

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
LABORATÓRIO DE SOROEPIDEMIOLOGIA E IMUNOBIOLOGIA

FERNANDA NARANJEIRA DE ARAÚJO

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

SÃO PAULO

2019

Universidade de São Paulo
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia

Fernanda Narangeira de Araújo

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

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

Área de concentração: Doenças Tropicais
e Saúde Internacional

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Hiro Goto

São Paulo

2019

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

© Reprodução autorizada pelo autor

Araújo, Fernanda Narangeira de

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

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

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Hiro Goto

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

USP/IMTSP/BIB-20/2019.

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Aos meus familiares, de modo especial, meus pais Rogério e Márcia, minha irmã Amanda e meus avós Uzzias e Neusa, que acompanharam de perto, todos os dias, cada passo que foi dado durante essa jornada, sempre me incentivando e me apoiando. À minha

avó Maria que mesmo longe não mede esforços para demonstrar que se orgulha de mim. E àqueles que já não estão mais presentes fisicamente, mas sempre me fizeram acreditar em minha capacidade.

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

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

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

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

Chico Xavier

RESUMO

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

Citocinas definidoras do perfil Th1 e Th2 influenciam a evolução da infecção nas leishmanioses e também a expressão do fator de crescimento insulina-símile I (IGF-I) em macrófagos. Nosso grupo mostrou anteriormente que IGF-I constitui um fator efetor da citocina IL-4 durante a infecção por *Leishmania major*. No entanto, como a resposta pode ser diferente dependendo da espécie de *Leishmania*, propomos analisar os efeitos das citocinas IL-4, IL-13 e IFN- γ na expressão de IGF-I e seu receptor e sua correlação com o parasitismo na infecção de células RAW com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. A linhagem macrofágica RAW 264.7 (5×10^5 células) foi infectada com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e tratadas com IL-4, IL-13 e IFN- γ por 24, 48 e 72 horas. Avaliamos a expressão de mRNA de *Igf-I* e seu receptor por RealTime PCR quantificação relativa, e também o parasitismo, a produção de óxido nítrico e a atividade da arginase. Em relação as citocinas do perfil Th2, IL-4 e IL-13, foi observado um aumento do parasitismo associado a um aumento da expressão do IGF-I e um aumento da atividade da arginase. Após estímulo com a citocina IFN- γ , observamos o aumento do parasitismo, com aumento da produção de óxido nítrico e uma diminuição da expressão de IGF-I. Na avaliação do receptor de IGF-I, observamos uma diminuição na expressão do mRNA de *Igf-IR* em todos os grupos avaliados. O silenciamento do IGF-I por RNA de interferência (siRNA) resultou na diminuição da expressão do mRNA em 90%. Observamos uma diminuição significativa do parasitismo nos grupos com siRNA quando comparado com o controle sem siRNA. Na avaliação das citocinas após silenciamento do IGF-I, todos os grupos tratados com siRNA e estimulados com citocinas apresentaram diminuição do parasitismo em relação aos seus controles sem siRNA. Na infecção por *L. amazonensis*, a citocina do perfil Th1, IFN- γ , apresenta um efeito diferente no parasitismo quando comparado com a infecção por *L. major*. Nossos resultados sugerem que o IGF-I tem efeito direto no parasitismo e que mesmo com os estímulos das citocinas, a presença do IGF-I é necessária para promover a suscetibilidade da infecção.

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

ABSTRACT

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

Th1 and Th2 profile-defining cytokines influence the evolution of leishmaniasis infection and also the expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) in macrophages. Our group has previously shown that IGF-I is an effector factor of cytokine IL-4 during *Leishmania major* infection. However, as the response may differ depending on the species of *Leishmania*, we propose to analyze the effects of cytokines IL-4, IL-13 and IFN- γ on the expression of IGF-I and its receptor and its correlation with parasitism in the infection of RAW cells with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. The macrophage lineage RAW 264.7 (5×10^5 cells) was infected with *L. (L.) amazonensis* promastigotes and treated with IL-4, IL-13 and IFN- γ for 24, 48 and 72 hours. We evaluated the expression of *Igf-I* mRNA and its receptor by RealTime PCR relative quantification, parasitism, nitric oxide production and arginase activity. Regarding Th2 cytokines, IL-4 and IL-13, an increase in parasitism associated with increased IGF-I expression and increased arginase activity was observed. After stimulation with cytokine IFN- γ , observe a increase parasitism, increase nitric oxide production and decrease IGF-I expression. In the IGF-I receptor evaluation, we observed a decrease in *Igf-IR* mRNA expression in all discount groups. IGF-I silencing by interfering RNA (siRNA) resulted in decreased mRNA expression (> 90%). Regarding the parasitism of these cells, we observed a significant decrease in parasitism in the siRNA groups when compared to the control without siRNA at 24 and 48 hours. In assessing the participation of Th1 and Th2 cytokines in parasitism after IGF-I silencing, all siRNA-treated and cytokine-stimulated groups showed decreased parasitism relative to their controls without siRNA. In *L. amazonensis* infection, the Th1 profile cytokine, IFN- γ , has a different effect on parasitism when compared to *L. major* infection. Our results suggest that IGF-I has a direct effect on parasitism and that even with cytokine stimuli, the presence of IGF-I is necessary to promote susceptibility of infection.

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

CONCLUSÕES

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

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

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

REFERÊNCIAS

- 1- Sacks DL, Louis JA, Wirth DF. Leishmaniasis. In: Warren KS, editor. Immunology and molecular biology of parasitic infections. Boston: Blackwell Scientific Publications. Boston. 1993; p.237-68.
- 2- WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis & World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva, 22-26 March 2010.
- 3- Silveira FT. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *Leishmania (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. Parasite Immunol. 2009; 31:423-31.
- 4- Sacks DL. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. Exp Parasite. 1989; 69(1):100-3.
- 5- Walters LL. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sandfly hosts. J Eukaryotic Microbiol. 1993; 40(2):196-206.
- 6- Lewis DJ, Ward RD. Transmission and vectors. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editores. The leishmaniasis in biology and medicine. London: Acad Press; 1987. p. 235-62.
- 7- Lindoso JA, Goto H. Leishmaniose Visceral. In: Lopes AC, organizador. Tratado de Clínica Médica. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016; p.3172-82.
- 8- Center for disease control. Leishmaniasis. 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>
- 9- Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editores. The leishmaniasis in biology and medicine. London: Academic Press; 1987. p.1-12.
- 10- Reis AB, Gontijo CMF. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Neves DP, Melo AL, Linardi, PM, Vitor, RW, organizadores. Parasitologia humana, 12ª edição. São Paulo: Atheneu, 2012; p.49-65.

- 11- Brasil. BVS/MS. Leishmaniose tegumentar. 2017. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/leishmaniose_tegumentar.pdf
- 12- Brasil. Ministério da Saúde. Manual da vigilância da leishmaniose tegumentar. Brasília: Ministério da Saúde; 2017.
- 13- Silveira F. Leishmaniose cutânea difusa (LCD) na Amazônia, Brasil: aspectos clínicos e epidemiológicos. *Gaz Médica da Bahia*. 2009; 79(3):25-29.
- 14- Brasil. Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde. 2017. Disponível em: <http://saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-tegumentar>
- 15- Thomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux JA, Pratlong F, Martini-Dumas A, Serres E. Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1993; 68(2):107-8.
- 16- Rey L. Parasitologia. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; Leishmanioses cutâneas e mucocutâneas do novo mundo. 2001; p.62-74.
- 17- Sacks DL, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2:845-58.
- 18- Lainson R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. *Rev. Pan-Amaz Saúde*. 2010; 1(2):1-20.
- 19- Ritting MG, Bogdan C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol Today*. 2000; 16(7):292-7.
- 20- Muxel SM, Aoki JI, Fernandes JC, Laranjeira-Silva MF, Zampieri RA, Acuña SM, *et al*. Arginine and polyamines fate in *Leishmania* infection. *Front Microbiol*. 2018 Jan 15;8:2682.
- 21- Sacks DL, Pimenta PF. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sandy fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J Exp Med*. 1995; 181(2): 685-97.
- 22- Descouteaux A, Turco SJ. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim biophys Acta*. 1999; 1455(3):341-52.

- 23- Silva-López RE. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. 2010. Quim Nova. 33(7):1541-8.
- 24- Van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, et al. Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages. J Immunol. 2004; 173(11):6521-5.
- 25- Assis FP. Participação do fator de crescimento insulina simili-I na imunidade específica na infecção por *Leishmania (L.) major* (Dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo; 2008.
- 26- Hibbs JB, Taintor RR. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. Biochem Biophys Res Commun. 1987; 157(1):87-94.
- 27- Reczkowski RS, Ash EP. Evidence for Binuclear Mn(II) Centers in Rat Liver Arginase. J Am Chem Soc. 1992; 114:10992-4.
- 28- Melos JL, Echevarria A. Sistemas Enzimáticos de Tripanossomatídeos como Potenciais Alvos Quimioterápicos. Rev Virtual Quim. 2012; 4(4):374-92.
- 29- Alexander J, Bryson K. T helper 1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. Immunol Lett. 2005; 99(1):17-23.
- 30- Wanasen N, Xin L, Soong L. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. Int J Parasitol. 2008; 38(4): 417-29.
- 31- Sacks D, Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. Nat Immunol. 2002; 3(11):1041-7.
- 32- Locksley RM, Heinzel FP, Saddick MD, Holaday BJ, Gardner Jr KD. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. Immunol. 1987; 138(5):744-9.
- 33- Qi H, Ji J, Wanasen N, Soong L. Enhanced Replication of *Leishmania amazonensis* Amastigotes in Gamma Interferon-Stimulated Murine Macrophages: Implications for the Pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis. Infect Immun. 2004; 72(2):988–95.

- 34- Côrtes DF, Carneiro MBH, Santos LM, Souza TCO, Maioli TU, Duz AL, *et al.* Low and high-dose intradermal infection with *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* in C57BL/6 mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010; 105(6):736-45.
- 35- Soong L, Chang CH, Sun J. Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol.* 1997; 158(11): 5374–83.
- 36- Bogdan, C, Rollinghoff M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Inter J Parasitol.* 1998; 8:121-34.
- 37- Gumy A, Louis JA, Pascal L. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. *Inter J Parasitol.* 2004; 34:433–44.
- 38- Shankar AH, Titus RG. T-cell and non-T-cell compartments can independently determine resistance to *Leishmania major*. *J Exp Med.* 1995; 181:845-55.
- 39- Wanasen N, MacLeod CL, Ellies LG, Soong L. L-Arginine and Cationic Amino Acid Transporter 2B Regulate Growth and Survival of *Leishmania amazonensis* Amastigotes in Macrophages. *Infect and Immun.* 2007; 75(6):2802-10.
- 40- Charlab R, Blaineau C, Schetman D, Barcinski MA. Granulocyte-macrophage colony-stimulant factor is a growth factor for promastigotas of *Leishmania Mexicana amazonensis*. *J Protozool.* 1990; 37(5):352-7.
- 41- Barral A, Teixeira M, Reis P, Vinhas V, Costa J, Lessa H, *et al.* Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis. *Am J Pathol.* 1995; 147(4):947-54.
- 42- Custodio RJ, Oliveira MHA. Fisiologia do Eixo GH-System IGF. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2008; 52(5):717-25.
- 43- Gomes CM, Goto H, Corbett CE, Gidlund M. Insulin-like growth factor-1 is a growth promoting factor for *Leishmania* promastigotes. *Acta Trop.* 1997; 64:225–8.
- 44- Jones JI, Clemmons DR. Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins: Biological Actions. *Endoc Reviews.* 1995; 16(1):30-4.

- 45- Smith, TJ. Insulin-Like Growth Factor-I Regulation of Immune Function: A potential therapeutic target in autoimmune diseases. *Pharmacol Rev.* 2010; 62: 199-236.
- 46- Leroith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts AT. Molecular and Cellular Aspects of the Insulin-Like Growth Factor I Receptor. *Endoc Rev.* 1995; 16(2):143–63.
- 47- Yu H, Rohan T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92(18):1472-89.
- 48- Goto H, Gomes CM, Corbett CEP, Monteiro HP, Gidlund M. Insulin-like growth factor I is a growth-promoting factor for *Leishmania* promastigotes and amastigotes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:1321-16.
- 49- Gomes CM, Monteiro HP, Gidlund M, Corbett CE, Goto H. Insulin like growth factor-I induces phosphorylation in *Leishmania (Leishmania) mexicana* promastigotes and amastigotes. *J Eukaryot Microbiol.* 1998; 45:352–5.
- 50- Vendrame CM, Carvalho M, Rios FJO, Manuli ER, Assis FP, Goto H. Effect of Insulin-Like Growth Factor-I on *Leishmania amazonensis* promastigote arginase activation and reciprocal inhibition of NOS2 pathway in macrophage *in vitro*. *Scand J of immunol.* 2007; 66:287-96.
- 51- Wynes MW, Riches DW. Induction of macrophage insulin-like growth factor-I expression by the Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J Immunol.* 2003; 17:3550-9.
- 52- Arkins S, Rebeiz N, Biragyn A, Reese DL, Biragyn A, Kelley KW. Interferon-gamma inhibits macrophage insulin-like growth factor I synthesis at the transcriptional level. *Mol Endocrinol.* 1995; 9:350-60.
- 53- Boussein ML, Rosen CJ, Turner CH, Ackert CL, Shultz KL, Dnahue LR, *et al.* Generation of a new congenic mouse strain to test the relationships among serum insulin-like growth factor I, bone mineral density, and skeletal morphology *in vivo*. *J Bone Miner Res.* 2002; 17(4):570-9.
- 54- Reis LC, Ramos-Sanches EM, Nerland, AH, Valladares MH, Selhein F, Winter LM, *et al.* Insulin-Like Growth Factor-I as an Effector Element of the cytokine IL-4 in the development of a *Leishmania major* infection. *Mediators Inflamm*, 2018 Jul 29;2018:9787128.

- 55- Van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN, Stuitje AR. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*. 1990; 2(4):291-9.
- 56- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression on homologous genes in trans. *Plant Cell*. 1990; 2(4):279-89.
- 57- Baulcombe D. RNA silencing. *Curr Biol*. 2002; 12(3):82-4.
- 58- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas AS, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998; 391:806-11.
- 59- Hannon GJ. RNA interference. *Nature*. 2002; 418(6894):244-51.
- 60- Faramiglio L. Uma possível ferramenta genética contra o câncer: o RNA de interferência. 2007. Disponível em: <http://www.temasbio.ufscar.br/?q=artigos/uma-poss%C3%ADvel-ferramenta-gen%C3%A9tica-contra-oc%C3%A2ncer-o-rna-de-interfer%C3%A2ncia>
- 61- Gil J, Esteban M. Induction of apoptosis by the dsRNA dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis*. 2000; 5(2):107-14.
- 62- Paddison PJ, Caudy AA, Hannon GJ. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99(3):1443-8.
- 63- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001; 411(6836):494-8.
- 64- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and nitric oxide in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982; 126:131-8.
- 65- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in Real-Time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29:2002-7.

- 66- Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell, M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods*. 1994; 174(2): 231–5.
- 67- Guimarães ET, Santos LA, dos Santos RR, Teixeira MM, Santos WLC, Soares MPB. Role of interleukin-4 and prostaglandin E2 in *Leishmania amazonensis* infection of BALB/c mice. *Microbes Infect*. 2005; 8:1219-26.
- 68- Jones DE, Buxbaum LU, Scott P. IL-4-Independent Inhibition of IL-12 Responsiveness During *Leishmania amazonensis* Infection. *J Immunol*. 2000; 165:364-72.
- 69- Hurddayal R, Brombacher F. The role of IL-4 and IL-13 in cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett*. 2004; 161:179-83.
- 70- Mohrs M, Ledermann B, Köhler G, Dorfmueller A, Gessner A, Brombacher F. Differences Between IL-4- and IL-4 Receptor α -Deficient Mice in Chronic Leishmaniasis Reveal a Protective Role for IL-13 Receptor Signaling. *J Immunol*. 1999; 162:7302-8.
- 71- Jones DE, Buxbaum LU, Scott P. IL-4-Independent Inhibition of IL-12 Responsiveness During *Leishmania amazonensis* Infection. *J Immunol*. 2015; 165:364-72.
- 72- Alexander J, Brombacher F, McGachy HA, McKenzie AN, Walker W, Carter KC. An essential role for IL-13 in maintaining a non-healing response following *Leishmania mexicana* infection. *Eur J Immunol*. 2002; 32:2923-33.
- 73- Ferrante CJ, Pinhal-Enfield G, Elson G, Haski G, Outram S, Leibovich SJ. The Adenosine-Dependent Angiogenic Switch of Macrophages to an M2-Like Phenotype is Independent of Interleukin-4 Receptor Alpha (IL-4R α) Signaling. *Inflammation*. 2013; 36:921–31.
- 74- Laranjeira-Silva MF, Floeter-Winter LM. Arginase in *Leishmania*. *Subcell Biochem*. 2014; 74:103-14.
- 75- Giudice A, Camada I, Leopoldo PTG, Pereira MBJ, Riley LW, Wilson ME, *et al*. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in tegumentary leishmaniasis. *BMC Infec Dis*. 2007; 7(7):1-12.

- 76- Costa MT, Fabeni RC, Aptekmann KP, Machado RR. Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias. *Cienc Rural*. 2003; 33(5):967-74.
- 77- Vespa GN, Silva JS. Oxido nítrico (NO): produção e significado fisiológico durante as infecções. 1994. *Rev Pat Trop*. 23(1):1-23.
- 78- Laranjeira-Silva MF, Zampieri RA, Muxel SM, Beverley SM, Floeter-Winter LM. *Leishmania amazonensis* arginase compartmentalization in glycosome is important for parasite infectivity. *Plos One*. 2012;7(3):e34022.
- 79- DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metab*. 2008; 7:11-20.
- 80- Walenta S, Salameh A, Lyng H, Evensen JF, Mitze M, Rofstad EK, *et al*. Correlation of High Lactate Levels in Head and Neck Tumors with Incidence of Metastasis. *Am J Pathol*. 1997; 150(2): 409-15.
- 81- Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, *et al*. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature*. 2014; 513:559-63.
- 82- Gomes CM, Goto H, Ribeiro da Mata, VL, Laurenti MD, Gidlund M, Corbett CE. Insulin like growth factor-I affects parasite growth and host cell migration in experimental cutaneous leishmaniasis. *Int J Exp Pathol*, 2000; 81:249-55.
- 83- Reis LC. Influência do fator de crescimento insulina-símile I no efeito de citocinas na resistência e suscetibilidade na leishmaniose cutânea murina por *Leishmania (Leishmania) major* (Tese). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo; 2013.
- 84- Carvalheira JB, Zecchin HG, Saad MJ. Vias de sinalização da insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002; 46:419-25.
- 85- Laviola L, Natalicchio A, Perrini S, Giorgio F. Abnormalities of IGF-I signaling in the pathogenesis of diseases of the bone, brain and fetoplacental unit in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008; 295(5):991-9.

- 86- Rosenfeld RG. Characterization of the somatomedin-c/insulin-like growth factor I (SM-C/IGF-I) receptor on cultured human fibroblast monolayers: regulation of receptor concentration by SMC/IGF-I and insulin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1982; 55:434-40.
- 87- Yamamoto H, Prager D, Yamasaki H, Melmed S. Rat pituitary GC cell insulin-like growth factor I receptor regulation. *Endocrinology.* 1993; 133:1420-5.
- 88- Souza LD, Vendrame CM, de Jesus AR, Carvalho MD, Magalhães AS, Schriefer A, *et al.* Insulin-like growth factor-I serum levels and their biological effects on *Leishmania* isolates from different clinical forms of American Tegumentary leishmaniasis. *Parasit Vectors.* 2016 Jun 11;9(1):335.