

Jonathan Miguel Zanatta

Poliaminas regulam a expressão de genes do seu metabolismo e resistência à infecção em macrófagos com *Leishmania amazonensis*

Polyamines regulate the expression of genes related to its metabolism and resistance to infection of macrophages with *Leishmania amazonensis*

São Paulo

2022

Jonathan Miguel Zanatta

Poliaminas regulam a expressão de genes do seu metabolismo e resistência à infecção em macrófagos com *Leishmania amazonensis*

Polyamines regulate the expression of genes related to its metabolism and resistance to infection of macrophages with *Leishmania amazonensis*

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Fisiologia Geral.

Orientadora: Sandra Marcia Muxel

São Paulo

2022

Ficha catalográfica

Zanatta, Jonathan Miguel

Poliaminas regulam a expressão de genes do seu metabolismo e resistência à infecção em macrófagos com *Leishmania amazonensis* / Jonathan Miguel Zanatta ; orientadora Sandra Marcia Muxel -- São Paulo, 2022. 142 p.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Leishmania. 2. Poliaminas. 3. L-arginina. 4. expressão gênica. 5. óxido nítrico. I. Muxel, Sandra Marcia, orient. II. Título.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

*À Olívia A Costa, cuja a história
de persistência na ciência me tocou profundamente*

Ah, olhe para o céu azul
Prometi sempre seguir os meus sonhos
Ah, sempre vou lembrar desse eterno azul
Que para sempre brilhará

Tradução de “Blue Forever”

Seiji Yokoyama

Agradecimentos

Aos meus pais, Marcia e Angelo e minhas avós Edna e Valdomira, agradeço por sempre me apoiarem e confiarem em mim.

Agradeço a minha orientadora, Sandra Marcia Muxel, e a vida, por esse encontro tão importante e que deu super certo.

Meus amigos de São Paulo, Olívia, Luan, Lídia, Lucas, Clei, Guilherme, Sthephany, Beatriz e Suemy, tão importantes desde o início do mestrado.

As pessoas da minha vida que amo, sinto falta e que mesmo distantes pelas circunstâncias dei um jeito de manter na lembrança, sempre perto, David, Bia, Mayara, Amanda, Marcella, Bruno, Pamela, Matheus, Mirella, Iara e José Ricardo.

Ao meu companheiro, Pábulo, agradeço por todo apoio, parceria e tudo mais que vivemos.

Agradeço a Roseli, secretária da pós da Fisiologia, sempre solícita e providencial.

Agradeço a toda turma do Laboratório de Interações Neuroimunes e próximos, Jean, Carol, Marília, Nágela, Lilian, Tiago, Laura, Yan, Igor, Tânia e Taís, tão amigos e acolhedores.

Agradeço pelo uso de equipamentos e das instalações do Laboratório de Fisiologia de Tripanossomatídeos. Também agradeço aos demais colegas, Samantha, Avery, Giovana, Thalita e Léo. Os dias de trabalho juntos foram bem acolhedores e divertidos.

As mulheres cientistas irmãs de orientação e mais importantes durante todo esse processo, Stephanie Maia Acuña (Phanie), Juliane Cristina Ribeiro Fernandes (Nandy) e Camilla Almeida Bento (Milla).

A todos vocês, meu carinho e meus sinceros agradecimentos.

Este trabalho recebeu financiamento a pesquisa relacionado aos projetos CNPq e FAPESP, (CNPq: 403100/2021-6) e (FAPESP: 2018/24693-9, 2022/00291-4), e da bolsa de mestrado (processo FAPESP n° 2019/07089-3).

Resumo

Os macrófagos são células fagocíticas do sistema imune e representam a primeira barreira frente à infecção com *Leishmania*. *Leishmania* é um protozoário causador das leishmanioses, doenças que apresentam manifestações clínicas classificadas em leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral. No contexto da infecção, o parasita é capaz de modular a expressão de genes do macrófago que afetam a atividade microbicida e a resposta imune frente ao parasita. A metabolização de L-arginina em poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) em detrimento da produção de óxido nítrico (NO) favorece a infecção com *Leishmania*. As poliaminas são moléculas essenciais para a síntese proteica e síntese de macromoléculas nas células, e também proliferação e diferenciação celular. No presente estudo, nós avaliamos como a disponibilidade de L-arginina e poliaminas afeta a expressão de genes relacionados ao seu metabolismo em macrófagos de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania amazonensis* e susceptibilidade à infecção. A privação de L-arginina em macrófagos durante a infecção com *L. amazonensis* aumentou a expressão de *Nos2*, mas não induziu produção de NO. Contudo, a suplementação com L-arginina não alterou a expressão de genes relacionados ao seu transporte e produção de poliaminas. A suplementação com L-arginina e putrescina aumentou a expressão de arginase 2 (*Arg2*) em macrófagos infectados comparado aos não infectados, enquanto a suplementação com espermidina ou espermina reduziu a expressão de *Arg2*. A suplementação com L-arginina e espermina aumentou a expressão de espermidina sintase (*SpdS*) em macrófagos infectados comparado aos não infectados. A suplementação com putrescina aumentou a expressão de *Nos2*, mas não aumentou a produção de NO durante a infecção. Enquanto, a suplementação dos macrófagos com espermina durante a infecção aumentou a frequência de células produtoras de NO. Os genes *Slc3a2/Slc7a5* que compõem o heterodímero do transportador de poliaminas foram modulados. Houve o aumento na expressão de *Slc3a2* em macrófagos suplementados com putrescina ou L-arginina e espermidina e de *Slc7a5* na suplementação com espermidina ou espermina durante a infecção. A suplementação com putrescina também aumentou a expressão do gene da proteína quimioatraente de monócito (*Mcp1*) após a infecção. A análise de infectividade mostrou que a suplementação com putrescina, L-arginina e espermidina ou L-arginina e espermina reduziu a porcentagem de macrófagos infectados quando comparamos com a suplementação com L-arginina. Nossos dados sugerem que as poliaminas regulam a expressão de genes relacionados ao seu transporte e metabolismo em macrófagos e afetam a infecção com *L. amazonensis*.

Palavras-chave: *Leishmania*, poliaminas, L-arginina, expressão gênica, óxido nítrico, resposta imune, macrófagos

Abstract

Macrophages are phagocytic cells of the immune system and represent the first barrier against infection with *Leishmania*. *Leishmania* is a protozoan that causes leishmaniasis, a disease that presents clinical manifestations classified as cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis. In the infection context, the parasite can modulate macrophage gene expression affecting microbicidal activity and immune response to the parasite. The metabolization of L-arginine in polyamines (putrescine, spermidine, and spermine) harmful to the nitric oxide (NO) production favoring *Leishmania* infection. Polyamines are essential for protein and macromolecules synthesis in cells, and cell proliferation and differentiation. In the present study, we evaluated how the availability of L-arginine and polyamines affected the expression of genes related to their metabolism in macrophages of BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and susceptibility to infection. L-arginine deprivation in macrophages during infection with *L. amazonensis* increased *Nos2* expression, but did not induce NO production. However, L-arginine supplementation did not alter the expression of genes related to polyamines transport and biosynthesis. Supplementation with L-arginine and putrescine increased the expression of arginase 2 (*Arg2*) in infected-macrophages in relation to uninfected macrophages, while the supplementation with spermidine or spermine reduced the expression of *Arg2*. Supplementation with L-arginine and spermine increased the expression of spermidine synthase (*SpdS*) in infected macrophages compared to uninfected ones. Putrescine supplementation increased *Nos2* expression, but did not increase NO production during infection. Meanwhile, the spermine supplementation of macrophages during infection increased the frequency of NO-producing cells. The *Slc3a2/Slc7a5* genes that compose a heterodimer of polyamine transport were modulated. *Slc3a2* expression increased in macrophages supplemented with putrescine or L-arginine and spermidine during infection and *Slc7a5* increased in spermidine or spermine supplementation during infection. The putrescine supplementation of macrophages during infection increased monocyte chemoattractant protein (*Mcp1*) gene expression. The infection analysis showed that supplementation with putrescine, L-arginine plus spermidine, or L-arginine plus spermine reduced the percentage of infected macrophage compared to L-arginine supplementation condition. Our data suggest that the polyamines regulate the expression of genes related to their transport and metabolism macrophages infected with *L. amazonensis*.

Keywords: *Leishmania*, polyamines, L-arginine, gene expression, nitric oxide, immune response, macrophages

Lista de Figuras

Figura 1: Mapa de disseminação mundial da leishmaniose cutânea e visceral em 2020.....	18
Figura 2: Manifestações clínicas da leishmaniose.....	20
Figura 3: Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.....	21
Figura 4: Processo infeccioso com <i>Leishmania</i> spp.....	24
Figura 5: Metabolismo de L-arginina e poliaminas no macrófago durante à infecção com <i>L. amazonensis</i>	27
Figura 6: Biossíntese de microRNAs.....	32
Figura 7: Estratégia metodológica para o experimento de privação de L-arginina e/ou suplementação com L-arginina e poliaminas em macrófagos, concomitante à infecção com <i>L. amazonensis</i>	37
Figura 8: Expressão gênica do metabolismo de L-arginina em macrófagos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i>	44
Figura 9: Expressão gênica de transportadores de aminoácidos e poliaminas em macrófagos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> em condição de privação de L-arginina.....	45
Figura 10: Expressão gênica de enzimas da via de biossíntese de poliaminas em macrófagos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> em condição de privação e suplementação com poliaminas.....	47
Figura 11: Expressão de <i>Nos2</i> e produção de NO em macrófagos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> em condição de privação e suplementação com poliaminas.....	49
Figura 12: Expressão gênica de transportadores de L-arginina e L-glutamina em macrófagos BALB/c não infectados e infectados.....	52
Figura 13: Expressão gênica do transportador de poliaminas em macrófagos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i>	53

Figura 14: Expressão do gene transportador de L-citrulina e L-ornitina em macrófagos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i>	54
Figura 15: Expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos BALB/c não infectados e infectados.....	56
Figura 16: Análise da infecção de macrófagos BALB/c com <i>L. amazonensis</i> em condição de suplementação com poliaminas.....	58
Figura 17: Expressão dos microRNAs em macrófagos BALB/c não infectados e infectados.....	61

Lista de Tabelas

Tabela 1: Estrutura molecular de três principais poliaminas (putrescina, espermidina e espermina).....	28
Tabela 2: Pares de oligonucleotídeos usados na amplificação de mRNA.....	40

Lista de abreviaturas

arg: L-arginina

Arg1: Arginase 1

Arg2: Arginase 2

ATP: Adenosina trifosfato

B2M: β -2-microglobulina

Cat1: Transportador de aminoácido Catiônico1

Cat2: Transportador de aminoácido Catiônico2

Ct: ciclo-treshold

DAF-FM: 4-amino-5metilamino-2', 7' -diclorofluoresceína diacetato

DAMPs: Danos associados a padrões de patógenos

DFMO: α -difluorometilornitina

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

GPI: Glicofosfatidilinositol

IL: interleucina

INF- γ : Intérferon gama

La: *Leishmania amazonensis*

LPG: Lipofosfoglicano

LPS: Lipopolissacarídeo

M1: Macrófago inflamatório

M2: Macrófago anti-inflamatório

MCP-1: Proteína quimioatraente de monócito

MFI: Média de intensidade de fluorescência

miR: microRNA

MO: Macrófago

MOI : Multiplicidade de infecção

mRNA: RNA mensageiro

mtROS- Espécies Reativas Mitocondriais de Oxigênio

NF- κ B: Fator nuclear-kappa B

NO : Óxido nítrico

Nos2 – Óxido nítrico sintase 2

Odc: Ornitina descarboxilase

OMS: Organização Mundial da Saúde

OXPPOS: Fosforilação oxidativa

PAMPs : Padrões moleculares associados a patógenos

PBS: Solução salina tamponada com fosfato

put: putrescina

ROS: Espécies reativas de oxigênio

RT-qPCR: Reação de transcrição reversa e reação de polimerase em cadeia quantitativa

Slc: Membro da família carreadora de soluto

spd: espermidina

SpdS: Espermidina sintase

spm: espermina

SpmS: Espermina sintase

TCA: Ciclo do ácido tricarbóxico

TGF- β : Fator de crescimento transformador beta

Th1: Célula T auxiliar tipo 1

Th2: Célula T auxiliar tipo 2

TLRs: Receptor do tipo Toll

Índice

Resumo.....	xiii
Abstract	ix
Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas	xii
Lista de abreviaturas	xiii
1. Introdução.....	17
1.1 Leishmaniose.....	17
1.2 Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp	21
1.3 Desenvolvimento da resposta imune.....	23
1.4 L-arginina e poliaminas no contexto da infecção com <i>Leishmania</i>	26
1.5 Regulação da expressão gênica e microRNAs na infecção com <i>L. amazonensis</i>	31
2. Hipótese.....	34
3. Objetivo	35
3.1: Objetivos específicos	35
4. Materiais e Métodos.....	36
4.1 Aprovação do comitê de ética	36
4.2 Obtenção e diferenciação de macrófagos murinos	36
4.3 Cultura do parasita	36
4.5 Extração do RNA	39
4.6 Reação de Transcrição Reversa e PCR em tempo real de mRNAs (RT-qPCR).....	39
4.7 Reação de Transcrição Reversa e PCR em tempo real de miRNA:	42
4.8 Ensaio de quantificação de óxido nítrico (NO)	42

4.9	Análise estatística	43
5.	Resultados.....	44
5.1	Privação e suplementação com L-arginina na modulação da expressão gênica em macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> ..	44
5.2	Privação e suplementação com poliaminas na modulação da expressão gênica da via biossintética de poliaminas em macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i>	47
5.3	Privação e suplementação com poliaminas na modulação da expressão gênica de <i>Nos2</i> e produção de NO em macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i>	49
5.4	Suplementação com poliaminas na modulação da expressão gênica dos transportadores de L-arginina, ornitina e poliaminas em macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i>	52
5.5	Suplementação com poliaminas na modulação da expressão de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i>	56
5.6	Suplementação com L-arginina e poliaminas e susceptibilidade a infecção de macrófagos com <i>L. amazonensis</i>	58
5.7	Expressão dos microRNAs miR-294, miR-302d e miR-721	61
6.	Discussão	64
7.	Conclusões.....	74
8.	Referências Bibliográficas	76
	Anexos.....	92
	Biografia.....	142

1. Introdução

1.1 Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença parasitária endêmica em 98 países de regiões tropicais e subtropicais (Alvar et al., 2012; Akhoundi et al., 2016). A patologia da leishmaniose inclui um espectro de manifestações com lesões cutâneas, mucocutâneas, ou formas mais graves como a leishmaniose visceral, que se não tratada adequadamente, pode levar a morte (Alvar et al., 2012; Burza et al., 2018; Id et al., 2019). Por ser uma doença com maior incidência em países mais pobres e em desenvolvimento como o Brasil, a leishmaniose é considerada uma doença negligenciada e reflete a falta de políticas direcionadas à saúde (Burza et al., 2018; World Health Organization, 2021).

Nos últimos 20 anos, a leishmaniose cutânea e mucocutânea acometeram cerca de 1.067.759 pessoas na região das Américas, representando uma média de 53.387 casos por ano. Em 2020, o número de casos reportados foi menor, cerca de 39.705 dos casos, e sugere um reflexo direto da pandemia de COVID-19 quanto à incidência e reportagem dos casos (PAHO, 2021b).

De 200 países que comunicaram o número de casos de leishmaniose à Organização Mundial de Saúde (OMS), 89 são endêmicos para leishmaniose cutânea, com 207.477 casos autóctones em 2020; 79 países são endêmicos para leishmaniose visceral, com 12.739 casos autóctones em 2020 (Ruiz-Postigo et al., 2021) (Fig. 1). Cerca de 7 países, sendo eles o Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Iraque, Paquistão e a República da Arábia Saudita, representam mais de 80% dos casos de leishmaniose cutânea no mundo (Ruiz-Postigo et al., 2021). Quanto à leishmaniose visceral,

apenas o Brasil representa 16% dos casos a nível global (Ruiz-Postigo et al., 2021).

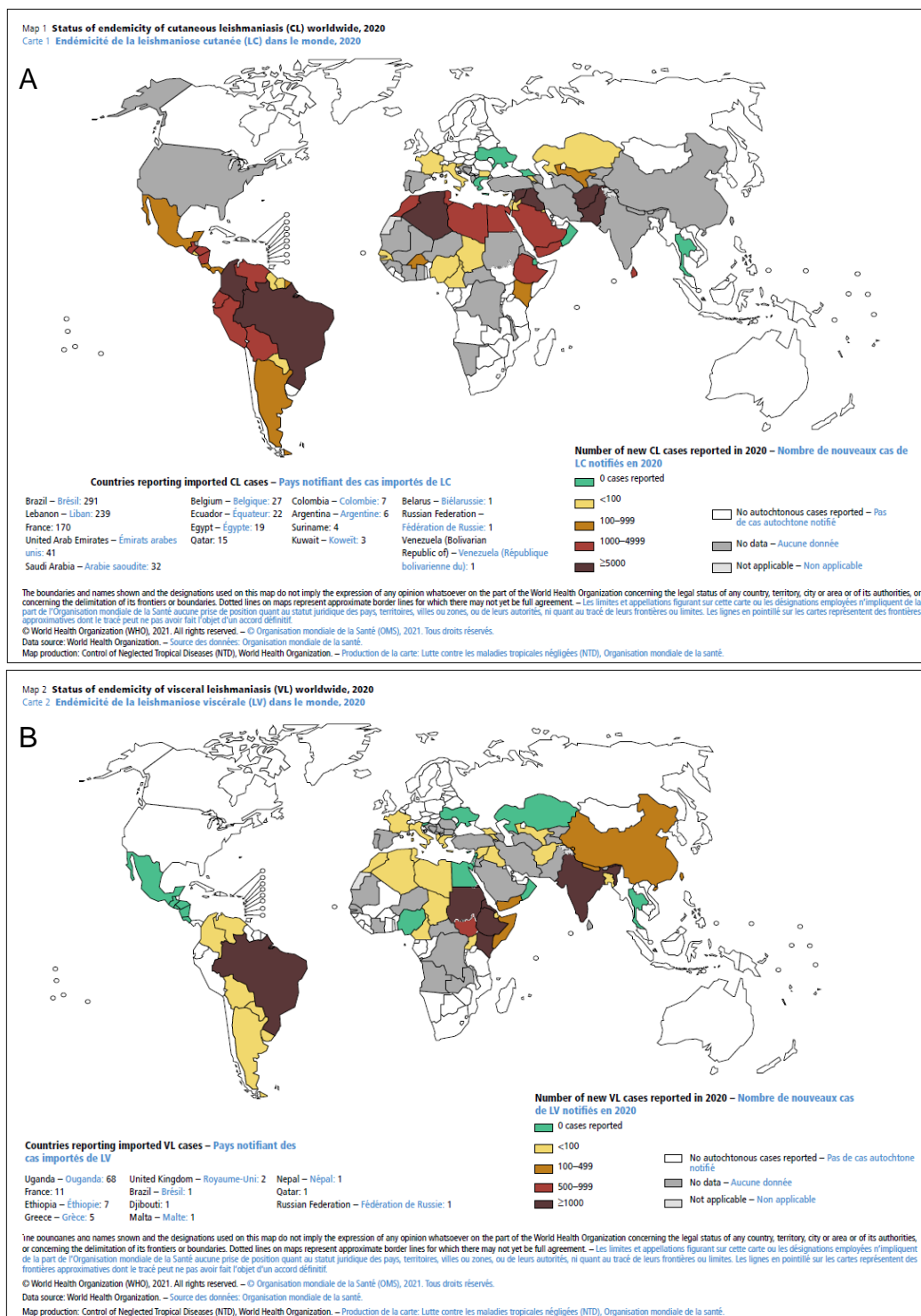


Figura 1: Mapa de disseminação mundial da leishmaniose cutânea e visceral em 2020. Em A, a incidência da leishmaniose cutânea; em B, a incidência da leishmaniose visceral. As cores mais escuras representam mais de 5000 casos (A) e mais de 1000 casos (B). Adaptado de Ruiz-Postigo et al., 2021.

As manifestações clínicas das leishmanioses dependem da espécie de *Leishmania*, e de fatores que podem influenciar a susceptibilidade à infecção, como a idade, nutrição, estado fisiológico e genético do hospedeiro e do parasita (Id et al., 2019; PAHO, 2021a).

Entre as características clínicas da leishmaniose cutânea está a lesão ulcerosa na pele (Fig.2), com tamanho que varia de milímetros a centímetros, podendo se apresentar também nas formas difusa, mais rara com polimorfismos e recidivas, e disseminada, apresentando diversos nódulos ulcerados (PAHO, 2021a). As leishmanioses cutâneas são causadas pelas espécies *L. amazonensis* e *L. mexicana* nas Américas Central e do Sul, e por espécies como *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* que são prevalentes no sul da Europa, na África e Ásia (Burza et al., 2018; World Health Organization, 2021). Além da manifestação cutânea, as espécies *L. brasiliensis* e *L. guyanensis* são causadoras da leishmaniose mucocutânea nas Américas Central e do Sul (Burza et al., 2018), na qual as lesões da infecção levam ao comprometimento da mucosa, principalmente da região nasal, dos lábios e faringe (PAHO, 2021a). A leishmaniose visceral causa sintomas como febre, esplenomegalia e hepatomegalia, distúrbios gastrointestinais, hemorragia e perda de massa muscular (Burza et al., 2018; DNDi, 2021; World Health Organization, 2021). Nas Américas, *L. infantum* é uma espécie de relevância clínica (PAHO; Ministério da Saúde, 2006). Somadas a outras espécies, como *L. donovani* no sul da Europa, na África e Ásia, são responsáveis por até 90.000 casos por ano, representando 600 milhões de pessoas em riscos de infecção, além do risco de

coinfecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Gregory et al., 2008; Burza et al., 2018; DNDi, 2021; World Health Organization, 2021).



Figura 2: Manifestações clínicas da leishmaniose. LC- Leishmaniose cutânea; LMC- Leishmaniose mucocutânea; LV- Leishmaniose visceral. Adaptado de PAHO, 2021a.

1.2 Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

A leishmaniose é causada pelo tripanossomatídeo do gênero *Leishmania*, um protozoário de vida dimórfica alternada entre as formas promastigota (flagelada) e amastigota (intracelular), que fazem parte do ciclo heteroxênico (Fig.3), ocorrendo entre os hospedeiros invertebrado, como o flebotomíneo dos gêneros *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*, e vertebrado,

como roedores e humanos (Ashford, 2000; Barral and Costa, 2011; Kaye and Scott, 2011; Dostálová and Volf, 2012).

O flebotomíneo faz o repasto em um indivíduo infectado ingerindo o parasita. Na porção posterior do trato digestivo do vetor, o parasita replica em formas promastigotas (Serafim et al., 2018; Zilberstein and Myler, 2021). Quando o desenvolvimento do parasita alcança a fase metacíclica infectiva, este migra e se concentra na região da probóscide (Barral and Costa, 2011; McConville, 2016; Serafim et al., 2018). Ao picar um

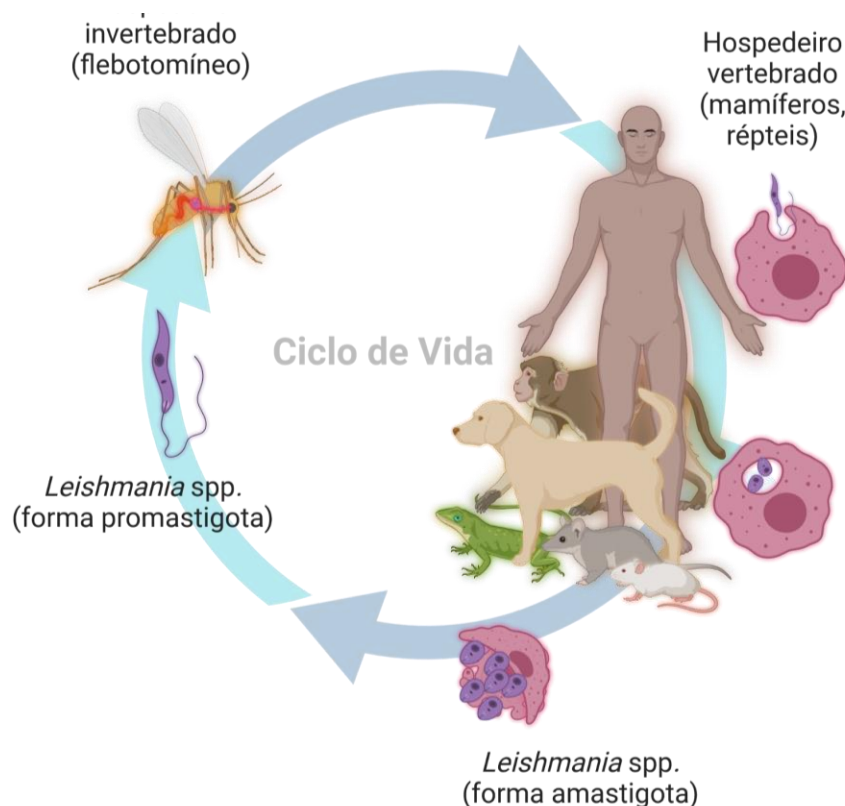


Figura 3: Ciclo de vida de *Leishmania* spp. O ciclo de vida dimórfico contém as formas promastigotas, que são transmitidas pelo vetor flebotomíneo aos hospedeiros vertebrados, como humanos, cães e roedores e répteis. No hospedeiro vertebrado, os macrófagos realizam a fagocitose das formas promastigotas. Para sobreviver, o parasita subverte as defesas do macrófago, evadindo da resposta imune e replicando em formas amastigotas no fagolisossomo. Criado com BioRender.com.

novo indivíduo, o flebotomíneo regurgita uma mistura de sangue e saliva contendo as formas promastigotas (Barral and Costa, 2011; Serafim et al., 2018). No início da infecção, o parasita é fagocitado pelos neutrófilos e macrófagos residentes no tecido (Pena and Mata, 2007; Kaye and Scott, 2011). No interior do macrófago, o parasita vive no interior do fagolisossomo, e se diferencia para a forma amastigota, sobrevivendo às condições de acidez e temperatura diferentes do microambiente do hospedeiro invertebrado (Kaye and Scott, 2011; Moradin and Descoteaux, 2012; McConville, 2016; Rossi and Fasel, 2018).

1.3 Desenvolvimento da resposta imune

Os macrófagos compõem a barreira de proteção inata contra patógenos. Os macrófagos infiltrantes tem origem de células mieloide mononucleadas, derivadas de monócitos após migração do sangue para os tecidos (Gordon and Plüddemann, 2017; Locati et al., 2020). Atuam na linha de frente na defesa contra patógenos por meio da atividade fagocítica e produção de citocinas e moléculas microbidas, tais como óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (Nicholson et al., 2001; Locati et al., 2020). Os macrófagos residentes nos tecidos tem origem no saco vitelínico e atuam no processo de vigilância contra patógenos (Hashimoto et al., 2013; Gordon and Plüddemann, 2017; Locati et al., 2020) (Fig.4).

A montagem da resposta imunológica é classicamente caracterizada pelo perfil de polarização da ativação dos macrófagos entre um espectro fenotípico pró-inflamatório (M1) e anti-inflamatório (M2) que pode guiar a resposta do macrófago (Wang et al., 2014; Locati et al., 2020). O perfil M1 em macrófagos é induzido em resposta ao reconhecimento de padrões ou danos moleculares associados a patógenos (PAMPs e DAMPs) via receptores Toll-like (TLRs), tais como lipopolissacarídeos (LPS) de

bactérias, ou citocinas pró-inflamatórias produzidas por linfócitos T CD4⁺ helper 1 (Th1) (Kropf et al., 2004). Macrófagos M1 produzem quimiocinas recrutadoras de monócitos, citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF), interferon gama (IFN- γ), e interleucina 1 (IL-1), bem como leva a indução de NF-kB e a produção de moléculas reativas de oxigênio (ROS), como o íon superóxido e moléculas reativas de nitrogênio, como NO (Nathan and Shiloh, 2000; Kropf et al., 2004; Tafani et al., 2013). Como consequência do metabolismo, altos níveis de ROS em macrófagos ativados podem desencadear a ativação de genes pró-inflamatórios, além de levar ao estresse celular (Nathan and Shiloh, 2000; Tafani et al., 2013). Com o aumento da atividade pró-inflamatória ocorre também aumento na captação de L-arginina, indução da óxido nítrico sintase 2 (NOS2) e a produção de NO (Fig.4), que atuam como agente microbicida em macrófagos infectados com *Leishmania* (Rath et al., 2014; Muxel et al., 2018c; Id et al., 2019).

Por outro lado, o estímulo de citocinas anti-inflamatórias como as interleucinas IL-4, IL-10, IL-13 e o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) induzem um perfil M2 em macrófagos (Martinez et al., 2009). Os macrófagos M2 apresentam a expressão de enzimas que desviam a disponibilidade de L-arginina para a biossíntese de poliaminas, reduzindo a produção de NO e favorecendo a sobrevivência do parasita (Latour et al., 2020b).

O reconhecimento do parasita e a interação com os fatores de virulência desencadeia a produção de uma série de mediadores da inflamação, mas também moléculas anti-inflamatórias (O'Neill et al., 2013; Muxel et al., 2018c, 2018b; Locati et al., 2020). É bem elucidado que a infecção

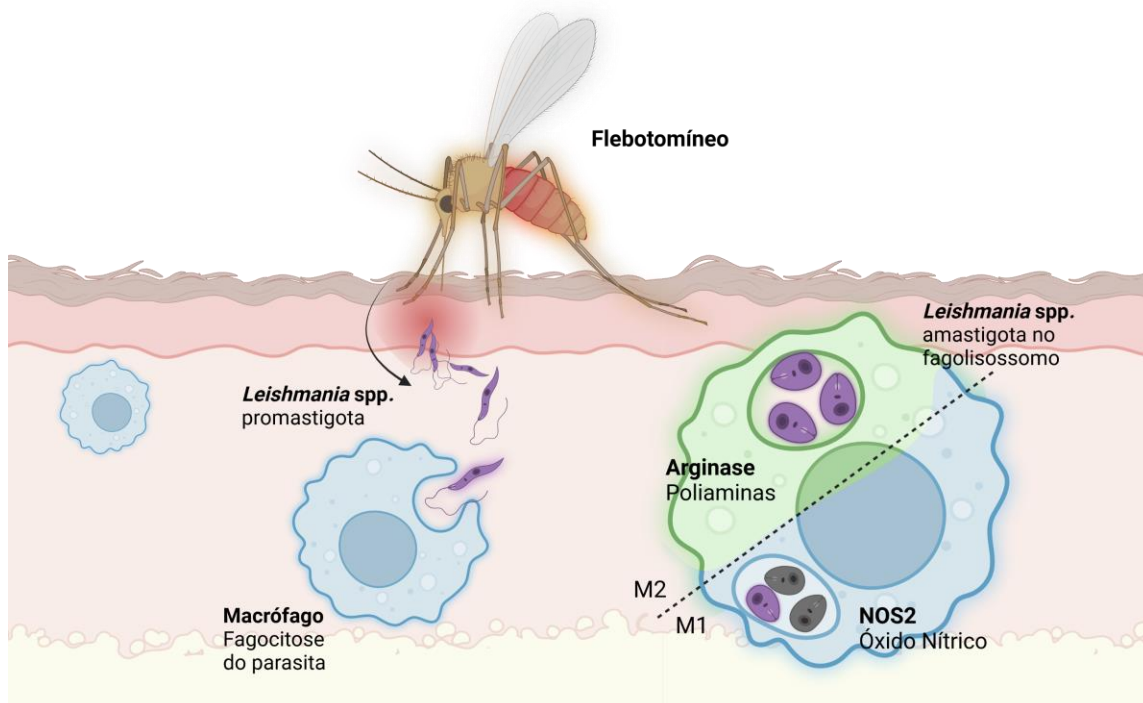


Figura 4: Processo infeccioso com *Leishmania* spp. O flebotomíneo transmite as formas promastigotas de leishmania através da picada. No hospedeiro, após serem fagocitadas por macrófagos, os parasitas diferenciam para a forma amastigota, e podem modular a polarização da ativação da resposta imune de M1 para M2, que influencia na sua morte ou sobrevivência. Criado com BioRender.com.

com *L. major* induz a produção de IL-4 (Launois et al., 1995; McMahon-Pratt and Alexander, 2004). Na superfície do parasita é possível encontrar proteínas ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol (GPI), lipofosfoglicanos (LPG) e a metaloprotease GP63, fatores de virulência que estimulam os receptores *Toll-like receptors* (TLR) 2 e 4, bem como auxiliam a sua evasão da resposta imune (McMahon-Pratt and Alexander, 2004; Olivier et al., 2005; Flandin et al., 2006; Naderer and McConville, 2008). O recrutamento de monócitos e células T na leishmaniose cutânea é realizado por MCP-1 (Moll et al., 1996; Ritter and Körner, 2002).

1.4 L-arginina e poliaminas no contexto da infecção com *Leishmania*

L-arginina é um aminoácido catiônico precursor da síntese de proteínas, uréia, ornitina, citrulina, NO, creatinina, agmatina, glutamato, prolina e poliaminas, sendo de extrema relevância para a manutenção da homeostase a nível celular (Vieira and Ioav Cabantchik, 1995).

O macrófago tem uma produção endógena de L-arginina a partir de L-glutamato, prolina ou ornitina, mas esta produção não é suficiente para suprir as demandas metabólicas da célula. Macrófagos possuem transportadores de aminoácidos catiônicos 1 e 2 (CAT1 e CAT2) codificados pelos genes SLC7A1 e SLC7A2, respectivamente. Estes carreadores de soluto possuem alta afinidade para o transporte de L-arginina, lisina, ornitina e poliaminas (Fig. 5) (Closs et al., 2004; Hatzoglou et al., 2004; Nicklin et al., 2009).

Em condições fisiológicas, os macrófagos regulam a expressão dos transportadores de L-arginina em função de sua disponibilidade para manter um *pool* interno adequado para suas atividades de vigilância imunológica (Hatzoglou et al., 2004; Rath et al., 2014; Muxel et al., 2018c). CAT1 e CAT2 são essenciais para controlar a disponibilidade de L-arginina para as enzimas óxido nítrico sintase 2 (NOS2) e arginase (ARG) 1 e 2 (MacLeod et al., 1994; MacLeod, 1996; Hosokawa et al., 1997). CAT1 possui uma forte afinidade por L-arginina e a com a privação do aminoácido a expressão do seu RNA mensageiro pode se manter estável e aumentar em disponibilidade para tradução da proteína transportadora (Aulak et al., 1999; Hatzoglou et al., 2004). O transportador CAT2 está relacionado com o sustento da produção de NO (Nicholson et al., 2001). O estímulo com LPS, IL-4, IFN- γ ou infecção com *Leishmania*, leva ao aumento na expressão de CAT2 e do transporte de L-arginina em macrófagos (Nicholson et al., 2001; Iniesta et al., 2002; Thompson et al., 2008;

Wanasen and Soong, 2008; Laranjeira-Silva et al., 2015; Muxel et al., 2017).

O metabolismo de L-arginina integra o ciclo da ureia (Fig. 5), ocorre pelas enzimas arginases 1 e 2 (ARG1, isoforma citoplasmática e ARG2, isoforma mitocondrial) (Dunand-Sauthier et al., 2014) que convertem a L-arginina em ornitina e ureia. ARG1 é conhecida por ser responsável pelo ciclo da ureia no fígado. A função de ARG2 é bastante investigada nos rins, infecções gastrointestinais e macrófagos, regulando a atividade inflamatória (Morris, 2002; Hardbower et al., 2016; Latour et al., 2020a). O ciclo da ureia ocorre parte na matriz mitocondrial e parte no citosol, o antiporte de ornitina, L-arginina, lisina e citrulina entre esses compartimentos é mediado pelo transportador membro da família de carreador de soluto SLC25A15 (Morris, 2002). A conversão de ornitina pode ser realizada pela enzima mitocondrial ornitina transcarbamilase (OTC), e produz citrulina que pode ser reintegrada ao ciclo da ureia para a biossíntese de L-arginina. Para a via de poliaminas, a ornitina é convertida pela ornitina descarboxilase (ODC) em putrescina (Latour et al., 2020a). A sequência dessa via produz espermidina através da espermidina sintase (SPDS) (Pérez-Cano et al., 2003), e espermina, pela conversão da espermidina pela espermina sintase (SPMS) que pode agir inibindo as ações pró-inflamatórias em macrófagos (Pérez-Cano et al., 2003; Muxel et al., 2019; Latour et al., 2020a). A espermidina também atua em processos como a síntese de hipusina e do fator de iniciação de tradução 5A em eucariotos (Puleston et al., 2019).

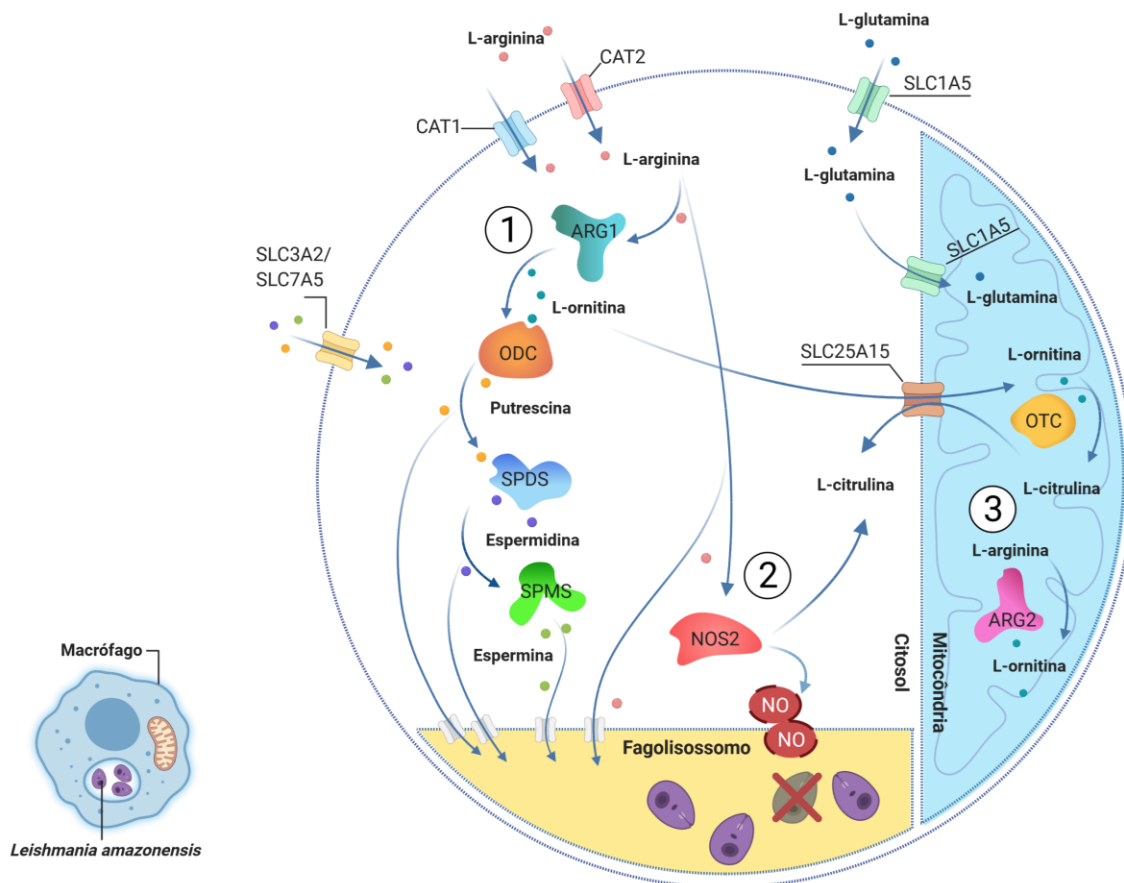


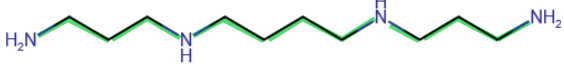


Figura 5: Metabolismo de L-arginina e poliaminas no macrófago durante a infecção com *L. amazonensis*. Os transportadores de L-arginina CAT1 e CAT2 e o transportador de poliaminas heterodimérico SLC3A2/SLC7A5 estão localizados na membrana plasmática. O transportador de L-glutamina SLC1A5 está localizado na membrana mitocondrial. SLC25A15 realiza a antiporte L-citrulina e L-ornitina entre a mitocôndria e o citosol. Em (1) estão as enzimas envolvidas na biossíntese de poliaminas: ARG1 converte L-arginina em ornitina e posteriormente convertida por ODC1 em putrescina. Depois, a putrescina é convertida por SPDS em espermidina, seguido pela conversão de espermidina por SPMS em espermina. Em (2), a enzima NOS2 produz óxido nítrico (NO). Em (3), a enzima mitocondrial ARG2 está representada. CAT: Cationic Amino Acid Transporter; SLC: Solute Carrier Family; ARG: Arginase; ODC1: Ornitina Descarboxilase 1; OTC: Ornitina Transcarbamilase; SPDS: Espermidina Sintase; SPMS: Espermina Sintase; NOS2: Óxido Nítrico Sintase 2; NO: Óxido Nítrico. Criado com Biorender.com.

Poliaminas são moléculas de baixo peso molecular, catiônicas e derivadas do metabolismo de aminoácidos como a L-arginina, L-glutamina, ornitina e agmatina (Pegg, 2009; Sánchez-Jiménez et al., 2019). As poliaminas são compostas por cadeias de carbono alifáticas com mais de um grupo amina em sua composição, sendo as principais delas putrescina (di-amina), espermidina (triamina) e espermina (tetramina; tabela 1). Estão presentes em todos os tipos celulares e são essenciais para manutenção do crescimento celular (Pegg, 2009; Wallace, 2009).

Tabela 1: Estrutura molecular de três principais poliaminas (putrescina, espermidina e espermina).

Poliamina	Estrutura molecular
Putrescina $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$	
Espermidina $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$	
Espermina $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$	

Por terem carga positiva, as poliaminas são capazes de interagir eletrostaticamente com o DNA e RNA, atuando em processos de transcrição e tradução (Pegg, 2009; Pasini et al., 2014; Puleston et al., 2019; Latour et al., 2020b). Também atuam em células mielóides, na modulação da polarização dos macrófagos e proteção contra danos oxidativos promovidos pelo aumento da atividade da NOS2 (Stewart et al., 2018; Latour et al., 2020b; Chia et al., 2022). Em tripanossomatídeos, a proteção antioxidante é realizada pela tripanotiona, um conjugado glutationa-espermidina (Manta et al., 2013; Stewart et al., 2018). A inibição da via de poliaminas pode interferir na biossíntese de tripanotiona, e já foi proposta como um possível tratamento para leishmaniose (Wallace, 2009). Uma droga capaz

de inibir a biossíntese de poliaminas é a α -difluorometilornitina (DFMO), pela inibição da atividade da ornitina descarboxilase (ODC), entretanto, a droga não impede a captação da ornitina e sua metabolização pelas vias biosintéticas de poliaminas (Wallace, 2009).

Aminoácidos e policações como as poliaminas podem ser transportados por proteínas da superfamília Aminoácido-poliamina-organocación (APC). O transportador responsável pelo antiporte de poliaminas, glutamina e aminoácidos neutros SLC3A2 (ou CD98) também está presente na membrana dos macrófagos (Palmieri, 2004; Abdulhussein and Wallace, 2014; Sánchez-Jiménez et al., 2019). SLC3A2 é uma proteína transmembrana que está amplamente distribuída e é capaz de formar complexos com outras cadeias peptídicas da mesma família, como a formação do heterodímero com a proteína SLC7A5 (ou *L-type amino acid transporter 1*, LAT-1; Fig2) (de La Ballina et al., 2016). Além disso, SLC3A2 está implicada a processos de sinalização celular na regulação da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, como *Ifn γ* e *Tnf α* , e sua ausência reduz a produção destas citocinas na resposta contra *L. major* (Kurihara et al., 2015).

O estímulo com LPS e processos inflamatórios como a colite levam ao aumento de SLC3A2, que pode ser regulada pelos fatores de transcrição (Sp1) e o fator nuclear kappa B (NF κ B) ou via de ativação MyD88-NF κ B e (Yan et al., 2007; Bhuyan et al., 2014). A redução de SLC3A2 em célula mononuclear de sangue periférico (PBMC) humana e em macrófagos murinos reduz a expressão de IL-1 β após estimulação com LPS, sem alterar IL-6 ou TNF α (Tannahill et al., 2013). Esses achados indicam o envolvimento desse transportador na resposta imune, mas há muitos pontos em aberto quanto ao metabolismo de poliaminas e correlação com seu transportador.

Leishmania é auxotrófica para a L-arginina (Reguera et al., 2009), o que leva a uma competição pela L-arginina do macrófago, controlando a expressão de proteínas relacionadas a síntese de poliaminas (Castilho-Martins et al., 2015; McConville, 2016). Espécies do gênero *Leishmania* possuem seus próprios transportadores de L-arginina, como as permeases de aminoácido 3 (AAP3) (Darlyuk et al., 2009; Castilho-martins et al., 2011; Aoki et al., 2017b; Müller et al., 2018), e a enzima arginase (Castilho-martins et al., 2011; McConville, 2016; Muxel et al., 2017). *L. amazonensis* e *L. donovani* são sensíveis à privação de L-arginina (Goldman-pinkovich et al., 2016; Aoki et al., 2017a; Goldman-Pinkovich et al., 2020; Zilberstein and Myler, 2021). Além disso, ao viver no fagolisossomo após a infecção, o parasita é capaz de ativar uma resposta de privação de arginina aumentando a expressão de *aap3* (McConville, 2016; Goldman-Pinkovich et al., 2020; Zilberstein and Myler, 2021).

1.5 Regulação da expressão gênica e microRNAs na infecção com *L. amazonensis*

A regulação da expressão gênica pode modular a resposta imune (Sonkoly et al., 2008; Geraci et al., 2015; Acuña et al., 2020). Os mecanismos de regulação pós-transcricional envolvem as interações mediadas pelos microRNAs (miRNAs) (Geraci et al., 2015). miRNAs são moléculas de RNA não codificante que possuem entre 18 a 25 nucleotídeos (Geraci et al., 2015; Muxel et al., 2018b). Sua ação está vinculada ao silenciamento de genes, por meio da ligação por complementaridade à região 3' não traduzida (UTR) do mRNA alvo, inibindo sua expressão e interferindo na eficiência da tradução (Humphreys et al., 2005; Maroney et al., 2006). Os microRNAs também podem atuar direta ou indiretamente reduzindo os níveis de produção de proteínas-alvo (Li et al., 2018).

No núcleo, a transcrição dos miRNAs pode ocorrer a partir de sequências monocistrônicas ou policistrônicas, compreendidas entre genes e em regiões intrônicas, exônicas ou na fita antisense (Fig.6) (Kim et al., 2009; Acuña et al., 2020; Santovito and Weber, 2022). A partir da transcrição pela RNA polimerase II, o miRNA primário (pri-miR) é processado por duas endonucleases, DROSHA e DGCR8, em uma estrutura de miRNA precursor (pre-miR) e, posteriormente, ligado a uma proteína exportina 5 que o transporta para o citoplasma (Fig.6) (Baltimore et al., 2008; Leung, 2015). No citoplasma, as RNases Dicer e TRBP reconhecem o pre-miRNA e o processam em miRNA maduro (Fig.6) (Acuña et al., 2020; Leitão and Enguita, 2022). O miRNA maduro é integrado ao complexo RISC, constituído das proteínas Dicer, TRBP e a argonauta (AGO), responsáveis por auxiliar no pareamento do miRNA-mRNA e silenciamento do mRNA alvo. (Leung, 2015; Leitão and Enguita, 2022).

Nosso grupo vem investigando a modulação da expressão de genes envolvidos no metabolismo de L-arginina e possíveis genes alvos da interação miRNA-mRNA em macrófagos infectados com *L. amazonensis* (Muxel et al., 2018c, 2018b; Fernandes et al., 2019; Acuña et al., 2020). Nossos dados mostram que os miR-294, miR-302d e miR-721, modulados positivamente durante a infecção com *L. amazonensis* em modelo murino têm como alvo o transcrito de *Nos2* (Muxel et al., 2017). Além disso, a inibição desses miRNAs aumenta a expressão de NOS2 e produção de NO, consequentemente reduzindo a infectividade (Muxel et al., 2017; Fernandes et al., 2019). Também mostramos que a infecção de macrófagos murinos com *L. amazonensis* aumenta a expressão do miRNA-let-7e, interferindo na expressão de genes da via dos TLRs (Muxel et al., 2018a). Nosso último trabalho mostrou que o miR-294 também inibe a expressão do RNA mensageiro dos transportadores de L-arginina CAT1 e CAT2 e da citocina TNF (Acuña et al., 2022). Os microRNAs também podem ser

induzidos por TLRs e regular a ativação de genes pró-inflamatórios (Neill et al., 2011). Nesse sentido, o estudo do impacto das poliaminas na expressão de mRNAs e miRNAs no modelo de infecção com *L. amazonensis* contribui com as interações já conhecidas na literatura, além de evidenciar possíveis genes de interesse na biossíntese de poliaminas.

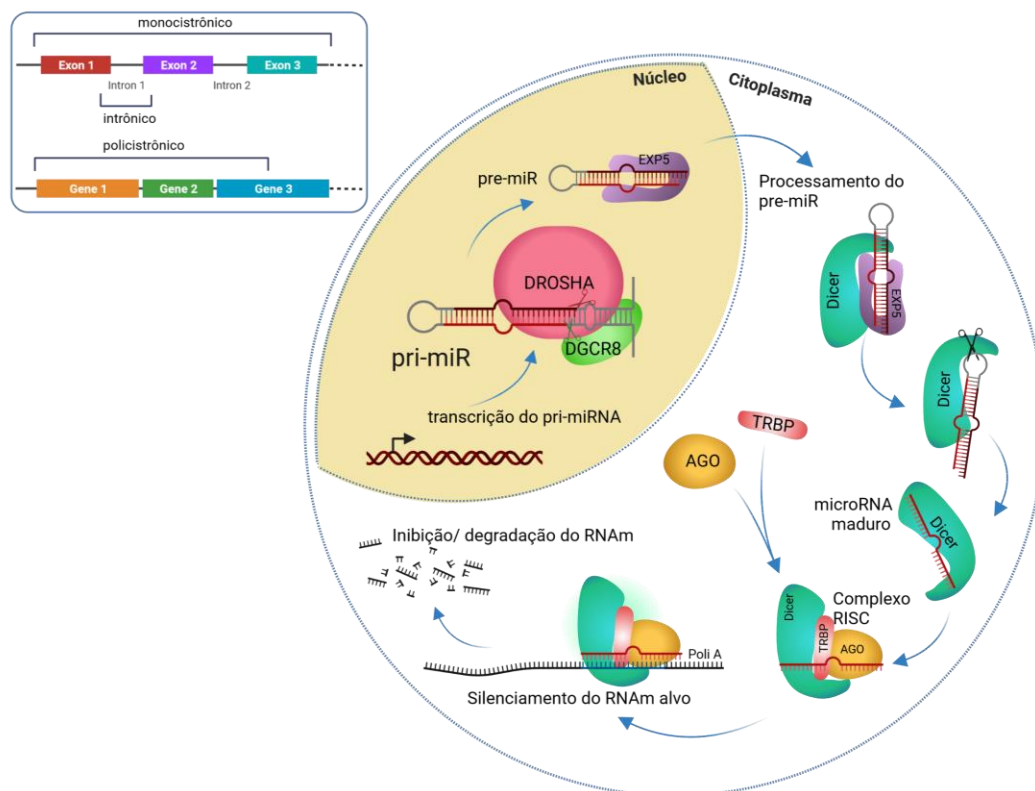


Figura 6: Biossíntese de microRNAs: a transcrição do pri-miRNA forma uma estrutura em forma de grampo que é processada pelas endonucleases DROSHA e DGCR8 em pre-miRNA. Em seguida, a proteína exportina 5 se liga ao pre-miR e o transporta do núcleo para o citoplasma, onde as proteínas Dicer e TRBP processam a estrutura em microRNA maduro. Em seguida, o complexo RISC, composto pelas proteínas Dicer, TRBP e a proteína argonauta (AGO) auxiliam no pareamento do microRNA, levando à sua inibição e consequentemente a degradação. AGO: Argonauta; Exp5: Exportina5; pri-miR: miRNA primário; pre-miR: miRNA precursor TRBP: *Trans-activation response RNA-binding protein*; RISC: *RNA-induced silencing complex*. Criado com Biorender.com.

2. Hipótese

A interação entre o parasita e o hospedeiro desvia a L-arginina para produção de poliaminas e reduz a produção de óxido nítrico e atividade microbicida dos macrófagos. Sendo assim, este trabalho se baseia na hipótese de que a disponibilidade de L-arginina e poliaminas induz alterações na expressão de genes e miRNAs relacionados ao seu metabolismo nos macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis* e aumentam a susceptibilidade à infecção.

3. Objetivo

Avaliar como a disponibilidade de L-arginina e poliaminas afeta a expressão de genes relacionados ao seu metabolismo em macrófagos de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania amazonensis* e susceptibilidade à infecção

3.1: Objetivos específicos:

3.1.1) Avaliar como a privação ou suplementação com L-arginina modula a expressão de genes envolvidos no seu metabolismo em macrófagos infectados com *L. amazonensis*

3.1.2) Avaliar se a privação ou suplementação com poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) altera a expressão de genes de enzimas envolvidas na sua produção (*Arg1*, *Arg2*, *Odc*, *SpdS* e *SpmS*) em macrófagos infectados com *L. amazonensis*

3.1.3) Avaliar se a privação ou suplementação com L-arginina e poliaminas altera a expressão de genes envolvidos no transporte de L-arginina e poliaminas em macrófagos infectados com *L. amazonensis*

3.1.4) Analisar o impacto da privação ou suplementação com L-arginina e poliaminas para a produção de óxido nítrico em macrófagos infectados com *L. amazonensis*.

3.1.5) Avaliar se a privação ou suplementação com L-arginina e poliaminas afeta a expressão de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos infectados com *L. amazonensis*

3.1.6) Analisar o impacto da privação ou suplementação com L-arginina e poliaminas na infecção de macrófagos com *L. amazonensis*.

3.1.7) Avaliar se a privação ou suplementação com L-arginina e putrescina altera a expressão dos miR-294, miR-302d e miR-721 em macrófagos infectados com *L. amazonensis*.

4. Materiais e Métodos

4.1 Aprovação do comitê de ética

O protocolo experimental para os experimentos com animais foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (número de aprovação CEUA-IB: IB-USP 314/2018). Este estudo foi conduzido em conformidade com as recomendações do guia e políticas para o cuidado e uso de animais de laboratório do Estado de São Paulo (Lei Estadual 11.977, de 25 de agosto de 2005) e do Governo Federal (Lei Federal 11.794, de 8 de outubro de 2008).

4.2 Obtenção e diferenciação de macrófagos murinos

Foram isoladas células derivadas da medula óssea de fêmures e tíbias de camundongos BALB/c, fêmeas com idade entre 6 e 8 semanas, fornecidas pelo Centro de Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e mantidas no Instituto de Biociências da USP. Para a diferenciação em macrófagos, as células foram incubadas por 7 dias com 10% de sobrenadante de cultura condicionada de células da linhagem de fibroblastos L9-29 (como fonte de “*Macrophage Colony-Stimulating 35ator*”, MCS-F) em meio RPMI 1640 (LGC, São Paulo, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) (Invitrogen), 5 mg/L hemina, 100 μ M adenina, 50 U de penicilina, 50 μ g/mL de estreptomicina (Gibco™, EUA) à 37°C e 5% de CO₂.

4.3 Cultura do parasita

Para realizar a infecção, formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269) foram mantidas em meio de cultura M199

(Gibco) suplementado com 10% de SFB inativado, 50 U de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina, 40 mM HEPES-NaOH, e 12 mM NaHCO₃, em pH 6.85, em cultura de passagem baixa (até 5).

4.4. Ensaio de infecção dos Macrófagos e suplementações com L-arginina e poliaminas

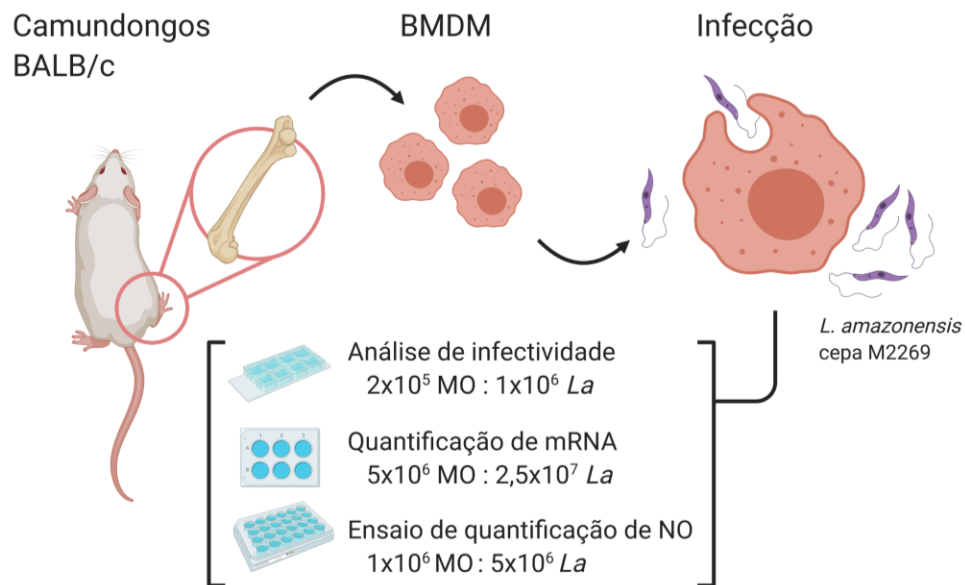
Para a análise de RNA, 5x10⁶ macrófagos/poço foram plaqueados em placas de 6 poços (SPL, Lifescience) e para análise de citometria de fluxo, 1x10⁶ macrófagos/poço em placas de 24 poços. Para a infectividade, 2x10⁵ macrófagos/poço foram plaqueados em *chamber slides* de 8 poços (Sigma, EUA) e mantidas por 18h a 34°C, 5% CO₂.

Os macrófagos e formas promastigotas de *L. amazonensis* (La) na fase estacionária foram lavados em solução fosfato salina (PBS) na concentração 1X. Macrófagos e *Leishmania* foram co-cultivados na proporção de 5 parasitas por macrófago, em meio RPMI 1640 sem L-arginina (R1780, Sigma-Aldrich, EUA) suplementado com 2% de SFB inativado (Invitrogen). As suplementações com ou sem L-arginina, putrescina, espermidina e espermina, foi realizada nas condições a seguir:

- (1) privado de L-arginina (arg-);
- (2) suplementado com L-arginina (400 µM, arg+);
- (3) suplementado com putrescina (100 µM, put +);
- (4) suplementado com L-arginina mais putrescina (arg +/-put+);
- (5) suplementado com espermidina (100 µM, spd+);
- (6) suplementado com L-arginina mais espermidina (arg+/spd+);
- (7) suplementado com espermina (100 µM, spm+);
- (8) suplementado com L-arginina mais espermina (arg+/spm+).

Essas condições são as mesmas para macrófagos não infectados (MO) e macrófagos infectados (MO-La; Fig 7). As concentrações de L-arginina e

poliaminas são baseadas em dados prévios de nosso grupo e outros trabalhos da literatura que estudaram macrófagos (Bianchi et al., 1995; Pérez-Cano et al., 2003; Laranjeira-Silva et al., 2015; Hardbower et al., 2017).



Estratégia metodológica

Privação com L-arginina e suplementação com L-arginina e poliaminas para macrófagos não infectados (MO) e infectados com *Leishmania amazonensis*

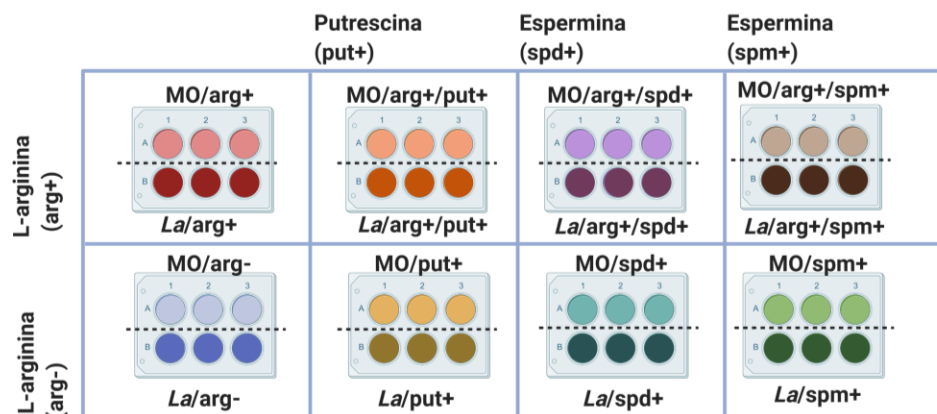


Figura 7: Estratégia metodológica para o experimento de privação de L-arginina e/ou suplementação com L-arginina e poliaminas em macrófagos, concomitante à infecção com *L. amazonensis*.

Após 4 horas de infecção, a cultura foi lavada duas vezes com 1X PBS para remover parasitas não fagocitados. Após, foi adicionado meio

RPMI 1640 completo (contendo L-arginina, LGC) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, 50U de penicilina, 50µg/mL de estreptomicina a 34°C e 5% de CO₂.

Para análise dos RNAs, a cultura foi coletada após 4h e 24h de infecção. Para a análise da infectividade, a cultura foi mantida por períodos de 24 e 48 horas, fixada com acetona: metanol (1: 1, v: v), após coloração com Panóptico (Laborclin, Paraná, Brasil), as lâminas foram lavadas, e a infectividade foi analisada por microscopia óptica. O índice de infecção (taxa de macrófagos infectados multiplicada pelo número médio de amastigotas por macrófago) foi calculado pela contagem de campos aleatórios de pelo menos 500 macrófagos por lâmina.

4.5 Extração do RNA

As células foram lavadas com 1X PBS, ressuspensas em 750µL de reagente Trizol™ (Invitrogen) e a extração de RNA foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi ressuspenso em 20µL de água livre de RNase e quantificado, com pureza verificada pela razão 260/230 em espectrofotometria (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific).

4.6 Reação de Transcrição Reversa e PCR em tempo real de mRNAs (RT-qPCR)

A síntese de cDNA de para análise de mRNAs, foi realizada com o kit RevertAID Reverse Transcriptase (ThermoScientific), seguindo as instruções do fabricante. A reação foi preparada em um volume final de 40 µL, contendo 2 µg de RNA total, incubado na presença de 2 µL de oligos *random primer* (1,5µg/µL, ThermoScientific), 2µL de dNTP (10mM, ThermoScientific) e 8µL de água a 72°C por 5 min. Em seguida, foram adicionados 8 µL do tampão 5X, 2 µL de DTT (0,1M), 2 µL de RNase OUT e 2 µL de transcriptase reversa (200U/µL). A reação foi realizada em

termociclador (Eppendorf Mastercycler Nexus) com os ciclos de temperaturas de 37°C por 5 min, 25°C por 10 min, 42°C por 45min e 72°C por 10 min. Para preparar o controle negativo da transcrição reversa e descartar possível contaminação por DNA genômico, as amostras foram preparadas nas mesmas condições, sem adicionar a enzima transcriptase reversa. Os cDNAs obtidos foram diluídos 100 vezes em água livre de RNase para análise em qPCR.

Para obter a quantificação gênica relativa, a reação foi preparada com 5µL de SYBR Green PCR Master Mix, 200nM de oligonucleotídeos e 5µL de cDNA da amostra (diluído 100X), em um volume final de 10,1 µL. As reações foram realizadas usando StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific): a primeira etapa, um ciclo a 95 ° C por 10 minutos e a segunda etapa, 40 ciclos a 94 ° C por 30s e a 60 ° C por 30s, seguida da curva de dissociação. Para avaliar a eficiência de cada primer no qPCR, uma amostra contendo o fragmento do amplicon clonado em pGEM T-Easy foi utilizada em diluição em série 10X a partir da concentração de 10^8 a 10^2 número de moléculas para a construção da curva padrão. Os pares de oligonucleotídeos usados estão dispostos na tabela a seguir:

Tabela 2: Pares de oligonucleotídeos usados na amplificação de mRNA

Espécie: <i>Mus musculus</i>	Direção	Primer (5'-3')
Cationic amino acid transporter 1 (<i>Cat1</i>)	Forward	5'-cgtaatgccactgtgacct-3'
	Reverse	5'-ggctggtaccgtaagaccaa-3'
Cationic amino acid transporter 2 (<i>Cat2</i>)	Forward	5'-tccaaaacgaagacaccagt -3'
	Reverse	5'-gccatgagggtgccataga-3'
Solute Carrier Family 3 Member 2 (<i>Slc3a2</i>)	Forward	5'-gccactgagaatgcaaagacc -3'
	Reverse	5'-ttcacgacgtgatgggatgt-3'
Solute Carrier Family 7 Member 5 (<i>Slc7a5</i>)	Forward	5'-aagggcagggattcatggtg-3'
	Reverse	5'-gtaggggtgtctttcagggc-3'
Solute Carrier Family 1 Member 5 (<i>Slc1a5</i>)	Forward	5'-cacttctgtgaccttcca-3'
	Reverse	5'-actctagggccatggtcaatac-3'
Solute Carrier Family 25 Member 15 (<i>Slc25a15</i>)	Forward	5'-gcgaccttaaaaattgcccg-3'
	Reverse	5'-ctggtttctgtggaaggcga-3'
Arginase 1 (<i>Arg1</i>)	Forward	5'-agcactgaggaaagctggtc-3'
	Reverse	5'-cagaccgtgggttcttcaca-3'
Arginase 2 (<i>Arg2</i>)	Forward	5'-tctcctccacgggcaaatc -3'
	Reverse	5'-cactcctagcttcttctgcc-3'
Ornithine decarboxilase (<i>Odc1</i>)	Forward	5'-ctgccagtaacggagtccag-3'
	Reverse	5'-tcagtggcaatccgtagaac-3'
Spermidine Synthase (<i>SpdS</i>)	Forward	5'-tggtggactacgcctactgt-3'
	Reverse	5'-tggtgcggttttctgcta-3'
Spermine Synthase (<i>SpmS</i>)	Forward	5'-acactatggcagcagcaagac-3'
	Reverse	5'-tgtgcaactgactctgtcatcc-3'
Nitric Oxide Synthase (<i>Nos2</i>)	Forward	5'-agagccacagtctctttgc-3'
	Reverse	5'-gctctcttccaaggtgctt-3'
Interleukin-1- β (<i>Il-1β</i>)	Forward	5'-ccaagcttcttctgtgcaagtg-3'
	Reverse	5'-ctgtcaaaaggtggcatttcac-3'
Tumor Necrosis Factor alpha (<i>Tnf-α</i>)	Forward	5'-ccaccagctcttctgtcta-3'
	Reverse	5'-agggtctgggccatagaact-3'
Monocyte Chemoattractant Protein-1 (<i>Mcp-1</i>)	Forward	5'-tgatcccaatgagtaggctgg-3'
	Reverse	5'-gcacagacctctctttagac-3'
β -2-microglobulin (<i>B2M</i>)	Forward	5'-cactgaattcaccctcactga-3'
	Reverse	5'-acagatggagcgtccagaaag-3'

A expressão relativa foi calculada baseada utilizando o gene β -2-microglobulina como normalizador (Δ Ct) e o grupo MO/arg⁺ em 4 horas como grupo referência ($\Delta\Delta$ Ct). O Fold-Change foi apresentado em log₂.

4.7 Reação de Transcrição Reversa e PCR em tempo real de miRNA: Utilizamos o “miScript II RT Kit” (Qiagen) para a transcrição reversa do RNA para cDNA de miRNAs maduros utilizando 250 ng RNA, seguindo recomendações do fabricante. A quantificação relativa do miR-294, miR-302d, miR-721 e SNORD95 foi realizada em Termociclador StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific) utilizando 2,5µL de cDNA (diluído 10-vezes), “miScript Primer Assay” e “miScript SYBR PCR Kit” (Qiagen) em volume final de 10 µL (Muxel et al., 2017; Acuña et al., 2022) com o seguinte protocolo: ativação da *HotStart* DNA polimerase a 95°C por 15s e 40 ciclos de 94°C por 15s, seguido por um ciclo de 55°C por 30s e 70°C por 30s. A expressão relativa foi calculada utilizando o gene SNORD95 como normalizador (Δ Ct) e o grupo MO/arg+ em 4 horas como grupo referência ($\Delta\Delta$ Ct). O Fold-Change foi apresentado em log2.

4.8 Ensaio de quantificação de óxido nítrico (NO)

Os macrófagos foram deaderidos com 1mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) em PBS 1X seguida de raspagem com rodinho. As células foram lavadas e em PBS 1X gelado (500 x g, 10 min, 4°C) e incubados com 5 µM DAF-FM (4-amino-5metilamino-2', 7' -diclorofluoresceína diacetato, Life Technologies, Eugene, EUA) em 1X PBS por 30 min a 34°C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1X. A aquisição de fluorescência do DAF-FM (FL1) foi realizada usando citômetro BD Accuri (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA) com a coleta de 30.000 eventos, com base nas características de dispersão direta (FSC) e dispersão lateral (SSC).

4.9 Análise estatística

Os dados coletados foram analisados no software GraphPad Prism 7. Para entender a diferença biológica para cada condição, as análises estatísticas foram realizadas utilizando One-way ANOVA para RNAm e análise de citometria, e Two-way ANOVA para infectividade, com intervalo de confiança de 95% e teste *post-hoc* de Sidak. Comparações com $p \leq 0,05$ foram representadas nos gráficos. As comparações entre os grupos não infectados e infectados ocorreram apenas entre condições semelhantes, partindo da suplementação com L-arginina. As comparações de um único grupo (grupos não infectados e grupos infectados) privado de L-arginina ou suplementado com L-arginina ocorreram com poliaminas semelhantes.

5. Resultados

5.1 Privação e suplementação com L-arginina na modulação da expressão gênica em macrófagos infectados com *L. amazonensis*

Dado que a ativação do macrófago regula a expressão gênica direcionada o consumo de L-arginina por meio de enzimas típicas aos perfis M1 ou M2 (Rath et al., 2014; Muxel et al., 2018c), analisamos se a disponibilidade de L-arginina seria capaz de alterar a expressão gênica das vias de produção poliaminas e NO. Para isso, realizamos a privação de L-arginina (arg-) em macrófagos BALB/c nas 4h iniciais da infecção com *L. amazonensis*. Os mRNAs *Arg1* e *Arg2*, *Odc1*, *SpdS*, *SpmS* e *Nos2* foram analisados após 4 e 24h de infecção por RT-qPCR. A produção de NO foi analisada por citometria de fluxo (Fig. 8). A suplementação com L-arginina (arg+) foi usada como referência para comparação das condições nas respectivas 4 e 24h.

A suplementação (arg+) ou privação de L-arginina (arg-) em macrófagos infectados (MO-La) e não infectados (MO) não modulou os níveis dos transcritos de genes envolvidos na produção de poliaminas *Arg1* e *Arg2*, *Odc1*, *SpdS* e *SpmS*, comparando com macrófagos não infectados ou macrófagos infectados (Fig.8A-E).

Na condição de suplementação (arg+), não houve modulação de *Nos2* e produção de NO (Fig. 8F,G). Na condição arg-, os níveis de *Nos2* aumentaram nos macrófagos infectados em 4h em relação aos macrófagos não infectados, mas não em relação ao arg+ (Fig.8F). Quando comparamos 4 e 24h no grupo arg+, os níveis de *Nos2* reduziram cerca de duas vezes em arg+ nos macrófagos infectados ou não-infectados (Fig.8F).

A porcentagem de células produtoras de óxido nítrico (células DAF-FM+) e a média de intensidade de fluorescência (MFI) não foram modificadas nas condições arg+ e arg- (Fig.8G-H). Esses dados sugerem que a privação com L-arginina modula os níveis do mRNA de *Nos2*, sem refletir na produção de NO.

Concluimos que a disponibilidade de arginina *per se* não alterou a expressão das enzimas envolvida na produção de poliaminas.

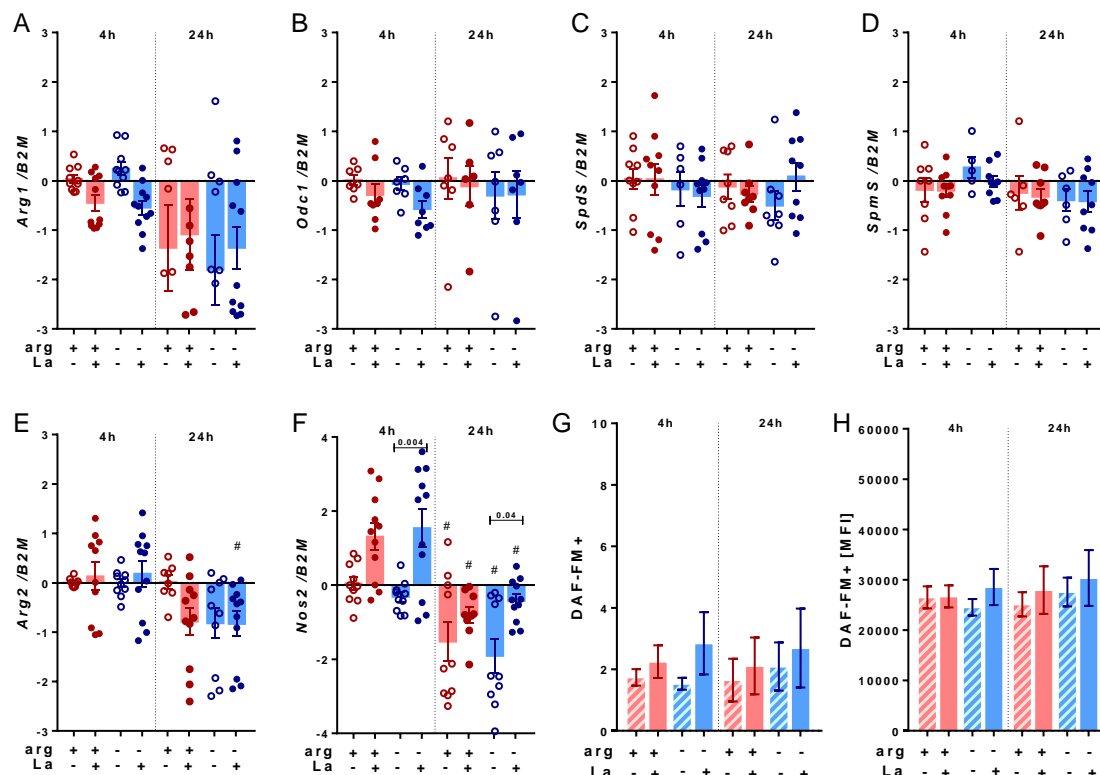


Figura 8: Expressão gênica do metabolismo de L-arginina em macrófagos BALB/c infectados com *L. amazonensis*. Os macrófagos (5×10^6) (A-F) e (1×10^6) (G,H) foram privados de L-arginina (arg-) ou suplementados com L-arginina (arg+) simultaneamente à infecção com *L. amazonensis* (MOI 5: 1) por 4h. Após este tempo, meio completo foi adicionado e a cultura mantida por 24h. A quantificação relativa dos genes *Arg1* (A), *Odc1* (B), *SpdS* (C), *SpmS* (D), *Arg2* (E) e *Nos2* (F) por RT-qPCR. A produção de NO foi avaliada em amostras marcadas com DAF-FM para análise por citometria de fluxo, a frequência de células DAF-FM+ (G) e MFI (H). Os dados foram normalizados usando o gene β -2-microglobulina. Os macrófagos não infectados suplementados com arg+ às 4h foram usados como controle nos cálculos de $\Delta\Delta C_T$. As barras representam as médias e S.E.M dos valores. A análise estatística usando One-Way ANOVA está indicada nas barras. #: $p \leq 0,05$ para a comparação entre 4h e 24h.

A captação de L-arginina pode ser modulada de modo a alterar a disponibilidade de aminoácidos e poliaminas no citoplasma, fagolisossomo e outros compartimentos nos macrófagos (Yeramian et al., 2006a; Kishikawa et al., 2015). Nós analisamos se a privação de L-arginina altera os níveis de transcritos dos transportadores de L-arginina, *Cat1* e *Cat2* e transportadores de poliaminas, *Slc3a2* e *Slc7a5* (Fig.9). Para isso, realizamos a privação de L-arginina (arg-) em macrófagos BALB/c nas 4h iniciais da infecção com *L. amazonensis*. Os mRNAs *Cat1*, *Cat2*, *Slc3a2* e *Slc7a5* foram analisados após 4 e 24h de infecção por RT-qPCR (Fig.9). A suplementação com L-arginina (arg+) foi usada como referência para comparação das condições nas respectivas 4 e 24h.

Os níveis de *Cat1* e *Slc7a5* reduziram em 24h comparados com 4h, em macrófagos infectados ou não-infectados independente da disponibilidade de L-arginina (Fig.9A, D). Os níveis de *Cat1*, *Cat2*, *Slc3a2* e *Slc7a5* permaneceram similares. Estes dados indicam que a disponibilidade L-arginina não afetou a expressão de genes envolvidos na captação e na metabolização de L-arginina para produção de poliaminas.

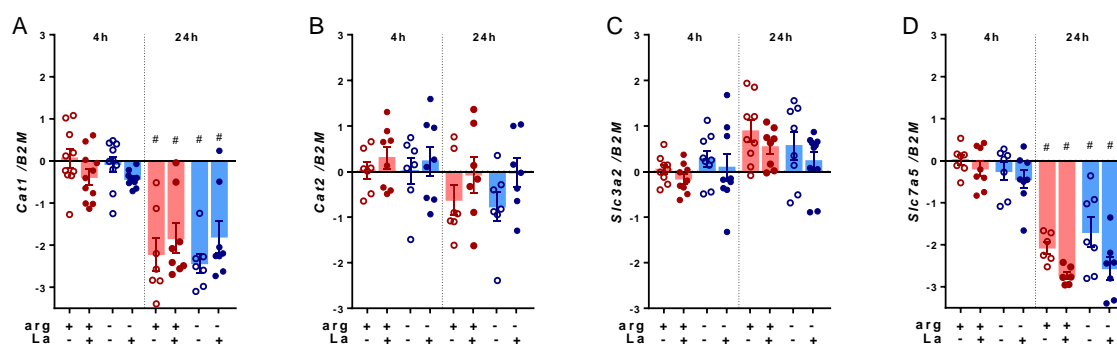


Figura 9: Expressão gênica de transportadores de aminoácidos e poliaminas em macrófagos BALB/c infectados com *L. amazonensis* em condição de privação de L-arginina. Os macrófagos (5×10^6) foram privados de L-arginina (arg-) ou suplementados com L-arginina (arg+), simultaneamente à infecção com *L. amazonensis* (MOI de 5:1) por 4h. Após este tempo, meio completo foi adicionado e a cultura mantida por 24h. A quantificação relativa dos genes *Cat1/Slc7a1* (A),

Cat2/Slc7a2 (B), *Slc3a2* (C) *Slc7a5* (D) foi realizada por RT-qPCR. Os dados foram normalizados usando o gene *β -2-microglobulina*. Os macrófagos não infectados suplementados com arg⁺ às 4h foram usados como controle nos cálculos de $\Delta\Delta C_T$. As barras representam as médias e S.E.M dos valores. A análise estatística One-Way ANOVA está indicada nas barras. #: $p \leq 0,05$ para a comparação entre 4h e 24h.

5.2 Privação e suplementação com poliaminas na modulação da expressão gênica da via biossintética de poliaminas em macrófagos infectados com *L. amazonensis*

Como a disponibilidade de L-arginina não alterou a expressão de genes responsáveis pela biossíntese de poliaminas, decidimos analisar se as poliaminas podem influenciar os níveis desses genes. Para isso, realizamos a suplementação com putrescina, espermidina e espermina, subdivididos em condições com ou sem L-arginina, em macrófagos BALB/c nas 4h iniciais da infecção com *L. amazonensis*. Os mRNAs *Arg1* e *Arg2*, *Odc1*, *SpdS*, *SpmS* e *Nos2* foram analisados após 4 e 24h de infecção por RT-qPCR (Fig.10).

Não foram observadas diferenças nos transcritos de *Arg1* nas condições de privação ou suplementação com L-arginina e poliaminas (Fig.10A).

De maneira interessante durante a infecção, a suplementação com L-arginina e putrescina (arg⁺/put⁺) ou somente putrescina (put⁺), aumentou os níveis dos transcritos de *Arg2* em 4h, em relação ao grupo MO-La/arg⁺ 4h (Fig.10B). A suplementação dos macrófagos não infectados com L-arginina e espermidina (arg⁺/spd⁺) ou somente espermidina (spd⁺), L-arginina e espermina (arg⁺/spm⁺) ou apenas com espermina (spm⁺; Fig.10B) promoveram de maneira semelhante a redução da expressão de *Arg2* em 24h comparados com MO/arg⁺ (Fig.10B).

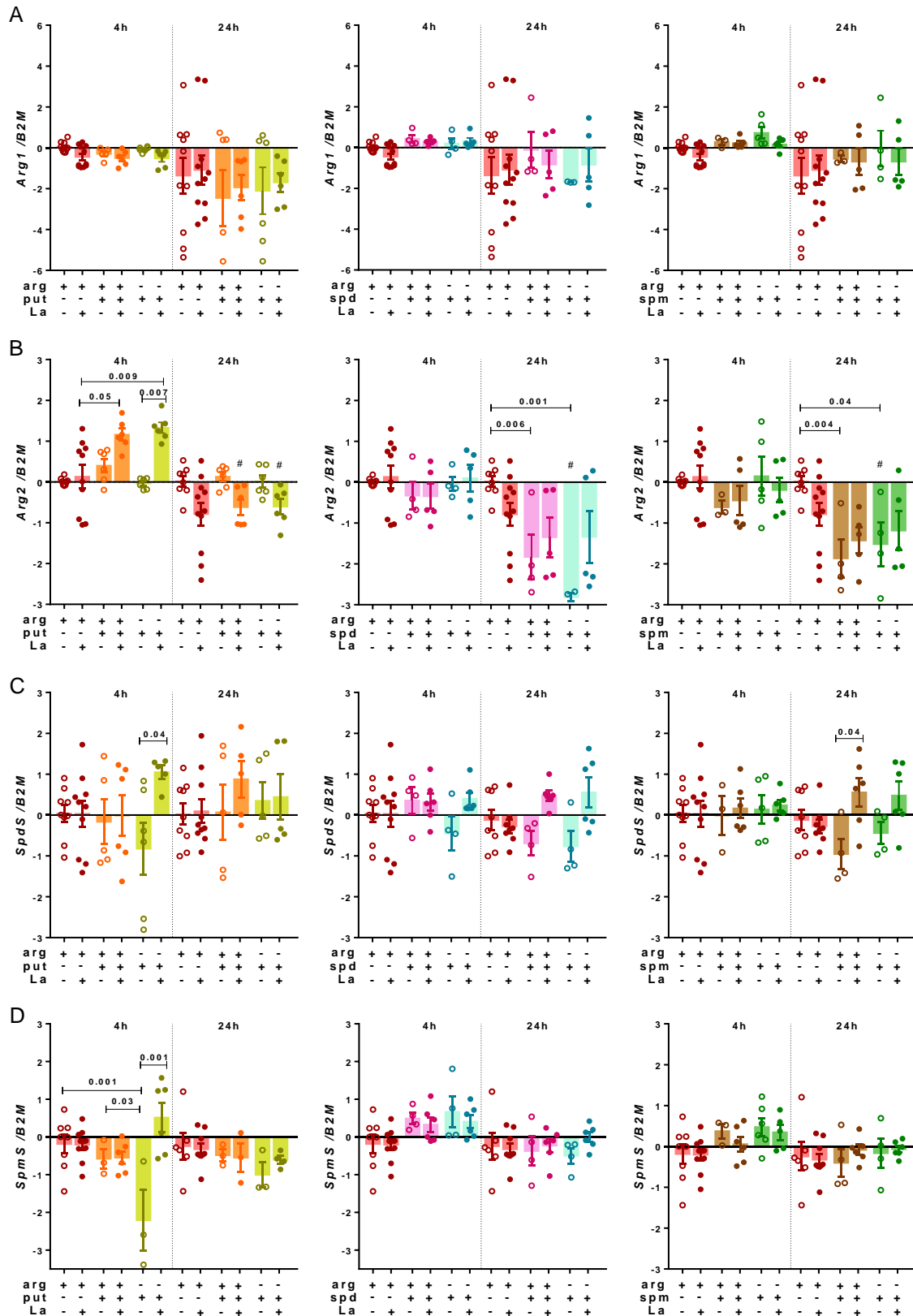


Figura 10: Expressão gênica de enzimas da via de biossíntese de poliaminas em macrófagos BALB/c infectados com *L. amazonensis* em condição de privação e suplementação com poliaminas. Os macrófagos (5×10^6) foram suplementados com

L-arginina (arg⁺) e/ou putrescina (put⁺), espermidina (spd⁺), espermina (spm⁺), simultaneamente à infecção com *L. Amazonensis* (MOI 5:1) por 4h. Após este tempo, meio completo foi adicionado e a cultura mantida por 24h. A quantificação relativa dos genes *Arg1* (A), *Arg2* (B), *SpdS* (C) e *SpmS* (D) foi realizada por RT-qPCR. Os dados foram normalizados usando o gene β -2-microglobulina. Os macrófagos não infectados suplementados com arg⁺ às 4h foram usados como controle nos cálculos de $\Delta\Delta C_T$. As barras representam as médias e S.E.M dos valores. A análise estatística usando One-Way ANOVA está indicada nas barras. #: $p \leq 0,05$ para a comparação entre 4h e 24h

Em macrófagos infectados, a suplementação com put⁺ aumentou a expressão de *SpdS* em 4h. A suplementação com arg⁺/spm⁺ em macrófagos infectados aumentou a expressão de *SpdS* em 24h (Fig.10C).

A suplementação arg⁺/put⁺ ou put⁺ dos macrófagos não infectados, promoveu a redução de *SpmS* em 4h, comparado com macrófagos arg⁺ 4h (Fig.10D). Quando os macrófagos foram suplementados com put⁺ durante a infecção, nós observamos um aumento nos níveis de *SpmS*, levando a uma mudança de perfil entre os macrófagos infectados e não infectados em 4h (Fig.10D).

Nossos dados demonstram que a suplementação com L-arginina e poliaminas modulam a expressão de *Arg2*, *SpdS* e *SpmS* em macrófagos infectados com *L. amazonensis*.

5.3 Privação e suplementação com poliaminas na modulação da expressão gênica de *Nos2* e produção de NO em macrófagos infectados com *L. amazonensis*

Nesta parte, buscamos entender como a via de produção de NO pode ser afetada pela disponibilidade de poliaminas. Para isso, realizamos a suplementação com putrescina, espermidina e espermina, subdivididos em condições com ou sem L-arginina, em macrófagos BALB/c nas 4h iniciais da infecção com *L. amazonensis*. O mRNA *Nos2* foi analisado após 4 e

24h de infecção por RT-qPCR. A produção de NO foi analisada por citometria de fluxo (Fig.11A).

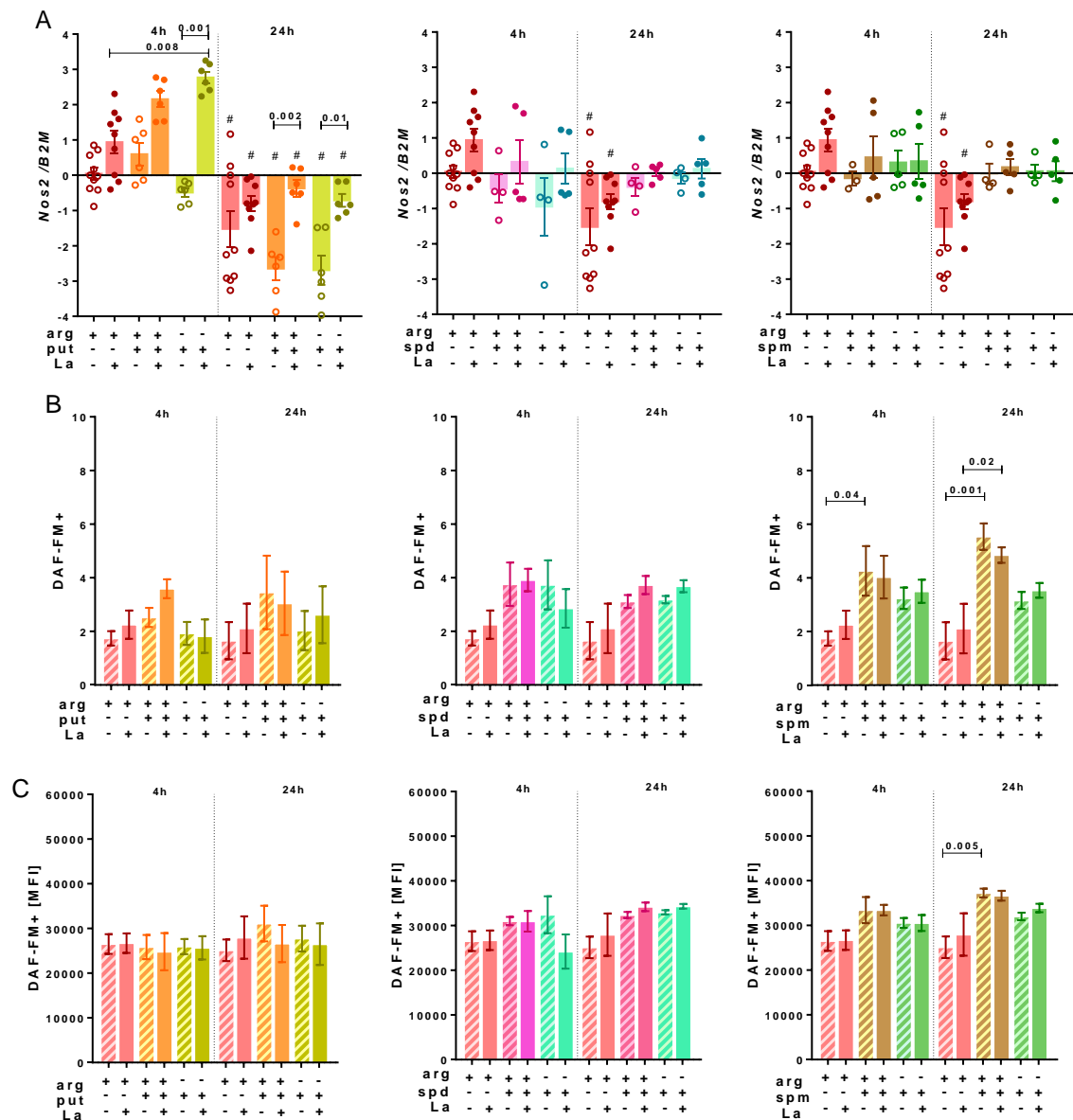


Figura 11: Expressão de *Nos2* e produção de NO em macrófagos BALB/c infectados com *L. amazonensis* em condição de privação e suplementação com poliaminas. Os macrófagos (5×10^6) (A) e (1×10^6) (BC) foram suplementados com L-arginina e/ou putrescina (put+), espermidina (spd+), espermina (spm+), simultaneamente à infecção com *L. Amazonensis* (MOI 5:1) por 4h. Após este tempo, meio completo foi adicionado e a cultura mantida por 24h. A quantificação relativa do gene *Nos2* (A) foi realizada por RT-qPCR. Os dados foram normalizados usando o gene β -2-microglobulina. A produção e NO foi avaliada em amostras marcadas com

DAF-FM para análise por citometria de fluxo, a frequência de células DAF-FM⁺ (B) e MFI (C). Os macrófagos não infectados suplementados com arg⁺ às 4h foram usados como controle nos cálculos de $\Delta\Delta C_T$. As barras representam as médias e S.E.M dos valores. A análise estatística usando One-Way ANOVA está indicada nas barras. #: $p \leq 0,05$ para a comparação entre 4h e 24h.

No contexto da infecção, a suplementação com put⁺ aumentou em duas vezes os níveis de *Nos2* em 4h comparado com macrófagos infectados e suplementado com arg⁺ (Fig.11A). Também observamos que a suplementação com put⁺ nas 4 h de infecção aumentou os níveis de *Nos2* em relação aos macrófagos não infectados nas mesmas condições (Fig.11A). Nas 24h, houve uma mudança no perfil de expressão com a redução de *Nos2* em ambos os grupos infectado e não infectado (Fig.11A). Por outro lado, a suplementação com putrescina aumentou a expressão de *Nos2* em 24h, nos macrófagos infectados em relação aos não infectados (Fig.11A), mas não levou ao aumento na produção de NO, como observado na frequência de DAF-FM⁺ (células produtoras de NO; Fig.11B) ou MFI (média de produção de NO por célula; Fig.11C).

A suplementação com espermidina ou espemina não alteraram a expressão de *Nos2* em macrófagos infectados e não infectados (Fig.11A).

Em macrófagos não infectados, a suplementação com arg⁺/spm⁺ aumentou a porcentagem de células DAF-FM⁺ em 4 e 24h, comparadas com MO/arg⁺ (Fig.11B). Em macrófagos infectados, a suplementação com arg⁺/spm⁺ aumentou a porcentagem de células DAF-FM⁺ em 24h, comparadas com macrófagos infectados e suplementados com arg⁺ (Fig.11B-C).

Nossos dados indicam a modulação da expressão de *Nos2* a nível de transcrito pela suplementação com putrescina durante a infecção, o que não culminou em aumento da produção de NO, enquanto a suplementação

com L-arginina e espermina favoreceram a produção de NO em ambos os grupos infectado e não infectado.

5.4 Suplementação com poliaminas na modulação da expressão gênica dos transportadores de L-arginina, ornitina e poliaminas em macrófagos infectados com *L. amazonensis*

Quantificamos genes relacionados à captação de L-arginina, L-glutamina e poliaminas em macrófagos infectados com *L. amazonensis* nas condições de privação ou suplementação com L-arginina e poliaminas durante 4h, com ou sem L-arginina, em macrófagos BALB/c nas 4h iniciais da infecção com *L. amazonensis*. Os mRNAs *Cat1*, *Cat2*, *Slc1a5*, *Slc3a2*, *Slc7a5* e *Slc25a15* foram analisados após 4 e 24h de infecção por RT-qPCR (Fig.12-14). A suplementação com L-arginina (arg+) foi usada como referência para comparação das condições nas respectivas 4 e 24h.

Após 24h houve redução dos transcritos de *Cat1* comparados com 4h em macrófagos não infectados, nas condições arg+/put+, put+, arg+/spd+ ou spm+ (Fig. 12A). De modo semelhante, em macrófagos infectados, a suplementação com arg+/put+ ou put+ reduziu os níveis de *Cat1* (Fig.12A).

Em macrófagos não infectados a suplementação com arg+/put+, levou a redução na expressão de *Cat2* em 24 h comparado com 4h (Fig.12B). Não observamos modificações nos níveis de *Slc1a5* nas condições de suplementações estudadas (Fig.12C).

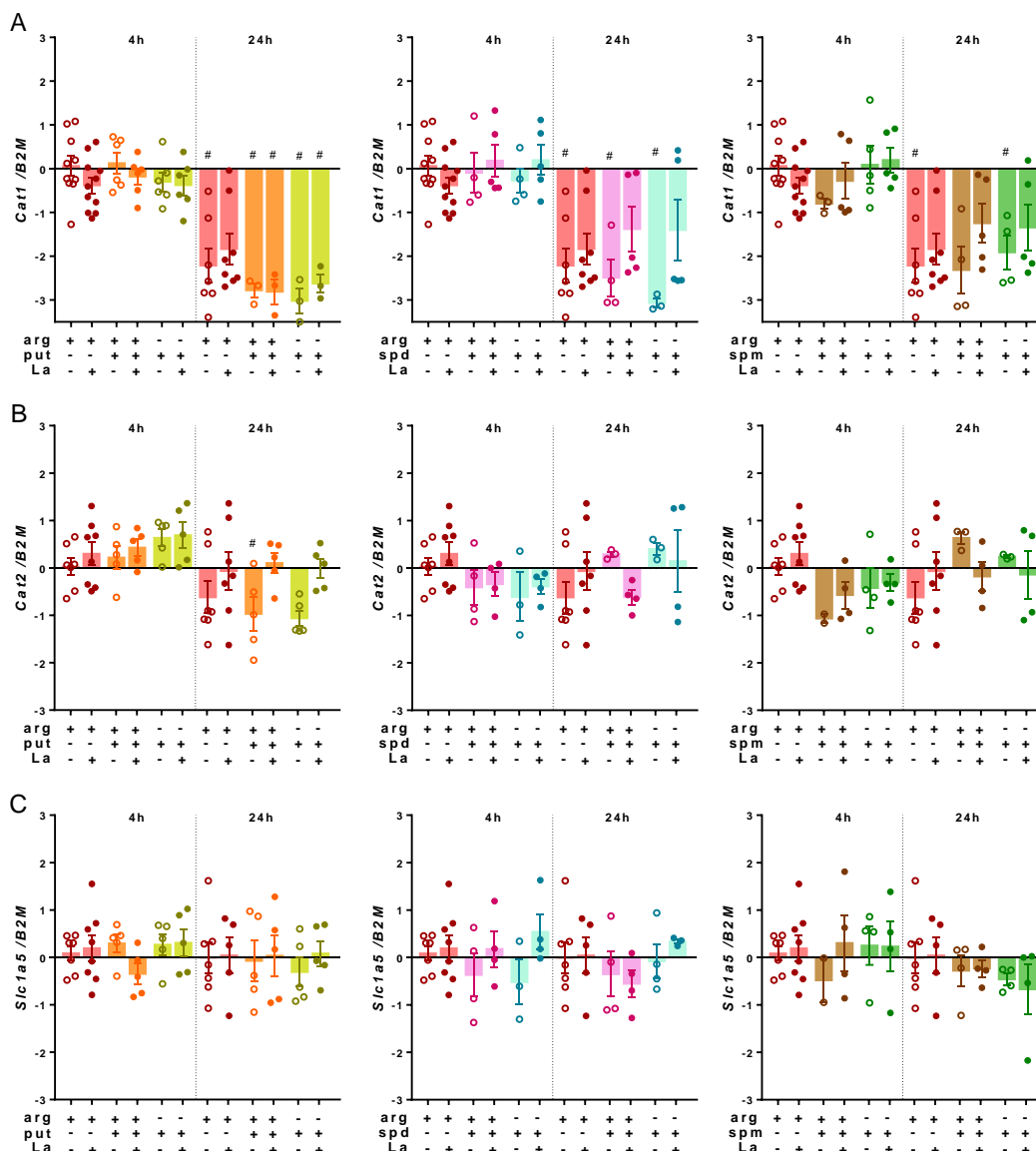


Figura 12: Expressão gênica de transportadores de L-arginina e L-glutamina em macrófagos BALB/c não infectados e infectados. Os macrófagos (5×10^6) foram suplementados com L-arginina (arg+) e/ou putrescina (put+), espermidina (spd+), espermina (spm+), simultaneamente à infecção com *L. amazonensis* (MOI 5:1) por 4h. Após este tempo meio completo foi adicionado e a cultura mantida por 24h. A quantificação relativa dos genes *Cat1/Slc7a1* (A), *Cat2/Slc7a2* (B) e *Slc1a5* (C) foi realizada por RT-qPCR. Os dados foram normalizados usando o gene β -2-microglobulina. Os macrófagos não infectados suplementados com arg+ às 4h foram usados como controle nos cálculos de $\Delta\Delta C_T$. As barras representam as médias e S.E.M dos valores. A análise One-Way ANOVA está indicada nas barras. #: $p \leq 0,05$ para a comparação entre 4h e 24h.

Em macrófagos infectados com *L. amazonensis*, a suplementação com put+ levou ao aumento nos níveis de *Slc3a2* em 4h, comparado aos macrófagos não infectados (Fig.13A). A suplementação dos macrófagos infectados com arg+/spd+ também aumentou a expressão de *Slc3a2* comparados com macrófagos infectados e suplementados com arg+ em 4h (Fig.13A). Em 24h, a suplementação de macrófagos não infectados com arg+/spd+ ou spd+ reduziu *Slc3a2* comparada com a suplementação com arg+ (Fig.13A).

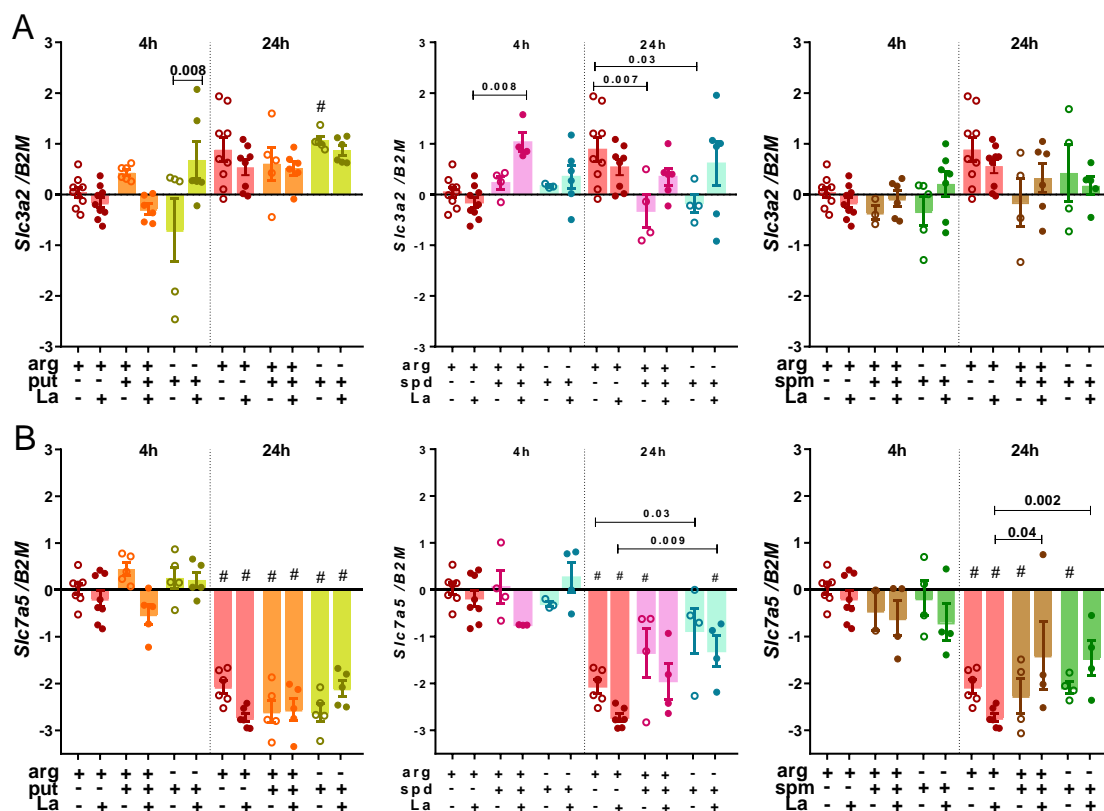


Figura 13: Expressão gênica do transportador poliaminas em macrófagos BALB/c infectados com *L. amazonensis*. Os macrófagos (5×10^6) foram suplementados com L-arginina (arg+) e/ou putrescina (put+), espermidina (spd+), espermina (spm+), simultaneamente à infecção com *L. amazonensis*, mantida na proporção MOI de 5:1 por 4h. Após este tempo, meio completo foi adicionado e a cultura mantida por mais 24h. A quantificação relativa dos genes *Slc3a2* (A) e *Slc7a5* (B) foi realizada por RT-qPCR. Os dados foram normalizados usando o gene β -2-microglobulina. Os

macrófagos não infectados suplementados com arg⁺ às 4h foram usados como controle nos cálculos de $\Delta\Delta C_T$. As barras representam as médias e S.E.M dos valores. A análise estatística usando One-Way ANOVA está indicada nas barras. #: $p \leq 0,05$ para a comparação entre 4h e 24h.

Em macrófagos infectados, observamos uma redução na expressão de *Slc7a5* em 24h em relação a 4h (Fig.13B). A suplementação dos macrófagos não infectados com spd⁺ aumentou a expressão de *Slc7a5* em 24h comparando com arg⁺ (Fig. 13B). Já em macrófagos infectados, a suplementação com spd⁺, arg⁺/spm⁺ ou spm⁺ aumentou a expressão de *Slc7a5* em 24h em relação ao arg⁺ (Fig. 13B).

Tanto a infecção como a suplementação com poliaminas não alterou a expressão do transportador de ornitina *Slc25a15* (Fig.14).

Nossos dados indicam que a suplementação com putrescina e espermidina influenciaram a expressão de *Slc3a2* em macrófagos infectados. Além disso, a suplementação com espermidina modificou a expressão dos transcritos de *Slc7a5* em macrófagos não infectados. As suplementações com espermidina ou L-arginina e espermina modularam *Slc7a5* em macrófagos infectados com *L. amazonensis*.

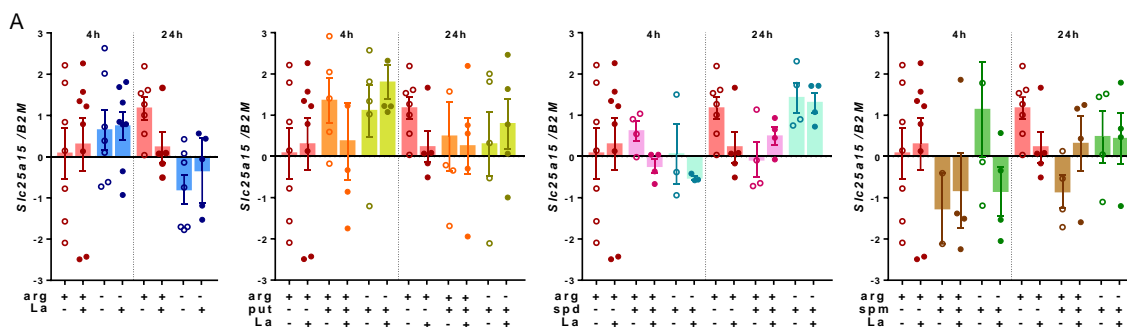


Figura 14: Expressão do gene transportador de L-citrulina e L-ornitina em macrófagos BALB/c infectados com *L. amazonensis*. Os macrófagos (5×10^6) foram suplementados com L-arginina (arg⁺) e/ou putrescina (put⁺), espermidina (spd⁺), espermina (spm⁺), simultaneamente à infecção com *L. Amazonensis* (MOI 5:1) por 4h. Após este tempo, meio completo foi adicionado e a cultura mantida por 24h. A quantificação relativa do gene *Slc25a15* (A) foi realizada por RT-qPCR. Os dados foram normalizados usando o gene β -2-microglobulina. Os macrófagos não infectados

suplementados com arg⁺ às 4h foram usados como controle nos cálculos de $\Delta\Delta cT$. As barras representam as médias e S.E.M dos valores. A análise One-Way ANOVA está indicada nas barras. #: $p \leq 0,05$ para comparação entre 4h e. 24h.

5.5 Suplementação com poliaminas na modulação da expressão de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos infectados com *L. amazonensis*

Citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β podem induzir a síntese da NOS2 e produção de NO. MCP-1 tem a função de recrutar monócitos/macrófagos para o sítio da lesão e também modula o perfil de ativação de macrófagos. Então, focamos em analisar a influência das poliaminas no perfil de expressão das citocinas *Il1b*, *Tnfa* e *Mcp1* em macrófagos infectados. Para isso, realizamos a suplementação com putrescina, espermidina e espermina, subdivididos em condições com ou sem L-arginina, em macrófagos BALB/c nas 4h iniciais da infecção com *L. amazonensis*. Os mRNAs *Il1b*, *Tnfa* e *Mcp1* foram analisados após 4 e 24h de infecção por RT-qPCR (Fig.15).

A suplementação dos macrófagos não infectados com arg⁺, arg⁺/put⁺, put⁺ ou arg⁺/spd⁺ aumentou a expressão de *Il-1b* em 24h em comparação às 4h nas mesmas condições (Fig.15A). Enquanto em 24h, a suplementação de macrófagos infectados com arg⁺, arg⁺/put⁺ ou spm⁺ reduziu a expressão dos transcritos de *Il-1b* comparando com os grupos não infectados em suas respectivas condições (Fig.15A).

Não foram observadas alterações na expressão de *Tnfa* nas condições de privação ou suplementação com L-arginina e poliaminas (Fig.15A, B).

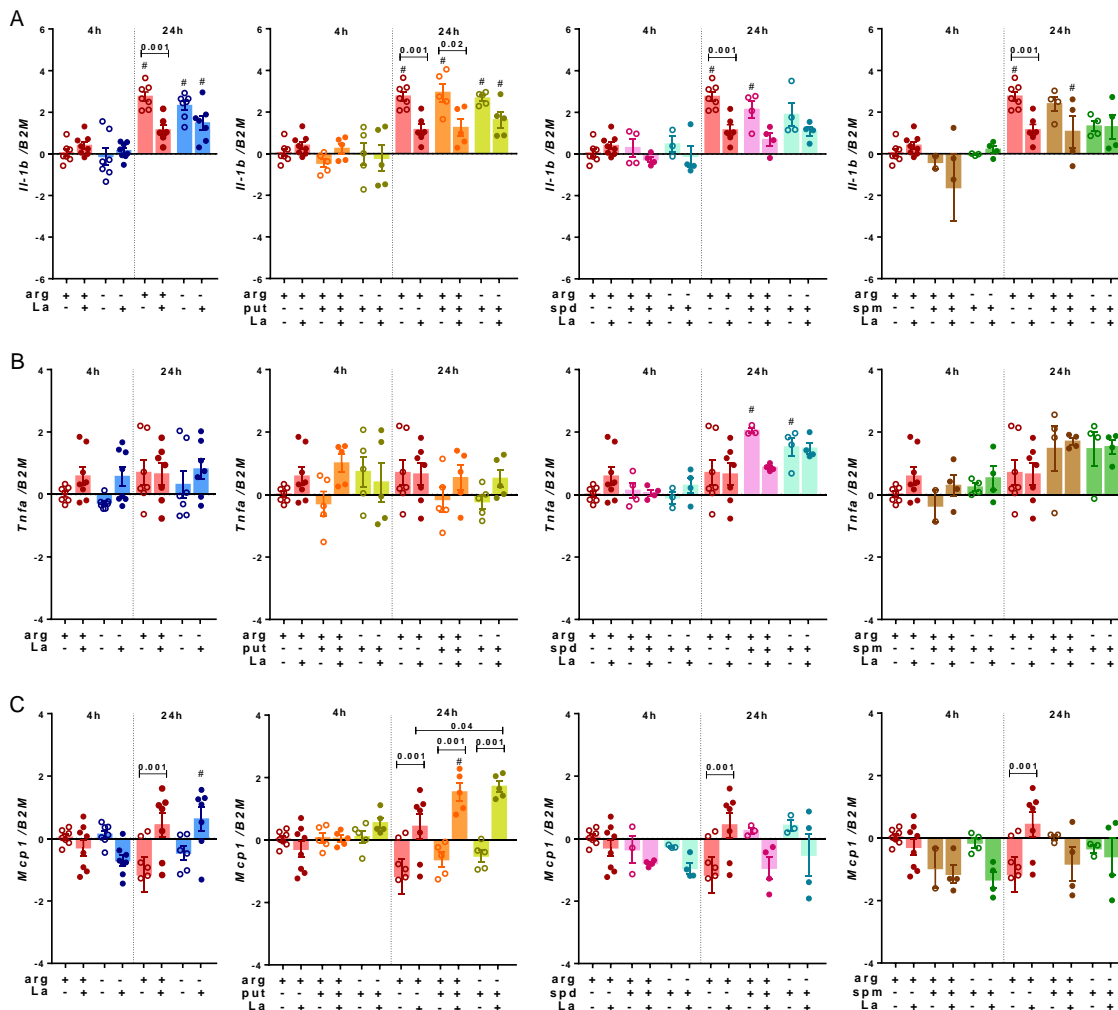


Figura 15: Expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos BALB/c não infectados e infectados. Os macrófagos (5×10^6) foram suplementados com L-arginina (arg+) e/ou putrescina (put+), espermidina (spd+), espermina (spm+), simultaneamente à infecção com *L. Amazonensis* (MOI 5:1) por 4h. Após este tempo, meio completo foi adicionado e a cultura mantida por 24h. A quantificação relativa dos genes *Il-1b* (A), *Tnfa* (B) e *Mcp1* (C) por RT-qPCR. Os dados foram normalizados usando o gene β -2-microglobulina. Os macrófagos não infectados suplementados com arg+ às 4h foram usados como controle nos cálculos de $\Delta\Delta C_T$. As barras representam as médias e S.E.M dos valores. A análise estatística usando One-Way ANOVA está indicada nas barras. #: $p \leq 0,05$ para a comparação entre 4h e 24h.

Em macrófagos infectados, a condição arg- aumentou a expressão de *Mcp1* em 24h quando comparada com 4h (Fig.15C). Nas 24h, os

macrófagos infectados suplementados com arg^+ , arg^+/put^+ e put^+ aumentaram a expressão de *Mcp1* em comparação com os grupos não infectados (Fig.15C).

Nossos dados indicam que a expressão *Mcp1* foi modulada com a suplementação com putrescina.

5.6 Suplementação com L-arginina e poliaminas e susceptibilidade a infecção de macrófagos com *L. amazonensis*

Para avaliar a influência da L-arginina e poliaminas na susceptibilidade dos macrófagos a infecção com *L. amazonensis*, realizamos a suplementação com putrescina, espermidina e espermina, subdivididos em condições com ou sem L-arginina, em macrófagos BALB/c nas 4h iniciais da infecção com *L. amazonensis*. Analisamos a porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófagos infectados.

A porcentagem de macrófagos infectados na suplementação com arg^+ permaneceu com valores semelhantes nas 4 e 24h, e aumentou nas 48h ($p \leq 0.001$) em comparação com 4h (Fig.16A). O número de amastigotas por macrófago infectado foi semelhante para arg^+ nos 3 tempos de infecção (Fig.16B).

Na privação arg^- , a infecção apresentou o mesmo padrão de arg^+ , indicando que a suplementação com L-arginina não é suficiente para influenciar a infecção de macrófagos *in vitro* com *L. amazonensis*.

A suplementação com arg^+/put^+ e put^+ reduziu a porcentagem de macrófagos infectados em 4h em comparação com arg^+ em 4 horas (Fig.16A). Houve redução da porcentagem de macrófagos infectados em 48h na condição de suplementação com arg^+/put^+ , em comparação com arg^+/put^+ 4h e arg^+ em 48h. Na suplementação put^+ , os macrófagos infectados aumentaram em 24h e 48h em relação às 4h na mesma condição

de suplementação. O número de amastigotas por macrófago infectado aumentou com a suplementação $\text{arg}^+/\text{put}^+$ em 4h em comparação com arg^+ 4h. Contudo, observamos a redução nas 24 e 48h. Os dados indicam que a suplementação com putrescina reduz a porcentagem de macrófagos infectados ao longo dos tempos analisados.

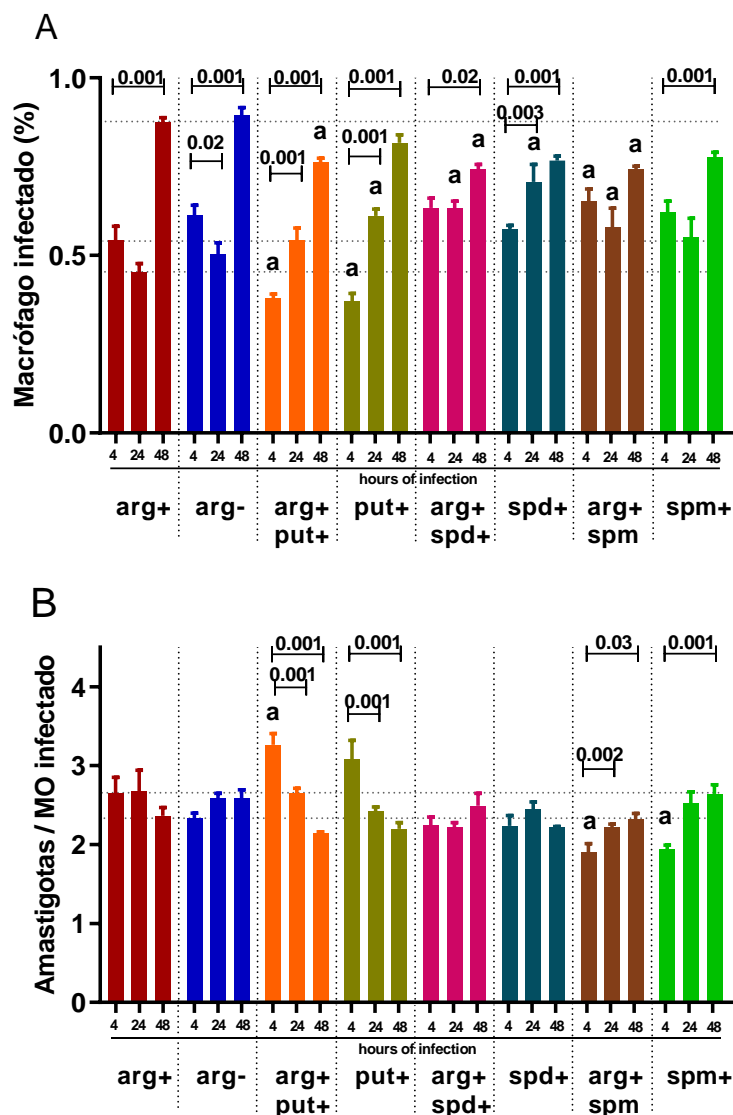


Figura 16: Análise da infecção de macrófagos BALB/c com *L. amazonensis* em condição de suplementação com poliaminas. Os macrófagos ($2,5 \times 10^5$) foram privados com L-arginina (arg^-), ou suplementados com L-arginina (arg^+) e/ou putrescina (put^+), espermidina (spd^+), espermina (spm^+), simultaneamente à infecção

com *L. Amazonensis* (MOI 5:1) por 4h. Após este tempo, meio completo foi adicionado e a cultura mantida por 24h. As lâminas foram fixadas com 4, 24 e 48h de infecção e as células foram coloridas com Panóptico para determinar a frequência de macrófagos infectados (A), o número de amastigotas por macrófago (B). Cada barra representa a média \pm S.E.M dos valores obtidos em 2 experimentos independentes (n = 500 macrófagos). A análise One-Way ANOVA está indicada nas barras. a: $p \leq 0,05$ para a comparação com arg+.

A suplementação com arg+/spd+ ou spd+ aumentou a porcentagem de macrófagos infectados em 24h em comparação com arg+ em 24h (Fig.16). No entanto, na suplementação com arg+/spd+, a porcentagem de macrófagos infectados foi reduzida em 48h em comparação com arg + 48h (Fig.16B).

Quando suplementamos com arg+/spm+, a porcentagem de macrófagos infectados aumentou em 4 e 24h e reduziu em 48h em comparação com arg+ nos mesmos tempos. Em arg+/spm+ e spm+, o número de amastigotas por macrófago infectado reduziu em 4h (Fig. 16B).

Esses dados sugerem que as poliaminas interferem na fagocitose dos parasitas. A suplementação com putrescina reduz o número de macrófagos infectados, enquanto a suplementação com espermidina ou espermina aumentou esse número.

5.7 Expressão dos microRNAs miR-294, miR-302d e miR-721

A fim de entender o efeito das poliaminas na expressão de microRNAs em macrófagos infectados com *L. amazonensis*, os miR-294, miR-302d e miR-721 e foram analisados em condições de privação de L-arginina ou suplementação com L-arginina e putrescina, concomitante à infecção com *L. amazonensis* durante 4h (Fig.17).

Em macrófagos não infectados, a privação arg- ou a suplementação com arg+ não modificou a expressão dos transcritos de miR-

294, miR-302d e miR-721 (Fig. 17). A infecção promoveu o aumento na expressão de miR-294, em 4 e 24h. Na suplementação dos macrófagos infectados com arg + (MO-La/arg+), os níveis do miR-294 foram menores em 24h comparando com as 4h ($p \leq 0.009$, Fig.17A).

A suplementação de macrófagos não infectados com put+ aumentou a expressão do miR-294 comparando com arg+ em 4h e com arg+/put+ em 4h (Fig.17A).

Não houve modificação na expressão do miR-302d nos macrófagos durante a privação de L-arginina ou suplementação com L-arginina e putrescina (Fig.17B).

Em macrófagos infectados observamos aumento de miR-721 em 4h (Fig.17C). A suplementação dos macrófagos não infectados com arg+/put+ reduziu a expressão do miR-721 em 24h, comparado com arg+ em 24h. Em 24h, a suplementação com arg+ dos macrófagos infectados apresentou uma tendência de redução de miR-721, comparado com 4h.

Nossos dados sugerem que a infecção modula a expressão dos miR-294 e miR-721 nos macrófagos. Contudo a suplementação com L-arginina e putrescina não alteram a expressão dos miR-294 e miR-721 em macrófagos infectados.

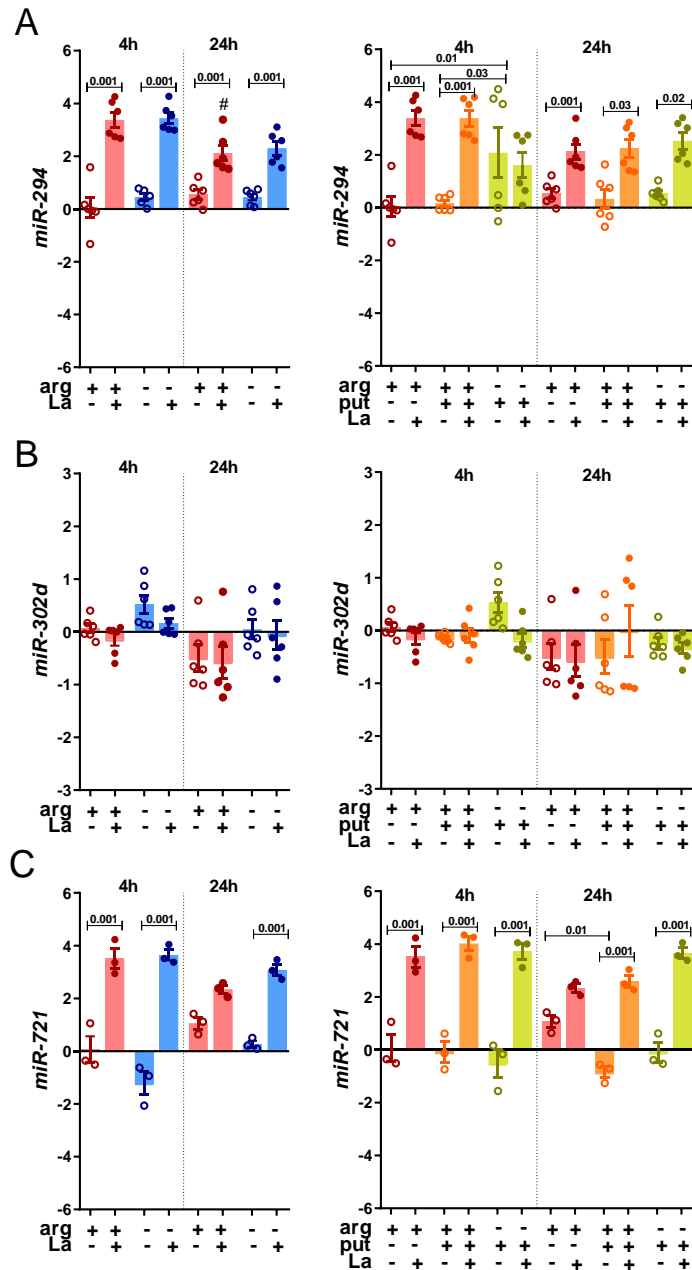


Figura 17: Expressão dos microRNAs em macrófagos BALB/c não infectados e infectados. Os macrófagos (5×10^6) foram suplementados com L-arginina (arg+) e/ou putrescina (put+), simultaneamente à infecção com *L. amazonensis* (MOI 5:1) por 4h. Após este tempo, meio completo foi adicionado e a cultura mantida por 24h. A quantificação relativa dos genes miR-294 (A), miR-302d (B) e miR-721 (C) foi realizada por RT-qPCR. Os dados foram normalizados usando o gene SNORD95. Os macrófagos não infectados suplementados com arg+ às 4h foram usados como controle nos cálculos de $\Delta\Delta Ct$. As barras representam as médias e S.E.M dos valores. A análise One-Way ANOVA está indicada nas barras. #: $p \leq 0,05$ para comparar 4h e 24h.

6. Discussão

Os macrófagos fazem parte de uma complexa rede de reconhecimento de patógenos e induzem a ativação inflamatória apropriada para a resposta das células T e B e a geração de memória (Bogdan, 2008; Rossi and Fasel, 2018; Ryan and O'Neill, 2020). A atividade microbicida resultante do metabolismo de L-arginina para a produção de NO, como para a biossíntese de poliaminas, reflete o perfil de ativação dos macrófagos. As poliaminas atuam na regulação da síntese de aminoácidos e proteínas, dano oxidativo ao DNA, modificações de histonas, da cromatina e ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) em macrófagos (Pegg, 2009; Pasini et al., 2014; Hardbower et al., 2017). Nesse contexto, L-arginina e poliaminas participam do perfil de polarização M1-pró-inflamatório e M2-anti-inflamatório. Com isso, é importante estudar como a metabolização de L-arginina e poliaminas em macrófagos regula mecanismos microbicidas do hospedeiro frente a infecção com o parasita *Leishmania*.

A disponibilidade da L-arginina está implicada com a resistência à infecção por *Leishmania*. O consumo do aminoácido L-arginina pela arginase presente no macrófago (ARG1), bem como pela arginase presente no parasita (La-arg), que competem com a NOS2 do hospedeiro, reduz a produção de NO e resulta na sobrevivência do parasita (Ji et al., 2002; Naderer and McConville, 2008; Velasquez et al., 2016; Maia et al., 2017; Muxel et al., 2018c). Neste trabalho, analisamos a expressão de genes relacionados ao metabolismo de L-arginina/poliaminas em macrófagos BALB/c infectados e sob privação ou suplementação com L-arginina, putrescina, espermidina e espermina durante a infecção com *L. amazonensis*. Neste trabalho mostramos que a privação ou suplementação com L-arginina em macrófagos durante a infecção com *L. amazonensis* não modulou a expressão de

Arg1, *Arg2*, *Odc1*, *SpdS* e *SpmS*. Apesar de a privação de L-arginina levar ao aumento na expressão de *Nos2* em macrófagos após 4 horas de infecção, não observamos aumento nos níveis de produção de NO. Além disso, a privação ou suplementação com L-arginina não promoveu alteração na infecção dos macrófagos. Na resposta imunológica contra injúrias provocadas por patógenos, como bactérias e parasitas, os macrófagos ativados aumentam a expressão do gene *Nos2* que pode levar ao aumento da produção de NO (Cassado, 2017; Muxel et al., 2018c). A metabolização de L-arginina para produção de NO nos macrófagos é elemento importante para a elaboração da resposta inflamatória frente a infecção com *L. amazonensis* (Wang et al., 2014; Muxel et al., 2018b, 2018c; Rossi and Fasel, 2018; Krayem and Lipoldová, 2020).

A expressão dos transportadores de L-arginina e sua capacidade de transportar L-arginina mesmo em macrófagos suplementados com L-arginina é um ponto que pode contribuir com a resposta imune. Sabemos que tanto a ativação dos macrófagos como a disponibilidade de L-arginina aumentam a expressão de CAT1 e CAT2 e transporte de L-arginina (Yeramian et al., 2006b, 2006a). Contudo, a privação de L-arginina em macrófagos durante a infecção não modificou a expressão dos transportadores de L-arginina *Cat1* e *Cat2*, e poliaminas, *Slc3a2* e *Slc7a5*. Algo similar foi observado em macrófagos de camundongos BALB/c nocautes de *Cat2*, que resultou na redução no transporte de L-arginina em resposta a estímulos com IFN- γ plus LPS ou IL-4 plus IL-10, mas não modificou os níveis de NOS2 ou ARG1 (Yeramian et al., 2006b).

Nosso grupo mostrou em análise de metaboloma, o aumento nos níveis de L-arginina, ornitina, putrescina e glutamina em macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 4h de infecção com *L. amazonensis* (Muxel et al., 2019; Mamani-Huanca et al., 2021). Essas informações sugerem que a infecção leva ao aumento de L-arginina disponível a ser

metabolizada pelo hospedeiro e parasita, mas que a disponibilidade do aminoácido ainda não exerce efeito na regulação transcricional dos genes da via de sua metabolização na célula hospedeira. A infecção de macrófagos de camundongos BALB/c com *L. amazonensis* nocaute da enzima arginase leva ao acúmulo de L-arginina durante a infecção, mas há redução nos níveis de prolina, ornitina e putrescina em relação a infecção com *L. amazonensis* selvagem (Muxel et al., 2019; Mamani-Huanca et al., 2021). Estes dados reforçam que a enzima arginase do parasita consome L-arginina da célula hospedeira. Já foi descrito que formas amastigotas consomem nutrientes do interior do fagolisossomo e afetam a disponibilidade de L-arginina para ARG1 e NOS2 (Muxel et al., 2017). Estas informações sugerem que o pool interno de L-arginina é suficiente para suprir a produção de poliaminas na fase inicial da infecção.

A disponibilidade de poliaminas pode interferir nos níveis dos transportadores de L-arginina (CAT1/2) e na atividade das enzimas do metabolismo de L-arginina ARG1 e ARG2, e subsequentemente nas enzimas ODC, SPDS e SPMS (Pérez-Cano et al., 2003). A disponibilidade de poliaminas também está correlacionada com a síntese de transportadores do tipo antiportador, como o complexo heterodimérico SLC3A2 /SLC7A5, que podem realizar o transporte de poliaminas para dentro e para fora da célula (Nicklin et al., 2009; Abdulhussein and Wallace, 2014; Kurihara et al., 2015; Scalise et al., 2018).

Com essas informações, pensamos que a suplementação com poliaminas trouxe à luz percepções a respeito da expressão de genes relacionados ao metabolismo de macrófagos sob a disponibilidade de L-arginina e das poliaminas putrescina, espermidina e espermina durante a infecção. Após a suplementação com L-arginina e putrescina ou somente com putrescina, os níveis de *Cat1*, *Cat2*, *Slc3a2*, *Slc7a5*, *Arg2*, *SpdS*, *SpmS* e *Nos2* foram alterados em relação a privação ou suplementação, impactando na

infecção com *L. amazonensis*. Os níveis de *Cat1* e *Cat2* reduziram com a suplementação arg⁺/put⁺ e put⁺ em macrófagos infectados, sugerindo que os níveis de putrescina modulam a disponibilidade dos transportadores de L-arginina. A suplementação dos macrófagos não infectados com put⁺ e arg⁺/spd⁺ aumentou os transcritos de *Slc3a2* em 4h, assim como a condição spd⁺ aumentou o *Slc7a5*. Durante a infecção, espermidina ou L-arginina *plus* espermina modularam *Slc7a5*, sugerindo que as poliaminas podem regular a transcrição de *Slc3a2/Slc7a5* e afetar o transporte de poliaminas.

Ressaltamos que, em dados prévios do nosso grupo, em macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* os níveis aumentados de citrulina não correlacionam com a produção de NO, pois observamos produção aumentada de NO somente em macrófagos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* (Muxel et al., 2019; Mamani-Huanca et al., 2021; Acuña et al., 2022). Além disso, a falta da arginase do parasita leva a redução nos níveis de CAT1, CAT2 e NOS2-NO em macrófagos de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* (Muxel et al., 2017). O aumento dos níveis de glutamina em macrófagos durante a infecção com *L. amazonensis* (Muxel et al., 2019; Mamani-Huanca et al., 2021) também nos levou a analisar a expressão do gene do transportador de L-glutamina *Slc1a5*. Nossos achados revelaram níveis semelhantes na expressão de *Slc1a5* entre as condições analisadas.

Em nosso trabalho, mostramos que a suplementação com putrescina aumentou os níveis de *Nos2*, sem refletir no aumento da produção de NO. Contudo, a frequência de células produtoras de NO aumentou na suplementação com L-arginina *plus* espermina em macrófagos infectados com *L. amazonensis* e não infectados. De modo interessante, outro grupo mostrou que a espermidina reduz os níveis de *Nos2* em macrófagos estimulados com LPS (Jeong et al., 2018). Também já foi mostrado que em

macrófagos de camundongos BALB/c nocautes para NOS2 não há diferença na expressão de *Cat1* e *Cat2*, bem como no transporte de L-arginina em resposta ao estímulo com IFN- γ *plus* LPS ou IL-4 *plus* IL-10 (Yeramian et al., 2006b). Nossos dados sugerem que as poliaminas podem influenciar a produção de NO durante a infecção com *L. amazonensis*.

Nos dados de macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. amazonensis*, além dos níveis de citrulina e L-glutamina, há o aumento nos níveis de ornitina, prolina, e putrescina (Muxel et al., 2019; Mamani-Huanca et al., 2021). No ciclo da ureia, a ornitina pode ser posteriormente metabolizada para produzir prolina e L-glutamina e poliaminas envolvidas na polarização de macrófagos M2, limitando a ativação inflamatória e regulando a proliferação celular (Morris, 2002; O'Neill et al., 2016; Sivashanmugam et al., 2017). De modo inesperado, a expressão de *Arg1* não foi alterada com a infecção nem na suplementação com poliaminas. Por outro lado, a transcrição de *Arg2* foi aumentada na condição de suplementação com putrescina ou L-arginina *plus* putrescina, em macrófagos infectados após 4h. Apesar da via biossintética das poliaminas não ter sido descrita na mitocôndria, podemos especular que o aumento nos níveis de *Arg2* foram induzidos pela disponibilidade de putrescina e podem guiar o uso de L-arginina pela ARG2 aumentando os níveis de ornitina, que pode ser convertida em citrulina ou poliaminas no citoplasma.

Os níveis aumentados de ornitina, prolina, e L-glutamina em macrófagos de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* pode suprir a produção de glutamato e interferir no estado metabólico durante a ativação dos macrófagos (Muxel et al., 2019; Mamani-Huanca et al., 2021). Em macrófagos M2, a ativação da fosforilação oxidativa (OXPHOS) está associada com a produção de poliaminas, proliferação celular e fase de resolução da inflamação (Vander Heiden et al., 2010; O'Neill et al., 2016; Tran et al., 2016). Por outro lado, o metabolismo

glicolítico para produção de ATP pode ser regulado pela disponibilidade de O₂, glicose, glutamina, L-arginina e poliaminas, característico do metabolismo aeróbico em macrófagos pró-inflamatórios M1. As poliaminas contribuem para a produção de glutamato e subsequente α -cetoglutarato (Ryan and O'Neill, 2020). Esse último composto supre o ciclo do TCA, em um mecanismo conhecido como Efeito Warburg, que afeta a produção de ATP e estado redox da células (Vander Heiden et al., 2010; O'Neill et al., 2016; Tran et al., 2016). Consideramos que o estado metabólico dos macrófagos durante a infecção integra a disponibilidade de poliaminas e o aporte energético da célula. Assim como está vinculado com a produção de NO no citoplasma e disponibilidade de O₂ para produção deste radical para produção de ROS ou ativação da fosforilação oxidativa para gerar ATP.

A espermidina e a espermina desempenham um papel importante na proteção das células contra agentes oxidantes. Espermidina é conhecida por reduzir a expressão de ROS em macrófagos estimulados com LPS (Jeong et al., 2018). As poliaminas, especialmente a espermina, atuam dentro da mitocôndria, mediando atividades como o transporte de Ca²⁺ ou desempenhando funções na respiração mitocondrial, via estimulação da atividade da succinato desidrogenase, aumentando a produção de espécies reativas mitocondriais de oxigênio (mtROS) (Ming et al., 2012; Koo et al., 2019; Dowling et al., 2021). A glutathiona é composta por glicina, cisteína e ácido glutâmico e atua como um mitigador de ROS em reações de tiol-dissulfeto para controlar as funções das proteínas (Diotallevi et al., 2017). A *Leishmania* pode usar glutathiona e espermidina para produzir glutathionilespermidina e, subsequentemente, tripanotiona como proteção contra ROS (Oza et al., 2005; Manta et al., 2013). Em nosso trabalho, observamos que a suplementação com L-arginina plus espermina em macrófagos não infectados levou ao aumento na produção de NO. Contudo, a infecção com

L. amazonensis foi capaz de subverter esse efeito bloqueando a capacidade dos macrófagos em responder às variações nos níveis de poliaminas, desviando a atividade dos macrófagos aumentando sua sobrevivência nos macrófagos. A espermina disponível também pode induzir a síntese de superóxido dismutase e prevenir o dano oxidativo (Ming et al., 2012; Pegg, 2014). Por outro lado, a desregulação da atividade antioxidante gera ROS de diferentes fontes e afeta a integridade mitocondrial (Gavin et al., 2004). A espermina também atua regulando negativamente a ativação de macrófagos, que pode estar ligada ao catabolismo de poliaminas mediado pela acetilação via modulação de N1-espermidina/espermina acetiltransferase (SSAT) (Casero e Pegg, 1993; Gavin et al., 2004).

Em macrófagos não infectados, a suplementação com putrescina reduziu a expressão de *SpdS* e *SpmS* em 4h em comparação com a infecção e com *arg+*. A infecção restaurou a expressão tanto de *SpdS* como de *SpmS* observada em macrófagos não infectados. Estes dados sugerem que a *L. amazonensis* interfere na capacidade do macrófago de responder às variações nos níveis de poliaminas para garantir sua sobrevivência no hospedeiro. Por outro lado, o acúmulo de poliaminas pode orientar o *feedback* na regulação cruzada de genes do metabolismo do macrófago durante a infecção (Carter et al., 2022). Isso pode resultar na geração de toxinas e ROS, previamente implicados na disfunção lisossomal e estresse oxidativo (Li et al., 2017). Em macrófagos nocaute de *SpmS* ocorre o acúmulo de espermidina e aumento da produção de aldeído e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Li et al., 2017). A espermina também pode inibir a tradução de NOS2 em macrófagos e reduzir a produção de NO (Bussière et al., 2005; Flamigni et al., 2007). O estímulo com IL-4 induz a expressão de ODC, que leva ao aumento nos níveis de putrescina em macrófagos murinos, enquanto a inibição da ODC com o análogo de ornitina DFMO (α -difluoromethylornithine) reduz o conteúdo de putrescina, sem afetar os níveis de

espermidina e espermina (Bussi re et al., 2005; Flamigni et al., 2007). Neste contexto,   interessante citar que a espermidina também tem a fun o de regular a tradu o através do mecanismo de hipusina o, em que a espermidina hipusina r sduos de lisina no fator de inicia o de tradu o, *eukariotic initiation factor* (eIF5A) (Boitz et al., 2017; Muxel et al., 2018c). Nos macrófagos o estímulo com IL-4 aumenta os níveis de putrescina e de hipusina o do fator eIF5A (Boitz et al., 2017; Muxel et al., 2018c).

Em rela o aos genes correlacionados a ativa o pr -inflamatória, a suplementa o da infec o com putrescina aumentou a expressão de *Nos2* e de *Mcp1* em rela o a arg⁺, independentemente da suplementa o de L-arginina. Foi observado que em culturas de células da glia, a suplementa o de putrescina e espermina   capaz de aumentar os níveis de MCP1 e TNF-  (Puntambekar et al. 2011). A espermidina reduz os níveis de TNF-  e IL-1  secretados por macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (Jeong et al., 2018) e MCP-1 em macrófagos THP-1 estimulados com IFN-  (Mor n et al., 2013).

Como vimos na figura 16, a suplementa o com putrescina, espermidina e espermina afetou a infec o dos macrófagos. A suplementa o com putrescina reduziu a porcentagem de macrófagos infectados nas primeiras horas, enquanto espermidina e espermina aumentaram essa porcentagem. Observamos um número maior de amastigotas por macrófago infectado na suplementa o com putrescina, enquanto na suplementa o com espermina esse número foi menor em rela o a condi o de suplementa o apenas com L-arginina. Isso reforça a ideia de que as poliaminas interferem na ativa o da atividade microbicida dos macrófagos. Dados anteriores de nosso grupo evidenciaram que a suplementa o com putrescina aumenta a infec o da *L. amazonensis* em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c tratados com melatonina (Laranjeira-Silva et al.,

2015). Nesse mesmo trabalho foi evidenciada a redução nos níveis de CAT2 em macrófagos tratados com melatonina, sem observar alterações na expressão de *Arg1* ou *Nos2*. Isso nos leva a correlacionar a disponibilidade de L-arginina e poliaminas com o estado metabólico dos macrófagos e sua resistência à infecção.

A expressão dos miRNAs mostrou que a infecção com *L. amazonensis* induz a expressão dos miR-294 e miR-721 nos macrófagos, algo visto em outros trabalhos do nosso grupo (Muxel et al., 2017; Fernandes et al., 2019; Acuña et al., 2022). A inibição desses miRNAs em macrófagos infectados é capaz de aumentar a NOS2 e o NO produzidos, reduzindo a infecção (Muxel et al., 2017). Em nosso trabalho, a suplementação com putrescina em macrófagos não infectados aumentou a expressão de miR-294 em 4h em comparação com a suplementação com L-arginina, mas também reduziu a expressão do miR-721 em 24h (Fig.17A, C). Mostramos que a suplementação com L-arginina e putrescina não foi capaz de reverter o impacto da infecção sobre a expressão dos miR-294 e miR-721. Em outra perspectiva, a disponibilidade das poliaminas pode ser influenciada por miRNAs como o miR-7, que regula a o mRNA de *Slc3a2*, ou o miR-124, que inibe a transcrição da espermina oxidase, gene relacionado ao catabolismo de espermina (Nguyen and Merlin, 2012; Stewart et al., 2018).

Nossos resultados sugerem que as poliaminas podem atuar como protagonistas na regulação da resposta inflamatória à infecção por *Leishmania*, não só pela correlação de disponibilidade de L-arginina e produção de NO, mas também por integrar a via da glutatona do macrófago e do equilíbrio redox, assim como a regulação traducional mediada pela espermidina, pelo processo de hipusinação (Boitz et al., 2017; Muxel et al., 2018c; Puleston et al., 2019). A suplementação com putrescina, espermidina e espermina impactou a infecção com *L. amazonensis*, corroborando com ideia de que as poliaminas favorecem a ativação dos macrófagos e a

influenciam sua capacidade microbicida em detrimento da sobrevivência do parasita.

7. Conclusões

7.1. A privação de L-arginina aumentou a expressão de *Nos2* a nível transcrricional, sem levar a produção de NO em macrófagos infectados. A suplementação com L-arginina *per se* não alterou a expressão dos genes envolvidos na produção de poliaminas.

7.2. A suplementação com L-arginina e poliaminas modulam a expressão de *Arg2*, *SpdS* e *SpmS* em macrófagos não infectados e infectados com *L. amazonensis*.

7.3. A suplementação com putrescina durante a infecção aumentou a expressão de *Nos2* sem aumentar a produção de NO. A suplementação com L-arginina e espermina favoreceram o aumento na frequência de células produtoras de NO em macrófagos infectados.

7.4. A suplementação com putrescina e espermidina aumentou a expressão de *Slc3a2* em macrófagos infectados. As suplementações com espermidina ou L-arginina e espermina aumentaram *Slc7a5* em macrófagos infectados com *L. amazonensis*.

7.5. A expressão de *Mcp1* aumentou em macrófagos infectados e suplementados com putrescina, enquanto *Il-1b* reduziu com a infecção.

7.6. A suplementação com putrescina reduziu a porcentagem de macrófagos infectados ao longo dos tempos analisados comparados a suplementação com L-arginina.

7.7. A infecção aumentou a expressão dos miR-294 e miR-721, de maneira independente da suplementação com L-arginina e poliaminas.

Os dados aqui apresentados sugerem que a suplementação com poliaminas concomitantemente a infecção de macrófagos com *L. amazonensis* regulou a expressão de genes das vias de seu transporte e biossíntese tanto de poliaminas como de óxido nítrico e com isso favoreceu a resistência a infecção.

8. Referências Bibliográficas

- Abdulhussein, A. A., and Wallace, H. M. (2014). Polyamines and membrane transporters. *Amino Acids* 46, 655–660. doi:10.1007/s00726-013-1553-6.
- Acuña, S. M., Floeter-Winter, L. M., and Muxel, S. M. (2020). MicroRNAs: Biological Regulators in Pathogen-Host Interactions. *Cells* 9. doi:10.3390/cells9010113.
- Acuña, S. M., Zanatta, J. M., de Almeida Bento, C., Floeter-Winter, L. M., and Muxel, S. M. (2022). miR-294 and miR-410 Negatively Regulate Tnfa, Arginine Transporter Cat1/2, and Nos2 mRNAs in Murine Macrophages Infected with *Leishmania amazonensis*. *Non-Coding RNA* 8, 17. doi:10.3390/ncrna8010017.
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., et al. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1–40. doi:10.1371/journal.pntd.0004349.
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., et al. (2012). Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One* 7, e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671.
- Aoki, J. I., Muxel, S. M., Zampieri, R. A., Acuña, S. M., Fernandes, J. C. R., Vanderlinde, R. H., et al. (2017a). L-arginine availability and arginase activity: Characterization of amino acid permease 3 in *Leishmania amazonensis*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, 1–19. doi:10.1371/journal.pntd.0006025.
- Aoki, J. I., Muxel, S. M., Zampieri, R. A., Laranjeira-Silva, M. F., Müller, K. E., Nerland, A. H., et al. (2017b). RNA-seq transcriptional profiling of *Leishmania amazonensis* reveals an

- arginase-dependent gene expression regulation. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, 1–22. doi:10.1371/journal.pntd.0006026.
- Ashford, R. W. (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Parasites and Vectors* 3, 1269–1281. Available at: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-1261-z>.
- Aulak, K. S., Mishra, R., Zhou, L., Hyatt, S. L., De Jonge, W., Lamers, W., et al. (1999). Post-transcriptional regulation of the arginine transporter Cat-1 by amino acid availability. *J. Biol. Chem.* 274, 30424–30432. doi:10.1074/jbc.274.43.30424.
- Baltimore, D., Boldin, M. P., O’Connell, R. M., Rao, D. S., and Taganov, K. D. (2008). MicroRNAs: New regulators of immune cell development and function. *Nat. Immunol.* 9, 839–845. doi:10.1038/ni.f.209.
- Barral, A., and Costa, J. (2011). *Leishmanias e a leishmaniose tegumentar nas américas*. Salvador, BA.
- Bhuyan, Z. A., Arimochi, H., Nishida, J., Kataoka, K., Kurihara, T., Ishifune, C., et al. (2014). CD98hc regulates the development of experimental colitis by controlling effector and regulatory CD4⁺ T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 444, 628–633. doi:10.1016/j.bbrc.2014.01.144.
- Bianchi, M., Ulrich, P., Bloom, O., Meistrell, M., Zimmerman, G. A., Schmidtmayerova, H., et al. (1995). An inhibitor of macrophage arginine transport and nitric oxide production (CNI-1493) prevents acute inflammation and endotoxin lethality. *Mol. Med.* 1, 254–266. doi:10.1007/bf03401550.
- Bogdan, C. (2008). Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: Leishmaniasis as an example. *Cell. Microbiol.* 10, 1221–1234. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01146.x.
- Boitz, J. M., Gilroy, C. A., Olenyik, T. D., Paradis, D., Perdeh, J.,

- Dearman, K., et al. (2017). Arginase is essential for survival of *Leishmania donovani* promastigotes but not intracellular amastigotes. *Infect. Immun.* 85. doi:10.1128/IAI.00554-16.
- Burza, S., Croft, S. L., and Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *Lancet* 392, 951–970. doi:10.1016/S0140-6736(18)31204-2.
- Bussière, F. I., Chaturvedi, R., Cheng, Y., Gobert, A. P., Asim, M., Blumberg, D. R., et al. (2005). Spermine causes loss of innate immune response to *Helicobacter pylori* by inhibition of inducible nitric-oxide synthase translation. *J. Biol. Chem.* 280, 2409–2412. doi:10.1074/jbc.C400498200.
- Carter, N. S., Kawasaki, Y., Nahata, S. S., Elikae, S., Rajab, S., Salam, L., et al. (2022). Polyamine Metabolism in *Leishmania* Parasites: A Promising Therapeutic Target. *Med. Sci.* 10, 24. doi:10.3390/medsci10020024.
- Casero, R. A., and Pegg, A. E. (1993). Spermidine/spermine N 1 - acetyltransferase — the turning point in polyamine metabolism . *FASEB J.* 7, 653–661. doi:10.1096/fasebj.7.8.8500690.
- Cassado, A. dos A. (2017). *F4/80 as a Major Macrophage Marker: The Case of the Peritoneum and Spleen.* , ed. M. Kloc Cham: Springer International Publishing doi:10.1007/978-3-319-54090-0.
- Castilho-Martins, E. A., Canuto, G. A. B., Muxel, S. M., DaSilva, M. F. L., Floeter-Winter, L. M., del Aguila, C., et al. (2015). Capillary electrophoresis reveals polyamine metabolism modulation in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* wild-type and arginase-knockout mutants under arginine starvation. *Electrophoresis* 36, 2314–2323. doi:10.1002/elps.201500114.
- Castilho-martins, E. A., Fernanda, M., Santos, M. G., Sandra, M., and Floeter-winter, L. M. (2011). Axenic *Leishmania amazonensis* Promastigotes Sense both the External and Internal Arginine Pool

- Distinctly Regulating the Two Transporter-Coding Genes. 6.
doi:10.1371/journal.pone.0027818.
- Chia, T., Zolp, A., and Miska, J. (2022). Polyamine Immunometabolism : Central Regulators of. 1–17.
- Closs, E. I., Simon, A., Vékony, N., and Rotmann, A. (2004). Plasma membrane transporters for arginine. *J. Nutr.* 134.
doi:10.1093/jn/134.10.2752s.
- Darlyuk, I., Goldman, A., Roberts, S. C., Ullman, B., Rentsch, D., and Zilberstein, D. (2009). Arginine Homeostasis and Transport in the Human Pathogen *Leishmania donovani* *. 284, 19800–19807.
doi:10.1074/jbc.M901066200.
- de La Ballina, L. R., de Garay, T., Féral, C. C., and Palacín, M. (2016). “SLC3A2,” in *Encyclopedia of Signaling Molecules* (New York, NY: Springer New York), 1–13. doi:10.1007/978-1-4614-6438-9_101895-1.
- Diotallevi, M., Checconi, P., Palamara, A. T., Celestino, I., Coppo, L., Holmgren, A., et al. (2017). Glutathione Fine-Tunes the innate immune response toward antiviral pathways in a macrophage cell line independently of its antioxidant properties. *Front. Immunol.* 8.
doi:10.3389/fimmu.2017.01239.
- DNDi (2021). Visceral leishmaniasis. Available at:
<https://dndi.org/diseases/visceral-leishmaniasis/facts/> [Accessed October 28, 2021].
- Dostálová, A., and Volf, P. (2012). *Leishmania* development in sand flies: Parasite-vector interactions overview. *Parasites and Vectors* 5, 1–12. doi:10.1186/1756-3305-5-276.
- Dowling, J. K., Afzal, R., Gearing, L. J., Cervantes-Silva, M. P., Annett, S., Davis, G. M., et al. (2021). Mitochondrial arginase-2 is essential for IL-10 metabolic reprogramming of inflammatory macrophages.

- Nat. Commun.* 12, 1–14. doi:10.1038/s41467-021-21617-2.
- Dunand-Sauthier, I., Irla, M., Carnesecchi, S., Seguí-Estévez, Q., Vejnár, C. E., Zdobnov, E. M., et al. (2014). Repression of Arginase-2 Expression in Dendritic Cells by MicroRNA-155 Is Critical for Promoting T Cell Proliferation. *J. Immunol.* 193, 1690–1700. doi:10.4049/jimmunol.1301913.
- Fernandes, J. C. R., Aoki, J. I., Maia Acuña, S., Zampieri, R. A., Markus, R. P., Floeter-Winter, L. M., et al. (2019). Melatonin and *Leishmania amazonensis* Infection Altered miR-294, miR-30e, and miR-302d Impacting on Tnf, Mcp-1, and Nos2 Expression. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 1–15. doi:10.3389/fcimb.2019.00060.
- Flamigni, F., Stanic', I., Facchini, A., Cetrullo, S., Tantini, B., Borzì, R. M., et al. (2007). Polyamine biosynthesis as a target to inhibit apoptosis of non-tumoral cells. *Amino Acids* 33, 197–202. doi:10.1007/s00726-007-0514-3.
- Flandin, J. F., Chano, F., and Descoteaux, A. (2006). RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon- γ -primed macrophages. *Eur. J. Immunol.* 36, 411–420. doi:10.1002/eji.200535079.
- Gavin, I. M., Glesne, D., Zhao, Y., Kubera, C., and Huberman, E. (2004). Spermine acts as a negative regulator of macrophage differentiation in human myeloid leukemia cells. *Cancer Res.* 64, 7432–7438. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0051.
- Geraci, N. S., Tan, J. C., and McDowell, M. A. (2015). Characterization of microRNA expression profiles in *Leishmania* -infected human phagocytes. *Parasite Immunol.* 37, 43–51. doi:10.1111/pim.12156.
- Goldman-pinkovich, A., Balno, C., Strasser, R., Zeituni-molad, M., Myler, J., and Zilberstein, D. (2016). An Arginine Deprivation Response Pathway Is Induced in *Leishmania* during Macrophage

- Invasion. 1–18. doi:10.1371/journal.ppat.1005494.
- Goldman-Pinkovich, A., Kannan, S., Nitzan-Koren, R., Puri, M., Pawar, H., Bar-Avraham, Y., et al. (2020). Sensing Host Arginine Is Essential for Leishmania Parasites' Intracellular Development. *MBio* 11, 1–13. doi:10.1128/mBio.02023-20.
- Gordon, S., and Plüddemann, A. (2017). Tissue macrophages: Heterogeneity and functions. *BMC Biol.* 15, 1–18. doi:10.1186/s12915-017-0392-4.
- Gregory, D. J., Sladek, R., Olivier, M., and Matlashewski, G. (2008). Comparison of the effects of *Leishmania major* or *Leishmania donovani* infection on macrophage gene expression. *Infect. Immun.* 76, 1186–1192. doi:10.1128/IAI.01320-07.
- Hardbower, D. M., Asim, M., Luis, P. B., Singh, K., Barry, D. P., Yang, C., et al. (2017). Ornithine decarboxylase regulates M1 macrophage activation and mucosal inflammation via histone modifications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E751–E760. doi:10.1073/pnas.1614958114.
- Hardbower, D. M., Asim, M., Murray-Stewart, T., Casero, R. A., Verriere, T., Lewis, N. D., et al. (2016). Arginase 2 deletion leads to enhanced M1 macrophage activation and upregulated polyamine metabolism in response to *Helicobacter pylori* infection. *Amino Acids* 48, 2375–2388. doi:10.1007/s00726-016-2231-2.
- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M. B., Leboeuf, M., et al. (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38, 792–804. doi:10.1016/j.immuni.2013.04.004.
- Hatzoglou, M., Fernandez, J., Yaman, I., and Closs, E. (2004). REGULATION OF CATIONIC AMINO ACID TRANSPORT: The

- Story of the CAT-1 Transporter. *Annu. Rev. Nutr.* 24, 377–399. doi:10.1146/annurev.nutr.23.011702.073120.
- Hosokawa, H., Sawamura, T., Kobayashi, S., Ninomiya, H., Miwa, S., and Masaki, T. (1997). Cloning and characterization of a brain-specific cationic amino acid transporter. *J. Biol. Chem.* 272, 8717–8722. doi:10.1074/jbc.272.13.8717.
- Humphreys, D. T., Westman, B. J., Martin, D. I. K., and Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 16961–16966. doi:10.1073/pnas.0506482102.
- Id, S. M. C., Belew, A. T., El-sayed, N. M., Tafuri, W. L., Silveira, F. T., and Mosser, D. M. (2019). Host and parasite responses in human diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*. 1–23.
- Iniesta, V., Gómez-Nieto, L. C., Molano, I., Mohedano, A., Carcelén, J., Mirón, C., et al. (2002). Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol.* 24, 113–118. doi:10.1046/j.1365-3024.2002.00444.x.
- Jeong, J. W., Cha, H. J., Han, M. H., Hwang, S. J., Lee, D. S., Yoo, J. S., et al. (2018). Spermidine protects against oxidative stress in inflammation models using macrophages and Zebrafish. *Biomol. Ther.* 26, 146–156. doi:10.4062/biomolther.2016.272.
- Ji, J., Sun, J., Qi, H., and Soong, L. (2002). Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 338–345. doi:10.4269/ajtmh.2002.66.338.
- Kaye, P., and Scott, P. (2011). Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 604–615. doi:10.1038/nrmicro2608.

- Kim, V. N., Han, J., and Siomi, M. C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 126–139. doi:10.1038/nrm2632.
- Kishikawa, T., Otsuka, M., Tan, P. S., Ohno, M., Sun, X., Yoshikawa, T., et al. (2015). Decreased miR122 in hepatocellular carcinoma leads to chemoresistance with increased arginine. *Oncotarget* 6, 8339–8352. doi:10.18632/oncotarget.3234.
- Koo, B. hyeock, Hong, D., Hong, H. D., Lim, H. K., Hoe, K. L., Won, M. H., et al. (2019). Arginase II activity regulates cytosolic Ca²⁺ level in a p32-dependent manner that contributes to Ca²⁺-dependent vasoconstriction in native low-density lipoprotein-stimulated vascular smooth muscle cells. *Exp. Mol. Med.* 51. doi:10.1038/s12276-019-0262-y.
- Krayem, I., and Lipoldová, M. (2020). Role of host genetics and cytokines in Leishmania infection. *Cytokine*, 155244. doi:10.1016/j.cyto.2020.155244.
- Kropf, P., Freudenberg, M. A., Modolell, M., Price, H. P., Herath, S., Antoniazzi, S., et al. (2004). Toll-Like Receptor 4 Contributes to Efficient Control of Infection with the Protozoan Parasite *Leishmania major*. *Infect. Immun.* 72, 1920–1928. doi:10.1128/IAI.72.4.1920-1928.2004.
- Kurihara, T., Arimochi, H., Bhuyan, Z. A., Ishifune, C., Tsumura, H., Ito, M., et al. (2015). CD98 heavy chain is a potent positive regulator of CD4⁺ T cell proliferation and interferon- γ production in vivo. *PLoS One* 10. doi:10.1371/journal.pone.0139692.
- Laranjeira-Silva, M. F., Zampieri, R. A., Muxel, S. M., Floeter-Winter, L. M., and Markus, R. P. (2015). Melatonin attenuates *Leishmania (L.) amazonensis* infection by modulating arginine metabolism. *J. Pineal Res.* 59, 478–487. doi:10.1111/jpi.12279.

- Latour, Y. L., Gobert, A. P., and Wilson, K. T. (2020a). The role of polyamines in the regulation of macrophage polarization and function. *Amino Acids* 52, 151–160. doi:10.1007/s00726-019-02719-0.
- Latour, Y. L., Gobert, A. P., and Wilson, K. T. (2020b). The Role of Polyamines in the Regulation of Macrophage Polarization and Function. *Physiol. Behav.* 176, 139–148. doi:10.1007/s00726-019-02719-0.The.
- Launois, P., Ohteki, T., Swihart, K., MacDonald, H. R., and Louis, J. A. (1995). In susceptible mice, *Leishmania major* induce very rapid interleukin-4 production by CD4⁺ T cells which are NK1.1⁻. *Eur. J. Immunol.* 25, 3298–3307. doi:10.1002/eji.1830251215.
- Leitão, A. L., and Enguita, F. J. (2022). A Structural View of miRNA Biogenesis and Function. *Non-coding RNA* 8. doi:10.3390/ncrna8010010.
- Leung, A. K. L. (2015). The Whereabouts of microRNA Actions: Cytoplasm and Beyond. *Trends Cell Biol.* 25, 601–610. doi:10.1016/j.tcb.2015.07.005.
- Li, C., Brazill, J. M., Liu, S., Bello, C., Zhu, Y., Morimoto, M., et al. (2017). Spermine synthase deficiency causes lysosomal dysfunction and oxidative stress in models of Snyder-Robinson syndrome. *Nat. Commun.* 8. doi:10.1038/s41467-017-01289-7.
- Li, H., Jiang, T., Li, M. Q., Zheng, X. L., and Zhao, G. J. (2018). Transcriptional regulation of macrophages polarization by microRNAs. *Front. Immunol.* 9, 1–12. doi:10.3389/fimmu.2018.01175.
- Locati, M., Curtale, G., and Mantovani, A. (2020). Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 15, 123–147. doi:10.1146/annurev-pathmechdis-

012418-012718.

- MacLeod, C. L. (1996). Regulation of cationic amino acid transporter (CAT) gene expression. *Biochem. Soc. Trans.* 24, 846–852. doi:10.1042/bst0240846.
- MacLeod, C. L., Finley, K. D., and Kakuda, D. K. (1994). y⁺-type cationic amino acid transport: Expression and regulation of the mCAT genes. *J. Exp. Biol.* 196, 109–121. doi:10.1242/jeb.196.1.109.
- Maia, S., Aoki, J. I., Laranjeira-silva, M. F., Zampieri, A., Cristina, J., Fernandes, R., et al. (2017). Arginase expression modulates nitric oxide production in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. 1–21.
- Mamani-Huanca, M., Muxel, S. M., Acuña, S. M., Floeter-Winter, L. M., Barbas, C., and López-González, Á. (2021). Metabolomic reprogramming of c57bl/6-macrophages during early infection with *L. Amazonensis*. *Int. J. Mol. Sci.* 22. doi:10.3390/ijms22136883.
- Manta, B., Comini, M., Medeiros, A., Hugo, M., Trujillo, M., and Radi, R. (2013). Trypanothione: A unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830, 3199–3216. doi:10.1016/j.bbagen.2013.01.013.
- Maroney, P. A., Yu, Y., Fisher, J., and Nilsen, T. W. (2006). Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 1102–1107. doi:10.1038/nsmb1174.
- Martinez, F. O., Helming, L., and Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: An immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 451–483. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132532.
- McConville, M. J. (2016). Metabolic Crosstalk between *Leishmania* and the Macrophage Host. *Trends Parasitol.* 32, 666–668. doi:10.1016/j.pt.2016.05.005.

- McMahon-Pratt, D., and Alexander, J. (2004). Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? *Immunol. Rev.* 201, 206–224. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00190.x.
- Ming, X., Rajapakse, A. G., Yepuri, G., Xiong, Y., Carvas, J. M., Ruffieux, J., et al. (2012). Arginase II Promotes Macrophage Inflammatory Responses Through Mitochondrial Reactive Oxygen Species, Contributing to Insulin Resistance and Atherogenesis. *J. Am. Heart Assoc.* 1, 1–18. doi:10.1161/jaha.112.000992.
- Ministério da Saúde (2006). *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.*
- Moll, H., Ritter, U., Flohé, S., Erb, K., Bauer, C., and Blank, C. (1996). Cutaneous leishmaniasis: A model for analysis of the immunoregulation by accessory cells. *Med. Microbiol. Immunol.* 184, 163–168. doi:10.1007/BF02456130.
- Moradin, N., and Descoteaux, A. (2012). Leishmania promastigotes: building a safe niche within macrophages. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 121. doi:10.3389/fcimb.2012.00121.
- Morón, B., Spalinger, M., Kasper, S., Atrott, K., Frey-Wagner, I., Fried, M., et al. (2013). Activation of Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 2 by Spermidine Exerts Anti-Inflammatory Effects in Human THP-1 Monocytes and in a Mouse Model of Acute Colitis. *PLoS One* 8, 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0073703.
- Morris, S. M. (2002). Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 87–105. doi:10.1146/annurev.nutr.22.110801.140547.
- Müller, K. E., Zampieri, R. A., Aoki, J. I., Muxel, S. M., Nerland, A. H., and Floeter-Winter, L. M. (2018). Amino acid permease 3 (aap3) coding sequence as a target for Leishmania identification and

- diagnosis of leishmaniasis using high resolution melting analysis. *Parasites and Vectors* 11, 1–12. doi:10.1186/s13071-018-2989-z.
- Muxel, S. M., Acuña, S. M., Aoki, J. I., Zampieri, R. A., and Floeter-Winter, L. M. (2018a). Toll-like receptor and miRNA-let-7e expression alter the inflammatory response in leishmania amazonensis-infected macrophages. *Front. Immunol.* 9. doi:10.3389/fimmu.2018.02792.
- Muxel, S. M., Acuña, S. M., Aoki, J. I., Zampieri, R. A., and Floeter-Winter, L. M. (2018b). Toll-Like Receptor and miRNA-let-7e Expression Alter the Inflammatory Response in Leishmania amazonensis-Infected Macrophages. *Front. Immunol.* 9. doi:10.3389/fimmu.2018.02792.
- Muxel, S. M., Aoki, J. I., Fernandes, J. C. R., Laranjeira-silva, M. F., Zampieri, R. A., Acuña, S. M., et al. (2018c). Arginine and Polyamines Fate in Leishmania Infection. 8, 1–15. doi:10.3389/fmicb.2017.02682.
- Muxel, S. M., Laranjeira-Silva, M. F., Zampieri, R. A., and Floeter-Winter, L. M. (2017). Leishmania (Leishmania) amazonensis induces macrophage miR-294 and miR-721 expression and modulates infection by targeting NOS2 and L-arginine metabolism. *Sci. Rep.* 7, 1–15. doi:10.1038/srep44141.
- Muxel, S. M., Mamani-Huanca, M., Aoki, J. I., Zampieri, R. A., Floeter-Winter, L. M., López-González, Á., et al. (2019). Metabolomic profile of BALB/c macrophages infected with Leishmania amazonensis: Deciphering L-arginine metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* 20. doi:10.3390/ijms20246248.
- Naderer, T., and McConville, M. J. (2008). The Leishmania-macrophage interaction: A metabolic perspective. *Cell. Microbiol.* 10, 301–308. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01096.x.

- Nathan, C., and Shiloh, M. U. (2000). Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 8841–8848. doi:10.1073/pnas.97.16.8841.
- Neill, L. a O., Sheedy, F. J., and McCoy, C. E. (2011). MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. imm* 268, 262–268. doi:10.1038/nri29.
- Nguyen, H. T. T., and Merlin, D. (2012). Homeostatic and innate immune responses: Role of the transmembrane glycoprotein CD98. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 3015–3026. doi:10.1007/s00018-012-0963-z.
- Nicholson, B., Manner, C. K., Kleeman, J., and MacLeod, C. L. (2001). Sustained Nitric Oxide Production in Macrophages Requires the Arginine Transporter CAT2. *J. Biol. Chem.* 276, 15881–15885. doi:10.1074/jbc.M010030200.
- Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., et al. (2009). Bidirectional Transport of Amino Acids Regulates mTOR and Autophagy. *Cell* 136, 521–534. doi:10.1016/j.cell.2008.11.044.
- O’Neill, L. A. J., Golenbock, D., and Bowie, A. G. (2013). The history of Toll-like receptors-redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 453–460. doi:10.1038/nri3446.
- O’Neill, L. A. J., Kishton, R. J., and Rathmell, J. (2016). A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 553–565. doi:10.1038/nri.2016.70.
- Olivier, M., Gregory, D. J., and Forget, G. (2005). Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: A signaling point of view. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 293–305. doi:10.1128/CMR.18.2.293-305.2005.
- Oza, S. L., Shaw, M. P., Wyllie, S., and Fairlamb, A. H. (2005).

- Trypanothione biosynthesis in *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 139, 107–116. doi:10.1016/j.molbiopara.2004.10.004.
- PAHO, P. A. H. O. Visceral Leishmaniasis. Available at: <https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis/visceral-leishmaniasis> [Accessed April 6, 2022].
- PAHO, P. A. H. O. (2021a). *Atlas interativo de leishmaniose nas Américas: aspectos clínicos e diagnósticos diferenciais*. Pan American Health Organization doi:10.37774/9789275721902.
- PAHO, P. A. H. O. (2021b). Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas, No. 10 (December 2021). *Institutional Repos. Inf. Shar.*, 10. Available at: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55368>.
- Palmieri, F. (2004). The mitochondrial transporter family (SLC25): Physiological and pathological implications. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 447, 689–709. doi:10.1007/s00424-003-1099-7.
- Pasini, A., Calderera, C. M., and Giordano, E. (2014). Chromatin remodeling by polyamines and polyamine analogs. *Amino Acids* 46, 595–603. doi:10.1007/s00726-013-1550-9.
- Pegg, A. E. (2009). Mammalian Polyamine Metabolism and Function Anthony. *Bone* 23, 1–7. doi:10.1002/iub.230.Mammalian.
- Pegg, A. E. (2014). The function of spermine. *IUBMB Life* 66, 8–18. doi:10.1002/iub.1237.
- Pena, J., and Mata, D. (2007). Indução de Apoptose em Macrófagos de Camundongos BALB / c pela Infecção in vitro com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Jarina Pena Da Mata Indução de Apoptose em Macrófagos de Camundongos BALB / c pela Infecção in vitro com *Leishmania (Leishmania) a*.
- Pérez-Cano, F. J., Franch, À., Castellote, C., and Castell, M. (2003). Immunomodulatory action of spermine and spermidine on NR8383 macrophage line in various culture conditions. *Cell. Immunol.* 226,

- 86–94. doi:10.1016/j.cellimm.2003.09.009.
- Puleston, D. J., Buck, M. D., Klein Geltink, R. I., Kyle, R. L., Caputa, G., O’Sullivan, D., et al. (2019). Polyamines and eIF5A Hypusination Modulate Mitochondrial Respiration and Macrophage Activation. *Cell Metab.* 30, 352–363.e8. doi:10.1016/j.cmet.2019.05.003.
- Puntambekar, S. S., Davis, D. S., Hawel, L., Crane, J., Byus, C. V., and Carson, M. J. (2011). LPS-induced CCL2 expression and macrophage influx into the murine central nervous system is polyamine-dependent. *Brain. Behav. Immun.* 25, 629–639. doi:10.1016/j.bbi.2010.12.016.
- Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E. I., and Munder, M. (2014). Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages. *Front. Immunol.* 5, 1–11. doi:10.3389/fimmu.2014.00532.
- Reguera, R. M., Balaña-Fouce, R., Showalter, M., Hickerson, S., and Beverley, S. M. (2009). Leishmania major lacking arginase (ARG) are auxotrophic for polyamines but retain infectivity to susceptible BALB/c mice. *Mol. Biochem. Parasitol.* 165, 48–56. doi:10.1016/j.molbiopara.2009.01.001.
- Ritter, U., and Körner, H. (2002). Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 24, 295–301. doi:10.1046/j.1365-3024.2002.00467.x.
- Rossi, M., and Fasel, N. (2018). How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions! *Int. Immunol.* 30, 103–111. doi:10.1093/intimm/dxx075.
- Ruiz-Postigo, J. A., Jain, S., Mikhailov, A., Valadas, S., Warusavithana, S., Osman, M., et al. (2021). Global leishmaniasis surveillance: 2019–2020, a baseline for the 2030 roadmap. *Relev. épidémiologique Hebd.* 35, 19. Available at:

- <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9635-401-419>.
- Ryan, D. G., and O'Neill, L. A. J. (2020). Krebs Cycle Reborn in Macrophage Immunometabolism. *Annu. Rev. Immunol.* 38, 289–313. doi:10.1146/annurev-immunol-081619-104850.
- Sánchez-Jiménez, F., Medina, M. Á., Villalobos-Rueda, L., and Urdiales, J. L. (2019). Polyamines in mammalian pathophysiology. *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 3987–4008. doi:10.1007/s00018-019-03196-0.
- Santovito, D., and Weber, C. (2022). Non-canonical features of microRNAs: paradigms emerging from cardiovascular disease. *Nat. Rev. Cardiol.* 0123456789. doi:10.1038/s41569-022-00680-2.
- Scalise, M., Galluccio, M., Console, L., Pochini, L., and Indiveri, C. (2018). The human SLC7A5 (LAT1): The intriguing histidine/large neutral amino acid transporter and its relevance to human health. *Front. Chem.* 6, 1–12. doi:10.3389/fchem.2018.00243.
- Serafim, T. D., Coutinho-Abreu, I. V., Oliveira, F., Meneses, C., Kamhawi, S., and Valenzuela, J. G. (2018). Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. *Nat. Microbiol.* 3, 548–555. doi:10.1038/s41564-018-0125-7.
- Sivashanmugam, M., J., J., V., U., and K.N., S. (2017). Ornithine and its role in metabolic diseases: An appraisal. *Biomed. Pharmacother.* 86, 185–194. doi:10.1016/j.biopha.2016.12.024.
- Sonkoly, E., Stähle, M., and Pivarcsi, A. (2008). MicroRNAs and immunity: Novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Semin. Cancer Biol.* 18, 131–140. doi:10.1016/j.semcancer.2008.01.005.
- Stewart, T. M., Dunston, T. T., Woster, P. M., and Casero, R. A. (2018). Polyamine catabolism and oxidative damage. *J. Biol. Chem.* 293, 18736–18745. doi:10.1074/jbc.TM118.003337.

- Tafani, M., Pucci, B., Russo, A., Schito, L., Pellegrini, L., Perrone, G. A., et al. (2013). Modulators of HIF1 α and NF κ B in cancer treatment: Is it a rational approach for controlling malignant progression? *Front. Pharmacol.* 4 FEB, 1–12. doi:10.3389/fphar.2013.00013.
- Tannahill, G. M., Curtis, A. M., Adamik, J., Palsson-Mcdermott, E. M., McGettrick, A. F., Goel, G., et al. (2013). Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature* 496, 238–242. doi:10.1038/nature11986.
- Thompson, R. W., Pesce, J. T., Ramalingam, T., Wilson, M. S., White, S., Cheever, A. W., et al. (2008). Cationic amino acid transporter-2 regulates immunity by modulating arginase activity. *PLoS Pathog.* 4. doi:10.1371/journal.ppat.1000023.
- Tran, Q., Lee, H., Park, J., Kim, S. H., and Park, J. (2016). Targeting cancer metabolism - revisiting the Warburg effects. *Toxicol. Res.* 32, 177–193. doi:10.5487/TR.2016.32.3.177.
- Vander Heiden, M. G., Locasale, J. W., Swanson, K. D., Sharfi, H., Heffron, G. J., Amador-Noguez, D., et al. (2010). Evidence for an alternative glycolytic pathway in rapidly proliferating cells. *Science* (80-.). 329, 1492–1499. doi:10.1126/science.1188015.
- Velasquez, L. G., Galuppo, M. K., De Rezende, E., Brandão, W. N., Peron, J. P., Uliana, S. R. B., et al. (2016). Distinct courses of infection with *Leishmania* (L.) *amazonensis* are observed in BALB/c, BALB/c nude and C57BL/6 mice. *Parasitology* 143, 692–703. doi:10.1017/S003118201600024X.
- Vieira, L. L., and Ioav Cabantchik, Z. (1995). Amino acid uptake and intracellular accumulation in *Leishmania major* promastigotes are largely determined by an H⁺-pump generated membrane potential. *Mol. Biochem. Parasitol.* 75, 15–23. doi:10.1016/0166-6851(95)02505-7.

- Wallace, H. M. (2009). The polyamines: Past, present and future. *Essays Biochem.* 46, 1–9. doi:10.1042/BSE0460001.
- Wanasen, N., and Soong, L. (2008). L-arginine metabolism and its impact on host immunity against Leishmania infection. *Immunol. Res.* 41, 15–25. doi:10.1007/s12026-007-8012-y.
- Wang, N., Liang, H., and Zen, K. (2014). Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. *Front. Immunol.* 5, 1–9. doi:10.3389/fimmu.2014.00614.
- World Health Organization (2021). Leishmaniasis - Key facts. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.
- Yan, Y., Dalmaso, G., Sitaraman, S., and Merlin, D. (2007). Characterization of the human intestinal CD98 promoter and its regulation by interferon- γ . *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 292, G535–G545. doi:10.1152/ajpgi.00385.2006.
- Yeremian, A., Martin, L., Arpa, L., Bertran, J., Soler, C., McLeod, C., et al. (2006a). Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. *Eur. J. Immunol.* 36, 1516–1526. doi:10.1002/eji.200535694.
- Yeremian, A., Martin, L., Serrat, N., Arpa, L., Soler, C., Bertran, J., et al. (2006b). Arginine Transport via Cationic Amino Acid Transporter 2 Plays a Critical Regulatory Role in Classical or Alternative Activation of Macrophages. *J. Immunol.* 176, 5918–5924. doi:10.4049/jimmunol.176.10.5918.
- Zilberstein, D., and Myler, P. J. (2021). Arginine sensing in intracellular parasitism of Leishmania. *Curr. Opin. Microbiol.* 64, 41–46. doi:10.1016/j.mib.2021.09.003.

Anexos

Anexo I



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **“Análise do perfil de transcriptômica e metabolômica de macrófagos murinos infectados com *Leishmania amazonensis*: análise de transcritos e metabólitos do parasita e do hospedeiro”**, registrada com o nº 314/2018, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Lucile Maria Floeter Winter e com a participação dos colaboradores Juliana Ide Aoki (IB/USP), Sandra Marcia Muxel (IB/USP), Ricardo Andrade Zampieri (IB/USP), Stephanie Maia Acuna (IB/USP), Juliane Cristina Ribeiro Fernandes (IB/USP), Felipe Cortez (IB/USP), (*)Jonatham Miguel Zanatta (IB/USP), (*)Leonardo Cortazzo (IB/USP) e (*)Camilla de Almeida Bento (IB/USP), que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, em reunião de 17 de abril de 2018.

Vigência da autorização: 17/04/2018 a 05/04/2020

Finalidade: Pesquisa Científica

Espécie/linhagem: camundongo isogênico/BALB/c e C57BL/6

Nº de animais: 150 (F) de cada linhagem **Peso:** 20-30g **Idade:** 4-8sem. **Total:** 300 animais


Origem: Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP – São Paulo, SP

Adendo

A Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, em 10/10/2019 aprovou a prorrogação do prazo de vigência do projeto, de 06/04/2020 a 05/04/2022 e a inclusão de (*)novos pesquisadores colaboradores.

OBS.: Qualquer intercorrência ou alteração do projeto em andamento deverá ser previamente autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA-IB.




Prof. Dr. Pedro Augusto Carlos Magno Fernandes
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Anexo II

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2022.05.27.493766>; this version posted May 27, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under a [CC-BY-NC-ND 4.0 International license](#).

Title: Polyamines shift expression of macrophage L-arginine metabolism related-genes during *Leishmania amazonensis* infection

Author: Jonathan Miguel Zanatta^{1,2}, Stephanie Maia Acuña^{1,2}, Camilla de Almeida Bento^{1,2}, Beatriz Simonsen Stolf³, Sandra Marcia Muxel^{1,2,*}

Affiliation:

1- Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo

2- Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 3- Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo

Av Prof Lineu Prestes, 1730, sala 232, CEP 05508-900, Cidade Universitária São Paulo, SP, Brazil

* **Correspondence:**

Corresponding author: Sandra M Muxel, sandrammuxel@usp.br

Abstract: Polyamines are molecules involved in macrophage activation and polarization in response to pathogens. The interaction with *Leishmania* promotes modulation of macrophage immune response to favor arginine deviation to polyamines production, leading to parasite survival. Polyamine levels are a potential modulator of growth factors, driving cells to proliferation, wound healing, oxidative stress, or regulating translation. Here, we investigate the impact of L-arginine and polyamines in the transcriptional regulation of genes involved in arginine metabolism and pro-inflammatory response to *L. amazonensis* in murine BALB/c macrophages. We found that supplementation with L-arginine is insufficient to modulate macrophage gene expression and infection. Polyamine supplementation altered nitric oxide synthase (*Nos2*) and nitric oxide (NO) production, as well as other macrophage enzymes. Putrescine supplementation increased transcript levels of polyamine metabolism-related genes Arginase 2 (*Arg2*), Spermidine synthase (*SpdS*), and Spermine synthase (*SpmS*) in both uninfected

and *L. amazonensis* infected macrophages. Putrescine increased *Nos2* expression without leading to NO production, while L-arginine plus spermine led to production of NO in uninfected macrophages. Besides, L-arginine supplementation reduced the levels of *Il-1b* during infection, and L-arginine or L-arginine plus putrescine increased *Mcp1* at 24h of infection. The percentage of infected macrophages was lower after putrescine, spermidine, and spermine supplementation than L-arginine supplementation. Our data showed that the polyamines shift L-arginine-metabolism related-genes on BALB/c macrophages and affect infection by *L. amazonensis*.

Keywords: arginine metabolism, polyamines, nitric oxide, *Leishmania*, BALB/c macrophages

1. Introduction

Macrophage response and polarization may determine the inflammatory process and the outcome of infection by different pathogens. Parasitic infections can modify macrophage metabolism and the activity of enzymes such as those from L-arginine and polyamines pathways. Polyamines play an important function in macrophage activation and polarization by regulating amino acid and protein synthesis, oxidative DNA damage, histone modifications, chromatin structure, and tricarboxylic acid (TCA) cycle (1–3). The polyamines putrescine, spermidine, and spermine are aliphatic polycations with low molecular weight (4). The cationic amino acid L-arginine is converted in ornithine and urea by the cytosolic enzyme arginase 1 (ARG1) and by the mitochondrial isoform arginase 2 (ARG2)(5). Ornithine is then converted by ornithine decarboxylase (ODC) into putrescine and subsequently transformed by

spermidine synthase (SPDS) in spermidine, and then in spermine by spermine synthase (SPMS)(6).

The activation and polarization to pro-inflammatory M1 or anti-inflammatory M2 (pro-resolution) profiles also guide the metabolic state of macrophages (7,8). M1 macrophages are characterized by an increase in uptake of L-arginine, nitric oxide synthase 2 (NOS2) activity, and nitric oxide (NO) production in response to interferon gamma (IFN- γ) and lipopolysaccharide (LPS), resulting in high microbicidal activity (9,10). On the other hand, M2 macrophages are characterized by an increase in ARG1, which uses arginine to produce ornithine and subsequently polyamines, driving cell proliferation, collagen synthesis, tissue repair and wound healing (11,12). L-arginine and polyamines are valuable resources for macrophages. They are internalized via transporters from amino acid-polyamine-organocation (APC) superfamily, including cationic amino acid transporters such as CAT1/SLC7A1 and CAT2/SLCA2, and members of the solute carrier transporters (SLC's) family (13). Interestingly, polyamines are uptaken and exported via heterodimeric transporter SLC3A2/SLC7A5 at different levels in M1/M2 polarized macrophages compared to resting cells (14–17). The SLC25A15, SLC1A5, SLC7A5, and SLC3A2 transporters regulate the uptake of L-arginine, L-glutamine, L-ornithine and polyamines in macrophages (14,15,17,18). Thus the amounts of such biomolecules could modulate the outcome of infection and alter L-arginine metabolism (19,20).

Leishmaniasis is a parasitic disease caused by *Leishmania*, endemic in the Americas, Africa, Europe, and Asia, and characterized by a large spectrum of clinical manifestations grouped into cutaneous, mucocutaneous, or visceral forms (21–23). The absence of effective treatment or vaccine reflects low public health policies commitment and is responsible for the high death rate of visceral leishmaniasis (24).

Leishmania amazonensis is one of the causative agents of cutaneous leishmaniasis in Brazil (22,23). *Leishmania* alters between the sand fly invertebrate host from the genus *Phlebotomus* or *Lutzomyia*, and vertebrate hosts such as rodents and humans (25–28). During the bite of an infected sandfly, the promastigote form of *Leishmania* interacts with resident macrophages in the region of the injury, and is phagocytosed (29). Once inside the phagolysosome, the parasite differentiates into the amastigote form and multiplies (30).

The fate of infection by *Leishmania* is determined by the balance between macrophage activation and parasite capacity to subvert the host pro-inflammatory response by several mechanisms (31,32). One well-known mechanism is consuming L-arginine and modulating gene expression of proteins related to polyamines synthesis (20,33,34). Indeed, *Leishmania* is auxotrophic for L-arginine and other nutrients, and is able to regulate its content inside macrophages, interfering in its metabolism and consequently in microbicidal mechanisms (30,33,35–37). Besides, polyamines are essential for host-glutathione and parasite-trypanothione biosynthesis. Thus, these pathways compete for polyamines and L-arginine during infection, interfering in NO production and microbicidal activity (38,39).

Here we analyzed the influence of L-arginine and polyamines in modulating their metabolization-related genes and *L. amazonensis* infection in BALB/c-macrophages. We found that putrescine supplementation modulated *Arg2*, *SpdS*, *SpmS* and *Nos2* transcripts without leading to NO production but reducing infectivity. On the other hand, L-arginine plus spermine increased NO production in uninfected macrophages. However, infectivity was lower after spermidine and spermine supplementation than in arginine, supporting that polyamines affect macrophage activation, interfering in the control of *Leishmania* infection, not necessarily associated with NO.

2. Methods

2.1. Ethics Statement

The experimental protocol for the animal experiments was approved by the Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) from the Instituto de Biociências of the Universidade de São Paulo (approval number CEUA-IB: IB-USP 314/2018). This study was conducted in strict accordance with the recommendations in the guide and policies for the care and use of laboratory animals of São Paulo State (Lei Estadual 11.977, de 25 August 2005) and the Brazilian government (Lei Federal 11.794, de 8 October 2008).

2.2. Murine macrophages differentiation

Bone marrow cells were isolated from femurs and tibiae of BALB/c female mice aged 6 to 8 weeks, supplied by the Centro de Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, and maintained at the Instituto de Biociências da USP. Cells were incubated with 10% supernatant from the conditioned culture of L929 cells in RPMI 1640 medium (LGC, São Paulo, Brazil), supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum, 50 U penicillin, 50 µg / mL streptomycin (Gibco™, USA) for 7 days at 34° C and 5% CO₂.

2.3. Macrophage infection and polyamine treatment

Promastigotes of *L. amazonensis* (MHOM / BR / 1973 / M2269) were maintained in M199 medium (Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum

(Invitrogen), 5 mg/L hemine, 100 μ M adenine, 100 U penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, 40 mM Hepes-NaOH, and 12 mM NaHCO₃, at pH 6.85, at 25°C for a week-long culture at low passage numbers (up to 5).

For RNA analysis, 5×10^6 macrophages/well were plated in 6-well plates (SPL Lifescience, Korea) and for flow cytometry analysis, 1×10^6 macrophages/well in 24-well plates. For infectivity, 2×10^5 macrophages/well were plated in 8-well chamber-slides (Sigma, USA). Macrophages were maintained for 18 h at 34° C, 5% CO₂. Then, macrophages and stationary-phase promastigote forms of *L. amazonensis* (La) were washed in 1X PBS and co-cultured at a ratio of 5 parasites per macrophage (MOI 5:1) in RPMI 1640 medium without L-arginine (R1780, Sigma-Aldrich, USA) supplemented with 2% of inactivated FBS (Invitrogen) with or without L-arginine, putrescine, spermidine, and spermine, as follows: deprived of L-arginine (arg-); supplemented with L-arginine (400 μ M, arg+); supplemented with putrescine (100 μ M, put+); supplemented with L-arginine plus putrescine (arg+/put+); supplemented with spermidine (100 μ M, spd+); supplemented with L-arginine plus spermidine (arg+/spd+); supplemented with spermine (100 μ M, spm+); supplemented with L-arginine plus spermine (arg+/spm+). These conditions were employed for uninfected (MO) and infected macrophages (MO-La).

After 4 hours of infection, the culture was washed twice with 1X PBS to remove non-phagocyted parasites and maintained with complete RPMI 1640 medium supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum, 50 U penicillin, 50 μ g / mL streptomycin at 34° C and 5% CO₂. For the analysis of infection, the culture was maintained for 24 and 48 hours, cells in glass slides were fixed with acetone: methanol (1: 1, v: v), stained with Panoptic (Laborclin, Parana, Brazil), washed, and infectivity was analyzed by optical microscopy. The percentage of infected macrophages and the number of

amastigotes per infected macrophage were calculated by randomly counting at least 500 macrophages per slide.

2.4. RNA extraction and Reverse Transcription

Macrophages were washed 2-times with 1x PBS. The supernatant was discarded and the pellet resuspended in 250 μ L of 1x PBS and 750 μ L of TrizolTM reagent (Invitrogen), and RNA extraction was performed following manufacturer's instructions. The RNA was resuspended in 20 μ L of RNase-free water and quantified by spectrometry (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific). cDNA synthesis was performed using RevertAID Reverse Transcriptase kit (Thermoscientific), following the manufacturer's instructions. Briefly, the reaction was prepared with 2 μ g of total RNA, 2 μ L of random primer oligos (1.5 μ g/ μ L, ThermoScientific), 2 μ L of dNTP (10mM, ThermoScientific) and water q.s.p. 26 μ L and incubated at 72°C for 5 min. Then, 8 μ L of 5x Buffer, 2 μ L of DTT (0.1M), 2 μ L RNase OUT and 2 μ L of reverse transcriptase (200U / μ L) were added, and the samples were incubated at 37°C for 5 min, 25°C for 10 min, 42°C for 45min and 72°C for 10 min. To discard possible contamination by genomic DNA, the negative controls of reverse transcription were prepared with the samples under the same conditions without reverse transcriptase. The obtained cDNAs were diluted 10 times in RNase-free water for qPCR.

2.5. Relative Quantification of mRNA by RT-qPCR

The reaction was assembled with 2X SYBR Green PCR Master Mix, 200 nM of oligonucleotides and 5 μ L of template cDNA (10x diluted), in a final volume of 10 μ L. The

reactions were performed using *StepOne* Real-Time PCR System (*Applied Biosystems*, Thermo Fisher Scientific): the first step, one cycle at 95 ° C for 10 minutes and second step, 40 cycles of 94 ° C for 30s and 60 ° C for 30s. To evaluate the qPCR efficiency, standard curves containing the target fragment cloned in pGEM T-Easy were used in 10x serial dilution from 10⁸ to 10² molecules. The oligonucleotides pairs used were: *Mus musculus* - β -2-microglobulin-F: 5'-cactgaattcaccctga-3', β -2-microglobulin-R: 5'- acagatggagcgtccagaaag-3'; *Nos2*-F: 5'-agagccacagtcctctttgc-3'; *Nos2*-R: 5'-gctcctctccaaggtgctt-3'; *Arg1*-F: 5'-agcactgaggaaagctggtc-3'; *Arg1*-R: 5'- cagac-cgtgggtttctcaca-3'; *Arg2*-F: 5'-tctctccacgggcaaattc -3'; *Arg2*-R: 5'-cac-tcctagcttcttctgcc-3'; *Cat1*-F: 5'-cgtaatgccactgtgacct-3'; *Cat1*-R: 5'- ggctgtaccgtaagaccaa-3'; *Slc3a2*-F: 5'-gccactgagaatgcaaagacc -3'; *Slc3a2*-R: 5'-ttcagcacgtgatgggatgt-3'; *SpdS*-F: 5'-tggtggactacgcctactgt-3'; *SpdS*-R: 5'-tggtgcggttttgccta-3'; *SpmS*-F: 5'-acactatggcagcagcaagac-3'; *SpmS*-R: 5'-tgtgcactgactctgtcatcc-3'; *Slc7a5*-F: 5'-aagggcagggattcatggtg-3'; *Slc7a5*-R: 5'-gtaggggtgtcttcagggc-3'; *Slc1a5*-F: 5'-cacttctgtgaccttccca-3'; *Slc1a5*-R: 5'-actctagggccatggtcaatac-3'; *Slc25a15*-F: 5'-gcgaccttaaaaattgcccc-3'; *Slc25a15*-R: 5'-ctggttctgtggaaggcga-3'; *Cat2*-F: 5'-tccaaaacgaagacaccagt-3'; *Cat2*-R: 5'-gccatgagggtgccaataga-3'; *Tnfa*-F: 5'- ccaccagctcttctgtcta-3'; *Tnfa*-R: 5'- ag-ggtctgggcatagaact-3'; *Il-1b*-F: 5'- ccaagcttctgtgcaagtg-3'; *Il-1b*-R: 5'-ctgtcaaaaggtggcatttcac-3'; *Mcp1*-F: 5'- tgatcccaatgagtaggetg-3'; *Mcp1*-R: 5'-gcacagacctctcttctgagc-3'; *Odc1*-F: 5'- ctgccagtaacggagtccag-3'; *Odc1*-R: 5'-tcagtggaatccgtagaac-3'. The fold-change was calculated by *Delta-Delta Ct* ($\Delta\Delta Ct$) method, based in β -2-microglobulin and normalized with MO/arg+ 4h group. The fold-change was presented in log₂.

2.6. NO quantification assay

The macrophages were ungripped by incubation with 1mM EDTA in 1X PBS for 10 min at 34 °C, and then adding RPMI plus 10% FBS and cell scraping on ice. The cells were washed by centrifugation with 1X PBS cold (500 xg, 10 min, 4°C) and incubated with 50 µL of 5 µM DAF-FM (4-amino-5methylamino-2',7'-dichlorofluorescein diacetate, Life Technologies, Eugene, OR, USA) diluted in 1X PBS for 30 min at 34 °C. Cells were then washed by centrifugation with 1X PBS (500 xg, 10 min, 4°C) and re-suspended in 300 µL of cold 1X PBS. Fluorescence acquisition was performed using BD Accuri cytometer (BD, Franklin Lakes, NJ, USA), and the collected data were analyzed in viable cells (PI-; FL2 detector) for 20,000 events, based on the characteristics of forward scatter (FSC) and side scatter (SSC).

2.7. Statistical analysis

The collected data were analyzed in GraphPad Prism software 7. The statistical analyses were performed using One-way ANOVA for mRNA and citometry analysis and Two-way ANOVA for infectivity, with a 95% confidence interval and Sidak's test. Comparisons were established based on the groups supplemented with L-arginine uninfected and infected (MO/arg+ and MO-La/arg+, respectively). Comparisons of uninfected and infected groups were performed between similar conditions. Comparisons within a single group (uninfected or infected groups) were based on deprived x supplemented conditions for the same polyamine.

3. Results

3.1. L-arginine deprivation is not sufficient to modify gene expression of polyamine- related enzymes and transporters and NO production

To study polyamine pathway-related genes, we analyzed the effects of the precursor L-arginine on RNA abundance and NO production, by infecting BALB/c macrophage with *L. amazonensis* in conditions of L-arginine deprivation (arg-) or supplementation (arg +) for 4h. The mRNAs of genes involved in polyamine production in macrophages *Arg1* and *Arg2*, *Odc1*, *SpdS*, *SpmS*, and *Nos2* were analyzed by RT-qPCR and NO production was analysed by flow cytometry (Fig.1). L-arginine supplementation (arg+) was used as a reference to compare conditions of 4 and 24 h of infection. Results shown in Fig 1 indicate that under supplementation with arg transcripts levels of *Arg1*, *Arg2*, *Odc1*, *SpdS*, and *SpmS* were similar in uninfected (MO) and infected macrophages (MO-La; Fig. 1 A-E). However, under L-arginine deprivation, the levels of *Nos2* increased in infected macrophages at 4h and 24h compared to uninfected macrophages, but not in relation to arg+ (Fig.1F). When we compared 24 to 4 h, *Nos2* levels reduced about two times in arg+ MO and MO-La (Fig.1F). The percentage of NO producing cells (represented by DAF-FM+ cells) and median of fluorescence (MFI) of NO production didn't change upon infection or arginine deprivation (Fig. 1G-H). At the same time, L-arginine deprivation induced *Nos2* during infection without reflecting in the NO production.

Considering that arginine uptake can be modulated and may alter amino acid and polyamines availability inside macrophages, we analyzed if L-arginine deprivation

affected transcripts levels of the transporters of L-arginine and polyamines *Cat1* *Cat2*, *Slc3a2*, and *Slc7a5*. As shown in Fig 2, L-arginine + and - conditions of both MO and MO-La showed reduced levels of *Cat1* and *Slc7a5* at 24 h compared to 4 h. L-arginine deprivation didn't modulate transcript levels for *Cat1*, *Cat2*, *Slc3a2*, and *Slc7a5* compared to arg+. These data indicate that L-arginine *per se* did not affect the expression of genes involved in L-arginine uptake and metabolism.

3.2. Polyamines modulate *Arg2*, *SpdS* and *SpmS* transcripts

To evaluate if polyamines can influence the expression of genes related to L-arginine metabolism for polyamines biosynthesis, BALB/c macrophages co-cultured or not with *L. amazonensis* for 4h were supplemented with the polyamines putrescine, spermidine and spermine in conditions of L-arginine deprivation (arg-) or supplementation (arg +).

The results shown in Fig 3 indicate that *Arg1* transcript abundances were not modulated neither by polyamines nor by infection (Fig.3A). On the other hand, L-arginine plus putrescine supplementation (arg+/put+) or putrescine only (put+) during 4h of infection led to higher levels of *Arg2* transcripts compared to only arg+ (MO-La 4h) (Fig.3B). Interestingly, the supplementation of uninfected macrophages with L-arginine plus spermidine (arg+/spd+) and spermidine only (spd+) reduced *Arg2* levels at 24h compared to arg+ (Fig.3B). A reduction of *Arg2* was also observed after supplementation of uninfected cells with L-arginine plus spermine (arg+/spm+) and spermine (spm+; Fig.3B).

Comparing MO and MO-La, the supplementation with put+ and with arg+/spm increased the *SpdS* levels at 4 and at 24h, respectively (Fig.3C). In MO supplemented

with put⁺ the levels of *SpmS* were lower at 4h compared to MO/arg⁺ or arg⁺/put⁺ (Fig.3D). When macrophages were supplemented with put⁺ during infection, we observed an increase in *SpmS* levels (Fig.3D) compared to uninfected cells.

Our data suggest that polyamines modulate the expression of *Arg2*, *SpdS*, and *SpmS* in both uninfected and infected macrophages.

3.3 Putrescine increased *Nos2* expression, while spermine increased NO producing cells

We then evaluated if polyamines can influence the expression of genes related to L-arginine metabolism associated with NO production. Again, BALB/c macrophages co-cultured or not with *L. amazonensis* were supplemented with polyamines putrescine, spermidine and spermine in conditions of L-arginine deprivation (arg⁻) or supplementation (arg⁺) during 4h.

In the context of macrophage infection for 4h, supplementation with put increased more than 2-times *Nos2* levels compared to MO-La/arg⁺ (Fig.4A). Also, putrescine supplementation of macrophages infected for 4h increased the *Nos2* levels compared to uninfected macrophages (Fig.4A). Despite that, putrescine supplementation did not lead to increase in NO production, as stated by the similar frequencies of DAF-FM⁺ cells (Fig. 4B) and MFI values (mean of NO production per cell; Fig. 4C) in supplemented and no supplemented conditions.

The supplementation with spermidine or spermine did not alter *Nos2* levels (Fig.4A). However, supplementation with arg⁺/spm⁺ increased the frequency of DAF-FM⁺ cells at 4 and 24h compared to MO/arg⁺ (Fig.4B). Curiously, the increase in the

frequency of DAF-FM⁺ cells during 24 h macrophage infection induced by arg⁺/spm⁺ was not accompanied by changes in NO production per cell (MFI; Fig.4B-C).

Our data indicate modulation of *Nos2* expression by putrescine supplementation during infection, without a corresponding increase in NO production. On the other hand, L-arginine and spermine together can stimulate NO production in uninfected macrophages in the absence of *Nos2* transcript modulation.

3.4. Polyamines affect the levels of arginine and polyamine transporters

Our next aim was to analyze if polyamines could alter the expression of genes related to L-arginine and polyamines uptake. For that, transcript levels of the transporters *Cat1*, *Cat2*, *Slc1a5*, *Slc3a2* and *Slc7a5* were analyzed in macrophage samples obtained under the conditions mentioned in the previous experiments.

Cat1 levels decreased in non-infected macrophages after 24 h incubations with arg⁺/put⁺, put⁺, arg⁺/spd⁺, or spm compared to 4h incubations (Fig. S1A). Similarly, in infected macrophages the supplementation with arg⁺/put⁺ or put⁺ diminished *Cat1* levels (Fig. S1A). We also found a reduction in *Cat2* levels in uninfected macrophages supplemented with arg⁺/put⁺ in 24h compared with 4h ($p \leq 0.006$, Fig.S1B).

No differences were observed in *Slc1a5* levels between infected and uninfected cells upon supplementation (Fig. S1C). However, during macrophage infection putrescine supplementation led to increase in *Slc3a2* levels at 4h (Fig.5A). Also, the supplementation with arg/spd increased *Slc3a2* levels compared to MO-La/arg⁺ at 4h of infection (Fig.5A). Concerning uninfected macrophages at 24 h, arg⁺/spd⁺ or spd⁺ reduced the *Slc3a2* levels compared to MO/arg⁺ (Fig. 5A).

We observed a reduction in the levels of *Slc7a5* at 24h compared to 4h in arg+/put+ and put+ conditions in both infected or uninfected macrophages (Fig. 5B). Indeed, most conditions of incubations with spd and spm for 24h also decreased *Slc7a5* transcript levels compared to 4h. In uninfected macrophages, the supplementation with spd+ increased the *Slc7a5* levels in comparison to MO/arg+ at 24h (Fig.5B). In infected macrophages, supplementation with spd+, spm+ or arg+/spm+ increased *Slc7a5* levels at 24h compared to arg+ (Fig.5B).

Our data indicate that supplementation with putrescine or L-arginine plus spermidine impacts the expression of *Slc3a2* in uninfected macrophages. Furthermore, spermidine supplementation alters *Slc7a5* expression in uninfected macrophages, and both spermidine or L-arginine plus spermine can modulate *Slc7a5* during macrophage infection by *L. amazonensis*.

3.5. Polyamines can induce *Mcp1* and *Il-1b* expression

Next, we analyzed if polyamines could alter the expression of genes of cytokines related to pro-inflammatory activation of macrophages.. Transcript levels of *Il-1b*, *Tnfa* and *Mcp1* were analyzed in macrophage samples obtained under the conditions mentioned in the previous experiments

In uninfected macrophages, the supplementation with arg+, arg+/put+, put+ or arg+/spd+ increased *Il-1b* levels at 24 h compared to 4h in the same conditions (Fig.6A). At 24h, infected macrophages supplemented with arg+, or arg+/put+ presented a reduction in the *Il-1b* levels compared to uninfected ones (Fig. 6A). No modifications were observed in *Tnfa* levels under arginine or polyamines supplementation

during *L. amazonensis* infection, but *Tnfa* transcript levels increased in uninfected macrophages after 24h incubations with arg⁺/spd⁺ or spd⁺ compared to 4h (Fig.6B).

The supplementation with L-arginine increased *Mcp1* levels at 24h of infection compared to uninfected macrophages (Fig. 6C). Accordingly, *Mcp1* transcripts are significantly higher after 24h of infection compared to 4h. Macrophages infected for 24h and supplemented with arg⁺, arg⁺/put⁺ or put⁺ showed an increase in *Mcp1* levels compared to uninfected counterparts (Fig.6C).

Our data indicate that *Il-1b* and *Mcp1* transcripts can be modulated by infection in the presence of arginine and putrescine supplementation. More specifically, *Mcp1* levels increased upon infection in the presence of arginine and putrescine, while *Il-1b* levels reduced upon infection in the presence of L-arginine or L-arginine plus putrescine.

3.6. Polyamines and macrophage infection

We finally evaluated the impact of polyamines and arginine supplementation on the infection of macrophages by *L. amazonensis*. We determined the frequency of infected macrophages and the number of amastigotes per infected macrophage. BALB/c macrophages were co-cultured with *L. amazonensis* during 4h in the presence or not of L-arginine and polyamines, parasites were washed out, and cells were either fixed or incubated until 24h and 48h

As shown in Fig 7, the percentage of infected macrophages increased after 48 hours in the presence and in the absence of arg⁺ ($p \leq 0.001$) compared to 4 hours (Fig. 7A). The number of amastigotes per macrophage was similar among arg⁺ and arg⁻ at all times (Fig.7B).

Unexpectedly, arg⁺/put⁺ and put⁺ supplementation showed a significantly lower percentage of infected macrophages at 4h compared to arg⁺ (Fig.7A). In arg⁺/put⁺ and put⁺ the percentage of infected macrophages increased at 24 and 48h compared to 4h (Fig.7A). However, upon arg⁺/put⁺ supplementation, the percentage of infected macrophages reduced at 48h compared to arg⁺. Curiously, the number of amastigotes per infected macrophage increased with arg⁺/put⁺ at 4h ($p \leq 0.001$) compared to arg⁺, but decreased after 24 and 48h.

The supplementation with arg/spd or spd increased the percentage of infected macrophages at 24h compared to arg⁺, but arg⁺/spd⁺ supplementation decreased the percentage of infected macrophages at 48h compared to arg⁺ (Fig.7B). Upon supplementation with arg and spm, the percentage of infected macrophages was higher than in arg⁺ at 4 and 24h, but lower at 48h. In arg⁺/spm⁺ and spm⁺, the number of amastigotes per infected macrophage were lower at 4h compared to arg⁺ at 4h (Fig.7B-C). These data indicate that polyamines interfere in a complex way in the percentage of infected macrophages and in the number of amastigotes per infected macrophage.

4. Discussion

Macrophages play an important role in recognizing pathogens and inducing an appropriate inflammatory activation, latter inducing T and B cell response and memory generation. The metabolization of L-arginine in macrophages can be guide to produce NO inducing cytotoxic mechanisms, or to produce polyamines. Polyamines act on the regulation of amino acid and protein synthesis, oxidative DNA damage, histone modifications, chromatin structure, and TCA cycle in macrophages (1–3), impacting on macrophage M1/M2 polarization. Studying the impact of L-arginine and polyamines

metabolization in macrophages may improve our comprehension of the regulation of microbicide activity against *Leishmania*. Here, we focused on analyzing the transcript levels of genes related to L-arginine/polyamines transport and metabolism in BALB/c macrophages upon deprivation or supplementation with L-arginine, putrescine, spermidine, and spermine in uninfected conditions and during infection with *L. amazonensis*.

L-arginine availability is implicated in the outcome of *Leishmania* infection, since the competition for this amino acid by the host and parasite arginase and NOS2 affect NO production and consequently parasite killing (Fig. 8) (39–43)(42,43). Unexpectedly, we showed that deprivation or supplementation with arginine during *L. amazonensis* infection of BALB/c macrophages did not modulate the expression of *Arg1*, *Arg2*, *Odc1*, *SpdS*, and *SpmS*. Besides, at 4 h of infection we observed an increase and after 24h a reduction of *Nos2* levels independent of arginine L-availability, without affecting NO production. The deprivation or supplementation with L-arginine did not alter the infection of macrophages. To estimate the effect of deprivation in L-arginine uptake we analyzed expression of arginine and polyamine transporters. Our results showed that the deprivation of this amino acid during infection did not modify the transporters *Cat1*, *Cat2*, *Slc3a2*, and *Slc7a5* levels. Interestingly, BALB/c macrophages knockout for *Cat2* present reduced transport of L-arginine during stimulation with IFN- γ plus LPS or IL-4 plus IL-10, without modifications in NOS2 or ARG1 levels (44).

Metabolomic data reported by our group reveal increased levels of L-arginine, ornithine, putrescine, spermine and glutamine in BALB/c and C57BL/6 macrophages after 4h of infection with *L. amazonensis* (35,45). Infection of BALB/c macrophages with *L. amazonensis* knockout for arginase leads to the accumulation of L-arginine during infection, while proline, ornithine, and putrescine were diminished relative to

infections with wild type parasite (35,45). These results reinforce that parasite arginase consumes L-arginine from the host, as described for amastigote forms consuming nutrients from phagolysosome, affecting the supply for ARG1 and NOS2 (46). This suggests that the internal pool of L-arginine is sufficient to support polyamines biosynthesis in the early phase of infection.

Polyamines availability can interfere in the levels of L-arginine transporters (CAT1/2) and in L-arginine metabolization by enzymes ARG1 and ARG2, and the enzymes of polyamine pathway ODC, SPDS, and SPMS (6). Also, polyamines uptake depends on the expression of polyamine transporter SLC3A2/SLC7A5 (14–17). With these facts in mind, we attempted to study the expression of macrophage metabolism-related genes upon supplementation with putrescine, spermidine and spermine, with or without L-arginine during infection. After L-arginine and putrescine or only putrescine supplementation, the levels of *Cat1*, *Cat2*, *Slc3a2*, *Slc7a5*, *Arg2*, *SpdS*, *SpmS* and *Nos2* suffered some alterations in relation to infection or time. Some of these alterations may impact in *L. amazonensis* infection outcome. The levels of *Cat1* and *Cat2* reduced in arg+/put+ and put+ supplementation during macrophage infection, implicating putrescine availability in the modulation of L-arginine transporters. The supplementation with put+ and arg+/spd+ increased *Slc3a2* at 4h and reduced at 24h in uninfected macrophages. Also, spd+ increased *Slc7a5* at 24h in uninfected macrophages. During *L. amazonensis* infection, spermidine or L-arginine plus spermine can modulate *Slc7a5*, suggesting that polyamines can influence *Slc3a2/Slc7a5* transcription.

We have already reported that higher levels of citrulline in BALB/c and C57BL/6 macrophages after 4h of infection with *L. amazonensis* did not correlate with NO production, once the NO production was observed only in C57BL/6 macrophages (35,45,47). We now showed that the supplementation with putrescine increased *Nos2*

levels, but did not reflect in increased NO production. NO producing cells were observed in L-arginine plus spermine supplementation in both uninfected and *L. amazonensis* infected conditions, without *Nos2* modulation. Curiously, another group reported that spermidine reduced the expression of *Nos2* in LPS-stimulated macrophages (48). It was previously shown that BALB/c macrophages knockout for *NOS2* did not differ in the expression of *Cat1* and *Cat2*, and also transport L-arginine during stimulation with IFN- γ plus LPS or IL-4 plus IL-10 (44). Our data can support the idea that polyamines can exert a major influence in NO production during infection.

In BALB/c and C57BL/6 macrophages after 4h of infection with *L. amazonensis* we previously observed increase in ornithine, putrescine, spermine, proline and glutamine levels (35,45). Through the urea cycle, ornithine can be metabolized to produce proline and glutamine (49–51). In contrast to our expectation, we did not find modulation in the levels of *Arg1* upon polyamine supplementation. On the other hand, *Arg2* abundance increased in the presence of L-arginine plus putrescine or only putrescine in infected-macrophages after 4h. Despite the lack of polyamines biosynthetic pathways in mitochondria, we can speculate that increased level of *Arg2* induced by putrescine availability can guide the use of L-arginine by ARG2 increasing ornithine, which could be converted in citrulline inside mitochondria or polyamines in cytoplasm. The increased levels of ornithine, proline and glutamine in *L. amazonensis* infected BALB/c macrophages can support glutamate production, interfering in the metabolic state of macrophages during activation (31). In M2 macrophages, the activation of the oxidative phosphorylation system (OXPHOS) is associated with releasing polyamines, allowing cell proliferation and wound healing (49,52,53). On the other hand, glycolytic metabolism can be induced in macrophages by the availability of O₂, glucose, glutamine, L-arginine, and polyamines to generate ATP, characteristic of aerobic

metabolism in pro-inflammatory M1 macrophages. The polyamines contribute to glutamate production and subsequent α -ketoglutarate production, broking the tricarboxylic acid cycle (TCA) in the Warburg effect and affecting ATP production and the redox state of cells (49,52,53).

Spermine and spermidine play a role in protecting cells from reactive oxygen species (ROS). Spermidine is know to reduce the expression of ROS in LPS-stimulated macrophages (48). Polyamines, specially spermine, can indirectly mediate Ca^{2+} transport or function on mitochondrial respiration, stimulating succinate dehydrogenase activity, coupling an increased mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) production (54–56). Glutathione is composed by glycine, cysteine and glutamic acid and acts as a ROS scavenger in thiol-disulfide reactions to control the protein functions (57). *Leishmania* can use glutathione and spermidine to produce glutathionylspermidine, and subsequently trypanothione, an essential molecule to protect the parasite against the mammalian host defense (58,59). Here, we found that uninfected macrophages supplemented with L-arginine plus spermine displayed an increase in NO production. Despite that, the infection subverts this effect suggesting that *L. amazonensis* blocks the macrophage capacity to respond to the variations in polyamine levels, deviating the macrophage activity to ensure its survival. Spermine induces superoxide dismutase synthesis and can prevent oxidative damage (60,61). The dysregulation of antioxidant activity leads to ROS accumulation and affects mitochondrial integrity (62). Spermine also negatively regulates macrophage activation, which can be linked to polyamines catabolism mediated by acetylation via N1-spermidine/spermine acetyltransferase (SSAT) (63,64).

In uninfected macrophages, putrescine supplementation reduced expression of *SpmS* at 4h compared to L-arginine supplementation. Expression was restored upon

macrophage infection, being similar to the condition of L-arginine supplementation. This observation suggests that *L. amazonensis* blocks/interferes in the macrophage capacity to respond to variations in polyamine levels, possibly to ensure its survival inside the host. On the other hand, the accumulation of polyamines can cross-regulate metabolic-related genes during infection. Also, it was shown that *SpmS* knockout cause accumulation of spermidine and increase of aldehyde and hydrogen peroxide (H₂O₂), leading to lysosomal dysfunction and oxidative stress (61). Spermine was also shown to inhibit translation of NOS2 mRNAs in macrophages, reducing NO production (55). IL-4 stimulation induces ODC, increasing putrescine production in murine macrophages, and the inhibition of ODC with difluoromethylornithine (DFMO) reduces putrescine content but not spermidine and spermine (65,66). In this context, it's interesting to cite the function of spermidine in the regulation of translation by mediating spermidine-hypusination of lysine residue in eukariotic initiation factor (eIF5A) (38,39). Also, macrophages stimulated with IL-4 display an increase in putrescine levels and hypusination of eIF5A (38,39).

Regarding the expression of genes related to macrophage polarization, putrescine supplementation during infection increased the expression of *Nos2* and *Mcp1* independently of L-arginine supplementation. Previous studies showed that the putrescine and spermine increase MCP-1 and TNF- α in mixed glial culture (67). Spermidine reduces the secretion of TNF- α and IL-1 β in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages (48), and MCP-1 secretion in THP-1-macrophages treated with IFN- γ (68).

Our results suggest that polyamines can act as protagonists in activating of inflammatory response to *Leishmania* infection, not only by releasing L-arginine and inducing NO production, but also by acting in the host-glutathione and redox balance, improving the microbicide activity of macrophage. Putrescine, spermidine and spermine

supplementation reduced the percentage of infected macrophages, corroborating the idea that polyamines favor macrophage activation and microbicide capacity, to the detriment of parasite survival.

5. Conflicts of Interest:

The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

6. Author Contributions:

Conceptualization, J.M.Z. and S.M.M.; methodology and experiments design, J.M.Z., S.M.A., and C.A.B.; designed the figure; J.M.Z., S.M.A. and S.M.M.; writing—original draft preparation, J.M.Z., B.S.C and S.M.M; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

7.Funding:

This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, <http://www.cnpq.br>: 403100/2021-6) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, <http://www.fapesp.br>: 2018/24693-9, 2022/00291-4 and 2018/23512-0). FAPESP fellowship: J.M.Z (2019/07089-3), S.M.A. (2017/23519-2), and C.A.M. (2018/18499-5).

8. Acknowledgments

We thank to Professor Jean Pierre Schatzmann Peron and Lab members for welcoming, encouraging and giving support to finish this work: Carolina Manganeli Polonio,

Nagela Ghabdan Zanluqui, Marília Garcia, Lilian Gomes de Oliveira, Laura Caroline de Faria, Tiago Francisco da Silva, Yan Souza Angelo and Igor Santiago Carvalho.

9. References

1. Pegg AE. Mammalian Polyamine Metabolism and Function Anthony. *Bone* (2009) 23:1–7. doi:10.1002/iub.230.Mammalian
2. Hardbower DM, Asim M, Luis PB, Singh K, Barry DP, Yang C, Steeves MA, Cleveland JL, Schneider C, Piazzuelo MB, et al. Ornithine decarboxylase regulates M1 macrophage activation and mucosal inflammation via histone modifications. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2017) 114:E751–E760. doi:10.1073/pnas.1614958114
3. Pasini A, Caldarera CM, Giordano E. Chromatin remodeling by polyamines and polyamine analogs. *Amino Acids* (2014) 46:595–603. doi:10.1007/s00726-013-1550-9
4. Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-Mcdermott EM, McGettrick AF, Goel G, Frezza C, Bernard NJ, Kelly B, Foley NH, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature* (2013) 496:238–242. doi:10.1038/nature11986
5. Dunand-Sauthier I, Irla M, Carnesecchi S, Seguí-Estévez Q, Vejnar CE, Zdobnov EM, Santiago-Raber M-L, Reith W. Repression of Arginase-2 Expression in Dendritic Cells by MicroRNA-155 Is Critical for Promoting T Cell Proliferation. *J Immunol* (2014) 193:1690–1700. doi:10.4049/jimmunol.1301913
6. Pérez-Cano FJ, Franch À, Castellote C, Castell M. Immunomodulatory action of spermine and spermidine on NR8383 macrophage line in various culture conditions. *Cell Immunol* (2003) 226:86–94. doi:10.1016/j.cellimm.2003.09.009
7. Locati M, Curtale G, Mantovani A. Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. *Annu Rev Pathol Mech Dis* (2020) 15:123–147. doi:10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718
8. Ryan DG, O’Neill LAJ. Krebs Cycle Reborn in Macrophage Immunometabolism. *Annu Rev Immunol* (2020) 38:289–313. doi:10.1146/annurev-immunol-081619-104850
9. Boucher JL, Moali C, Tenu JP. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci* (1999) 55:1015–1028. doi:10.1007/s000180050352
10. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* (2004) 25:677–686. doi:10.1016/j.it.2004.09.015
11. Filardy AA, Pires DR, Nunes MP, Takiya CM, Freire-de-Lima CG, Ribeiro-Gomes FL, DosReis GA. Proinflammatory Clearance of Apoptotic Neutrophils Induces an IL-12 low IL-10 high Regulatory Phenotype in Macrophages. *J Immunol* (2010) 185:2044–2050. doi:10.4049/jimmunol.1000017
12. Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. *Front Immunol* (2014) 5:1–9. doi:10.3389/fimmu.2014.00614
13. Sharpe JG, Seidel ER. Polyamines are absorbed through a y+ amino acid carrier in rat intestinal epithelial cells. *Amino Acids* (2005) 29:245–253. doi:10.1007/s00726-005-0234-5
14. Scalise M, Galluccio M, Console L, Pochini L, Indiveri C. The human SLC7A5 (LAT1): The intriguing histidine/large neutral amino acid transporter and its relevance to human health. *Front Chem* (2018) 6:1–12. doi:10.3389/fchem.2018.00243
15. Abdulhussein AA, Wallace HM. Polyamines and membrane transporters. *Amino Acids* (2014) 46:655–660. doi:10.1007/s00726-013-1553-6
16. Kurihara T, Arimochi H, Bhuyan ZA, Ishifune C, Tsumura H, Ito M, Ito Y, Kitamura A, Maekawa Y, Yasutomo K. CD98 heavy chain is a potent positive regulator of CD4+ T cell proliferation and interferon- γ production in vivo. *PLoS One* (2015) 10: doi:10.1371/journal.pone.0139692
17. Nicklin P, Bergman P, Zhang B, Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B, Yang H, Hild M, Kung C, Wilson C, et al. Bidirectional Transport of Amino Acids Regulates mTOR and Autophagy. *Cell* (2009) 136:521–534. doi:10.1016/j.cell.2008.11.044

18. Morris SM, Kepka-Lenhart D. Hormonal induction of hepatic mitochondrial ornithine/citrulline transporter mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* (2002) 294:749–752. doi:10.1016/S0006-291X(02)00549-1
19. Ferreira C, Mesquita I, Barbosa AM, Osório NS, Torrado E, Beuparlant C-JJ, Droit A, Cunha C, Carvalho A, Saha B, et al. Glutamine supplementation improves the efficacy of miltefosine treatment for visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* (2020) 14:1–17. doi:10.1371/journal.pntd.0008125
20. Reguera RM, Balaña-Fouce R, Showalter M, Hickerson S, Beverley SM. Leishmania major lacking arginase (ARG) are auxotrophic for polyamines but retain infectivity to susceptible BALB/c mice. *Mol Biochem Parasitol* (2009) 165:48–56. doi:10.1016/j.molbiopara.2009.01.001
21. Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Cannet A, Ravel C, Marty P, Delaunay P, Kasbari M, Granouillac B, et al. Molecular Aspects of Medicine Leishmania infections : Molecular targets and diagnosis. (2017) 57: doi:10.1016/j.mam.2016.11.012
22. World Health Organization. Leishmaniasis. (2018) Available at: <https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis>
23. Ruiz-Postigo JA, Grout L, Jain S. Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. *Wkly Epidemiol Rec* (2020) 95:265–280. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9525>
24. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Boer M den, WHO LCT. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One* (2012) 7:e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671
25. Barral A, Costa J. *Leishmanias e a leishmaniose tegumentar nas américas*. Salvador, BA (2011).
26. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol* (2011) 9:604–615. doi:10.1038/nrmicro2608
27. Dostálová A, Volf P. Leishmania development in sand flies: Parasite-vector interactions overview. *Parasites and Vectors* (2012) 5:1–12. doi:10.1186/1756-3305-5-276
28. Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Parasites and Vectors* (2000) 3:1269–1281. Available at: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-1261-z>
29. Pena J, Mata D. Indução de Apoptose em Macrófagos de Camundongos BALB / c pela Infecção in vitro com Leishmania (Leishmania) amazonensis Jarina Pena Da Mata Indução de Apoptose em Macrófagos de Camundongos BALB / c pela Infecção in vitro com Leishmania (Leishmania) a. (2007)
30. Moradin N, Descoteaux A. Leishmania promastigotes: building a safe niche within macrophages. *Front Cell Infect Microbiol* (2012) 2:121. doi:10.3389/fcimb.2012.00121
31. Aoki JI, Muxel SM, Zampieri RA, Acuña SM, Fernandes JCR, Vanderlinde RH, Sales MCO de P, Floeter-Winter LM. L-arginine availability and arginase activity: Characterization of amino acid permease 3 in Leishmania amazonensis. *PLoS Negl Trop Dis* (2017) 11:1–19. doi:10.1371/journal.pntd.0006025
32. Goldman-pinkovich A, Balno C, Strasser R, Zeituni-molad M, Myler J, Zilberstein D. An Arginine Deprivation Response Pathway Is Induced in Leishmania during Macrophage Invasion. (2016)1–18. doi:10.1371/journal.ppat.1005494
33. McConville MJ. Metabolic Crosstalk between Leishmania and the Macrophage Host. *Trends Parasitol* (2016) 32:666–668. doi:10.1016/j.pt.2016.05.005
34. Castilho-Martins EA, Canuto GAB, Muxel SM, DaSilva MFL, Floeter-Winter LM, del Aguila C, López-González Á, Barbas C. Capillary electrophoresis reveals polyamine metabolism modulation in Leishmania (Leishmania) amazonensis wild-type and arginase-knockout mutants under arginine starvation. *Electrophoresis* (2015) 36:2314–2323. doi:10.1002/elps.201500114
35. Muxel SM, Mamani-Huanca M, Aoki JI, Zampieri RA, Floeter-Winter LM, López-González Á, Barbas C. Metabolomic profile of BALB/c macrophages infected with Leishmania amazonensis: Deciphering L-arginine metabolism. *Int J Mol Sci* (2019) 20: doi:10.3390/ijms20246248
36. McConville MJ, de Souza D, Saunders E, Likic VA, Naderer T. Living in a phagolysosome; metabolism of Leishmania amastigotes. *Trends Parasitol* (2007) 23:368–375. doi:10.1016/j.pt.2007.06.009
37. Saunders EC, Naderer T, Chambers J, Landfear SM, McConville MJ. Leishmania mexicana can utilize amino acids as major carbon sources in macrophages but not in animal models. *Mol Microbiol* (2018) 108:143–158. doi:10.1111/mmi.13923

38. Boitz JM, Gilroy CA, Olenyik TD, Paradis D, Perdeh J, Dearman K, Davis MJ, Yates PA, Li Y, Riscoe MK, et al. Arginase is essential for survival of *Leishmania donovani* promastigotes but not intracellular amastigotes. *Infect Immun* (2017) 85: doi:10.1128/IAI.00554-16
39. Muxel SM, Aoki JI, Fernandes JCR, Laranjeira-silva MF, Zampieri RA, Acuña SM, Müller KE, Vanderlinde RH, Damatta RA. Arginine and Polyamines Fate in *Leishmania* Infection. (2018) 8:1–15. doi:10.3389/fmicb.2017.02682
40. Maia S, Aoki JI, Laranjeira-silva MF, Zampieri A, Cristina J, Fernandes R, Muxel SM, Floeter-winter M. Arginase expression modulates nitric oxide production in *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. (2017)1–21.
41. Naderer T, McConville MJ. The *Leishmania*-macrophage interaction: A metabolic perspective. *Cell Microbiol* (2008) 10:301–308. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01096.x
42. Velasquez LG, Galuppo MK, De Rezende E, Brandão WN, Peron JP, Uliana SRB, Duarte MI, Stolf BS. Distinct courses of infection with *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* are observed in BALB/c, BALB/c nude and C57BL/6 mice. *Parasitology* (2016) 143:692–703. doi:10.1017/S003118201600024X
43. Ji J, Sun J, Qi H, Soong L. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. *Am J Trop Med Hyg* (2002) 66:338–345. doi:10.4269/ajtmh.2002.66.338
44. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, Bertran J, McLeod C, Palacín M, Modolell M, Lloberas J, et al. Arginine Transport via Cationic Amino Acid Transporter 2 Plays a Critical Regulatory Role in Classical or Alternative Activation of Macrophages. *J Immunol* (2006) 176:5918–5924. doi:10.4049/jimmunol.176.10.5918
45. Mamani-Huanca M, Muxel SM, Acuña SM, Floeter-Winter LM, Barbas C, López-González Á. Metabolomic reprogramming of c57bl/6-macrophages during early infection with *L. Amazonensis*. *Int J Mol Sci* (2021) 22: doi:10.3390/ijms22136883
46. 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. *Sci Rep* (2017) 7:1–15. doi:10.1038/srep44141
47. Acuña SM, Zanatta JM, de Almeida Bento C, Floeter-Winter LM, Muxel SM. miR-294 and miR-410 Negatively Regulate Tnfa, Arginine Transporter Cat1/2, and Nos2 mRNAs in Murine Macrophages Infected with *Leishmania amazonensis*. *Non-Coding RNA* (2022) 8:17. doi:10.3390/ncrna8010017
48. Jeong JW, Cha HJ, Han MH, Hwang SJ, Lee DS, Yoo JS, Choi IW, Kim S, Kim HS, Kim GY, et al. Spermidine protects against oxidative stress in inflammation models using macrophages and Zebrafish. *Biomol Ther* (2018) 26:146–156. doi:10.4062/biomolther.2016.272
49. O'Neill LAJ, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol* (2016) 16:553–565. doi:10.1038/nri.2016.70
50. Morris SM. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr* (2002) 22:87–105. doi:10.1146/annurev.nutr.22.110801.140547
51. Sivashanmugam M, J. J, V. U, K.N. S. Ornithine and its role in metabolic diseases: An appraisal. *Biomed Pharmacother* (2017) 86:185–194. doi:10.1016/j.biopha.2016.12.024
52. Vander Heiden MG, Locasale JW, Swanson KD, Sharfi H, Heffron GJ, Amador-Noguez D, Christofk HR, Wagner G, Rabinowitz JD, Asara JM, et al. Evidence for an alternative glycolytic pathway in rapidly proliferating cells. *Science* (80-) (2010) 329:1492–1499. doi:10.1126/science.1188015
53. Tran Q, Lee H, Park J, Kim SH, Park J. Targeting cancer metabolism - revisiting the Warburg effects. *Toxicol Res* (2016) 32:177–193. doi:10.5487/TR.2016.32.3.177
54. Ming X, Rajapakse AG, Yepuri G, Xiong Y, Carvas JM, Ruffieux J, Scerri I, Wu Z, Popp K, Li J, et al. Arginase II Promotes Macrophage Inflammatory Responses Through Mitochondrial Reactive Oxygen Species, Contributing to Insulin Resistance and Atherogenesis. *J Am Heart Assoc* (2012) 1:1–18. doi:10.1161/jaha.112.000992
55. Koo B hyeock, Hong D, Hong HD, Lim HK, Hoe KL, Won MH, Kim YM, Berkowitz DE, Ryoo S. Arginase II activity regulates cytosolic Ca²⁺ level in a p32-dependent manner that contributes to Ca²⁺-dependent vasoconstriction in native low-density lipoprotein-stimulated vascular smooth muscle cells. *Exp Mol Med* (2019) 51: doi:10.1038/s12276-019-0262-y
56. Dowling JK, Afzal R, Gearing LJ, Cervantes-Silva MP, Annett S, Davis GM, De Santi C, Assmann N, Dettmer K, Gough DJ, et al. Mitochondrial arginase-2 is essential for IL-10 metabolic reprogramming of inflammatory macrophages. *Nat Commun* (2021) 12:1–14. doi:10.1038/s41467-021-21617-2
57. Dotallevi M, Checconi P, Palamara AT, Celestino I, Coppo L, Holmgren A, Abbas K, Peyrot

- F, Mengozzi M, Ghezzi P. Glutathione Fine-Tunes the innate immune response toward antiviral pathways in a macrophage cell line independently of its antioxidant properties. *Front Immunol* (2017) 8: doi:10.3389/fimmu.2017.01239
58. Manta B, Comini M, Medeiros A, Hugo M, Trujillo M, Radi R. Trypanothione: A unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* (2013) 1830:3199–3216. doi:10.1016/j.bbagen.2013.01.013
59. Oza SL, Shaw MP, Wyllie S, Fairlamb AH. Trypanothione biosynthesis in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* (2005) 139:107–116. doi:10.1016/j.molbiopara.2004.10.004
60. Pegg AE. The function of spermine. *IUBMB Life* (2014) 66:8–18. doi:10.1002/iub.1237
61. Li C, Brazill JM, Liu S, Bello C, Zhu Y, Morimoto M, Cascio L, Pauly R, Diaz-Perez Z, Malicdan MC V., et al. Spermine synthase deficiency causes lysosomal dysfunction and oxidative stress in models of Snyder-Robinson syndrome. *Nat Commun* (2017) 8: doi:10.1038/s41467-017-01289-7
62. Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* (2006) 443:787–795. doi:10.1038/nature05292
63. Casero RA, Pegg AE. Spermidine/spermine N 1 -acetyltransferase — the turning point in polyamine metabolism. *FASEB J* (1993) 7:653–661. doi:10.1096/fasebj.7.8.8500690
64. Gavin IM, Glesne D, Zhao Y, Kubera C, Huberman E. Spermine acts as a negative regulator of macrophage differentiation in human myeloid leukemia cells. *Cancer Res* (2004) 64:7432–7438. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0051
65. Bussière FI, Chaturvedi R, Cheng Y, Gobert AP, Asim M, Blumberg DR, Xu H, Kim PY, Hacker A, Casero RA, et al. Spermine causes loss of innate immune response to *Helicobacter pylori* by inhibition of inducible nitric-oxide synthase translation. *J Biol Chem* (2005) 280:2409–2412. doi:10.1074/jbc.C400498200
66. Flamigni F, Stanic’ I, Facchini A, Cetrullo S, Tantini B, Borz  RM, Guarnieri C, Caldarera CM. Polyamine biosynthesis as a target to inhibit apoptosis of non-tumoral cells. *Amino Acids* (2007) 33:197–202. doi:10.1007/s00726-007-0514-3
67. Puntambekar SS, Davis DS, Hawel L, Crane J, Byus C V., Carson MJ. LPS-induced CCL2 expression and macrophage influx into the murine central nervous system is polyamine-dependent. *Brain Behav Immun* (2011) 25:629–639. doi:10.1016/j.bbi.2010.12.016
68. Mor n B, Spalinger M, Kasper S, Atrott K, Frey-Wagner I, Fried M, McCole DF, Rogler G, Scharl M. Activation of Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 2 by Spermidine Exerts Anti-Inflammatory Effects in Human THP-1 Monocytes and in a Mouse Model of Acute Colitis. *PLoS One* (2013) 8:1–12. doi:10.1371/journal.pone.0073703

10. Figures

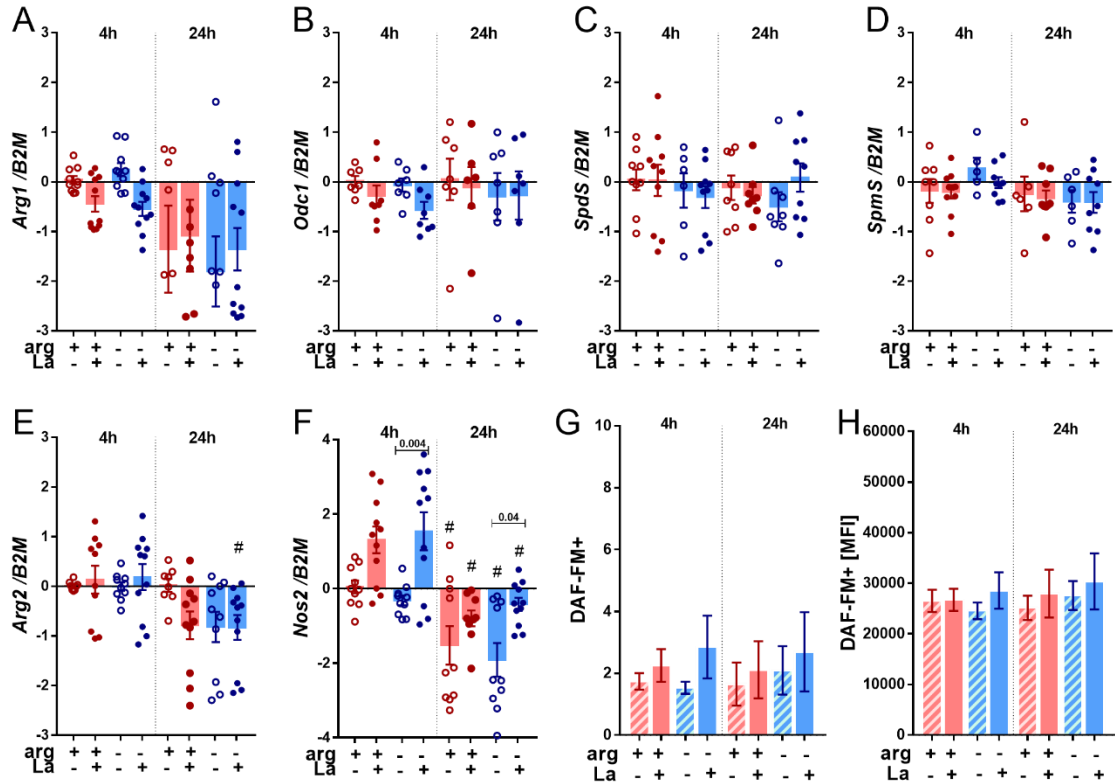


Figure 1: Relative expression of L-arginine metabolism related genes and NO production in BALB/c macrophages infected or not with *L. amazonensis* in conditions of L-arginine deprivation or supplementation. Macrophages were deprived of L-arginine (arg-) or supplemented with L-arginine (arg+) concomitant to *L. amazonensis* infection (MOI 5:1) for 4h and 24h. Relative quantification of *Arg1* (A), *Odc1* (B), *SpdS* (C), *SpmS* (D), *Arg2* (E) and *Nos2* (F) transcripts was performed by RT-qPCR. Data were normalized using β -2-microglobulin gene and uninfected macrophage arg+ at 4 h was used as reference for $\Delta\Delta$ CT relative quantification. The samples were also stained with DAF-FM to analyze the frequency of DAF-FM+ cells (G) and MFI (H) by flow cytometry. The bars represent the averages and S.E.M of the values from three independent experiments. Statistical analysis using One-Way ANOVA. #: p<0.05 for the comparison between 4h vs 24h.

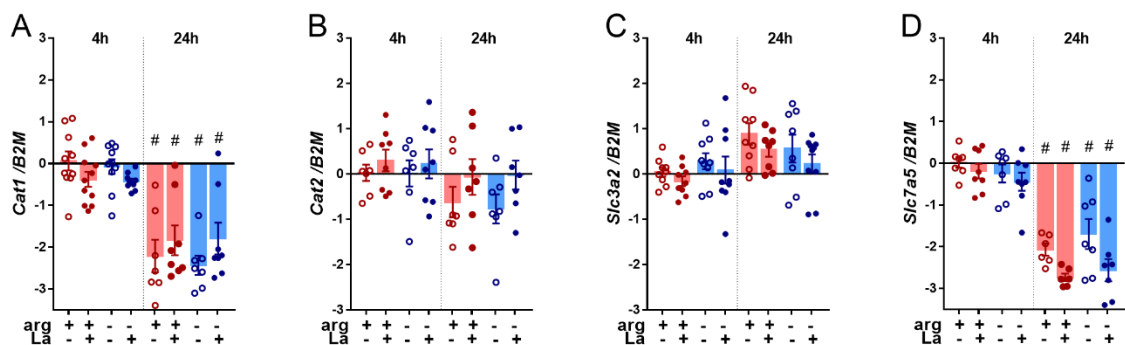


Figure 2: Relative expression of L-arginine and polyamines transporters in BALB/c macrophages infected or not with *L. amazonensis* in conditions of L-arginine deprivation or supplementation. Macrophages were deprived of L-arginine (arg-) or supplemented with L-arginine (arg+) concomitant to *L. amazonensis* infection (MOI 5:1) for 4h and 24h. Relative quantification of *Slc3a2* (A) e *Slc7a5* (B) transcripts was performed by RT-qPCR. Data were normalized using β -2-microglobulin gene and uninfected macrophage arg+ at 4 h was used as reference

for $\Delta\Delta\text{CT}$ relative quantification. The bars represent the averages and S.E.M of the values from three independent experiments. Statistical analysis using One-Way ANOVA. #: $p \leq 0.05$ for the comparison between 4h vs 24h.

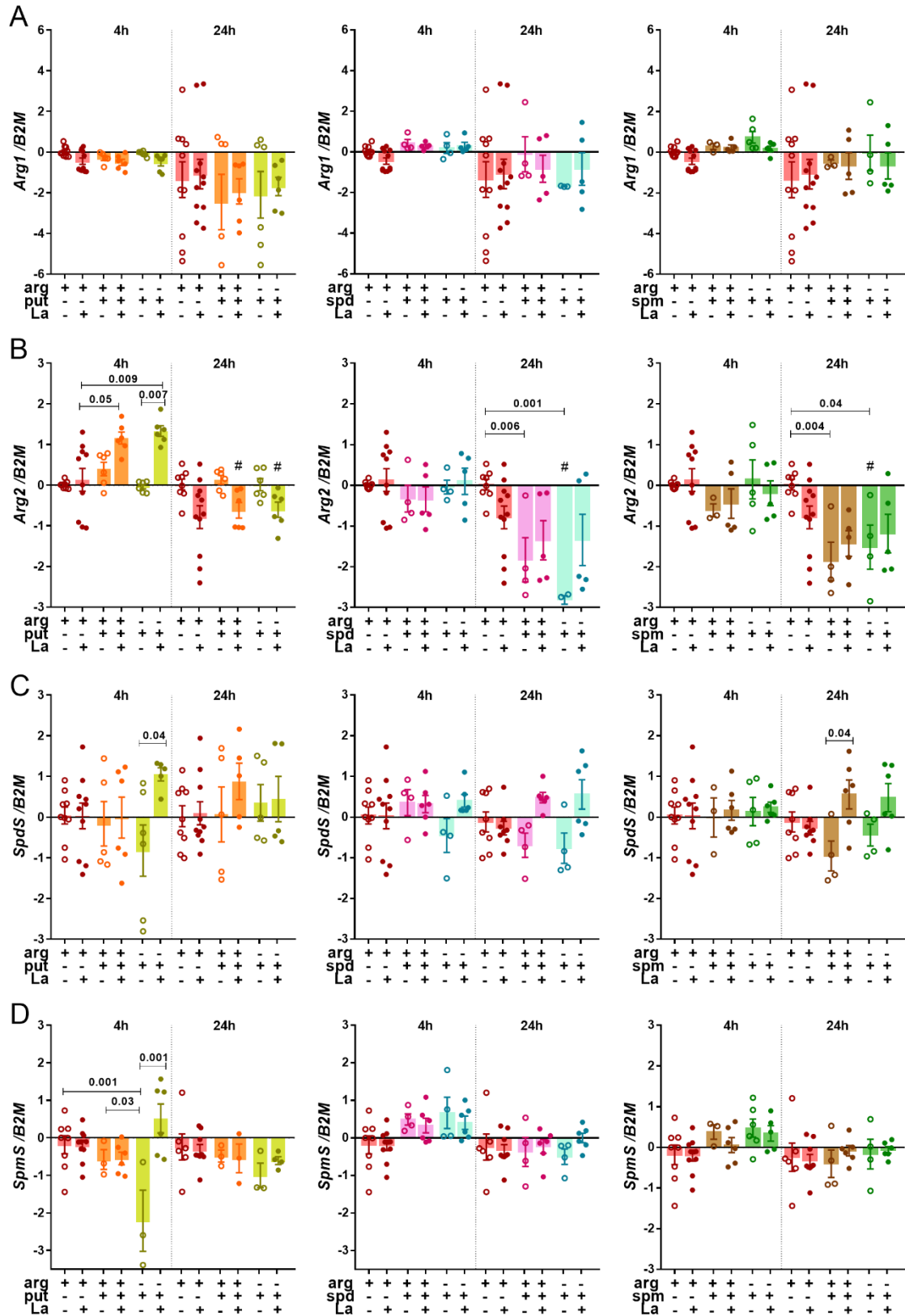


Figure 3: Relative expression of polyamine biosynthesis related genes in BALB/c macrophages infected or not with *L. amazonensis* with or without polyamine supplementation. Macrophages were supplemented with putrescine (put+), spermidine (spd+), spermine (spm+) with or without L-arginine (arg+) concomitant to *L. amazonensis* infection (MOI 5:1) for 4h, and after 24h in complete medium. The RNA was extracted for cDNA conversion and relative quantification of genes *Arg1* (A), *Arg2* (B), *SpdS* (C) and *SpmS* (D) by RT-qPCR. Data were normalized using β -2-microglobulin gene and the uninfected macrophage arg+ at 4 h was used as reference in $\Delta\Delta$ CT relative quantification. The bars represent the averages and S.E.M of the values from three independent experiments. Statistical analysis using One-Way ANOVA was indicated in the bars. #: $p \leq 0.05$ for the comparison between 4h vs 24h.

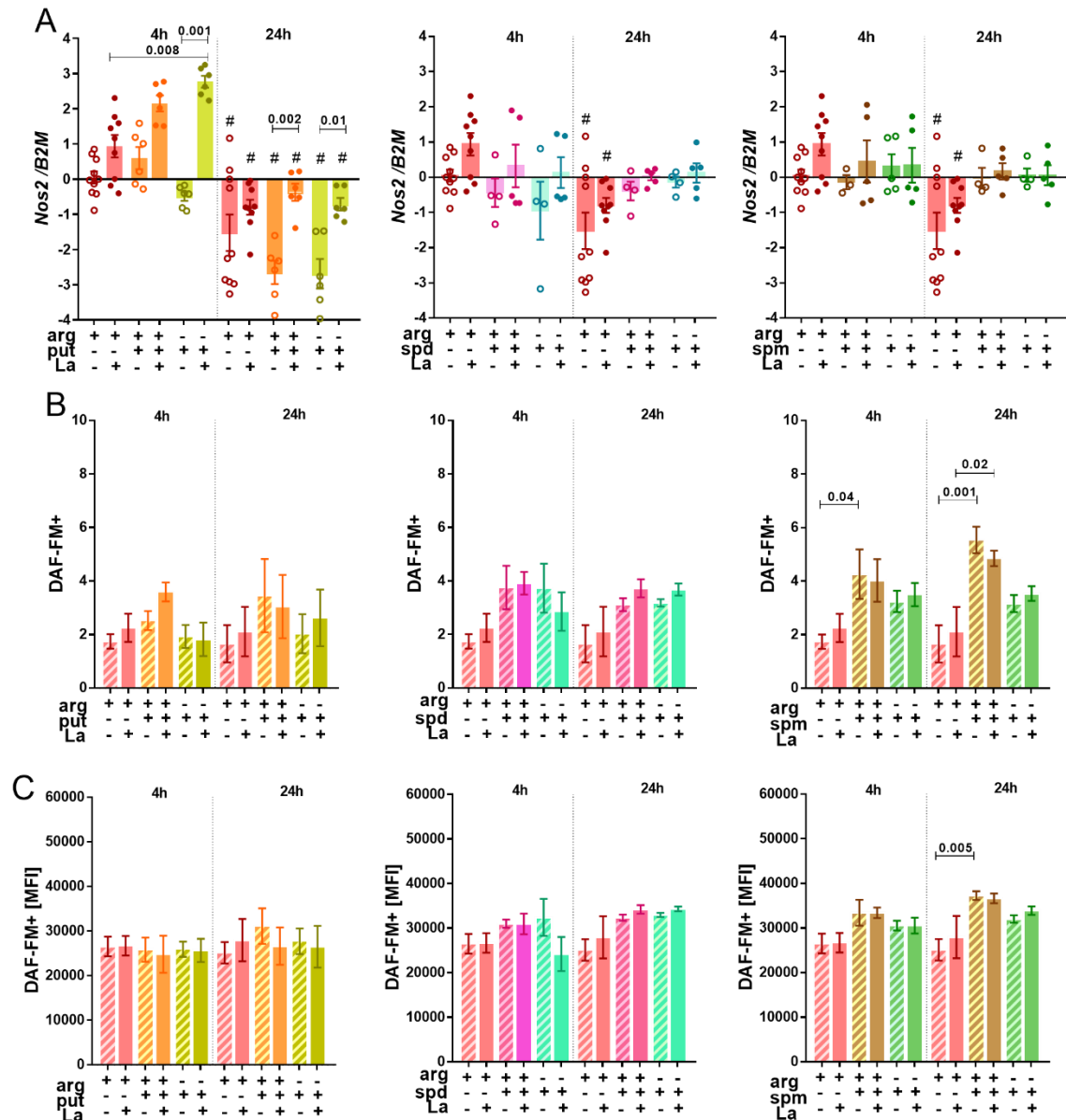


Figure 4: Relative expression of *Nos2* and NO production in BALB/c macrophages infected or not with *L. amazonensis* with or without polyamines supplementation. Macrophages (5×10^6) (A) and (1×10^6) (B-C) were supplemented with putrescine (put+), spermidine (spd+), spermine (spm+) with or without L-arginine (arg+) concomitant to *L. amazonensis* infection (MOI 5:1) for 4h, and after 24h in complete medium. The RNA was extracted for cDNA conversion and relative quantification of genes *Nos2* (A) by RT-qPCR. Data were normalized using β -2-microglobulin gene and the uninfected macrophage arg+ at 4 h was used as reference for $\Delta\Delta$ CT relative quantification. The samples were also stained with DAF-FM for flow cytometry analysis

of DAF-FM+ cells (B) and MFI (C). The bars represent the averages and S.E.M of the values from three independent experiments. Statistical analysis using One-Way ANOVA was indicated in the bars. #: $p \leq 0.05$ for the comparison between 4h vs 24h.

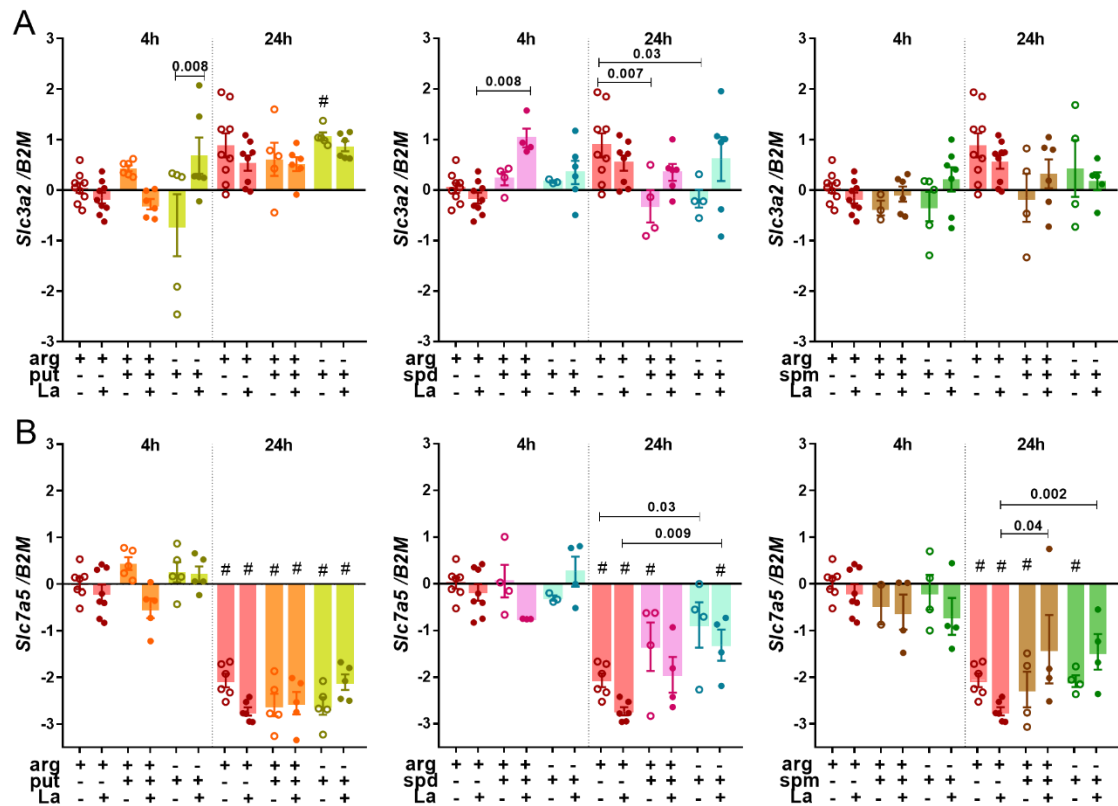


Figure 5: Relative expression of L-arginine and polyamines transporters in BALB/c macrophages infected or not with *L. amazonensis* with or without polyamines supplementation. Macrophages were supplemented with putrescine (put+), spermidine (spd+), spermine (spm+) with or without L-arginine (arg+) concomitant or not to *L. amazonensis* infection (MOI 5:1) for 4h, and after 24h in complete medium. RNA was extracted for cDNA conversion and quantification of *Slc3a2* (A) and *Slc7a5* transcripts (B) by RT-qPCR. Data were normalized using β -2-microglobulin gene and the uninfected macrophage arg+ at 4 h was used as reference for $\Delta\Delta$ CT relative quantification. The bars represent the averages and S.E.M of the values from three independent experiments. Statistical analysis using One-Way ANOVA was indicated in the bars. #: $p \leq 0.05$ for the comparison between 4h vs 24h.

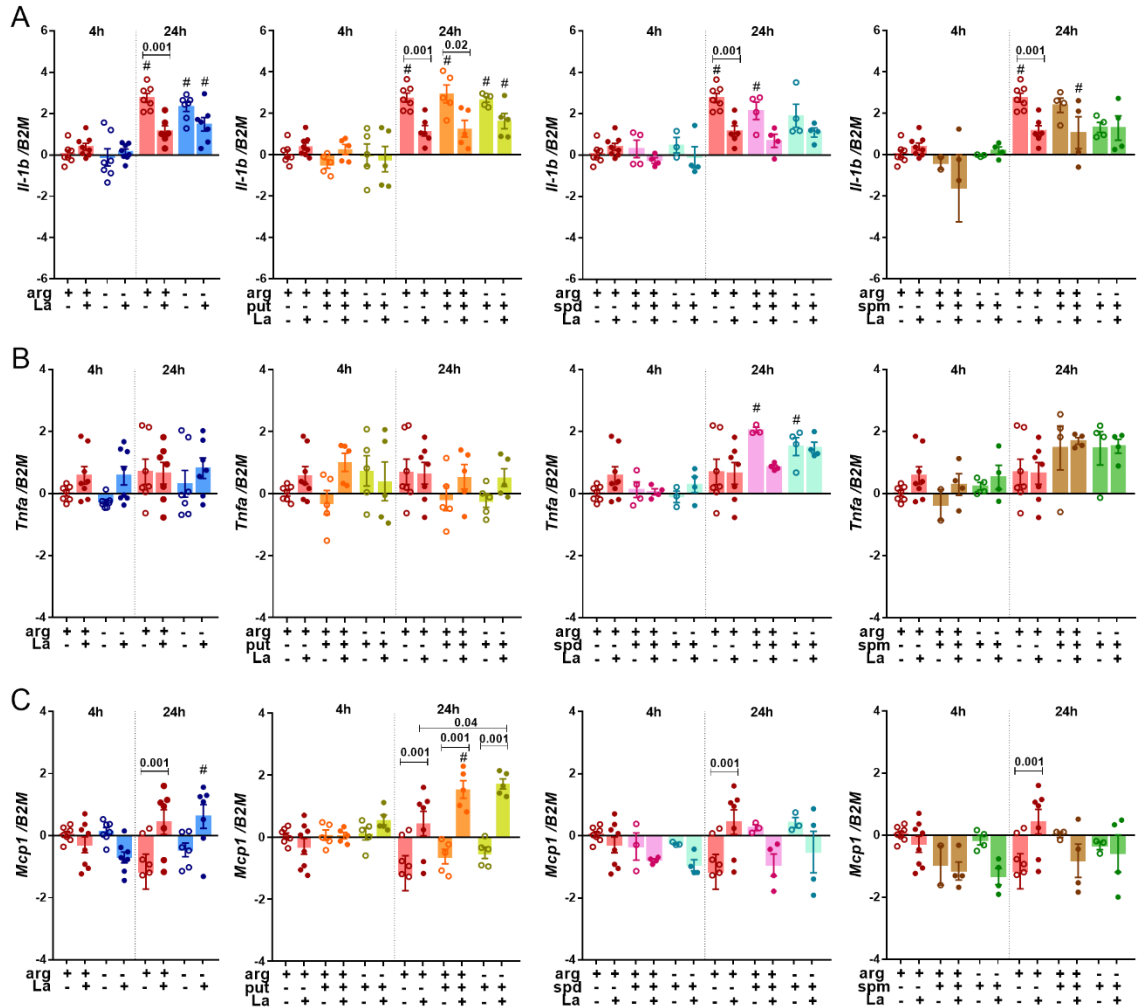
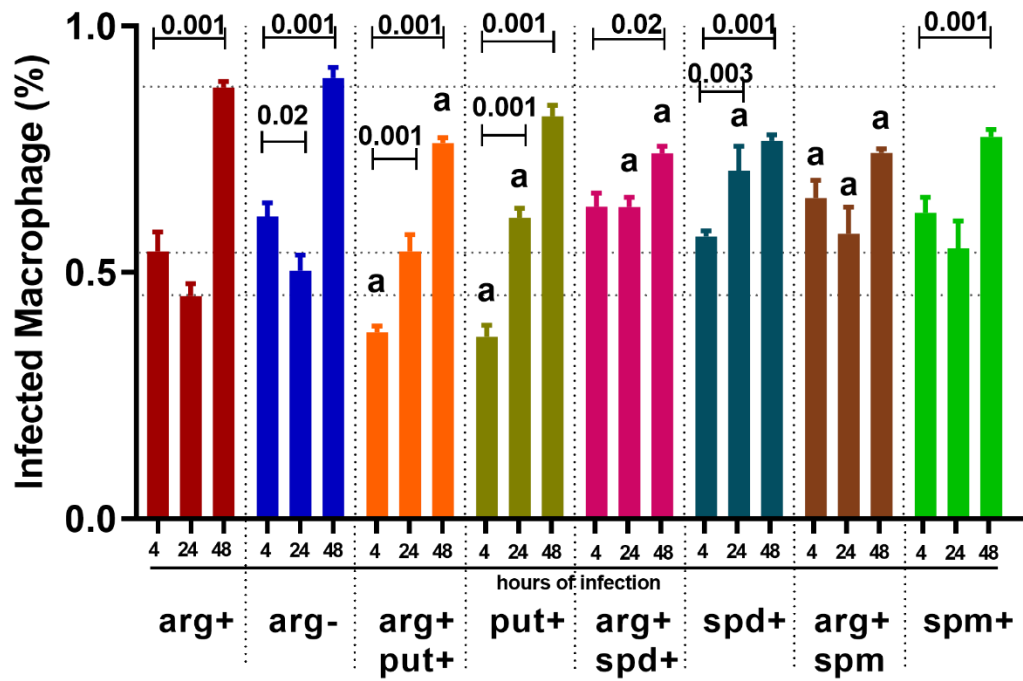


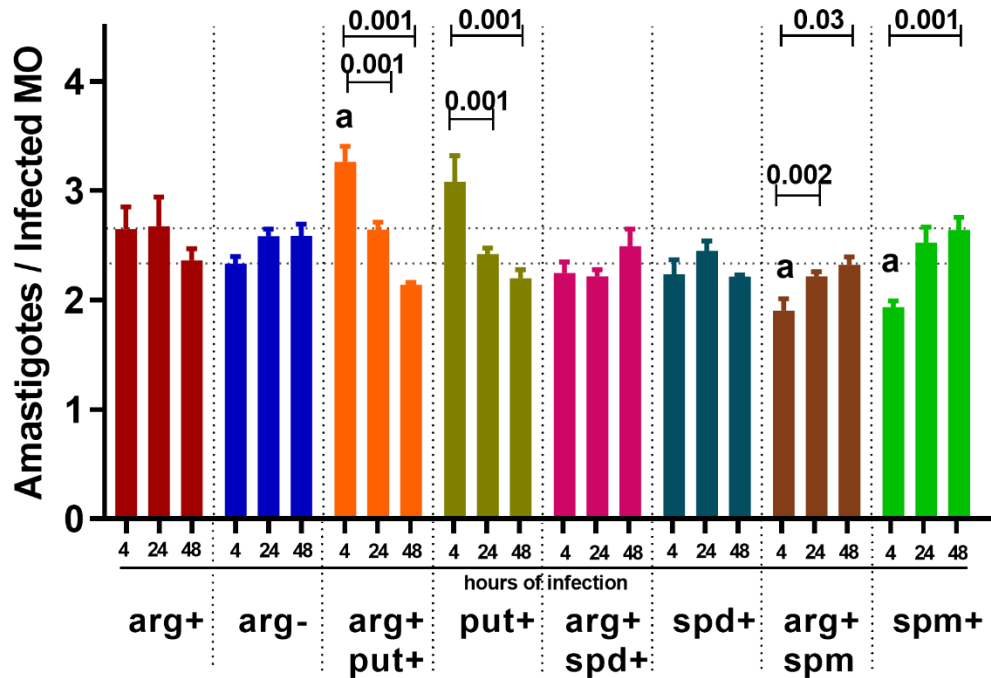
Figure 6: Relative expression of pro-inflammatory cytokines in BALB/c macrophages infected or not with *L. amazonensis* with or without polyamines supplementation. Macrophages were supplemented with putrescine (put+), spermidine (spd+), spermine (spm+) with or without L-arginine (arg+) concomitant or not to *L. amazonensis* infection (MOI 5:1) for 4h, and after 24h in complete medium. RNA was extracted for cDNA conversion and relative quantification of genes *Il-1b* (A), *Tnfa* (B) e *Mcp1* (C) by RT-qPCR. Data were normalized using β -2-microglobulin gene and uninfected macrophage arg+ at 4 h was used as reference for $\Delta\Delta$ CT relative quantification. The bars represent the averages and S.E.M of the values from three independent experiments. Statistical analysis using One-Way ANOVA was indicated in the bars. #: $p \leq 0.05$ for the comparison between 4h vs 24h.

Figure 7: Effect of polyamine supplementation in infection of BALB/c macrophages with *L. amazonensis*. Macrophages (2×10^5) were deprived (arg-) or supplemented (arg+) with L-arginine and/or putrescine (put+), spermidine (spd+), spermine (spm+) concomitant to *L. amazonensis* infection (MOI 5:1) for 4h, 24 and 48h. Cells were stained using Panoptic to determine the percentage of infected macrophage (A) and the number of amastigotes per macrophage. Each bar represents the mean \pm S.E.M of the values obtained in 2 independent experiments (n = 500 macrophages). One-Way ANOVA analysis indicates less or equal values or symbols above the bars. a: $p \leq 0,05$ for the comparison between 4h vs 24h.

A



B



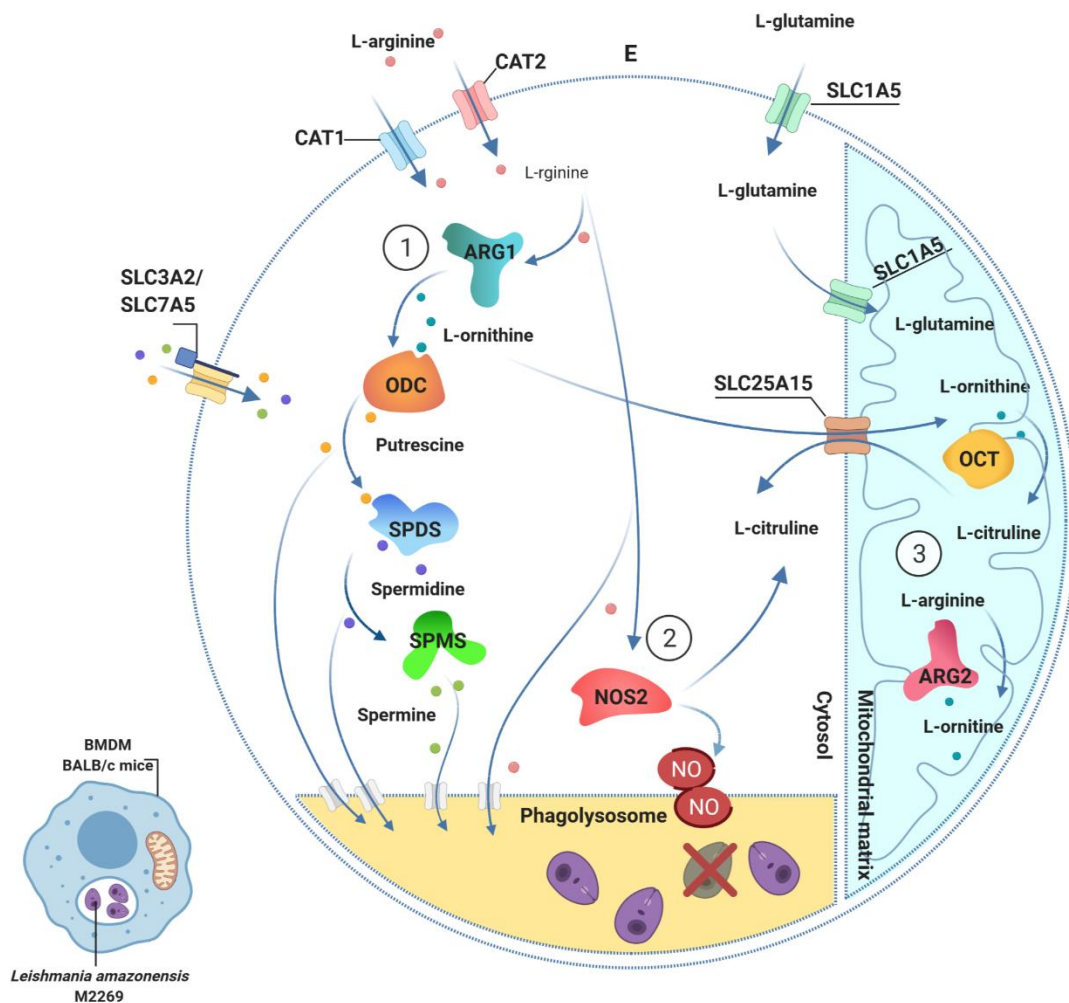


Figure 8: L-arginine and polyamines metabolism in BALB/c macrophage during infection with *L. amazonensis*. The L-arginine transporters CAT1 and CAT2, and the heterodimeric amino acid and polyamines transporter SLC3A2/SLC7A5 are shown in the plasmatic membrane. The amino acid and polyamines transporters can also mediate transport in phagolysosome membrane. The L-glutamine antiporter SLC1A5 is shown in the mitochondrial membrane. SLC25A15 performs the L-citrulline and L-ornithine antiport between the mitochondria and cytosol. In (1) are enzymes from polyamines biosynthesis: arginase 1 (ARG1) converts L-arginine into ornithine, which is subsequently converted by ornithine decarboxylase 1 (ODC1) into putrescine. Putrescine is converted by spermidine synthase (SPDS) into spermidine; and spermidine is converted by spermine synthase (SPMS) into spermine. In (2), nitric oxide 2 (NOS2) enzyme uses L-arginine to produce nitric oxide (NO) and citrulline. In (3), mitochondrial arginase 2 (ARG2) enzyme uses L-arginine to produce ornithine. E, extracellular environment. Created with Biorender.com.

Article

miR-294 and miR-410 Negatively Regulate *Tnfa*, Arginine Transporter *Cat1/2*, and *Nos2* mRNAs in Murine Macrophages Infected with *Leishmania amazonensis*

Stephanie Maia Acuña ^{1,*}, Jonathan Miguel Zanatta ¹, Camilla de Almeida Bento ¹, Lucile Maria Floeter-Winter ¹ and Sandra Marcia Muxel ^{1,2,*}

¹ Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-090, SP, Brazil; jonathanzanatta@usp.br (J.M.Z.); camillabento@usp.br (C.d.A.B.); lucile@usp.br (L.M.F.-W.)

² Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-020, SP, Brazil

* Correspondence: stephanie.acuna@usp.br (S.M.A.); sandramuxel@usp.br (S.M.M.)

Abstract: MicroRNAs are small non-coding RNAs that regulate cellular processes by the post-transcriptional regulation of gene expression, including immune responses. The shift in the miRNA profiling of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis* can change inflammatory response and metabolism. L-arginine availability and its conversion into nitric oxide by nitric oxide synthase 2 (*Nos2*) or ornithine (a polyamine precursor) by arginase 1/2 regulate macrophage microbicidal activity. This work aimed to evaluate the function of miR-294, miR-301b, and miR-410 during early C57BL/6 bone marrow-derived macrophage infection with *L. amazonensis*. We observed an upregulation of miR-294 and miR-410 at 4 h of infection, but the levels of miR-301b were not modified. This profile was not observed in LPS-stimulated macrophages. We also observed decreased levels of those miRNAs target genes during infection, such as Cationic amino acid transporters 1 (*Cat1/Slc7a1*), *Cat2/Slc7a22* and *Nos2*; genes were upregulated in LPS stimuli. The functional inhibition of miR-294 led to the upregulation of *Cat2* and *Tnfa* and the dysregulation of *Nos2*, while miR-410 increased *Cat1* levels. miR-294 inhibition reduced the number of amastigotes per infected macrophage, showing a reduction in the parasite growth inside the macrophage. These data identified miR-294 and miR-410 biomarkers for a potential regulator in the inflammatory profiles of macrophages mediated by *L. amazonensis* infection. This research provides novel insights into immune dysfunction contributing to infection outcomes and suggests the use of the antagomiRs/inhibitors of miR-294 and miR-410 as new therapeutic strategies to modulate inflammation and to decrease parasitism.

Keywords: microRNA; macrophage; *Leishmania*; nitric oxide synthase 2; *Cat2/Slc7a2*; *Tnfa*



Citation: Acuña, S.M.; Zanatta, J.M.; de Almeida Bento, C.; Floeter-Winter, L.M.; Muxel, S.M. miR-294 and miR-410 Negatively Regulate *Tnfa*, Arginine Transporter *Cat1/2*, and *Nos2* mRNAs in Murine Macrophages Infected with *Leishmania amazonensis*. *Non-coding RNA* **2022**, *8*, 17. <https://doi.org/10.3390/ncrna8010017>

Academic Editor: George A Calin

Received: 17 September 2021

Accepted: 29 October 2021

Published: 6 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs with 18–25 nucleotides that mediate the post-transcriptional regulation of the genes involved in physiological and pathological conditions, including the inflammatory response [1,2]. miRNAs are transcribed from intergenic, exonic, or intronic regions by the RNA polymerase II and are processed into primary miRNA transcripts (pri-miRNA), and they subsequently enter the precursor (pre-miRNA) and mature form across a series of steps involving class 2 RNAse III DROSHA and Dicer [3,4]. miRNAs recognize the complementary sequences in the 3' untranslated regions (3'UTR) of given transcripts, which cause their degradation or translational repression [3,4]. miRNA dysregulation occurs through various mechanisms, encompassing perturbations of miRNA transcription, epigenetic mechanisms, and disruption of the miRNA synthesis machinery [5].

Different miRNA expressions display macrophage polarization during infection, affecting the macrophage activation and the polarization to classically characterized M1-pro-inflammatory or M2-anti-inflammatory/pro-resolution phenotype [6]. The regulation of

cytokine/chemokine production, such as by interferon-gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) as well as the activation of Toll-like receptor (TLR), leads to macrophage differentiation into the M1 phenotype, which increases nitric oxide synthase 2 (NOS2) expression and NO production with microbicidal activity. Moreover, interleukin 4 (IL-4), IL-13, transforming growth factor-beta (TGF- β), IL-10, and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) differentiate macrophages into the M2 phenotype, expressing higher levels of arginase 1 (ARG1) and polyamine production [7].

Leishmaniasis is a neglected tropical disease that is caused by the *Leishmania* parasite, which manifests through a broad range of clinical outcomes, from cutaneous to visceral disease, depending on the species that is infecting the host. *Leishmania amazonensis* causes a cutaneous disease [8–10]. The parasite switches between an invertebrate host (sand fly *Phlebotomus* or *Lutzomyia*) and vertebrate hosts, such as mammals, rodents, and humans. The infected sand fly regurgitates the promastigotes form of *Leishmania* during the bite, which is recognized and phagocytosed by the resident macrophages, and it differentiates into the amastigotes form [11–13]. *Leishmania* is dependent on the host's L-arginine metabolism for polyamines to proliferate and establish a successful infection [14–16]. However, the host's immune response also uses this amino acid to produce NO, leading to parasite clearance [17,18]. In this case, the amino acid used can indicate how the macrophages polarize on the M1/M2 dichotomy [14,19]. In this scenario, miRNAs can act as regulators of how the cells decide to use the amino acid.

Over the past two decades, the regulation of the physiological and pathophysiological processes mediated by miRNAs has been widely studied, including in cancer studies and in studies on inflammatory and infectious diseases [5,20–23], as has the identification of miRNAs as a biomarker for infection and for the prognosis of diseases [24–26]. Our previous data revealed that the entrance of the parasite into the macrophages initiated the expression of miRNAs. miR-294 was upregulated after 4 and 24 h of infection with BMDM from BALB/c mice [27]. Additionally, the expression of that miRNA was inversely proportional to the expression of *Nos2*/NOS2, suggesting that they could be interacting with the *Nos2* 3'UTR. We demonstrated that this miRNA could bind to the 3'UTR portion of the mRNA. Functional inhibition led to an overexpression of *Nos2*/NOS2 [27], which plays a key role in the macrophage polarization and leads to susceptibility to the infection. Later, we demonstrated that the treatment of these macrophages with melatonin regulated not only the miR-294 expression but also the *Nos2* and *Tnfa* transcripts [3]. After that, we showed that miR-294 expression was independent of TLR-2, TLR-4, or MyD88 in C57BL/6J-macrophages infected with *L. amazonensis* [28]. Those data suggest a role of miR-294 in the regulation of pro-inflammatory response of macrophages, guiding us to evaluate miR-294 function in C57BL/6J murine macrophages, a resistant model for *L. amazonensis* infection both in vitro and in vivo [29–33].

This study analyzes how miR-294 and two other miRNAs, miR-301b and miR-410, can target *Nos2*, *Arg1*, *Odc1*, *Slc7a1* *Slc7a2*, and *Tnfa* mRNAs and regulate L-arginine metabolism-related genes during C57BL/6 macrophage infection with *L. amazonensis*. Our findings revealed that *L. amazonensis* upregulated miR-294 and miR-410 but not miR-301b after 4 h of infection. On the other hand, the *Slc7a1* L-arginine transporter was downregulated during the infection, and *Nos2*, *Arg1*, *Odc1*, and *Slc7a2* were expressed at similar levels in uninfected macrophages. LPS stimulation presented a distinct profile with reduced miRNAs and increased *Nos2*, *Arg1* *Slc7a1*, *Odc1*, *Arg22* *Slc7a2*, and *Tnfa*. In addition, the functional inhibition of miR-294 upregulated the levels of *Slc7a2* and *Tnfa* and dysregulated *Nos2* levels, reducing the parasite growth inside the macrophages. Additionally, the functional inhibition of miR-410 upregulated *Slc7a1* mRNA levels, showing a new miRNA–mRNA interaction that can impact infectivity. Our data bring perspectives on the function of the altered expression of miR-294 and miR-410 upon *L. amazonensis* infection and on the existence of miRNAs as biomarkers, which shift the inflammation and impact parasite growth.

2. Results

2.1. miR-294-3p, miR-301b-3p, and miR-410-3p Target the L-Arginine Metabolic Pathway

It is well-known that L-arginine metabolism contributes to macrophage polarization to the M1 or M2 phenotype. We have already demonstrated that macrophage infection with *L. amazonensis* promotes alterations to this scenario, leading to an M2-like macrophage phenotype in the early stages of infection [34]. To understand the impact of miRNAs on L-arginine metabolism in C57BL/6 macrophages, we focused on the analysis of transcript levels of two arginine transporters (*Slc7a1* and *Slc7a2*—Cationic Amino Acids 1 and 2, respectively), Arginases 1 and 2 (*Arg1* and *Arg2*), Nitric Oxide Synthase 2 (*Nos2*), and Ornithine Decarboxylase 1 (*Odc1*). Together, these genes are involved in the uptake and the first step of arginine metabolism to produce NO or polyamine biosynthesis (Figure 1).

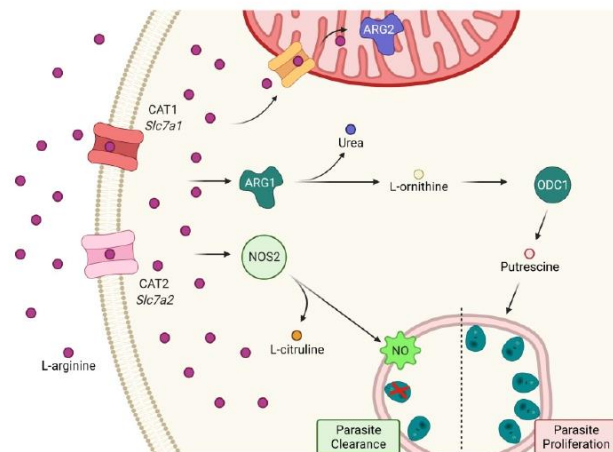


Figure 1. MicroRNAs can regulate the inflammatory branch of L-arginine uptake and consumption of infected macrophages with *Leishmania amazonensis*. Cells use L-arginine as one of the markers of macrophage polarization into the M1 or M2 phenotypes. During infection with *L. amazonensis*, macrophages obtain L-arginine via Cationic Amino Acid Transporters 1 and 2 (CAT1 and CAT2, encoded by the Solute Carrier Transporter family members *Slc7a1* and *Slc7a2*). Once inside, the amino acid can be used by Nitric Oxide Synthase 2 (NOS2) to produce the NO free radical, which kills the parasite when at high levels. L-citrulline is a side product of this reaction. Another use of L-arginine is its metabolism into urea and L-ornithine via Arginase 1 (ARG1). Once converted into L-ornithine, it starts the polyamine synthesis pathway, of which Ornithine Decarboxylase 1 (ODC1) is the first branch enzyme. It is accepted that polyamines promote *Leishmania* survival and proliferation. L-arginine can also be transported to the mitochondrion, where it is also converted to urea and L-ornithine. However, the effects of this mitochondrial L-ornithine production are still poorly understood in the inflammatory context. This panel was created with BioRender.com online tool.

Using *in silico* analysis, we found miRNAs, such as miR-294-3p, miR-301b-3p, and miR-410-3p, binding onto the 3'UTR of those gene transcripts, indicating an intricate network of post-transcriptional gene regulation in L-arginine uptake by transporters and their metabolism beyond just NO production, as we observed previously for miR-294-3p [27]. Focusing on the inflammatory branch of this pathway, in Figure 2A–C, we showed the predicted binding sites of miR-294-3p, miR-301b-3p, and miR-410-3p.

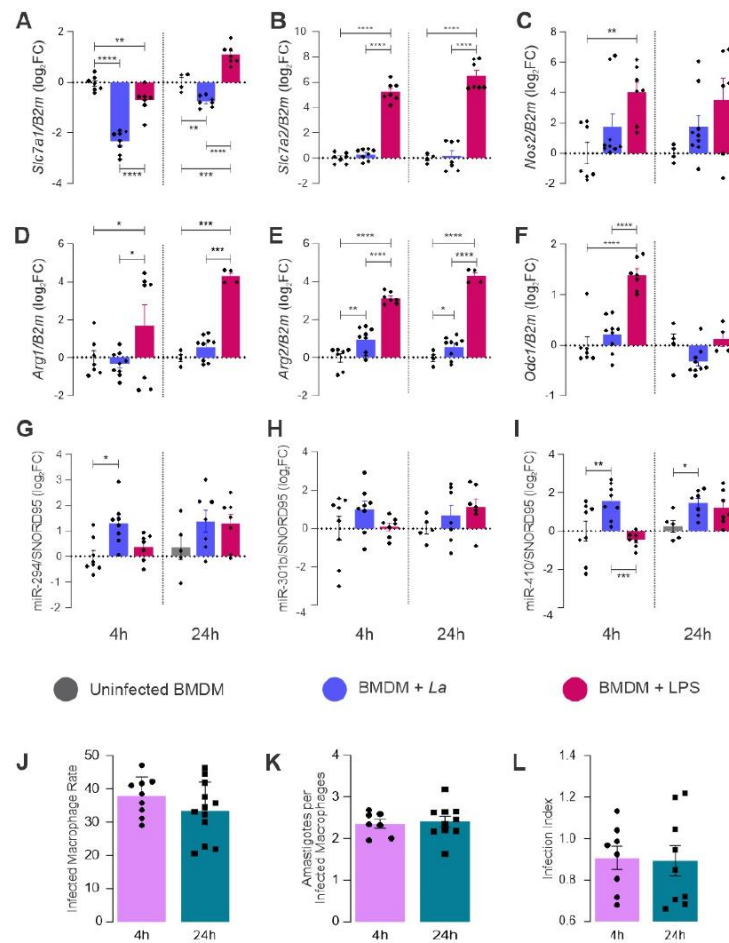


Figure 3. Quantification of L-arginine metabolism-related gene transcripts and miRNA levels on macrophages infected with *L. amazonensis*. Bone Marrow Derived-Macrophages were infected with stationary phase *L. amazonensis* promastigotes (MOI 1:5) or treated with LPS for 4 and 24 h. The total RNA was extracted and converted into cDNA to quantify transcripts of genes related to L-arginine metabolism through RT-qPCR: (A) *Slc7a1* (B) *Slc7a2* (C) *Nos2*, (D) *Arg1* (E) *Arg2* and (F) *Odc1*. The miRNAs levels were assessed through RT-qPCR: (G) miR-294, (H) miR-301b (I), and miR-410. The infected BMDM were fixed and Giemsa stained to assess the number of total macrophages ($n = 600$), infected macrophages and amastigotes. (J) infected macrophage rate [(infected macrophage/total macrophage) * 100], (K) amastigotes per infected macrophage, and the product of infected macrophages rate with amastigotes per infected macrophage; (L) infection index (rate of infected macrophages multiplied by number of amastigotes per infected macrophage). Statistics: Each dot represents a biological replicate from three independent experiments. Mixed-effects analysis, post hoc test: Sidak's multiple comparisons. p -values: *, $p \leq 0.05$. **, $p \leq 0.01$, ***, $p \leq 0.0005$, ****, $p \leq 0.0001$.

It was expected that *Arg1* would decrease to support *Nos2* L-arginine consumption when receiving an inflammatory stimulus. We observed that LPS stimulation increased *Arg1* expression, which was not observed during infection (Figure 3D). However, the infection did not increase or decrease, showing similar behavior to the arginine transporter (*Slc7a2*). The mitochondrial isoform of Arginase (*Arg2*) is also slightly regulated by infection with *L. amazonensis* at 4–24 h and LPS stimulation at 4 and 24 h. Although the inflammatory stimulus is a signal to increase *Arg2* transcription, the parasite signalization was not as high as the LPS in both of the tested periods (Figure 3E). Ornithine decarboxylase is the first enzyme committed to polyamine production from L-arginine metabolism. It was expected that if the inflammatory branch of the L-arginine metabolism pathway were not working, then the anti-inflammatory one would be, increasing the polyamine production. However, we did not observe an increase in the *Odc1* transcription during infection (Figure 3F). Even in the LPS stimulation, it was increased after 4 h.

Regarding miRNA expression, we observed that the infection promoted an increase in the level of miR-294 after 4 h of infection, sustaining the same expression level at 24 h. However, LPS stimulation did not promote a modulation at 4–24 h (Figure 3G). The infection and LPS stimulation did not modulate the miR-301b levels (Figure 3H) significantly.

The infected macrophages showed an increase in the levels of miR-410, while the LPS-stimulated ones showed a significant reduction at 4 h compared to infected individuals (Figure 3I). After 24 h, the infection led to sustained miR-410 expression. The infection led to a faster response when increasing miR-294 and miR-410; this effect was not observed during the LPS stimulation, as there was a classical M1 activator that did not interfere with these miRNAs in the studied periods.

The microscopical quantification of infection showed similar levels of infected macrophages, numbers of amastigotes per infected macrophage, and the infection index (Figure 3C), as previously shown by Muxel [28].

2.3. miRNAs Targeting mRNA from Arginine Metabolism Shift the Macrophage Response to *Leishmania*

Based on miRNA binding site prediction and miRNA modulation during C57BL/6 macrophage infection with *L. amazonensis*, we performed a miRNA inhibition assay for the miR-294, miR-301b, and miR-410 sequences in order to understand their functions in the infection context (Figure 4). The transfection with negative control was used as the baseline for evaluating the effect of the control and experimental miRNA inhibitor on the expression of miRNA and target-genes for all of the tested times. The miR-294 inhibitor led to a consistent decrease in the miRNA expression at 4 h of infection, which was sustained at 24 h. However, miR-301b did not respond to the inhibition at any tested time (Figure 4A). miR-410 tended to reduce its expression after 4 h of infection, but the inhibition did not significantly decrease the miRNA amount. However, miR-410 had a higher expression than the negative control after 24 h of infection (Figure 4A).

Since we chose miRNAs with the predicted binding site of the 3'UTR of the target genes *Nos2*, *Cat2/Slc7a2*, and *Cat1/Slc7a1* and because the genes were increased during LPS stimulation but not during infection, it was expected that inhibition would increase the expression of the target mRNAs. We observed this phenomenon in two of the tested target genes. The functional inhibition of miR-294 and miR-301b increased the expression of *Nos2* levels slightly at 4 h of infection, which was not significant. Despite that, the inhibition of miR-294 and miR-301b significantly reduced *Nos2* levels at 24 h compared to the negative control (Figure 4B), showing the role of these miRNAs in the dysregulation of *Nos2* mRNA. miR-294 also targets *Slc7a2*. We monitored whether the infection would promote an increase in the number of transcripts of the transporter in miR-294 inhibition and found a significant increase after 24 h of infection.

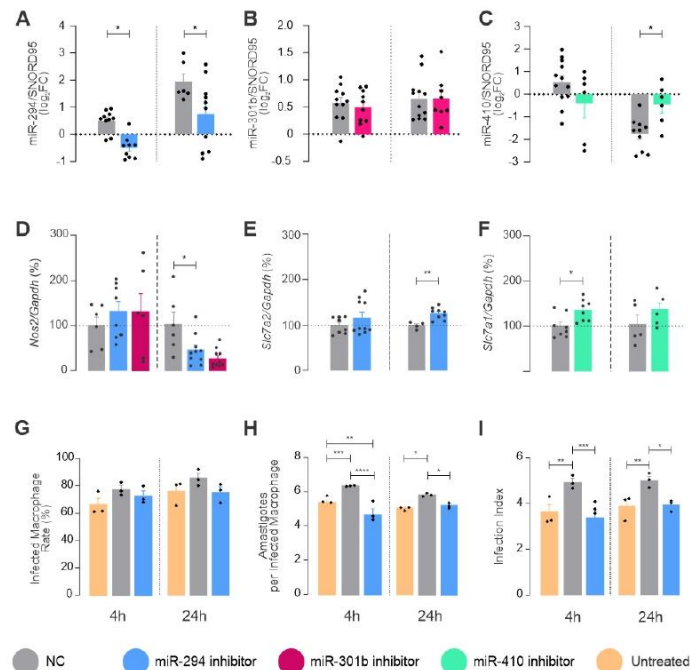


Figure 4. miRNA functional inhibition. Bone marrow derived macrophages were transiently transfected with specific miRNA inhibitors or negative control (NC) and were then infected with *L. amazonensis* for 4 or 24 h. Total RNA was extracted to quantify miRNA levels: (A) miR-294, (B) miR-301b, and (C) miR-410; Or to assess the levels of mRNA targets after inhibition: (D) *Nos2*, (E) *Slc7a2* and (F) *Slc7a1*. The infected BMDM were fixed and Giemsa stained to assess the number of total macrophages ($n = 300$), infected macrophages and amastigotes: (G) infected macrophage rate [(infected macrophage/total macrophage) * 100], (H) amastigotes per infected macrophage, (I) infection index. Statistics: Each dot represents a biological replicate from three independent experiments. Mixed-effects analysis, post hoc test: Sidak's multiple comparisons. p -values: *, $p \leq 0.05$. **, $p \leq 0.001$, ***, $p \leq 0.0005$. ****, $p \leq 0.0001$.

On the other hand, the arginine transporter variant *Slc7a1* is a target of miR-410, and miR410-inhibition increased the expression of *Slc7a1* after 4 h of infection compared to the negative control (Figure 4B).

Regarding the infectivity parameters (Figure 4C), we studied the inhibition of miR-294 compared to the negative control, but the negative control itself promoted a slight increase in the infected macrophage rate and the number of amastigotes per infected macrophage. The infection index was statistically significant when compared to untreated macrophages. On the other hand, treatment with the miR-294 inhibitor promoted a reduction in the number of amastigotes per infected macrophage, reducing the infectivity index at 4 and 24 h compared to the negative control.

2.4. miR-294 and miR-301b Can Also Interact with Other Inflammatory Factors during Macrophage Infection with *L. amazonensis*

Inflammatory stimuli can trigger some signaling cascades, the function of which is to regulate the response, both positively and negatively. M1 macrophages produce TNF

The involvement of *Leishmania* factors impacting miRNAs and subverting macrophage responses, such as glycoprotein GP63 of *Leishmania donovani* targeting the host-Dicer1, results in the downregulation of miR-122 and an increase in the parasite burden in the mouse liver [37], which can globally affect the host-miRNAs and post-transcriptional regulation of gene expression. Indeed, *L. amazonensis*-arginase indirectly interferes with an increase of miR-294 and miR-721, targeting *Nos2* and NO production in BALB/c murine macrophages [27]. Infection with *L. amazonensis* induces miR-30e and miR-302d, which regulate *Nos2* and NO levels and miR-294 and miR-302d, which regulate *Tnfa* levels, in BALB/c-BMDM [38]. *L. major*-infected human macrophages present with the dysregulation of miRNAs and their corresponding chemokine targets [39]. In *L. major* infection of human macrophages, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1 α) regulates miR-210 levels, linking HIF-1 α to susceptibility in other species, such as *L. donovani* and *L. amazonensis* [40,41]. miR-146a overexpression downregulates M1 markers such as *Tnfa* and *Nos2*, increasing *Arg1* and IL-10 in *L. donovani*-infected BMDM [42]. Let-7e interferes in TLR, NF κ B, IRF, and MAPK signaling in B6-BMDM infected with *L. amazonensis* [28]. However, the association between miRNAs and *Leishmania* diseases will only be fully understood once the genetic background is complete as well as when we have an understanding of the parasite species that could interfere in the post-transcriptional regulation mediated by miRNAs.

Once the modulation of *Arg1* and *Nos2* as well as *Tnfa* was implicated in the activation of the macrophage inflammatory response and the control of the parasite infection [7], we predicted that the miRNA interactions would be focused on the genes involved or correlated to arginine metabolism, which is implicated in amino acid transport (*Cat1/Slc7a1* and *Cat2/Slc7a2*), polyamine production (*Arg12*, *Arg22* and *Odc1*), and NO production (*Nos2*) (Figure 1). We found that miR-294-3p interacts with *Nos2* (as previously validated) and predicted the targets of *Cat1/Slc7a1* and *Cat2/Slc7a2*; miR-301b-3p can predict the targets of *Cat1/Slc7a1* and *Arg2*; and miR-410-3p can predict the targets *Cat1/Slc7a1* and *Nos2*. The analysis of the quantities of target genes and miRNAs in B6-macrophages infected with *L. amazonensis* showed lower *Cat1/Slc7a12*, *Cat2/Slc7a22*, *Nos22*, *Arg12* and *Odc1* and increased levels of miR-294-3p, miR-301b-3p, and miR-410-3p. miR-301b-3p and miR-410-3p are not modulated in BALB/c-macrophages infected with *L. amazonensis*, but *Cat1/Slc7a12*, *Cat2/Slc7a22* and *Arg1* are expressed [27]. Moreover, miR-294 comprises a miR-290-295 cluster and regulates the cell cycle during embryogenesis [43,44]. The miR-379/miR-410 gene cluster is a large genomic miRNA cluster that is involved in various aspects of neurodevelopment and neuronal maturation [45].

The availability of arginine, a common substrate to ARG1 and NOS2, can regulate the levels of CAT1 and CAT2 transporters in the external plasmatic membrane and the parasitophorous vacuole [19,46,47]. This complex regulation in arginine uptake is one of the multiple factors involved in regulating production during *Leishmania* infection through *Nos2* transcription and NOS2 translation and through the presence of the substrates and co-factors such as O₂, biopterin, NADPH, and others [48]. As previously shown, the B6-macrophages only increased *Nos2*, NOS2, and NO production when miRNA let-7e was inhibited during *L. amazonensis* infection, reducing the infectivity [28]. The IL-1 β and TNF levels also induced NO production [49]. Our group showed increased levels of arginine, citrulline, and polyamines inside the macrophages infected with *L. amazonensis* [50]. These data increased the modulation expectation of genes that can compete for arginine to produce polyamines, such as *Cats*, *Arg1*, *Arg2*, and *Odc1*. Although the levels of *Cat1/Slc7a12*, *Cat2/Slc7a22*, *Arg1*, and *Odc1* did not behave as expected during infection, increased levels of the *Arg2* transcript level were not reflected by the increased competition of cytoplasmic arginine with NOS2 because of its mitochondrial localization. Further, the regulation of arginase 2 by miR-155 regulates the arginine availability in the DCs, allowing t-cell activation [51]. IL-10 and *Arg2* synergy works to reprogram the immunometabolic response of macrophages in response to LPS, reducing the levels of succinate, HIF-1 α , and IL-1 β [52].

Interestingly, in LPS stimulation, we found an inversion of the phenomenon observed in infected macrophages, proving an increased level of the target genes *Cat1/Slc7a12*

Cat2/Slc7a22 Nos2 Arg12 Arg22 and *Odc1* and reduced levels of the miRNAs miR-294-3p, miR-301b-3p, and miR-410-3p, excluding these miRNAs from the inflammatory macrophage phenotype. LPS induces *Cat2*, *Arg1*, and *Nos2*-NO in macrophages, suppressing T cell proliferation through the starvation of arginine and causing glycolysis dependence [53]. This fact guided us to only study the functional inhibition of miRNA in infected macrophages so that we could understand the miRNA impacts in the B6-macrophages.

The reduction in the levels of miR-294, the maintenance of miR-301b, and the maintenance/reduction of miR-410 in the functional inhibition assay showed difficulty and variability in the efficiency in the quantification of miRNA during the inhibition assay, as previously observed in our own studies as well as in those of others [27,28,38,54]. Nevertheless, the modulation of mRNA levels can help us study miRNA interactions during infection by considering the post-transcriptional and translational mechanisms of gene expression regulation that interfere with the mRNA and protein levels as well as the stability and cellular compartmentalization of proteins [5]. The functional inhibition of miR-294 and miR-410 increased the *Cat2/Slc7a2* and *Cat1/Slc7a1* transcripts, respectively, which implies the increase of protein translation and arginine uptake. Kishikawa et al. showed that miR-122 represses CAT1 and regulates arginine availability [55]. miR-294 and miR-301b inhibition at 4 h of infection tended to increase *Nos2* levels and reduced them at 24 h. The amastigote number and infectivity index reduced the inhibition of miR-294. Similarly, *Nos2* transcripts were maintained during the inhibition of miR-294 in infected BALB/c-macrophages. Only the NOS2 protein levels increased in this condition [27].

The differential expression of miRNA, previously observed in B6-macrophages in the network regulation of signaling pathways mediated by TLR recognition, supports these ideas [28]. In a RAW 264.7 macrophage lineage model, the mimetics of miR-294 using mimics during LPS stimulation reduced the protein levels of TNF- α and IL-6 due to miR-294 targeting TREM-1 [56]. We also showed that miR-294 inhibition increased *Tnfa* levels after 24 h in infected B6-macrophages. Indeed, miR-301b is associated with NF- κ B activity inhibiting p65 nuclear translocation in pancreatic Panc-1 and BxPC-3 cell lines, interfering with LPS signals, and corroborating the involvement of these miRNAs in the regulation of inflammation [57], which is implicated in TNF and NOS2 expression. Intriguingly, miR-130b/miR-301b belongs to the same cluster family, sharing target genes and cell proliferation with prostate cancer [58]. miR-301b inhibition did not interfere in the *Tnfa* transcripts even though miR-301b shares the same seed as *Tnfa* 3'UTR does with miR-294, which is probably because it acts in a different way in the absence of miR-294.

Zuo et al. elegantly demonstrated the lower levels of miR-410-3p and increased the predicted target TLR2 in LPS-induced sepsis in mice, where miR-410-3p overexpression mediated TLR2 inhibition, relieving mitochondrial dysfunction and chemokine production [59]. miR-410 mimics also reduced IL6 and TNF levels in LPS-stimulated chondrocytes [60].

Overall, the present study showed that *Leishmania* subverts the macrophage-miRNA profile, altering miR-294, miR-301b, and miR-410 expression and the transcripts of the target genes *Cat2/Slc7a2*, *Cat1/Slc7a12*, *Nos2*, and *Tnfa*, building a complex network of miRNAs-mRNAs modulated during the recognition and activation of macrophages, leading to an infection outcome. Based on our findings, we speculate whether we may consider miR-294 and miR410 as a biomarker of *L. amazonensis* infection and for the development of therapeutic formulations for cutaneous leishmaniasis.

4. Materials and Methods

4.1. In Silico miRNA Binding Site Prediction

The interaction between miRNAs and mRNAs was assessed using the miRMap search tool [35]. All searches were made by setting *Mus musculus* as the species parameter using a combination of open $\Delta G > 9$ (mRNA opening free energy), exact probability > 60 (exact distribution of site over-representation probability), and miRmap score > 60 using Vienna-RNA algorithm [61].

4.2. Parasite Culture

Leishmania amazonensis (MHOM/BR/1973/M2269) promastigotes were cultivated at 25 °C in M199 culture media (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Invitrogen), 5 ppm hemin, 100 µM adenine, 50 U penicillin, 50 µg/mL streptomycin (Invitrogen), 40 nM Hepes-NaOH buffer, and 12 mM NaHCO₃ at a pH of 6.85. The culture was split every 7 days with preset inoculum 1 × 10⁶ cells per 10 mL and was maintained for up to five passages. Neubauer's chamber determined the number of cells, diluting 20× the cell suspension in phosphate-buffered saline (PBS 1×) plus 1% formaldehyde.

4.3. BMDM Harvesting and Culture

C57BL/6. Tac animals were purchased from the Medicine School of the University of São Paulo at 6 to 8 weeks old. They were euthanized inside a CO₂ chamber. Afterward, bone marrow was extracted from the femurs, tibias, and humeri by flushing them with ice-cold PBS 1× with a 24 G × 3/4 needle. The cell suspension was separated with a 21 G × 1/2 needle followed by centrifugation at 4 °C at 500× g for 10 min. The cells were resuspended in complete RPMI 1640 (LGC Biotechnologies, São Paulo, Brazil) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Gibco, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), 0.5% Pen/Strep (1 U/mL), 2-mercaptoethanol (50 µM), L-glutamine (2 mM), sodium pyruvate (1 mM), and 10% L9-29 supernatant as a source of Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF). The cells were cultivated for 7 days at 34 °C in 5% CO₂.

4.4. Macrophage Infection

After the macrophage differentiation, cells were seeded into 24-well plates (1 × 10⁶ cells/well; SPL, Lifescience, Pocheon, Korea) or 8-well chamber slides (5 × 10⁴ cells/well; Millipore, Merck, Darmstadt, Germany). Then, stationary phase promastigotes were added into the wells at MOI 5:1. After 4 h, the cells were washed two times with PBS 1× at room temperature to clean the unphagocytosed parasites. The culture was maintained for 4 and 24 h. The cells were stimulated with LPS (100 ng/mL; *Escherichia coli* LPS serotype 0127:B8, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to induce M1-inflammatory macrophages.

4.5. Infection Assessment

After 4 and 24 h of infection, the chamber slides were washed two times with PBS 1× and were then fixed with acetone/methanol (1:1 v/v; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and were incubated at −20 °C for 24 h followed by Giemsa staining (Fast Panotic Kit, Laborclin, São Paulo, Brazil). At least 600 macrophages were counted per well to achieve the parameters of the Macrophage Infection Rate [(infected macrophage/total macrophage) × 100], amastigotes per infected macrophage, and the infection index, which was calculated by multiplying the rate of infected macrophages by the average number of amastigotes per macrophage.

4.6. RNA Extraction and cDNA Preparation

For RNA extraction, macrophages (3 × 10⁶) were mixed with 750 µL of Trizol (Ambion, Thermo Scientific, USA) and 250 µL PBS 1×. Then, chloroform was added to separate the aqueous and organic phases. Following the manufacturer's instructions, the aqueous phase was added into miRNeasy (Qiagen, Hilden, Germany) columns. The extracted RNA was measured using Nanodrop (ND-100, Thermo Scientific) to reach a 200 ng/µL RNA solution. The total RNA was used to produce complementary DNA (cDNA) of mature mRNA and miRNA. For miRNA, we used the miScript II RT kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's recommendations and starting from 250 ng of RNA. To mature the mRNA, starting from 2 µg of RNA, we used random hexamer primer (1.5 µg/mL; Thermo Scientific), dNTP (10 µM; Fermentas, Thermo Scientific), RevertAid Reverse Transcriptase (200U; Thermo Scientific), and RiboLock (Thermo Scientific) to a final volume of 40 µL. The

cycling protocol was used following the manufacturer's recommendations. All cycles were undertaken using the Mastercycler Nexus Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany).

4.7. Transcript Quantification

A quantitative PCR was used to assess the amount of mRNA, which was conducted using LuminoCt SYBR Green qPCR Ready Mix (Sigma-Aldrich), specific primers (0.1 μ M), and a cDNA sample (5 μ L, 100-times diluted) to a final volume of 10 μ L. The reaction was performed in the QuantStudio Thermocycler (Thermo Scientific) following the following protocol: 94 °C to the initial denaturation, 40 cycles of denaturation (94 °C, 30 s), annealing and extension (60 °C, 30 s), and fluorescence capture at the end of every cycle. After 40 cycles, a melting curve was found between 60 °C and 95 °C, with fluorescence registers at every 0.5 °C. The primer list was as follows: *Nos2*-F: 5'-agagccacagctctcttgc-3' and *Nos2*-R: 5'-gctccttccaaggtgctt-3'; *Arg1*-F: 5-agcactgaggaagctggtc-3' and *Arg1*-R: 5'-cagaccgtgggttctcaca-3'; *Arg2*-F: 5'-tctctccacgggcaaattc-3'; *Arg2*-R: 5'-cactctagcttcttgc-3'; *Cat-2/Slc7a2*: 5'-tatgtgtctcggcaggctc-3' and 5'-gaaaagcaaccatctccg-3'; *Cat1/Slc7a1*: 5'-cgtaatcgccactgtgacct-3' and 5'-ggctggtaccgtaagaccaa-3'; *Tnfa*-F: 5'-caccacgctcttctgcta-3'; *Tnfa*-R: 5'-agggtctggccatagaact-3'; and β -2-microglobulin-F: 5'-cactgaattcaccctcactga-3', and β -2-microglobulin-R: 5'-acagatggagcgtccagaag-3'; *Odc1*-F: 5'-ctgccagtaacggatccag-3' *Odc1*-R: 5'-tcagtggcaatccgtagaac-3'. The fold-change was calculated using the Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta$ Ct) method and was based on β -2-microglobulin and was normalized with the uninfected group or negative control. The fold-change was presented in log2 (Table 1).

Table 1. Primer sequences for qPCR.

Target Gene		Primer (5'-3')
Nitric Oxide Synthase (<i>Nos2</i>)	Forward	5'-agagccacagctctcttgc-3'
	Reverse	5'-gctccttccaaggtgctt-3'
Arginase 1 (<i>Arg1</i>)	Forward	5'-agcactgaggaagctggtc-3'
	Reverse	5'-cagaccgtgggttctcaca-3'
Arginase 2 (<i>Arg2</i>)	Forward	5'-tctctccacgggcaaattc-3'
	Reverse	5'-cactctagcttcttgc-3'
Cationic amino acid transporter 1 (<i>Cat1/Slc7A1</i>)	Forward	5'-cgtaatcgccactgtgacct-3'
	Reverse	5'-ggctggtaccgtaagaccaa-3'
Cationic amino acid transporter 2 (<i>Cat2/Slc7A2</i>)	Forward	5'-tccaaacgaagacacagct-3'
	Reverse	5'-gccatgagggtgccaataga-3'
Tumor Necrosis Factor alpha (<i>Tnfa</i>)	Forward	5'-caccacgctcttctgcta-3'
	Reverse	5'-agggtctggccatagaact-3'
Ornithine decarboxylase (<i>Odc1</i>)	Forward	5'-ctgccagtaacggatccag-3'
	Reverse	5'-tcagtggcaatccgtagaac-3'
β -2-microglobulin (<i>B2m</i>)	Forward	5'-cactgaattcaccctcactga-3'
	Reverse	5'-acagatggagcgtccagaag-3'
Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (<i>Gapdh</i>)	Forward	5'-ggcaaatcaacggcagct-3'
	Reverse	5'-cctttggctccacctca-3'

To assess the amount of miRNA, the specific amplification of miR-294-3p, miR-301b-3p, miR-410-3p, and SNORD95A (used in normalization) was completed by qPCR, which was performed with an miScript SYBR Green (Qiagen), 10 \times miScript Universal Primer, 10 \times Specific Primer, and 2 μ L of cDNA (diluted 10-fold). RNase-free water was added to a final volume of 10 μ L. The reaction was performed in the QuantStudio Thermocycler (Thermo Scientific) with the following protocol: activation of the HotStart DNA Polymerase for 15 s at 95 °C and 40 cycles of 15 s at 94 °C followed by 30 s at 55 °C and 30 s at 70 °C. The fold-change was calculated using the Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta$ Ct) method and was based

on SNORD95 and was normalized with the uninfected group or negative control. The fold-change was presented in log2.

4.8. miRNA Inhibition

The miR-inhibition was performed with the addition of 50 nM of miR-294-3p-, miR-301b-3p-, or miR-410-3p-specific inhibitors (cat 4464084) or the negative control (cat 4464076) (miRVana, Ambion, Thermo Scientific) mixed with 6 µL FuGene Reagent Transfection (Roche, Promega, Madison, WI, USA), which was incubated for 20 min at room temperature following our previously described protocol [62] in 500 µL of serum-free RPMI 1640 medium (LGC Biotecnologia, São Paulo, SP, Brazil) [27]. After 24 h of transfection, the cells were infected as described above.

4.9. Ethics Statement

The experimental protocol for the animal experiments was approved by the Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) from the Instituto de Biociências of the Universidade de São Paulo (approval number CEUA-IB: IB-USP 233/2015). This study was conducted in strict accordance with the recommendations in the guide and policies for the care and use of laboratory animals of São Paulo State (Lei Estadual 11.977, de 25 August 2005) and the Brazilian government (Lei Federal 11.794, de 8 October 2008).

Author Contributions: Conceptualization, S.M.A. and S.M.M.; methodology and experiments design, S.M.A., J.M.Z. and C.d.A.B.; figure design, S.M.A. and S.M.M.; writing—original draft preparation, S.M.A. and S.M.M. Funding, S.M.M. and L.M.F.-W.; Revised the final version of manuscript L.M.F.-W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, <http://www.cnpq.br>: 406351/2018-0) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, <http://www.fapesp.br>: 2018/24693-9 and 2014/50717-1). FAPESP fellowship: S.M.A. (2017/23519-2), J.M.Z. (2019/07089-3) and C.A.M. (2018/18499-5).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of Instituto de Biociências of the Universidade de São Paulo (protocol code CEUA-IB: IB-USP 233/2015).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Baltimore, D.; Boldin, M.; O'Connell, R.M.; Rao, D.; Taganov, K.D. MicroRNAs: New regulators of immune cell development and function. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 839–845. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. O'Neill, L.A.; Sheedy, F.J.; McCoy, C.E. MicroRNAs: The fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Imm.* **2011**, *268*, 163–175. [[CrossRef](#)]
3. Mathew, R.; Mattei, V.; Al Hashmi, M.; Tomei, S. Updates on the Current Technologies for microRNA Profiling. *MicroRNA* **2019**, *9*, 17–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Leung, A.K.L. The Whereabouts of microRNA Actions: Cytoplasm and Beyond. *Trends Cell Biol.* **2015**, *25*, 601–610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Acuña, S.M.; Floeter-Winter, L.M.; Muxel, S.M. MicroRNAs: Biological Regulators in Pathogen–Host Interactions. *Cells* **2020**, *9*, 113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Li, H.; Jiang, T.; Li, M.-Q.; Zheng, X.-L.; Zhao, G.-J. Transcriptional Regulation of Macrophages Polarization by MicroRNAs. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Martinez, F.O.; Helming, L.; Gordon, S. Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. *Annu. Rev. Immunol.* **2009**, *27*, 451–483. [[CrossRef](#)]
8. Akhouni, M.; Kuhls, K.; Cannet, A.; Votycka, J.; Marty, P.; Delaunay, P.; Sereno, D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004349. [[CrossRef](#)]

9. Ashford, R.W. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. *Parasites Vectors* **2000**, *3*, 1269–1281. [[CrossRef](#)]
10. Burza, S.; Croft, S.L.; Boelaert, M. Leishmaniasis. *Lancet* **2018**, *392*, 951–970. [[CrossRef](#)]
11. Nathan, C.; Shiloh, M. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 8841–8848. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Gregory, D.; Olivier, M. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. *Parasitology* **2005**, *130*, S27–S35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Rossi, M.; Fasel, N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! *Int. Immunol.* **2018**, *30*, 103–111. [[CrossRef](#)]
14. Muxel, S.M.; Aoki, J.I.; Fernandes, J.C.R.; Laranjeira-silva, M.F.; Zampieri, R.A.; Acuña, S.M. Arginine and Polyamines Fate in *Leishmania* Infection. *Front. Microbiol.* **2018**, *8*, 1–15. [[CrossRef](#)]
15. Roberts, S.C.; Tancer, M.J.; Polinsky, M.R.; Gibson, K.M.; Heby, O.; Ullman, B. Arginase Plays a Pivotal Role in Polyamine Precursor Metabolism in *Leishmania*. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 23668–23678. [[CrossRef](#)]
16. Da Silva, M.F.L.; Zampieri, R.A.; Muxel, S.M.; Beverley, S.M.; Floeter-Winter, L.M. *Leishmania amazonensis* arginase compartmentalization in the glycosome is important for parasite infectivity. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e34022. [[CrossRef](#)]
17. Wanasen, N.; Soong, L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. *Immunol. Res.* **2007**, *41*, 15–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Yeramian, A.; Martin, L.; Arpa, L.; Bertran, J.; Soler, C.; McLeod, C.; Modolell, M.; Palacín, M.; Lloberas, J.; Celada, A. Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. *Eur. J. Immunol.* **2006**, *36*, 1516–1526. [[CrossRef](#)]
19. Sans-Fons, M.G.; Yeramian, A.; Pereira-Lopes, S.; Santamaria-Babi, L.F.; Modolell, M.; Lloberas, J.; Celada, A. Arginine Transport Is Impaired in C57Bl/6 Mouse Macrophages as a Result of a Deletion in the Promoter of Slc7a2 (CAT2), and Susceptibility to *Leishmania* Infection Is Reduced. *J. Infect. Dis.* **2013**, *207*, 1684–1693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Manzano-Román, R.; Siles-Lucas, M. MicroRNAs in parasitic diseases: Potential for diagnosis and targeting. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2012**, *186*, 81–86. [[CrossRef](#)]
21. Reynoso, R.; Laufer, N.; Hackl, M.; Skalicky, S.; Monteforte, R.; Turk, G.; Carobene, M.; Quarleri, J.; Cahn, P.; Werner, R.; et al. MicroRNAs differentially present in the plasma of HIV elite controllers reduce HIV infection in vitro. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, srep05915. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Petrini, E.; Caviglia, G.P.; Abate, M.L.; Fagoonee, S.; Smedile, A.; Pellicano, R. MicroRNAs in HBV-related hepatocellular carcinoma: Functions and potential clinical applications. *Panminerva Med.* **2015**, *57*, 500–509.
23. Fu, Y.; Yi, Z.; Wu, X.; Li, J.; Xu, F. Circulating MicroRNAs in Patients with Active Pulmonary Tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, 4246–4251. [[CrossRef](#)]
24. De Assis Souza, M.; Ramos-Sanchez, E.M.; Muxel, S.M.; Lagos, D.; Reis, L.C.; Pereira, V.R.A. miR-548d-3p Alters Parasite Growth and Inflammation in *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* Infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 1–15.
25. Yan, J.; She, Q.; Shen, X.; Zhang, Y.; Liu, B.; Zhang, G. Potential Role of MicroRNA-375 as Biomarker in Human Cancers Detection: A Meta-Analysis. *BioMed Res. Int.* **2017**, *2017*, 1–10. [[CrossRef](#)]
26. Filipów, S.; Laczmański, L. Blood circulating miRNAs as cancer biomarkers for diagnosis and surgical treatment response. *Front. Neurosci.* **2019**, *13*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Muxel, S.M.; Laranjeira-Silva, M.F.; Zampieri, R.A.; Floeter-Winter, L.M. *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* induces macrophage miR-294 and miR-721 expression and modulates infection by targeting NOS2 and L-arginine metabolism. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, srep44141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Muxel, S.M.; Acuña, S.M.; Aoki, J.I.; Zampieri, R.A.; Floeter-Winter, L.M. Toll-Like Receptor and miRNA-let-7e Expression Alter the Inflammatory Response in *Leishmania amazonensis*-Infected Macrophages. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Bogdan, C.; Rölinghoff, M. The immune response to *Leishmania*: Mechanisms of parasite control and evasion. *Int. J. Parasitol.* **1998**, *28*, 121–134. [[CrossRef](#)]
30. Von Stebut, E.; Ehrchen, J.M.; Belkaid, Y.; Kostka, S.L.; Mölle, K.; Knop, J. Interleukin 1 α promotes TH1 differentiation and inhibits disease progression in *Leishmania* major-susceptible BALB/c mice. *J. Exp. Med.* **2003**, *198*, 191–199. [[CrossRef](#)]
31. Alexander, J.; Brombacher, F. T helper1/T helper2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: Is this paradigm still relevant? *Front. Immunol.* **2012**, *3*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Felizardo, T.C.; Toma, L.S.; Borges, N.B.; Lima, G.M.C.A.; Abrahamssohn, I.A. *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection and dissemination in mice inoculated with stationary-phase or with purified metacyclic promastigotes. *Parasitology* **2007**, *134*, 1699–1707. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Velasquez, L.G.; Galuppo, M.K.; De Rezende, E.; Brandão, W.N.; Peron, J.P.; Uliana, S.R.B. Distinct courses of infection with *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* are observed in BALB/c, BALB/c nude and C57BL/6 mice. *Parasitology* **2016**, *143*, 692–703. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Aoki, J.I.; Muxel, S.M.; Laranjeira-Silva, M.F.; Zampieri, R.A.; Müller, K.E.; Nerland, A.H.; Floeter-Winter, L.M. Dual transcriptome analysis reveals differential gene expression modulation influenced by *Leishmania* arginase and host genetic background. *Microb. Genom.* **2020**, *6*, e000427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Vejnar, C.; Zdobnov, E.M. miRmap: Comprehensive prediction of microRNA target repression strength. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 11673–11683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Guerfali, F.Z.; Laouini, D.; Guizani-Tabbane, L.; Ottones, F.; Ben-Aissa, K.; Benkahla, A.; Manchon, L.; Piquemal, D.; Smandi, S.; Mghirbi, O.; et al. Simultaneous gene expression profiling in human macrophages infected with *Leishmania major* parasites using SAGE. *BMC Genom.* **2008**, *9*, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Ghosh, J.; Bose, M.; Roy, S.; Bhattacharyya, S.N. *Leishmania donovani* Targets Dicer1 to Downregulate miR-122, Lower Serum Cholesterol, and Facilitate Murine Liver Infection. *Cell Host Microbe* **2013**, *13*, 277–288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Fernandes, J.C.R.; Aoki, J.; Acuña, S.M.; Zampieri, R.A.; Markus, R.P.; Floeter-Winter, L.M.; Muxel, S.M. Melatonin and *Leishmania amazonensis* Infection Altered miR-294, miR-30e, and miR-302d Impacting on Tnf, Mcp-1, and Nos2 Expression. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2019**, *9*, 60. [[CrossRef](#)]
39. Lemaire, J.; Mkannez, G.; Guerfali, F.; Gustin, C.; Attia, H.; Sghaier, R.M.; Dellagi, K.; Laouini, D.; Renard, P. Sysco-Consortium MicroRNA Expression Profile in Human Macrophages in Response to *Leishmania major* Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2478. [[CrossRef](#)]
40. Degrossoli, A.; Bosetto, M.C.; Lima, C.B.C.; Giorgio, S. Expression of hypoxia-inducible factor 1 α in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania amazonensis*. *Immunol. Lett.* **2007**, *114*, 119–125. [[CrossRef](#)]
41. Kumar, V.; Kumar, A.; Das, S.; Kumar, A.; Abhishek, K.; Verma, S. *Leishmania donovani* activates hypoxia inducible factor-1 α and miR-210 for survival in macrophages by downregulation of NF- κ B mediated pro-inflammatory immune respons. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Das, S.; Mukherjee, S.; Ali, N. Super enhancer-mediated transcription of miR146a-5p drives M2 polarization during *Leishmania donovani* infection. *PLoS Pathog.* **2021**, *17*, e1009343. [[CrossRef](#)]
43. Houbavii, H.B.; Murray, M.F. Embryonic Stem Cell-Specific MicroRNAs the regulation of development. *Dev. Cell.* **2003**, *5*, 351–358. [[CrossRef](#)]
44. Wang, Y.; Liang, Y.; Lu, Q. MicroRNA epigenetic alterations: Predicting biomarkers and therapeutic targets in human diseases. *Clin. Genet.* **2008**, *74*, 307–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Winter, J. MicroRNAs of the miR379-410 cluster: New players in embryonic neurogenesis and regulators of neuronal function. *Neurogenesis* **2015**, *2*, e1004970. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Wanasen, N.; MacLeod, C.L.; Ellies, L.G.; Soong, L. L-Arginine and Cationic Amino Acid Transporter 2B Regulate Growth and Survival of *Leishmania amazonensis* Amastigotes in Macrophages. *Infect. Immun.* **2007**, *75*, 2802–2810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Darlyuk, I.; Goldman, A.; Roberts, S.C.; Ullman, B.; Rentsch, D.; Zilberstein, D. Arginine Homeostasis and Transport in the Human Pathogen *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 19800–19807. [[CrossRef](#)]
48. Nagarkoti, S.; Sadaf, S.; Awasthi, D.; Chandra, T.; Jagavelu, K.; Kumar, S.; Dikshit, M. L-Arginine and tetrahydrobiopterin supported nitric oxide production is crucial for the microbicidal activity of neutrophils. *Free. Radic. Res.* **2019**, *53*, 281–292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Junior, D.S.L.; Costa, D.; Carregaro, V.; Cunha, L.D.; Silva, A.L.N.; Mineo, T.W.P.M.; Gutierrez, F.R.; Bellio, M.; Bortoluci, K.; A Flavell, R.; et al. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 909–915. [[CrossRef](#)]
50. Mamani-Huanca, M.; Muxel, S.M.; Acuña, S.M.; Floeter-Winter, L.M.; Barbas, C.; López-González, Á. Metabolomic reprogramming of c57bl/6-macrophages during early infection with *L. amazonensis*. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6883. [[CrossRef](#)]
51. Dunand-Sauthier, I.; Irla, M.; Carnesecchi, S.; Seguin-Estévez, Q.; Vejnar, C.E.; Zdobnov, E.M.; Santiago-Raber, M.-L.; Reith, W. Repression of Arginase-2 Expression in Dendritic Cells by MicroRNA-155 Is Critical for Promoting T Cell Proliferation. *J. Immunol.* **2014**, *193*, 1690–1700. [[CrossRef](#)]
52. Dowling, J.K.; Afzal, R.; Gearing, L.J.; Cervantes-Silva, M.P.; Annett, S.; Davis, G.M.; De Santi, C.; Assmann, N.; Dettmer, K.; Gough, D.J.; et al. Mitochondrial arginase-2 is essential for IL-10 metabolic reprogramming of inflammatory macrophages. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 1–14. [[CrossRef](#)]
53. Dichtl, S.; Lindenthal, L.; Zeitler, L.; Behnke, K.; Schlösser, D.; Strobl, B.; Scheller, J.; El Kasmi, K.C.; Murray, P.J. Lactate and IL6 define separable paths of inflammatory metabolic adaptation. *Sci. Adv.* **2021**, *7*, eabg3505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Ye, J.; Xu, M.; Tian, X.; Cai, S.; Zeng, S. Research advances in the detection of miRNA. *J. Pharm. Anal.* **2019**, *9*, 217–226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Kishikawa, T.; Otsuka, M.; Tan, P.S.; Ohno, M.; Sun, X.; Yoshikawa, T.; Shibata, C.; Takata, A.; Kojima, K.; Takehana, K.; et al. Decreased miR122 in hepatocellular carcinoma leads to chemoresistance with increased arginine. *Oncotarget* **2015**, *6*, 8339–8352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Liu, Y.; Cao, D.; Mo, G.; Zhang, L. Effects of microRNA-294 on inflammatory factor of sepsis by targeting triggering receptor expressed on myeloid cells-1. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* **2014**, *26*, 661–665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Funamizu, N.; Lacy, C.R.; Parpart, S.T.; Takai, A.; Hiyoshi, Y.; Yanaga, K. MicroRNA-301b promotes cell invasiveness through targeting TP63 in pancreatic carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* **2014**, *44*, 725–734. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Gregorova, J.; Vychytilova-Faltejskova, P.; Sevcikova, S. Epigenetic Regulation of MicroRNA Clusters and Families during Tumor Development. *Cancers* **2021**, *13*, 1333. [[CrossRef](#)]
59. Zuo, T.; Tang, Q.; Zhang, X.; Shang, F. MicroRNA-410-3p Binds to TLR2 and Alleviates Myocardial Mitochondrial Dysfunction and Chemokine Production in LPS-Induced Sepsis. *Mol. Ther.-Nucleic Acids* **2020**, *22*, 273–284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

60. Pan, H.; Dai, H.; Wang, L.; Lin, S.; Tao, Y.; Zheng, Y.; Jiang, R.; Fang, F.; Wu, Y. MicroRNA-410-3p modulates chondrocyte apoptosis and inflammation by targeting high mobility group box 1 (HMGB1) in an osteoarthritis mouse model. *BMC Musculoskelet. Disord.* **2020**, *21*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Lorenz, R.; Bernhart, S.H.; zu Siederdissen, C.H.; Tafer, H.; Flamm, C.; Stadler, P.F. ViennaRNA Package 2.0 Ronny. *Algorithms Mol. Biol.* **2011**, *6*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Muxel, S.M.; Laranjeira-Silva, M.F.; Zampieri, R.A.; Aoki, J.I.; Acuña, S.M.; Floeter-Winter, L.M. Functional validation of miRNA-mRNA interactions in macrophages by inhibition/competition assays based in transient transfection. *Protoc. Exch.* **2017**, 1–17. [[CrossRef](#)]

Biografia

Jonathan Miguel Zanatta é graduado em Ciências Biológicas Pela Universidade Estadual do Norte do Paraná (2018), e até então mestrando no programa de pós-graduação em Ciências - Fisiologia Geral no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Com seu projeto direcionado a regulação da expressão gênica e microRNAs, integrou o grupo de pesquisa do Laboratório de Fisiologia de Tripanossomatídeos, também no Instituto de Biociências, que investiga a interação dos parasitas causadores das leishmanioses e sua relação com o sistema imune.