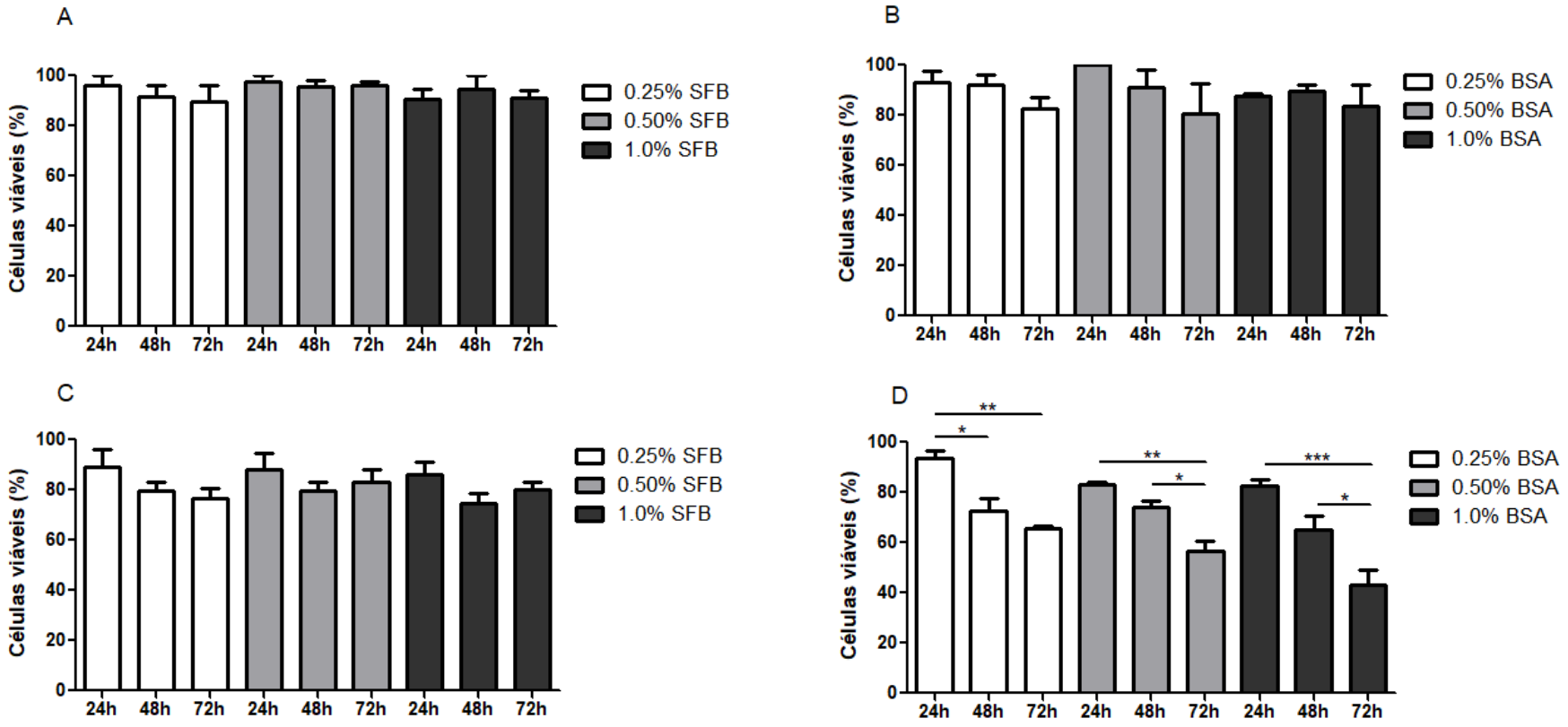

Figura 2.- Avaliação da viabilidade de monócitos THP-1 com concentrações diferentes de suplementos SFB e BSA. Monócitos cultivados previamente com 10% SFB (A, B) ou 5% SFB (C, D) foram mantidas em cultura com baixas concentrações de SFB (A, C) e BSA (B, D) por 24h, 48h e 72h. Resultado representado pela porcentagem de células viáveis (média ± desvio-padrão). *=P<0.05, **=P<0.001, ***=P<0.0001, Testes de ANOVA e Tukey.

4.1.2.- Diferenciação de monócitos em macrófagos THP-1

Após termos optado por cultivo de monócitos com suplementação com 10% de SFB, procuramos a menor concentração de SFB que não afetasse a diferenciação dos monócitos em macrófagos THP-1. Assim, foi testada a porcentagem de macrófagos aderidos após o tratamento com PMA. Foram utilizados 5 x 10^5 células por poço.

Durante o tratamento com PMA foram usadas as concentrações de 0.25%, 0.5%, 1.0%, 2.0% e 5.0% de SFB por 24 horas, após esse tempo o meio com PMA foi retirado e as células foram lavadas uma vez com PBS a 37 ºC para retirar as células não aderidas. O meio com PMA e o PBS das lavagens foram coletados e centrifugados à 1200 RPM para recuperar as células não aderidas.

Após as lavagens foi colocado meio novo nas mesmas concentrações de SFB por 48 horas, tempo em que os macrófagos completam a sua adesão. A seguir o meio foi retirado e os poços lavados uma vez com PBS a 37 ºC. O meio retirado e o PBS das lavagens foram centrifugados e as células contadas. O número final de células não aderidas foi obtido da soma das duas contagens expressadas em porcentagem de células aderidas (38).

Observamos que há uma maior porcentagem de células aderidas nas concentrações de 2% e 5% de SFB, não se observando diferença estatisticamente significante nessas concentrações, o que nos levou à opção de continuar os testes com essas duas concentrações (Fig. 3).

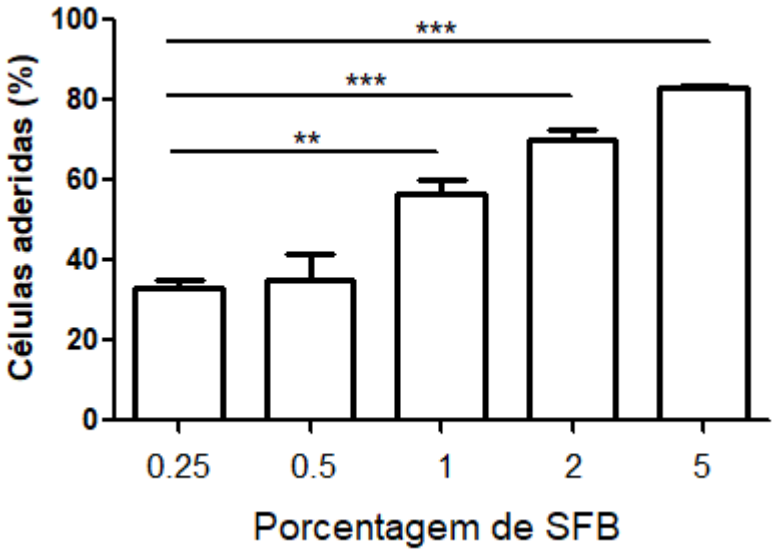

Figura 3. Diferenciação de monócitos em macrófagos THP-1. Diferenciação de monócitos THP-1 após tratamento com PMA (20ng/mL) em meio RPMI 1640 e SFB (0.25%, 0.5%, 1%, 2% e 5%). Resultado representado pela porcentagem de células aderidas nos poços de cultura (média ± desvio-padrão). **=P<0.001, ***=P<0.0001, Testes de ANOVA e Tukey.

4.1.3.- Viabilidade dos macrófagos

Após termos observado a porcentagem de macrófagos THP-1 aderidos, avaliamos a sua viabilidade quando cultivados com 2% e 5% de SFB, incubados em atmosfera úmida a 37 ºC e 5% de CO_2 por 24 e 48 horas.

O teste de viabilidade foi realizado por contagem de três campos de 100 células por poço de cultura utilizando azul de Trypan.

Observamos que a viabilidade dos macrófagos foi maior em meio com 5% de SFB, mas, nas duas concentrações de SFB, a viabilidade se manteve acima de 83% (Fig. 4), optando-se, portanto, por utilizar as duas concentrações nos testes posteriores.

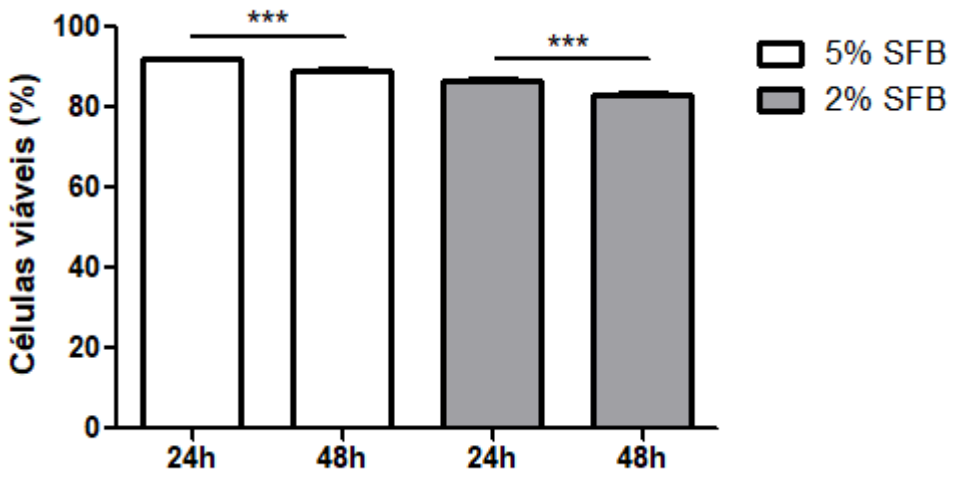

Figura 4. Viabilidade de macrófagos THP-1. Macrófagos THP-1 cultivados em meio RPMI 1640 e SFB 2% e 5% por 24h e 48h. Resultado representado pela porcentagem de células viáveis (média ± desvio-padrão). ***=P<0.0001, Testes de ANOVA e Tukey.

4.1.4.- Produção de óxido nítrico por estimulo de LPS

Macrófagos THP-1 foram estimulados com LPS em concentrações de 0.1 até 10 µg/mL. A produção de óxido nítrico, não foi influenciada pelo LPS, apresentando uma concentração basal em todos os experimentos na comparação com o não tratado.

4.1.5.- Parasitismo de macrófagos infectados com diferentes proporções de parasito/macrófago

Macrófagos THP-1 foram infectados com três proporções diferentes de parasitos por célula (4, 8 e 10 parasitos/célula).

Encontramos que a proporção 8 parasitos/célula permite observar um melhor desenvolvimento da infecção, com aumento no número de parasitos nos três tempos avaliados e com um perfil similar nas duas concentrações de SFB. Já na proporção de 4 parasitos/célula não se observou aumento progressivo no número de parasitos e na proporção 10 parasitos/célula se observa uma diminuição do número de parasitos nas 72 horas (Fig.5). Por essa razão, continuamos os experimentos com a proporção de 8 parasitos/célula.

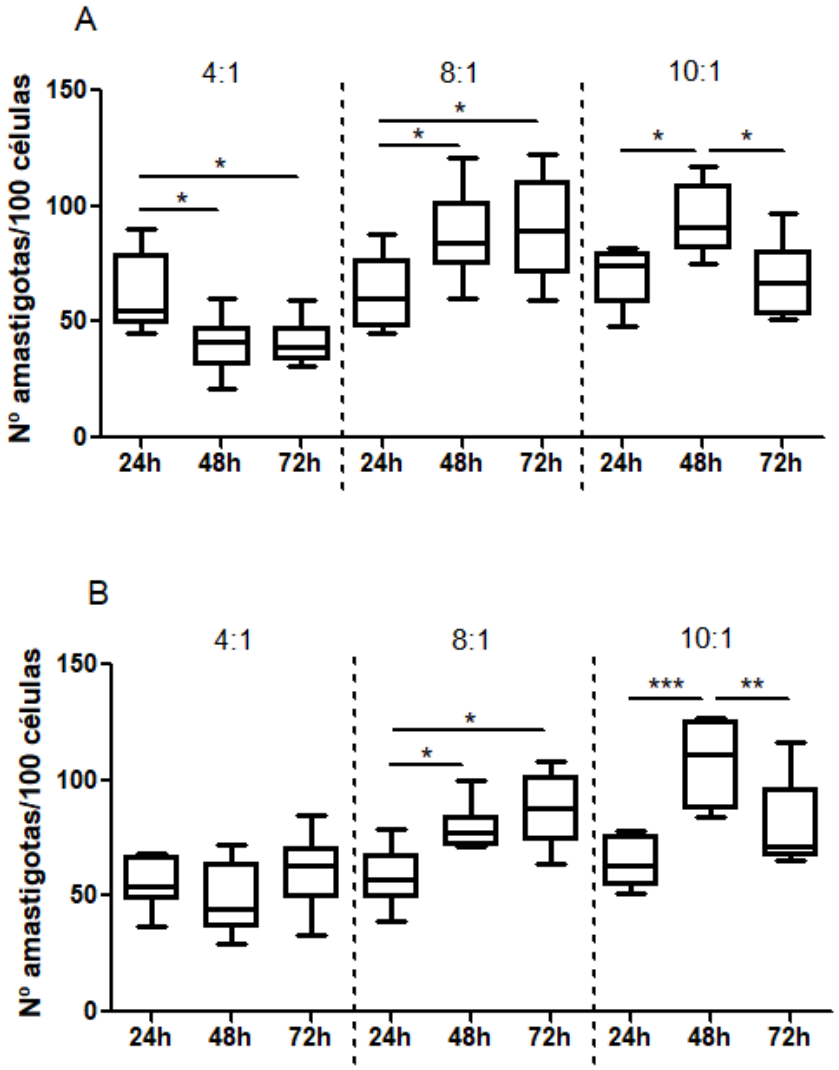

Figura 5. Parasitismo de macrófagos infectados com diferentes proporções de parasito/célula. Macrófagos THP-1 infectados com promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (4, 8 ou 10 parasitos/célula) em meio RPMI 1640 com 2% SBF (A) e 5% SBF (B) por 24h, 48h e 72h. Resultado representado pelo número de parasitos por 100 células (mediana e intervalo entre percentis 25 e 75). *=P<0.05, **=P<0.01, ***=P<0.001, Testes de ANOVA e Tukey.

4.1.6.- Expressão do mRNA de IGF-I e IGF-IR em macrófagos infectados

Tendo definida a proporção de parasito/célula passamos a avaliar a expressão do mRNA de IGF-I (Fig. 6A, 6B) e IGF-IR (Fig. 6C, 6D) em cultivos com 2% de SFB (A, C) e 5% de SFB (B, D). Foi utilizado o gene de GAPDH como referência.

Observamos que nos macrófagos infectados, tanto com 2% de SFB quanto com 5% de SFB, o mRNA de IGF-I se apresentou uma tendência a maior expressão nos três tempos avaliados quando comparados com o controle macrófago não infectado sem tratamento.

No experimento com 2% de SFB, após 24 horas se apresentou uma tendência a maior expressão de 0.27 vezes, já após 48h se apresentou uma tendência a maior expressão de 1.20 e após 72h uma tendência a maior expressão de 1.18 em comparação com o macrófago não infectado (figura 6 A).

No experimento com 5% de SFB, a expressão após 24 horas se apresentou uma tendência a maior expressão de 0.40 vezes, já após 48h uma tendência a maior expressão de 1.19 vezes e após 72h uma tendência a maior expressão de 1.15 vezes em comparação com o macrófago não infectado (figura 6 B).

Na avaliação da expressão de mRNA de IGF-IR observamos que os macrófagos infectados tanto com 2% quanto com 5% de SFB apresentaram uma tendência a menor expressão nos três tempos avaliados quando comparados com o controle macrófago não infectado e sem tratamento.

No experimento com 2% de SFB, após 24h se observou uma tendência a menor expressão de 0.37 vezes, após 48h uma tendência a menor expressão de 0.18 vezes e após 72h uma tendência a menor expressão de 0.27 vezes em comparação com os macrófagos não infectados (Fig. 6 C).

No experimento com 5% de SFB, após 24h se observou uma tendência a menor expressão de 0.33 vezes, após 48h uma tendência a menor expressão de 0.082 vezes e após 72h uma tendência a menor expressão de 0.26 vezes em comparação com os macrófagos não infectados (Fig. 6 D).

Nas duas concentrações de SFB, se observou que o perfil de expressão dos genes IGF-I e IGF-IR foi similar nos três tempos avaliados.

Nossos resultados mostraram que existe similaridade entre os macrófagos cultivados com 2% e 5% de SFB tanto na diferenciação do monócito, na viabilidade dos macrófagos, no parasitismo e na expressão de mRNA dos genes alvo. Sendo que esta etapa da padronização do estudo visara definir qual é a menor concentração de SFB que não afetara o desenvolvimento da infecção e suas características fisiológicas, decidimos utilizar 2% de SFB nos próximos experimentos do estudo.

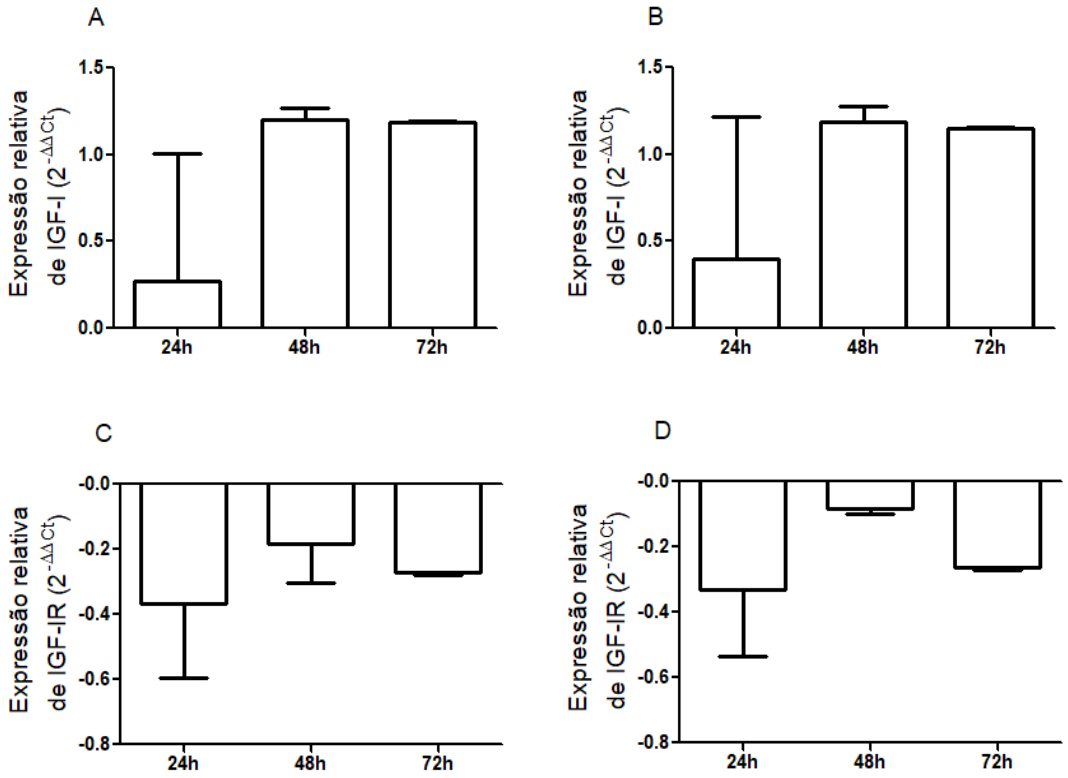

Figura 6. Expressão de mRNA de IGF-I e IGF-IR em macrófagos THP-1. Expressão de mRNA de IGF-I (A, B) e IGF-IR (C, D) em macrófagos THP-1 infectados por promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (8 parasitos/célula) em meio RPMI 1640 com 2% SFB (A, C) e 5% SFB (B, D) por 24h e 48h e 72h. Resultado representado pela expressão relativa de mRNA dos genes em relação a expressão do grupo controle sem infecção (média ± desvio-padrão). Testes de ANOVA e Tukey.

4.2.- Efeito do IL-4 sobre o parasitismo

Observou-se que nos macrófagos infectados, sem tratamento de IL-4, o parasitismo aumenta significativamente no período de 24 a 48 horas.

Observou-se que o parasitismo se mantem semelhante nos macrófagos infectados tratados com IL-4 na comparação com o controle infectado sem tratamento após 24 e 48 horas. Já após 72h o parasitismo aumenta no macrófago infectado com tratamento de IL-4, na comparação com o macrófago infectado sem tratamento (Fig. 7).

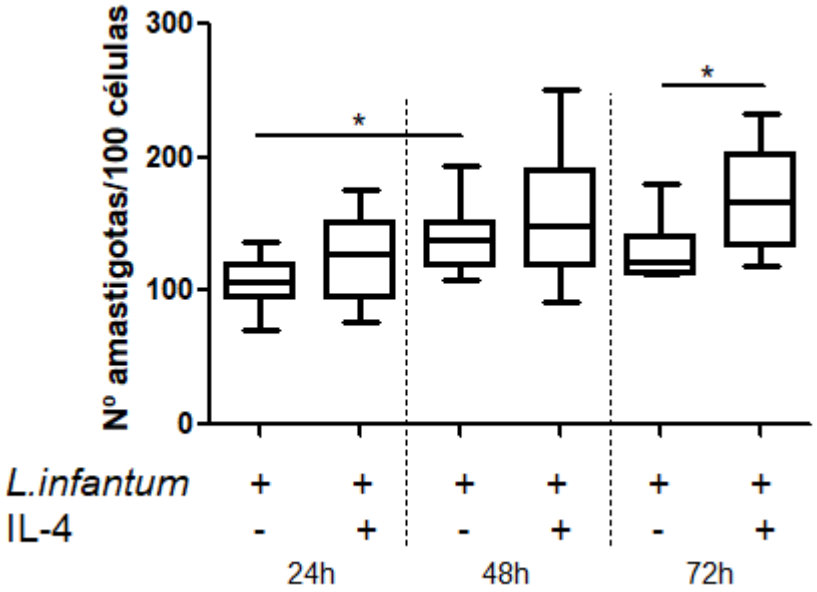

Figura 7. Efeito do IL-4 sobre o parasitismo de macrófagos THP-1. Macrófagos THP-1 infectados por *Leishmania (L.) infantum* (8 parasitos/célula) em meio RPMI 1640 suplementados com 2% SBF e sob estimulo de IL-4 (20ng/mL) por 24h, 48h e 72h. Resultado representado pelo número de amastigotas por 100 células (mediana e intervalo entre percentis 25 e 75). *=P<0.05, **=P<0.001, Testes de ANOVA e Tukey.

4.3.- Efeito de IL-4 sobre a concentração de óxido nítrico

Foi avaliada a produção de nitrito nos macrófagos THP-1 infectados na presença do IL-4 recombinante (20 ng/mL). IGF-I recombinante foi acrescentado após as 6 horas de infecção e mantido durante os três tempos avaliados 24, 48 e 72 horas.

No experimento, observou-se uma tendência a diminuição da produção de NO nos macrófagos não infectados tratados com IL-4, após 24 e 48 horas. Nas células infectadas, não se observou alteração na produção de NO na presença de IL-4. (Fig. 8).

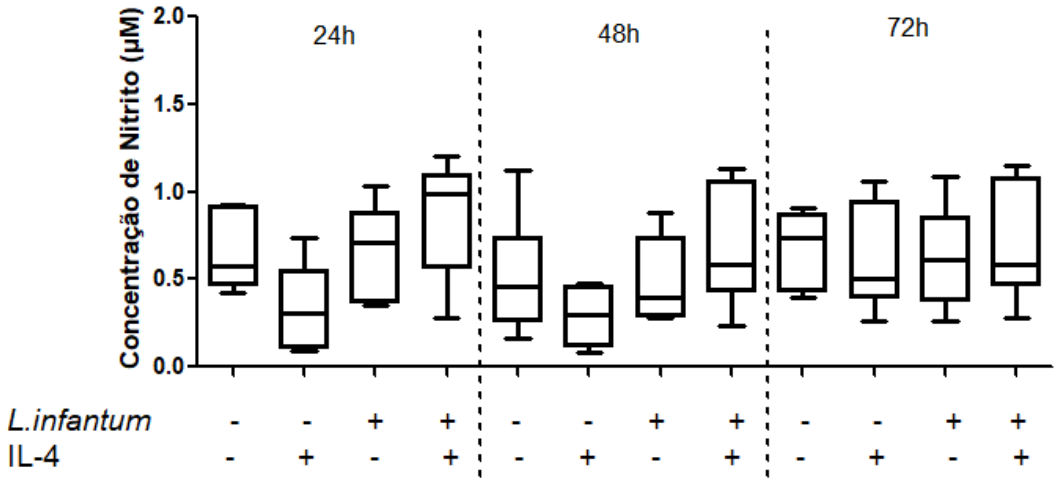

Figura 8. Efeito do IL-4 sobre a produção de óxido nítrico em macrófagos THP-1. Macrófagos THP-1 foram infectados por promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (8 parasitos/célula) e sob estimulo de IL-4 (20ng/mL) por 24h, 48h e 72h. Resultado representado pela concentração de nitrito (µM) (mediana e intervalo entre percentis 25 e 75). Testes de ANOVA e Tukey.

4.5.- Efeito do IGF-I sobre a atividade da arginase

Foi avaliada a atividade da arginase dos macrófagos infectados na presença do IL-4 recombinante (20 ng/mL). IL-4 recombinante foi acrescentado após as 6 horas de infecção. Observamos que nos macrófagos infectados sob estimulo ou não de IL-4, não houve alteração na atividade da arginase na comparação com o grupo controle de macrófagos não infectados e não tratados. Observamos resultados semelhantes nos macrófagos não infectados e tratados com IL-4 nos três tempos avaliados (Fig. 9).

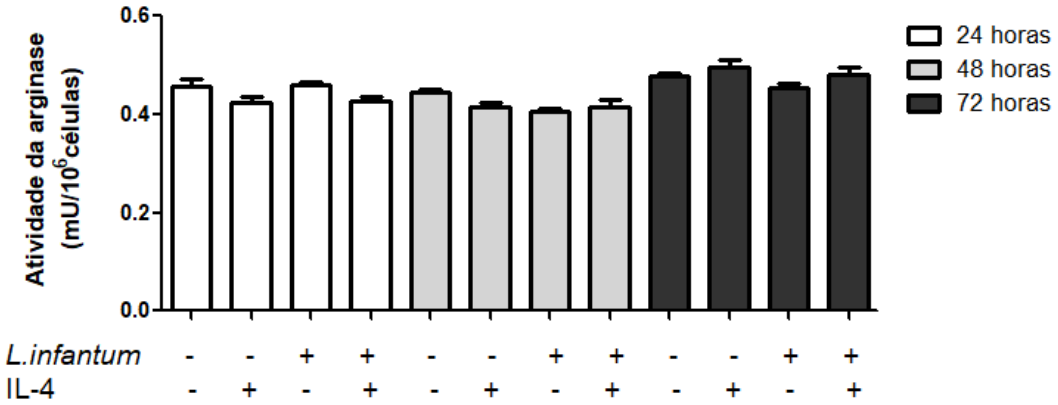

Figura 9. Efeito do IL-4 sobre a atividade da arginase em macrófagos THP-1. Macrófagos THP-1 foram infectados por promastigotas *Leishmania (L.) infantum* (8 parasitos/célula) e sob estimulo de IL-4 (20ng/mL) por 24h, 48h e 72h. Resultado apresentado pelo mU de arginase em 10^6 células (média ± desvio-padrão). Testes de ANOVA e Tukey.

4.6.- Efeito de IL-4 sobre a expressão da arginase 1 humana

Observamos, após 24h, que existe uma tendência a uma maior expressão de mRNA de arginase 1 nos três grupos avaliados. Nos macrófagos não infectados, com tratamento de IL-4, se observou uma maior expressão de 2 vezes. Nos macrófagos infectados, sem tratamento, houve uma tendência a maior expressão de 0.83 vezes. Nos macrófagos infectados e com tratamento, houve uma tendência a maior expressão de 1.53 vezes quando comparados com o controle macrófagos não infectados sem tratamento (Fig. 10 A).

Após 48h, observamos uma tendência a uma maior expressão nos três grupos quando comparado com o grupo controle macrófagos não infectados sem tratamento. Nos macrófagos não infectados com tratamento uma tendência a maior expressão de 1.82 vezes. Nos macrófagos infectados, sem tratamento, uma tendência a maior expressão de 1.34 vezes e nos macrófagos infectados com tratamento, uma tendência a maior expressão de 1.56 vezes (Fig. 10 B).

Nos grupos infectados, após 24h, com o tratamento com IL-4 observou-se uma tendência a maior expressão, já após 48 horas se manteve semelhante ao grupo não tratado.

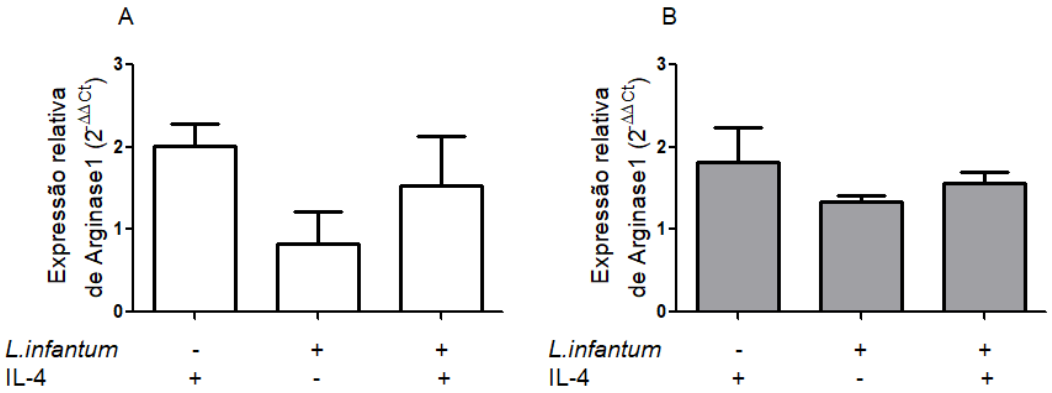

Figura 10. Efeito do IL-4 sobre a expressão de mRNA de Arginase 1 em macrófagos THP-1. Expressão de mRNA de Arginase 1 em macrófagos THP-1 infectados por promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (8 parasitos/célula) e sob estimulo de IL-4 (20 ng/mL) por 24 h (A) e 48 h (B). Resultado representado pela expressão relativa de mRNA de Arginase 1 em relação a expressão do grupo controle sem infecção e sem estimulo (média ± desvio-padrão). Testes de ANOVA e Tukey.

4.6.- Efeito de IL-4 sobre a expressão de mRNA de IGF-I e IGF-IR

Na comparação com o grupo controle de macrófagos não infectados, sem tratamento, após 24 horas, observou-se uma tendência a maior expressão de 1,03 vezes nos macrófagos não infectados, com tratamento. Nos macrófagos infectados, sem tratamento, não se observou alteração na expressão nos macrófagos infectados, com tratamento, uma tendência a maior expressão de 0.49 vezes.

Após 48 horas, nas três condições experimentais, houve tendência a maior expressão em comparação com o grupo controle macrófagos não infectados sem tratamento.

Após 48 horas o grupo infectado tem uma tendência ao aumento da expressão quando comparado com 24 horas.

Ao avaliar a expressão de mRNA de IGF-IR, observamos uma tendência a menor expressão nos três grupos avaliados após 24h. Os macrófagos não infectados não apresentaram alteração na expressão. Nos macrófagos infectados, sem tratamento, houve uma tendência a menor expressão de 0.57 vezes e nos macrófagos infectados com tratamento uma tendência a menor expressão de 0.68 vezes na comparação com o grupo controle macrófagos não infectados sem tratamento (Fig. 11 C).

Na avaliação da expressão após 48 horas, quando comparados com o grupo controle macrófagos não infectados sem tratamento, observamos maior expressão de 1.26 vezes nos macrófagos não infectados com tratamento. Nos macrófagos infectados, sem tratamento, apresentam uma tendência a menor expressão de 0.29 vezes e nos macrófagos infectados com tratamento, não se observou alteração na expressão (Fig. 11 D). A diferença do efeito de IL-4 sobre a expressão de IGF-IR na célula infectada, levando ao aumento da expressão, e sobre a célula infectada, levando à diminuição da sua expressão, foi significante.

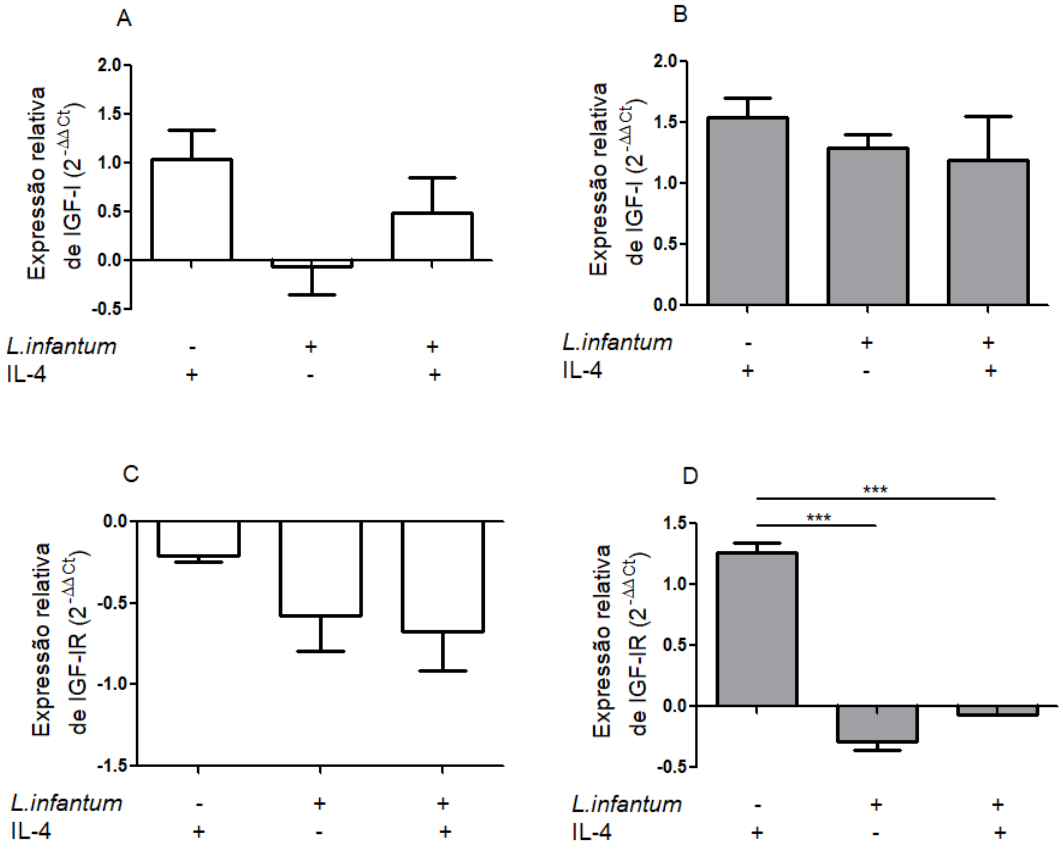

Figura 11. Efeito do IL-4 sobre a expressão de mRNA de IGF-I e IGF-IR em macrófagos THP-1. Expressão de mRNA de IGF-I (A, B) e IGF-IR (C, D) em macrófagos THP-1 infectados por promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (8 parasitos/célula) e sob estimulo de IL-4 (20 ng/mL) por 24 h (A, C) e 48 h (B, D). Resultado representado pela expressão relativa de mRNA dos genes em relação a expressão do grupo controle sem infecção e sem estimulo (média ± desvio-padrão). *=P<0.05, Testes de ANOVA e Tukey.

4.7.- Efeito do IGF-I sobre o parasitismo

Observou-se que nos macrófagos infectados sem tratamento com IGF-I o parasitismo aumenta significativamente após 48 e 72 horas na comparação com os macrófagos infectados não tratados após 24 horas.

Nos macrófagos infectados e tratados com IGF-I, o parasitismo diminui significativamente após 48 horas na comparação ao controle macrófagos infectados sem tratamento, caindo de 115 para 99 parasitos/100 células. Após 24h e 72h o parasitismo não apresenta uma diferença significativa entre os macrófagos tratados e não tratados (Fig. 12).

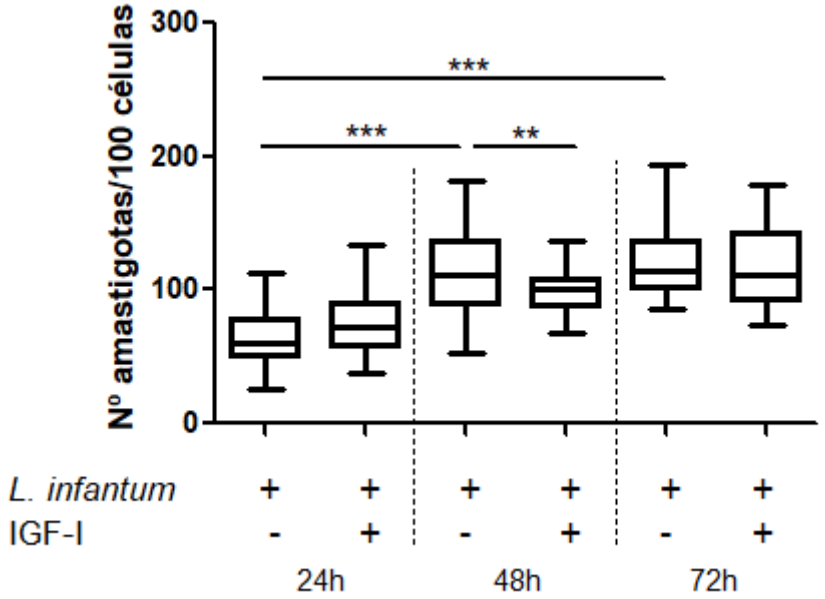

Figura 12. Efeito do IGF-I sobre o parasitismo de macrófagos THP-1. Macrófagos THP-1 infectados por promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (8 parasitos/célula) em meio RPMI 1640 suplementados com 2% SBF e sob estimulo de IGF-I (50ng/mL) por 24h, 48h e 72h. Resultado representado pelo número de amastigotas por 100 células (mediana e intervalo entre percentis 25 e 75). **=P<0.001, ***=P<0.0001, Testes de ANOVA e Tukey.

4.8.- Efeito do IGF-I na produção de óxido nítrico

Foi avaliada a produção de óxido nítrico, medido como nitrito, nos macrófagos THP-1 infectados na presença do IGF-I recombinante (50 ng/mL). O IGF-I recombinante foi acrescentado após as 6 horas de infecção e mantido durante os três tempos avaliados 24, 48 e 72 horas.

No experimento (Fig. 13), não se observam diferenças significativas nas diferentes condições. No entanto, observa-se uma tendência à diminuição na concentração de óxido nítrico nos macrófagos não infectados, sob efeito de IGF-I, em comparação com os macrófagos não infectados sem tratamento. Nos macrófagos infectados, não se observam alterações na produção de NO sob estímulo de IGF-I.

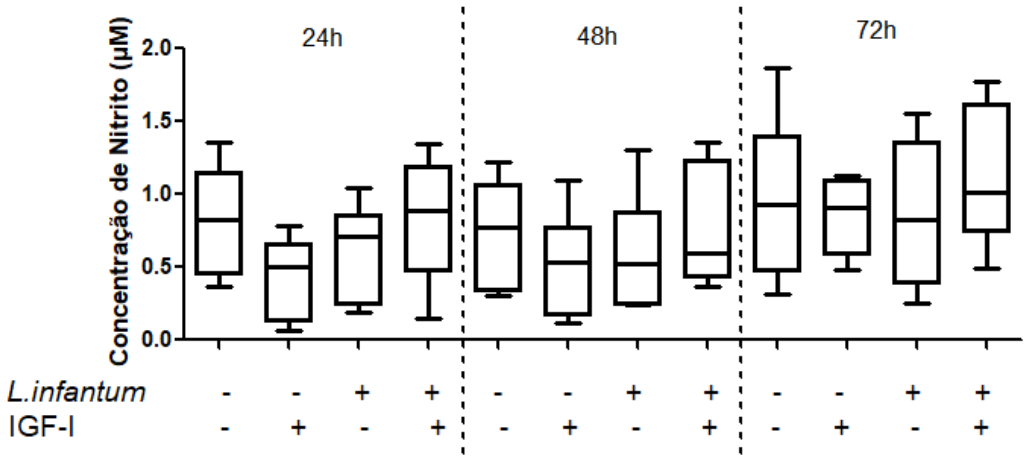

Figura 13. Efeito do IGF-I sobre a produção de óxido nítrico em macrófagos THP-1. Macrófagos THP-1 foram infectados por promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (8 parasitos/célula) e sob estimulo de IGF-I (50ng/mL) por 24h, 48h e 72h. Resultado representado pela concentração de nitrito (µM) (mediana e intervalo entre percentis 25 e 75). Testes de ANOVA e Tukey.

4.9.- Efeito do IGF-I sobre a atividade da arginase

Foi avaliada a atividade da arginase dos macrófagos infectados na presença do IGF-I recombinante (50 ng/mL). IGF-I recombinante foi acrescentado após as 6 horas de infecção. Observamos que nos macrófagos infectados, sob estimulo ou não de IGF-I, não houve alteração na atividade da arginase na comparação com o grupo controle de macrófagos não infectados sem tratamento. Observamos resultados semelhantes nos macrófagos não infectados e tratados com IGF-I nos três tempos avaliados (Fig. 14).

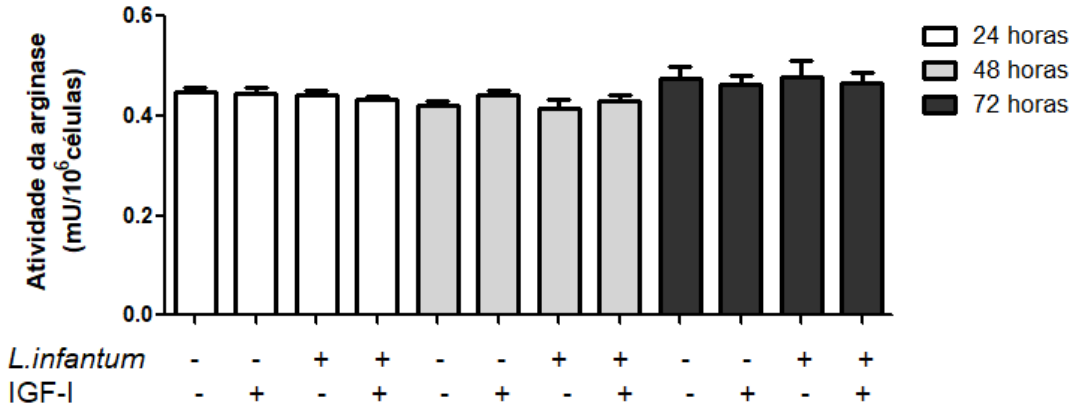

Figura 14. Efeito do IGF-I sobre a atividade da arginase em macrófagos THP-1. Macrófagos THP-1 foram infectados por promastigotas *Leishmania (L.) infantum* (8 parasitos/célula) e sob estimulo de IGF-I (50ng/mL) por 24h, 48h e 72h. Resultado apresentado pelo mU de arginase em 10^6 células (média ± desvio-padrão). Testes de ANOVA e Tukey.

4.10.- Efeito do IGF-I sobre a expressão da arginase 1 humana

Observamos uma tendência a maior expressão de mRNA de arginase 1 após 24h nos três grupos avaliados quando comparados com o controle macrófagos não infectados sem tratamento. Os macrófagos não infectados com tratamento apresentaram uma maior expressão de 2 vezes, os macrófagos infectados sem tratamento uma maior expressão de 1.23 vezes e os macrófagos infectados com tratamento uma tendência a maior expressão de 1.69 vezes quando comparados com o controle macrófagos não infectados sem tratamento (Fig. 15 A). Nos macrófagos infectados, o incremento na expressão na presença de IGF-I é marginal.

Já após 48h, observamos uma tendência a menor expressão de mRNA de Arginase 1 nos três grupos avaliados quando comparados com o controle macrófagos não infectados e sem tratamento. Os macrófagos não infectados com tratamento apresentaram uma tendência a menor expressão de 1.06 vezes, os macrófagos infectados sem tratamento uma tendência a menor expressão de 0.14 vezes e os macrófagos infectados com tratamento uma tendência a menor expressão de 1 vez quando comparados com o controle macrófagos não infectados sem tratamento (Fig. 15 B).

Após 24 horas nos macrófagos não infectados sem tratamento observou-se uma menor tendência ao aumento do mRNA de arginase 1 quando comparados com o grupo macrófagos infectados com tratamento (1,23 e 1.69 respectivamente) já em 48 horas quando comparamos os grupo macrófagos infectados sem tratamento e macrófagos infectados com tratamento observamos uma tendência a uma marcada diminuição da expressão quando comparado com o grupo infectado sem tratamento com uma tendência marginal a maior expressão de 0.12, mostrando que a diminuição marcada da expressão é efeito do IGF-I após 48 horas e apresenta diferença significativa (Fig. 15 B).

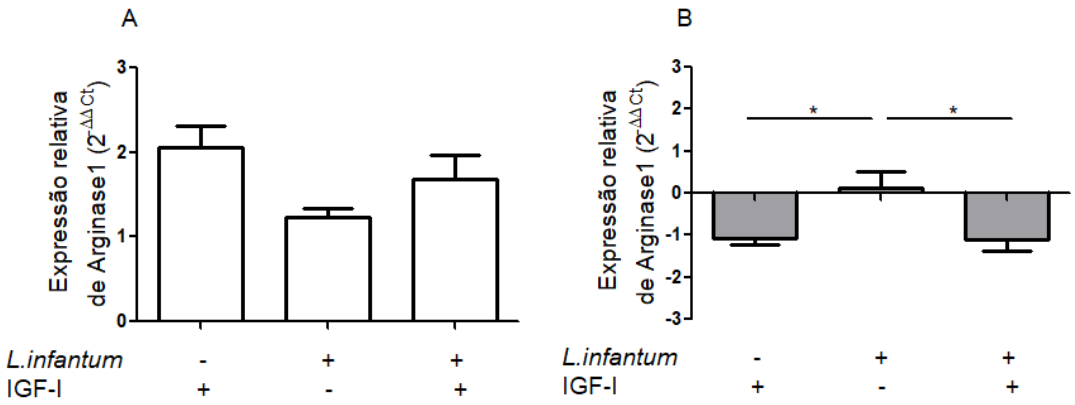

Figura 15. Efeito do IGF-I sobre a expressão de mRNA de Arginase 1 em macrófagos THP-1. Expressão de mRNA de Arginase 1 em macrófagos THP-1 infectados por promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (8 parasitos/célula) e sob estimulo de IGF-I (50 ng/mL) por 24 h (A) e 48 h (B). Resultado representado pela expressão relativa de mRNA de Arginase 1 em relação a expressão do grupo controle sem infecção e sem estimulo (média ± desvio-padrão). Testes de ANOVA e Tukey.

4.11.- Efeito do IGF-I sobre a expressão de mRNA de IGF-I e IGF-IR

Observamos aumento na expressão de mRNA de IGF-I nos três grupos avaliados tanto após 24h (Fig. 16 A) quanto 48h (16 B).

Após 24 horas, nos macrófagos não infectados com tratamento, o mRNA de IGF-I se apresentou uma tendência a maior expressão de 1,19 vezes. Nos macrófagos infectados sem tratamento se apresentou uma tendência aumento da expressão de 0.6 vezes. Nos macrófagos infectados, com tratamento, houve uma tendência a maior expressão de 0.92 vezes na comparação com o grupo controle macrófagos não infectados sem tratamento. Nos macrófagos infectados, o incremento na expressão na presença de IGF-I foi marginal

Após 48 horas, nos macrófagos não infectados com tratamento o mRNA de IGF-I apresentou uma tendência a maior expressão de 1,14 vezes. Nos macrófagos infectados sem tratamento. Houve uma tendência a maior expressão de 0.6 vezes. Nos macrófagos infectados, com tratamento, houve uma tendência a maior expressão de 0.28 vezes na comparação com o grupo controle macrófagos não infectados sem tratamento. Nos macrófagos infectados, na presença de IGF-I, houve diminuição da expressão em relação às células infectadas sem estímulo.

Ao avaliar a expressão de mRNA de IGF-IR, observamos uma tendência a menor expressão nos três grupos após 24h. No macrófago não infectados com tratamento observamos uma tendência a menor expressão de 0.21 vezes, nos macrófagos infectados sem tratamento uma tendência a menor expressão de 0.32 vezes e nos macrófagos infectados com tratamento uma tendência a menor expressão de 0.19 vezes na comparação com o grupo controle macrófagos não infectados sem tratamento (Fig. 16 C). Nos macrófagos infectados, o incremento na expressão na presença de IGF-I foi marginal.

Na avaliação da expressão após 48 horas, observamos uma tendência a maior expressão de 0.73 vezes nos macrófagos não infectados com tratamento. Já nos macrófagos infectados sem tratamento houve uma tendência a menor expressão de 0.35 vezes e nos macrófagos infectados com tratamento uma tendência a menor expressão de 0.20 vezes na comparação com o grupo controle macrófagos não infectados sem tratamento. (Fig. 16 D). Nos macrófagos infectados, a alteração na expressão na presença de IGF-I foi marginal.

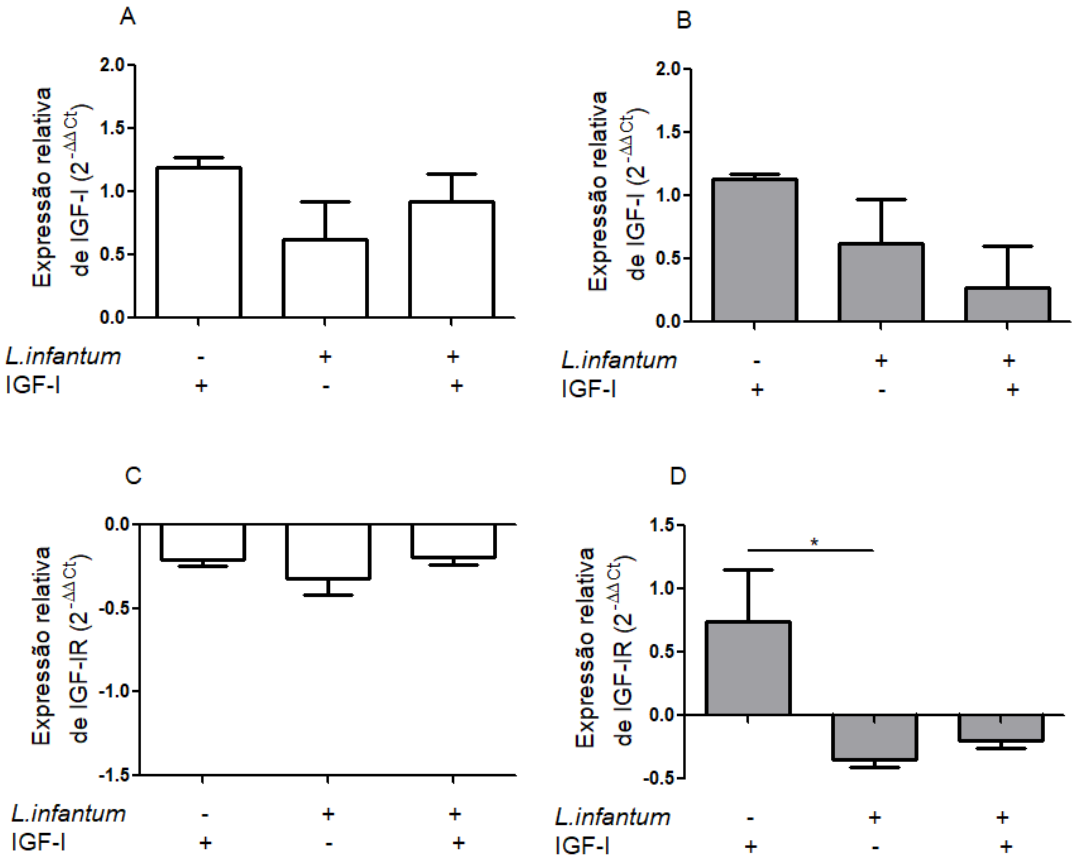

Figura 16. Efeito do IGF-I sobre a expressão de mRNA de IGF-I e IGF-IR em macrófagos THP-1. Expressão de mRNA de IGF-I (A, B) e IGF-IR (C, D) em macrófagos THP-1 infectados por promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (8 parasitos/célula) e sob estimulo de IGF-I (50 ng/mL) por 24 h (A, B) e 48 h (C, D). Resultado representado pela expressão relativa de mRNA dos genes em relação a expressão do grupo controle sem infecção e sem estimulo (média ± desvio-padrão). *=P<0.05, Testes de ANOVA e Tukey.

5.- DISCUSSÃO

Partindo dos dados anteriores do nosso grupo mostrando o papel importante do IGF-I no desenvolvimento da infecção por espécies dermotrópicas de *Leishmania*, IGF-I atuando como efetor da citocina IL-4 na infecção de macrófago murino por *L. (L.) major* e, principalmente, considerando que dados da literatura indicam não efeito de IL-4 na suscetibilidade à infecção de macrófagos por espécies viscerotrópicas de *Leishmania*, propomos estudar o papel do IL-4, sua relação com a expressão e efeito de IGF-I na interação *L. (L.) infantum* e macrófago humano na busca de elementos ou mecanismos que tragam uma explicação a diferença em esse modelo.

Como sabíamos, de antemão, que encontraríamos dados diferentes e até controversos dos estudos anteriores realizados com espécies dermotrópicas, empenhamos inicialmente na padronização de todos os detalhes metodológicos para chegarmos a dados realmente confiáveis. Observamos nesta fase que os macrófagos THP-1 apresentavam características distintas de macrófagos murinos. A atividade da arginase dos macrófagos THP-1 mostrou uma atividade basal que foi o dobro da atividade basal dos macrófagos murinos RAW 264.7. Também os macrófagos THP-1 mostraram não ter resposta ao tratamento com LPS mas produzia uma concentração basal de NO (dados não mostrados). A seguir, verificamos o efeito de IGF-I in vitro sobre promastigotas de *L. (L.) infantum*, analisamos a seguir a evolução do parasitismo em células infectadas e expressão de mRNA de IGF-I e receptor de IGF-I em células infectadas.

Iniciamos, na sequência, a avaliação do efeito de IL-4 e, depois de IGF-I, na infecção de macrófago humano THP-1 por *L. (L.) infantum* sobre o parasitismo e os elementos da via metabólica de L- arginina e expressão de mRNA de IGF-I e receptor de IGF-I em células infectadas.

Quando avaliamos o efeito de IGF-I sobre promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* in vitro, observamos efeito indutor de proliferação, um efeito dose-resposta de IGF-I com a proliferação, como fora mostrado com espécies dermotropicas anteriormente (21) (23) (32). Dados anteriores indicam que a ação de IGF-I sobre *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) brazilensis* leva ao aumento da expressão e atividade da arginase da via metabólica de L- arginina (32), levando à produção de poliaminas, nutriente importante para a replicação celular. No entanto, foi observado anteriormente

que o efeito de IGF-I sobre a espécie viscerotropica *L. (L.) infantum* (*L.(L.) chagasi*) era distinto, sendo relatada a diminuição na atividade da arginase sob efeito de IGF-I (32). Desta forma, repetimos o experimento no presente estudo observando-se diminuição da atividade da arginase em promastigotas de *L. (L.) infantum* estimuladas por IGF-I, corroborando os dados anteriores (dados não mostrados).

Tentando aprofundar estudos da relação hospedeiro-parasita que possui a *L. (L.) infantum* realizamos experimentos de infecção in vitro, a fim de observar inicialmente o efeito de IL-4 durante a infecção.

O efeito de IL-4 sobre o parasitismo não foi evidente nas primeiras 48 horas, sendo detectado aumento somente com 72 horas de cultura. Pesquisamos, a seguir, os elementos da via metabólica de L-arginina, ligados ao controle ou proliferação do parasito, para correlacionar ao parasitismo. Tanto a produção de óxido nítrico quanto a atividade da arginase não mostraram alterações significativas na presença do estímulo por IL-4. Esses resultados não parecem ser devidos à origem da célula utilizada, célula de linhagem humana, pois resultados semelhantes foram encontrados utilizando macrófagos murinos infectados por *L. (L.) infantum* (39). Esses resultados reforçam os dados da literatura que mostra não efeito de IL-4 na suscetibilidade à infecção por espécie viscerotrópica de *Leishmania* (40). Na literatura encontramos informações contraditórias sobre a expressão de mRNA e proteína da arginase nos macrófagos humanos, sob estimulo de IL-4 (41). Nossos resultados mostram que após 24 horas os macrófagos infectados com tratamento de IL-4 apresentam uma tendência a aumentar a expressão de mRNA de Arginase 1, porém essa tendência não foi evidenciada na atividade da arginase, o que sugere que exista algum tipo de controle postranscripcional que pode ser via microRNAs o que já foi relatado na literatura (42) (22) com o parasito modulando ou induzindo a expressão de microRNAs

A expressão de mRNA de IGF-I sugere-se ser maior sob efeito de IL-4 nas células infectadas a 24 horas de cultura. O perfil de expressão foi semelhante entre a expressão de mRNA de arginase 1 e IGF-I. Já a expressão do IGF-IR apresentou uma tendência a menor expressão nos macrófagos infectado com e sem tratamento que após 48 horas se torna significativa, mas estas mudanças nos perfis de expressão não tiveram efeito no parasitismo nos tempos de 24 e 48horas.

Não encontrando efeitos consistentes em macrófagos infectados por *L. (L.) infantum* sob estímulo de IL-4, passamos analisar o efeito de IGF-I. Quando analisamos o efeito de IGF-I na infecção de macrófago THP-1 por *L. (L.) infantum*, encontramos resultados inusitados. Não se observou alteração do parasitismo sob efeito de IGF-I nas primeiras 24 horas, mas após 48 horas o parasitismo dos macrófagos com tratamento foi menor que o grupo de macrófagos sem tratamento, efeito totalmente oposto ao observado com espécies dermotrópicas. Na busca de mecanismo plausível para essas observações, passamos a analisar elementos da via metabólica de L- arginina.

Na infecção de macrófago THP-1 por *L. (L.) infantum*, não se observou alteração significante da produção de NO quando sob efeito de IGF-I. Quanto a arginase, sua atividade se manteve semelhante sob efeito de IGF-I, mas após 48 horas, a expressão de mRNA da arginase 1 foi significativamente menor na presença de IGF-I, porém essa diminuição não foi evidenciada na atividade da arginase. A literatura descreve que existe uma expressão basal que gera uma concentração constitutiva pré-formada no interior do macrófago (41). A expressão de IGF-I após 48 horas nos macrófagos infectados sob estimulo de IGF-I apresenta uma tendência a menor expressão. Quanto ao IGF-IR, nos macrófagos infectados com e sem tratamento se manteve uma tendência a menor expressão, o que foi contrário à expressão da IGF-IR, mostrada na literatura (39), onde as infecções de macrófagos BALB/c derivados de medula infectados por *L. (L.) infantum* levam a um aumento da expressão de IGF-IR tanto nos macrófagos infectados com tratamento de IGF-I como os não tratados.

Especificamente em relação à expressão de mRNA e IGF-I e IGF-IR, embora algumas alterações tenham sido observadas, não constatamos relação com o parasitismo.

Observamos algumas alterações marginais, pontuais, sob estímulo de IL-4 e IGF-I, mas o conjunto de resultados indica que os mecanismos de controle ou proliferação do parasito intracelular conhecidos com espécies dermotrópicas de *Leishmania* não são funcionantes na infecção por *L. (L.) infantum*. Há necessidade de conhecer o que é diferente na *L. (L.) infantum* e na sua interação com a célula hospedeira.

Dados da literatura sobre o metabolismo de poliaminas em promastigotas e amastigotas de *L. (L.) donovani* mostram que é de grande importância para os parasitos as permeasas para aminoácidos (APP3) na *L. (L.) donovani* e também na L. *(L.) infantum* com alta afinidade por L-arginina. Na via das poliaminas observou-se que o knock-out de gene da Arginase era letal para *Leishmania (L.) mexicana*, mas não para a *L. (L.) donovani*. Não foi letal também procedendo knock-out de outro gene o da proteína ornithine decarboxylase (ODC). Por outro lado, realizando knock-outs das enzimas S-adenosylmethionine decarboxylase (ADOMETDC) e spermidine synthase (SPDSYN) que produzem espermidina, estes foram letais na *Leishmania (L.) donovani*, mostrando uma diferença no metabolismo entre espécies dermotropicas e viscerais. Nos últimos, houve recuperação com a reposição de espermidina *in vitro* e *in vivo* (43). Na literatura encontramos também que a enzima arginase é mais importante a promastigotas que amastigotas (44). Resultados do presente estudo sugerem que na infecção de macrófago humano por *L. (L.) infantum* a produção de poliaminas no parasita se daria por uma via diferente daquela envolvendo a enzima arginase.

Considerando os nossos achados, onde a infecção de macrófago humano por *L. (L.) infantum* não estimulou a produção de NO e nem a atividade da arginase e os estímulos de IL-4 e IGF-I nas células infectadas não provocou um aumento significativo da atividade da arginase, leva-nos a repensar a relação hospedeiro-parasita num cenário onde a arginase da célula e do parasita não seja fundamental para o desenvolvimento do parasita e onde a produção de NO na célula não seja danosa para o parasita.

6.- CONCLUSSÃO

Na infecção de macrófago humano THP1 por *L. (L.) infantum*, sob estímulos de IL-4 e IGF-I, não mostrou incremento do parasitismo.

Na infecção de macrófago humano THP1 por *L. (L.) infantum*, sob estímulos de IL-4 e IGF-I, não se observou efeito na produção de NO e nem na atividade da arginase.

Os dados do presente estudo sugerem que na interação *L. (L.) infantum* e célula macrofágica humana a arginase da célula e do parasito não seja fundamental para o desenvolvimento do parasita. Os dados sugerem também que a produção de NO na célula não seja lesiva para *L. (L.) infantum*.

7.- REFERÊNCIAS

1. Goto H, Lauletta Lindoso JA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Infectious disease clinics of North America. 2012;26(2):293-307. Epub 2012/05/29.
2. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases. 2004;27(5):305-18. Epub 2004/07/01.
3. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PloS one. 2012;7(5):e35671. Epub 2012/06/14.
4. WHO WHO. Visceral leishmaniasis rapid diagnostic test performance 2011 [cited 2018.
5. Banuls AL, Hide M, Prugnolle F. Leishmania and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. Advances in parasitology. 2007;64:1-109. Epub 2007/05/15.
6. Ministério da Saúde SdVeS, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral 2014.
7. Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. Clinics in dermatology. 1999;17(3):279-89. Epub 1999/06/29.
8. Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? Trends in parasitology. 2006;22(9):439-45. Epub 2006/07/18.
9. Larson EE, Marsden PD. The origin of espundia. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1987;81(5):880. Epub 1987/01/01.
10. Murray HW. Susceptibility of Leishmania to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. The Journal of experimental medicine. 1981;153(5):1302-15. Epub 1981/05/01.
11. Real F, Florentino PT, Reis LC, Ramos-Sanchez EM, Veras PS, Goto H, et al. Cell-to-cell transfer of Leishmania amazonensis amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. Cellular microbiology. 2014;16(10):1549-64. Epub 2014/05/16.
12. Goto H, Prianti M. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. 2009;51(5):241-6. Epub 2009/11/07.
13. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. Nature reviews Immunology. 2002;2(11):845-58. Epub 2002/11/05.
14. Murray HW, Lu CM, Mauze S, Freeman S, Moreira AL, Kaplan G, et al. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. Infection and immunity. 2002;70(11):6284-93. Epub 2002/10/16.

15. 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. Molecular endocrinology (Baltimore, Md). 1995;9(3):350-60. Epub 1995/03/01.

16. Wynes MW, Riches DW. Induction of macrophage insulin-like growth factor-I expression by the Th2 cytokines IL-4 and IL-13. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2003;171(7):3550-9. Epub 2003/09/23.

17. Baxter RC, Martin JL. Radioimmunoassay of growth hormone-dependent insulinlike growth factor binding protein in human plasma. The Journal of clinical investigation. 1986;78(6):1504-12. Epub 1986/12/01.

18. Blomsma MC, de Knegt RJ, Dullaart RP, Jansen PL. Insulin-like growth factor-I in liver cirrhosis. Journal of hepatology. 1997;27(6):1133-8. Epub 1998/02/07.

19. Daughaday WH, Rotwein P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. Endocrine reviews. 1989;10(1):68-91. Epub 1989/02/01.

20. Le Roith D. Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Insulin-like growth factors. The New England journal of medicine. 1997;336(9):633-40. Epub 1997/02/27.

21. Gomes CM, Monteiro HP, Gidlund M, Corbett CE, Goto H. Insulin-like growth factor-I induces phosphorylation in Leishmania (Leishmania) mexicana promastigotes and amastigotes. The Journal of eukaryotic microbiology. 1998;45(3):352-5. Epub 1998/06/17.

22. Pinho FA, Magalhaes NA, Silva KR, Carvalho AA, Oliveira FL, Ramos-Sanchez EM, et al. Divergence between hepatic insulin-like growth factor (IGF)-I mRNA expression and IGF-I serum levels in Leishmania (Leishmania) infantum chagasi-infected dogs. Veterinary immunology and immunopathology. 2013;151(1-2):163-7. Epub 2012/11/28.

23. 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. International journal of experimental pathology. 2000;81(4):249-55. Epub 2000/09/06.

24. 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. Scandinavian journal of immunology. 2007;66(2-3):287-96. Epub 2007/07/20.

25. Reis LC, Ramos-Sanchez EM, Goto H. The interactions and essential effects of intrinsic insulin-like growth factor-I on Leishmania (Leishmania) major growth within macrophages. Parasite immunology. 2013;35(7-8):239-44. Epub 2013/05/15.

26. Reis LC. Influência do fator de crescimento insulina-símile I no efeíto de cítocinas na resistência e suscetibilidade na leishmaniose cutânea murina por *Leishmania (leishmania) major*: Universidae de São Paulo; 2013.

27. Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, et al. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. The EMBO journal. 1986;5(10):2503-12. Epub 1986/10/01.

28. Pedrini MT, Giorgino F, Smith RJ. cDNA cloning of the rat IGF I receptors: structural analysis of rat and human IGF I and insulin receptors reveals differences in alternative splicing and receptor-specific domain conservation. Biochemical and biophysical research communications. 1994;202(2):1038-46. Epub 1994/07/29.

29. Galvan V, Logvinova A, Sperandio S, Ichijo H, Bredesen DE. Type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF-IR) signaling inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1). The Journal of biological chemistry. 2003;278(15):13325-32. Epub 2003/01/31.

30. Gomes CM, Goto H, Magnanelli AC, Monteiro HP, Soares RP, Corbett CE, et al. Characterization of the receptor for insulin-like growth factor on Leishmania promastigotes. Experimental parasitology. 2001;99(4):190-7. Epub 2002/03/13.

31. Ángel GH. Tratado de Nutrición: Bases Fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. Editorial Médica Panamericana. 2010;1:992.

32. Souza LD. Efeito do fator de crescimento insulina-simile-Iem promastigota e amastigota intracelular de *Leismania(Viannia) braziliensis* de pacientescom diferentes formas clínicas de leishmaniose tegumentar americana: Universidade de São Paulo; 2012.

33. Goto H, Lindoso JA. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas. 2004;37(4):615-23. Epub 2004/04/06.

34. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). International journal of cancer. 1980;26(2):171-6. Epub 1980/08/01.

35. Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. Journal of immunological methods. 1994;174(1-2):231-5. Epub 1994/09/14.

36. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. Analytical biochemistry. 1982;126(1):131-8. Epub 1982/10/01.

37. Pfaffl MW, Georgieva TM, Georgiev IP, Ontsouka E, Hageleit M, Blum JW. Real-time RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-1 receptor, IGF-2, IGF-2 receptor, insulin receptor, growth hormone receptor, IGF-binding proteins 1, 2 and 3 in the bovine species. Domestic animal endocrinology. 2002;22(2):91-102. Epub 2002/03/20.

38. Park EK, Jung HS, Yang HI, Yoo MC, Kim C, Kim KS. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]. 2007;56(1):45-50. Epub 2007/03/06.

39. Farias-Leal A. Influência do fator de crescimento insulina-símile ("insulin-like growth factor"= IGFI)-I no parasitismo de macrófagos peritoneais de camundongos por *Leishmania(L.) infantum*: Universidade de São Paulo; 2016.

40. Satoskar A, Bluethmann H, Alexander J. Disruption of the murine interleukin-4 gene inhibits disease progression during Leishmania mexicana infection but does not increase control of Leishmania donovani infection. Infection and immunity. 1995;63(12):4894-9. Epub 1995/12/01.

41. Munder M, Mollinedo F, Calafat J, Canchado J, Gil-Lamaignere C, Fuentes JM, et al. Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. Blood. 2005;105(6):2549-56. Epub 2004/11/18.

42. Muxel SM, Laranjeira-Silva MF, Zampieri RA, Floeter-Winter LM. Leishmania (Leishmania) amazonensis induces macrophage miR-294 and miR-721 expression and modulates infection by targeting NOS2 and L-arginine metabolism. Scientific reports. 2017;7:44141. Epub 2017/03/10.

43. Boitz JM, Yates PA, Kline C, Gaur U, Wilson ME, Ullman B, et al. Leishmania donovani ornithine decarboxylase is indispensable for parasite survival in the mammalian host. Infection and immunity. 2009;77(2):756-63. Epub 2008/12/10.

44. 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. Infection and immunity. 2017;85(1). Epub 2016/11/01.

ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br
Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132

São Paulo, 11 de Dezembro de 2014

Ilmo(a)
Dr(a). Hiro Goto
(aos cuidados de Orlando Raul Sevillano Acuna)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, analisou e **APROVOU**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CPE-IMT/000295A 'Contribuição da expressão do fator de crescimento insulina-símile I (IGF-I) e do seu receptor no parasitismo de monócitos humanos por Leishmania (L.) infantum'**, sob a sua responsabilidade.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-IMT, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei n 11.794, 8 de outubro de 2008).

As seguintes espécies serão utilizadas no projeto:
Hamster (12 animais).

Atenciosamente,

Dr. Expedito José de Albuquerque Luna
Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP