



Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA  
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E TECIDUAL

ELIANE IRANI BARBOSA PEGADO

Regulação da atividade inflamatória de macrófagos por fosfatidilserina exposta  
em amastigotas de *Leishmania amazonensis*: produção de óxido nítrico  
e radicais de oxigênio

CAMPOS DOS GOYTACAZES

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA  
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E TECIDUAL

ELIANE IRANI BARBOSA PEGADO

Regulação da atividade inflamatória de macrófagos por fosfatidilserina exposta em amastigotas de *Leishmania amazonensis*: produção de óxido nítrico e radicais de oxigênio

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. João Luiz Mendes Wanderley

Coorientador: Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta

CAMPOS DOS GOYTACAZES

2024

FICHA CATALOGRÁFICA  
UENF - Bibliotecas  
Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

P376 Pegado, Eliane Irani Barbosa.

"Regulação da atividade inflamatória de macrófagos por fosfatidilserina exposta em amastigotas de *Leishmania amazonensis* : produção de óxido nítrico e radicais de oxigênio." / Eliane Irani Barbosa Pegado. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2024.

46 f. : il.  
Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2024.

Orientador: João Luiz Mendes Wanderley.  
Coorientador: Renato Augusto Damatta.

1. *Leishmania*. 2. Fosfatidilserina. 3. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

**Eliane Irani Barbosa Pegado**

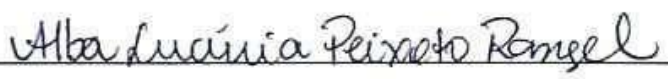
Regulação da atividade inflamatória de macrófagos por fosfatidilserina exposta em amastigotas de *Leishmania amazonensis*: produção de óxido nítrico e radicais de oxigênio

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Examinada em 22 de fevereiro de 2024

Banca examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Sergio Henrique Seabra - UENF

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr<sup>a</sup>. Alba Lucinia P. Rangel - UENF

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr<sup>a</sup>. Suzana Passos Chaves - UFRJ

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta - UENF  
(Coorientador)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. João Luiz Mendes Wanderley - UFRJ  
(Orientador)

“É necessário ter o caos dentro de si para gerar uma estrela.”

Friedrich Nietzsche

Dedico este trabalho à minha vó Cezarina Pegado (*in memoriam*), que sempre me inspirou, mostrando que com esforço, podemos sim alcançar nossos objetivos.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. João Luiz Wanderley por ter aceitado me orientar, mesmo que à distância. Este aceite me trouxe de volta à vida acadêmica da qual já estava afastada há 8 anos. Agradeço ao Prof. Dr. Renato DaMatta por sua atenção, paciência, conselhos, que me ajudaram a concluir este trabalho. Terei sempre imenso respeito e gratidão! Ao Prof. Dr. Sérgio Seabra pelas ajudas inesperadas e energia contagiante, ao prof. Henrique Mendonça por sempre transportar os materiais com muita boa vontade. Aos meus colegas do LBCT, Pedro Souto pela disponibilidade em atender minhas dúvidas e sempre me ajudar de forma muito paciente, ao Marcos Roberto (melhor parceiro de experimento que eu poderia ter), com quem tive uma relação de amor e ódio, que tenho enorme gratidão! Frederico, Lara, Felipe, Lícia, Taymara, Renata, Maiccley, Milena, Tâmara, Ana Beatriz, Ana Carolina, Saulo, Vitor, Lucas, Duda, Rhuan, Giullia, Maryana pela parceria e risadas, todos contribuíram para que este trabalho fosse realizado. Aos professores, alunos e técnicos do LBCT, em especial Beatriz Ribeiro, Adriana Martins, Rosemary Maciel e Giovana Moraes por toda assistência e conversas descontraídas que me deram energia em meio ao caos. Agradeço também pela amiga que o mestrado trouxe, Arieli, pelos conselhos e apoio desde que nos conhecemos. À minha família por sempre acreditar em mim mais do que eu mesma, à minha mãe por todo seu carinho e paciência e meu irmão Álvaro por me incentivar e dar apoio em tudo que quero fazer. Aos meus amigos de fora da UENF, que mesmo não participando ativamente durante o trabalho sempre me incentivaram. Em especial, Mariana e Luna por me abrigarem em Macaé em dias de experimentos e toda preocupação com meu bem-estar. Amanda Mendes por me incentivar desde a faculdade e acompanhar cada passo que dou. À minha amiga Camila, melhor definição de amizade que tenho nessa vida.

Agradeço às instituições de fomento CNPq, FAPERJ, UENF e CAPES, que disponibilizaram a verba necessária para realização dos experimentos e pela bolsa de mestrado CAPES.

Inúmeras vezes pensei em desistir, fiquei doente, perdi familiares e amigos, me perdi e perdi o controle de várias situações, mas me mantive firme, conversei com Deus e encontrei força e alegria para continuar. Deixo registrado o orgulho que tenho de mim, por ter chegado até aqui.

## SUMÁRIO

<b>1- INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Leishmania amazonensis .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Epidemiologia.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Macrófagos .....</b>	<b>5</b>
<b>1.4 Fosfatidilserina.....</b>	<b>8</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Objetivo geral .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>12</b>
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>12</b>
<b>3.1 Parasitos .....</b>	<b>12</b>
<b>3.2 Animais e aspectos éticos: .....</b>	<b>12</b>
<b>3.3 Obtenção de formas amastigotas:.....</b>	<b>12</b>
<b>3.4 Avaliação da exposição de PS das amastigotas .....</b>	<b>13</b>
<b>3.5 Macrófagos derivados de medula óssea .....</b>	<b>13</b>
<b>3.6 Plaqueamento dos macrófagos .....</b>	<b>14</b>
<b>3.7 Ativação de macrófagos .....</b>	<b>14</b>
<b>3.8 Infecção dos macrófagos .....</b>	<b>15</b>
<b>3.9 Bloqueio da PS .....</b>	<b>15</b>
<b>3.10 Dosagem de NO .....</b>	<b>15</b>
<b>3.11 Microscopia de fluorescência.....</b>	<b>15</b>
<b>3.12 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)</b> <b>16</b>	
<b>3.13 Análise estatística.....</b>	<b>16</b>
<b>4- RESULTADOS .....</b>	<b>16</b>
<b>5- DISCUSSÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>6- CONCLUSÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>28</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

BMM $\Phi$  - macrófagos derivados da medula óssea  
BSA - Albumina de Soro Bovino  
CR3 - receptor 3 do complemento  
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium Elisa - Ensaio de Imunoadsorção Enzimática  
FL1 - canal de fluorescência 1 FL2 - canal de fluorescência 2 FL3 - canal de fluorescência 3  
FSC - Forward Scatter - Tamanho Relativo Da Célula  
GPI – glicosilfosfatidilinositol  
IFN- $\gamma$  - Interferon Gama  
IL-1- Interleucina 1  
IL-4 - Interleucina 4  
IL-18 - Interleucina 18  
LPS- Lipopolissacarídeo  
LV - Leishmaniose visceral  
M1- Macrófagos ativados classicamente  
M2- Macrófagos ativados alternativamente  
MCSF- Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos  
M $\Phi$  - Macrófago  
NO - Óxido Nítrico  
PBS - Salina tamponada com fosfato  
pH – Potencial Hidrogeniônico  
PI- Iodeto de Propídio  
PS - Fosfatidilserina  
SFB - Soro Fetal Bovino  
TGF-  $\beta$  - Fator De Crescimento e Transformação Beta  
TLR2 - receptor Toll-like 2  
TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral Alfa  
WHO - Organização Mundial de Saúde

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1. Ciclo de vida da *Leishmania* spp. no hospedeiro vertebrado.** O flebotomíneo, ao fazer repasto sanguíneo, ingere sangue com macrófagos parasitados. No intestino do inseto, as formas amastigotas são liberadas e transformadas nas formas promastigotas infectantes. Na próxima alimentação sanguínea, o flebotomíneo inocula no hospedeiro vertebrado as formas promastigotas infectantes, que são fagocitadas principalmente por células fagocíticas. Dentro dos fagolisossomos, as promastigotas são diferenciadas em amastigotas, que se dividem até que a célula hospedeira fique repleta de parasitos e se rompa. Com a destruição da célula, inúmeras amastigotas são liberadas e fagocitadas por outros macrófagos, dando continuidade ao ciclo de reprodução assexuada. Figura adaptada de Kaye & Scott, 2011.

**Figura 2. Representação epidemiológica da disseminação da leishmaniose cutânea e visceral.** (A) O gráfico ilustra a disseminação global da leishmaniose cutânea, exibindo os novos casos reportados em 2020 e o estado de endemicidade por país. (B) A representação cartográfica apresenta a distribuição mundial da leishmaniose visceral, indicando o número de novos casos reportados em 2020, juntamente com o *status* de endemicidade por país

**Figura 3. Polarização e atribuições distintas dos macrófagos M1 e M2.** A ativação de macrófagos M1 ocorre em resposta a estímulos como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , LPS, entre outros, enquanto a ativação de macrófagos M2 ocorre em resposta a IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ , entre outras citocinas. Esses macrófagos manifestam funções diversas. Figura adaptada de Saqib et al. (2018).

**Figura 4. Estrutura da fosfatidilserina** – Composta por duas caudas de hidrocarbonetos hidrofóbicas, glicerol, um grupo fosfato e a serina. Fonte: Cassily, 2018.

**Figura 5. Etapas envolvidas no processo de apoptose.** Os sinais “*find-me*” liberados por células apoptóticas atraem fagócitos para a célula em apoptose. Os fagócitos usam receptores de engolfamento em sua superfície para acionar

sinais de “eat-me” fagocitando células apoptóticas. Esse processo de reconhecimento e fagocitose estimula a liberação de citocinas anti-inflamatórias, como o fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ), Interleucina 10 (L-10) e prostaglandina E2 (PGE2). Figura adaptada de Ravichandran, 2010.

**Figura 6. Análise por citometria de fluxo da exposição de fosfatidilserina de amastigotas de *Leishmania amazonenses* purificadas de lesões da pata de camundongo.** (A) Dot-plot de complexidade por tamanho de amastigotas. O gate R1 compreende as amastigotas (vermelho – população analisada) excluindo eventos de pequeno tamanho e de maior complexidade (preto). (B) Dot-plot de iodeto de propídeo (PI) x Anexina-V (Anexina-FITC) de amastigotas sem marcação (gate R1). 99% dos eventos são duplos negativos. (C) Dot-plot de complexidade por tamanho de amastigotas com marcadores (PI e Anexina-FITC). O gate R1 compreende as amastigotas (vermelho) que foram analisadas em “D”. (D) Dot-plot de PI x Anexina-FITC de amastigotas com marcação (gate R1). 61% dos eventos são negativos para PI e positivos para Anexina-FITC. (E) Dot-plot de complexidade por tamanho de amastigotas com marcadores incluindo PI por mais 5 minutos de incubação. O gate R1 compreende as amastigotas (vermelho) que foram analisadas em “F”. (F) Dot-plot de PI x Anexina-FITC de amastigotas com marcação (gate R1). 50% dos eventos são negativos para PI e positivos para Anexina-FITC. (G) Histograma de evento por Anexina-FITC dos dot-plots “B” (cinza) e “D” (verde) mostrando exposição de fosfatidilserina quando Anexina-FITC e PI foram adicionadas nas amastigotas. Note a positividade para Anexina-FITC das amastigotas, indicando exposição de fosfatidilserina.

**Figura 7. Produção de óxido nítrico de macrófagos derivados de medula óssea ativados 24 h antes da infecção com amastigotas de *Leishmania amazonenses* por 4, 24 e 48 h.** Macrófagos não infectados ativados (controle - coluna branca) e infectados ativados (coluna preta) (A) Experimento 1. Macrófagos infectados por 4 e 24 h. (B) Experimento 2. Macrófagos infectados por 24 e 48 h. (C) Experimento 3. Macrófagos infectados por 24 e 48 h. Note

que houve tendência de inibição de produção de óxido nítrico no Experimento 1, mas nos experimentos 2 e 3 a produção de óxido nítrico ficou similar com a infecção.

**Figura 8. Microscopia de fluorescência de macrófagos derivados de medula óssea ativados 24 h antes da infecção com amastigotas de *Leishmania amazonenses* por 24 e 48 h marcados para iNOS (vermelho), amastigotas (verde) e núcleo dos macrófagos (azul).** Macrófagos apresentam heterogeneidade de expressão de iNOS tanto no controle como no infectado com 24 e 48 h de cultivo. Amastigotas infectaram macrófagos iNOS positivos e negativos. Aumento de 1000x.

**Figura 9. Porcentagem de macrófagos iNOS positivos ativados 24 h antes da infecção com amastigotas de *Leishmania amazonenses* por 4, 24 e 48 h.** (A) Experimento 1. Macrófagos infectados por 4 e 24 h. (B) Experimento 2. Macrófagos infectados por 24 e 48 h. (C) Experimento 3. Macrófagos infectados por 24 e 48 h. Note que houve tendência de manutenção da porcentagem de expressão de iNOS nos experimentos 1 e 3 e tendência de redução da expressão de iNOS no experimento 2.

**Figura 10: Produção de óxido nítrico de macrófagos derivados de medula óssea ativados após a infecção com amastigotas de *Leishmania amazonenses* por 24 e 48 h com e sem bloqueio da fosfatidilserina por Anexina-V.** Macrófagos não infectados ativados (controle - coluna branca 24 e 48 h); infectados ativados sem bloqueio de fosfatidilserina (coluna cinza 24 e 48 h) e infectados ativados com o bloqueio de Anexina-V (coluna preta 24 e 48 h).

**Figura 11: Análise de citometria para avaliação de produção de radicais de oxigênio em macrófagos derivados de medula óssea ativados após a infecção com amastigotas de *Leishmania amazonenses* por 24 h com e sem bloqueio da fosfatidilserina por anexina-V.** Histograma: ctrl – macrófagos controle; ativ. – macrófagos ativados com interferon gama e LPS; amast. – macrófagos infectados com amastigotas; AX – amastigotas pré-

tratadas com anexina V; H2DCFDA – diclocriofluoresceína. Note como a infecção reduziu a produção de radicais de oxigênio, e que a inibição da produção de radicais de oxigênio foi parcialmente revertida com o bloqueio da fosfatidilserina. Média e desvio padrão de 1 experimento em triplicata. \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ , pelo teste One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey.

## RESUMO

*Leishmania* é um protozoário e agente etiológico da leishmaniose, doença dividida em leishmaniose cutânea e visceral. A transmissão ocorre através da picada do inseto flebotomíneo. A resposta microbicida dos macrófagos envolve a produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS). A fosfatidilserina (PS) exposta pelo parasito regula negativamente a atividade microbicida, favorecendo a infecção. Contudo, ainda não se sabe se o mecanismo afeta a expressão da enzima iNOS e a produção de ROS. Desse modo, avaliamos a modulação da produção de NO e expressão de iNOS e o papel da PS na superfície de amastigotas de *L. amazonenses* na modulação de ROS. Verificamos a exposição de PS do parasito por citometria de fluxo. As células da medula óssea de camundongos foram diferenciadas em macrófagos e ativadas com interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e lipopolissacarídeo (LPS) antes ou após a infecção com amastigotas de *L. amazonensis* com ou sem o bloqueio de anexina-V. A produção de NO (reagente de Griess), a expressão de iNOS (microscopia de fluorescência) e a produção de ROS (citometria de fluxo) foram avaliadas. A exposição de PS pelo parasito foi confirmada por citometria de fluxo (marcação com anexina-V-FITC e iodeto de propídio) e houve tendência de maior produção de NO em macrófagos ativados 24h antes da infecção. O perfil de expressão de iNOS dos macrófagos foi heterogêneo e quando infectados apresentou uma tendência de diminuir a expressão de iNOS em macrófagos ativados 24h antes da infecção. Quando os macrófagos foram ativados após a infecção, a produção de NO ficou similar entre o grupo infectado e o grupo controle, mas houve aumento na produção de NO pelo grupo infectado com amastigotas bloqueadas com PS. Macrófagos ativados após a interação tiveram diminuição da produção de ROS durante a infecção. No entanto, o bloqueio da PS de amastigotas reverteu essa regulação negativa na produção de ROS induzida pela infecção. Assim, o parasito promoveu a inibição na expressão de iNOS, mas não a produção de NO, e diminuiu a produção de ROS e, quando bloqueados com PS, o perfil foi revertido, aumentando expressão de iNOS, a produção de NO e ROS. Estes dados contribuem no entendimento do mecanismo de infecção e estabelecimento das amastigotas nos macrófagos.

**Palavras-chave:** *Leishmania*; fosfatidilserina; espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

## ABSTRACT

*Leishmania* is a protozoan and the etiological agent of leishmaniasis, a disease divided into cutaneous and visceral forms. Transmission occurs through the bite of the phlebotomine insect. The microbicidal response of macrophages involves the production of nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS). Phosphatidylserine (PS) exposed by the parasite negatively regulates microbicidal activity, favoring infection. However, it is still unknown whether this mechanism affects the expression of the enzyme iNOS and ROS production. Thus, we evaluated the modulation of NO production and iNOS expression, and the role of PS on the surface of *L. amazonensis* amastigotes in modulating ROS. We verified parasite PS exposure by flow cytometry. Mouse bone marrow cells were differentiated into macrophages and activated with gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) and lipopolysaccharide (LPS) before or after infection with *L. amazonensis* amastigotes with or without annexin-V blocking. NO production (Griess reagent), iNOS expression (fluorescence microscopy), and ROS production (flow cytometry) were evaluated. Parasite PS exposure was confirmed by flow cytometry (annexin-V-FITC and propidium iodide staining), and there was a tendency for higher NO production in macrophages activated 24h before infection. The iNOS expression profile of macrophages was heterogeneous, and when infected, there was a tendency to decrease iNOS expression in macrophages activated 24h before infection. When macrophages were activated after infection, NO production was similar between the infected group and the control group, but there was an increase in NO production by the infected group with PS-blocked amastigotes. Macrophages activated after interaction had decreased ROS production during infection. However, blocking PS of amastigotes reversed this negative regulation in ROS production induced by infection. Thus, the parasite promoted inhibition in iNOS expression but not NO production, and decreased ROS production, and when blocked with PS, the profile was reversed, increasing iNOS expression, NO, and ROS production. These data contribute to understanding the mechanism of infection and establishment of amastigotes in macrophages.

**Keywords:** *Leishmania*; phosphatidylserine; nitrogen and Oxygen-reactive species.

# 1- INTRODUÇÃO

## 1.1 *Leishmania amazonensis*

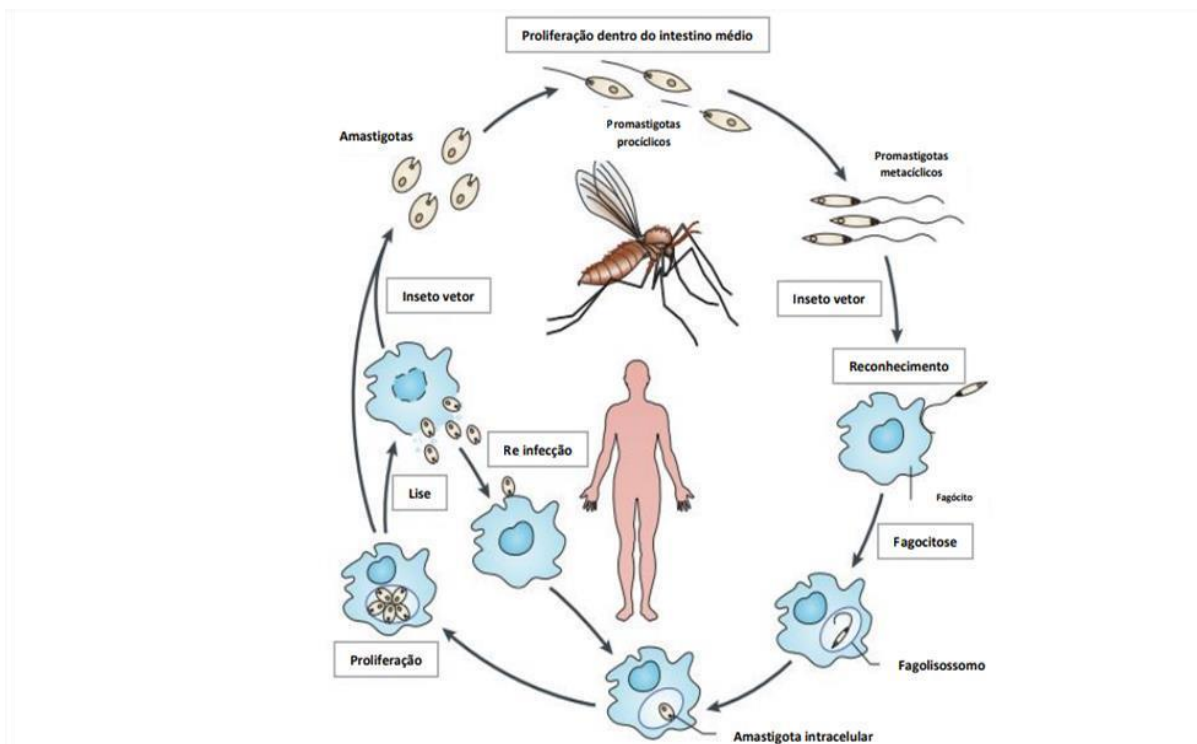
*Leishmania amazonensis* é um protozoário parasito da família Tripanossomatidae e agente etiológico da leishmaniose cutânea e visceral (SILVEIRA *et al.*, 2004). Atualmente são conhecidas aproximadamente 53 espécies, dentre as quais 20 exibem patogenicidade em relação aos indivíduos humanos (AKHOUNDI, 2016). Existem alguns medicamentos disponíveis como alternativas ao tratamento da leishmaniose, embora ainda não existam evidências consolidadas que assegurem o uso de forma eficiente, como é o caso da miltefosina. Esse medicamento de via oral é usado em alguns países da Ásia e África para tratar a leishmaniose visceral, porém apresenta diversas limitações como risco de resistência, baixa adesão, necessidade do uso de contraceptivos para mulheres que estão em idade fértil durante e após o tratamento, entre outros efeitos adversos (ARONSON *et al.*, 2016; DNDI, 2019). No Brasil, a anfotericina B lipossomal é considerada mais segura para estes casos, mais eficaz e menos tóxica quando comparada a outros medicamentos utilizados. Entretanto, o tratamento é elevado financeiramente e a necessidade de resfriamento restringem a utilização do medicamento em muitos países (BRASIL MS, 2014, 2017; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). No entanto, o tratamento mais adequado ainda são os antimoniais pentavalentes, mesmo com efeitos adversos. *Leishmania amazonensis* tem como principais hospedeiros vertebrados roedores, cães e primatas (LAISON, 1994) e pode causar diversas manifestações clínicas, dependendo da resposta imunológica do hospedeiro como lesões na pele, infecção disseminada e inflamação destrutiva da mucosa (HORTA *et al.*, 2012).

*Leishmania* é um organismo unicelular flagelado que geralmente realiza sua reprodução de maneira assexuada por meio de divisão binária. Há relatos esporádicos de algumas espécies que demonstram capacidade de reprodução sexuada no trato intestinal do inseto vetor (AKOPYANTS, 2009). O protozoário apresenta uma estrutura celular que contém uma organela abundante em ácido desoxirribonucleico (ADN), conhecida como cinetoplasto. Essa organela abriga a única mitocôndria e a bolsa flagelar, marcando uma característica distintiva



da Ordem Kinetoplastidae (LAURENT, 1970; WEBSTER, 1993). *Leishmania amazonensis* possui duas formas: amastigota, fase do parasito que se encontra no interior de determinadas células dos hospedeiros vertebrados, não apresenta motilidade, possui flagelo interno e corpo celular arredondado; e promastigota, possui flagelo, motilidade e a forma alongada (LAISON, 1994). A promastigota é a forma invasiva do parasito oriunda do inseto vetor (CARNEIRO *et al.*, 2016).

No intestino do flebotomíneo, o parasito se desenvolve na sua forma metacíclica (infecciosa) e infecta o hospedeiro vertebrado através do repasto sanguíneo. Nesse hospedeiro, as células fagocitam as promastigotas. No interior do fagolisossomo, as promastigotas se diferenciam em amastigotas e se replicam (Figura 1) (HORTA *et al.*, 2012). Esse processo de diferenciação morfológica no interior do fagolisossomo pode demorar de um a cinco dias dependendo da espécie (COURRET *et al.*, 2001). Em sua forma amastigota, o protozoário rompe os tecidos, se replicando cada vez mais e infectando novos macrófagos. Os parasitos não invadem ativamente os macrófagos, o mecanismo de entrada é feito por fagocitose (HORTA *et al.*, 2012).



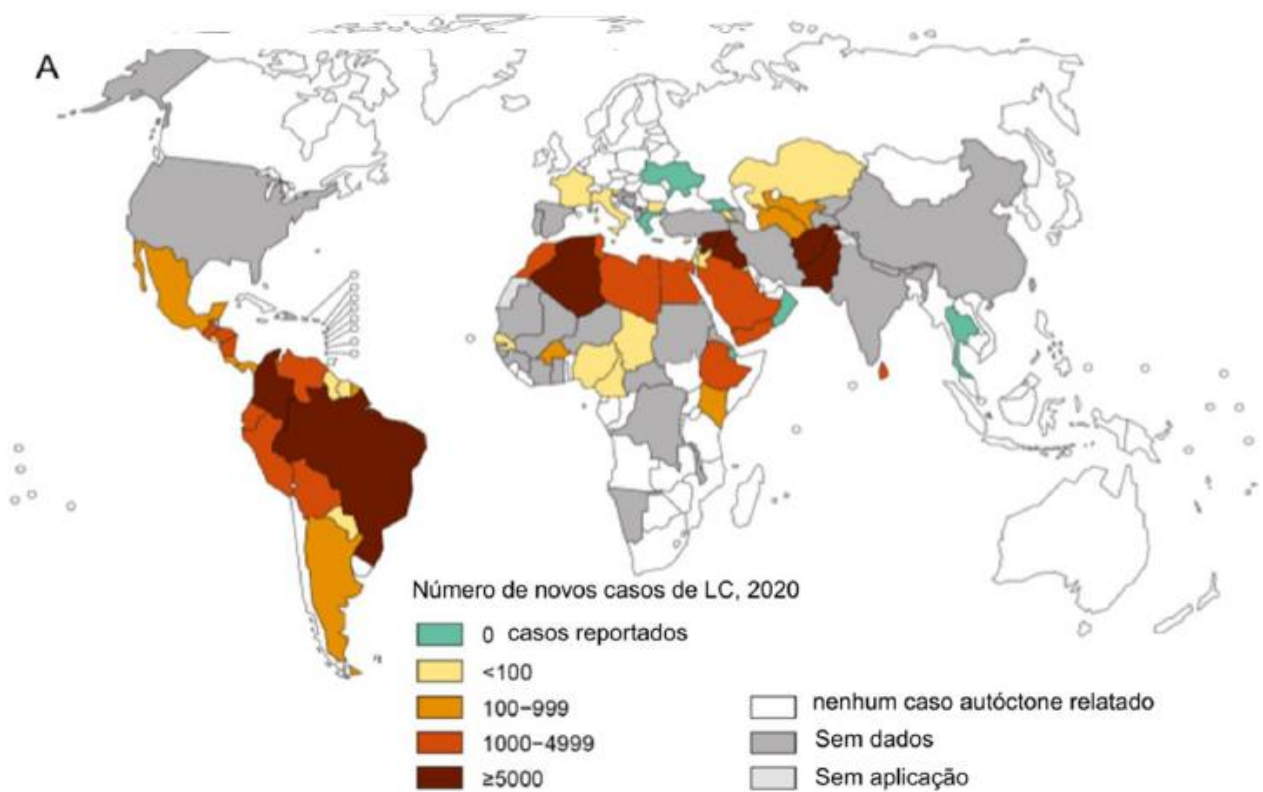
**Figura 1. Ciclo de vida da *Leishmania* spp. no hospedeiro vertebrado.** O flebotomíneo, ao fazer repasto sanguíneo, ingere sangue com macrófagos parasitados. No intestino do inseto, as formas amastigotas são liberadas e transformadas nas formas promastigotas infectantes. Na próxima alimentação sanguínea, o flebotomíneo inocula no hospedeiro vertebrado as formas promastigotas infectantes, que são fagocitadas principalmente por células fagocíticas. Dentro dos fagolisossomos, as promastigotas são diferenciadas em amastigotas, que se dividem até que a célula hospedeira fique repleta de parasitos e se rompa. Com a destruição da célula, inúmeras amastigotas são liberadas e fagocitadas por outros macrófagos, dando continuidade ao ciclo de reprodução assexuada. Figura adaptada de KAYE & SCOTT, 2011.

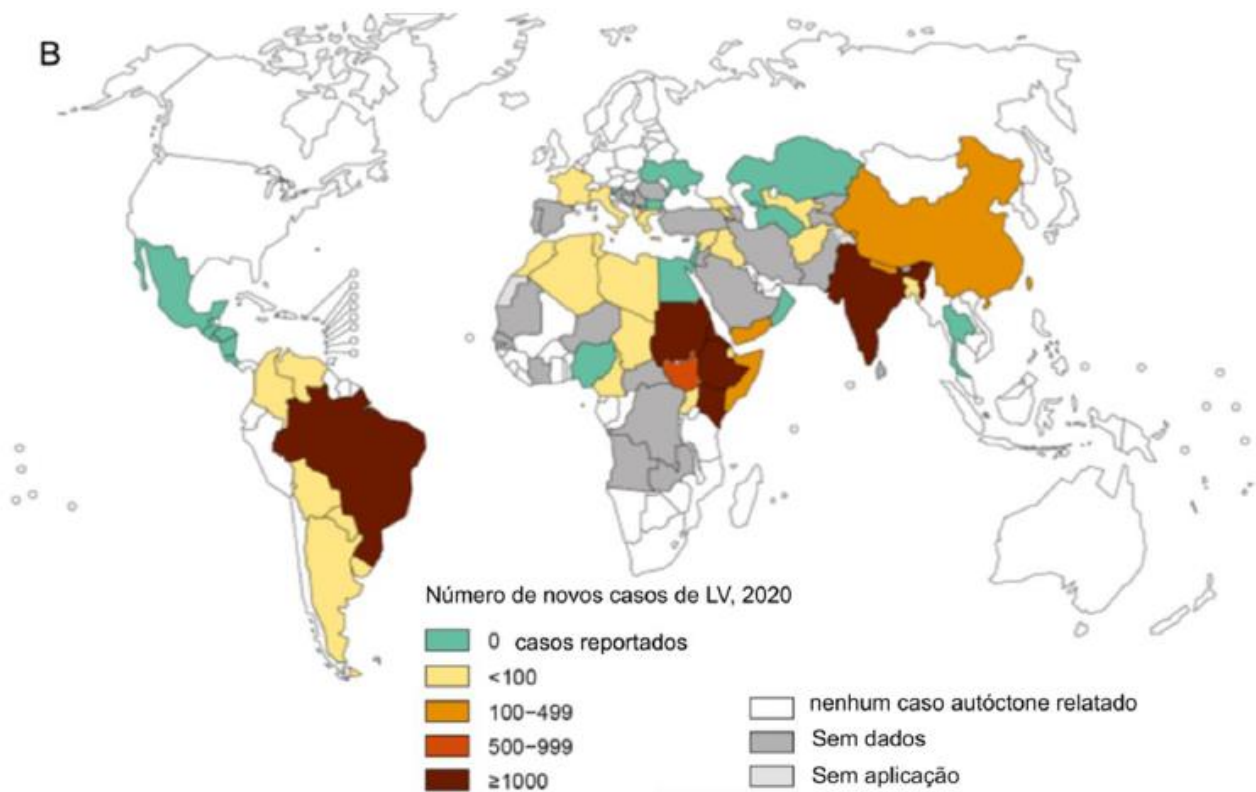
## 1.2 Epidemiologia

A leishmaniose é um problema de saúde em 4 regiões ecoepidemiológicas do mundo: Américas, Leste da África, Norte da África e Oeste e Sudeste Asiático (Figura 2) (WHO, 2021). Pela Organização Mundial da Saúde, a leishmaniose é uma doença endêmica no Brasil, sendo um grande problema de saúde pública (LORETE-TERRA *et al.*, 2021). Mesmo se dispersando em diversas regiões de países endêmicos e em novos países, abrangendo atualmente um total de 98 países ou territórios, a leishmaniose é considerada uma doença negligenciada (WHO, 2021). Atualmente, uma população superior a 1 bilhão de indivíduos reside em regiões endêmicas, sujeitas ao risco de contrair leishmaniose. As estimativas indicam que anualmente são registrados cerca de 30.000 novos casos de Leishmaniose Visceral (LV), a variante clínica mais severa da enfermidade. Destes, 87% dos casos ocorrem em países como Brasil, Eritreia, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Adicionalmente, são identificados anualmente mais de 1 milhão de novos casos de Leishmaniose Cutânea (LC), com 70% destes casos concentrados em nações como Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Iraque, Paquistão e República Árabe Síria (WHO, 2021). O Brasil está entre os países endêmicos para leishmaniose visceral, cutânea e mucocutânea. Em 2019, conforme dados da Organização Mundial de Saúde, o Brasil contribuiu com mais de 97% dos casos de leishmaniose visceral registrados nas Américas. No ano seguinte, em 2020, foram notificados à Organização Mundial

de Saúde 1.954 casos de leishmaniose visceral e 16.056 casos de leishmaniose cutânea no Brasil.

Foi registrado a presença da afecção em diversos municípios e localidades do Estado do Rio de Janeiro, notadamente em Macaé e Campos dos Goytacazes (SILVA, 1915). Em 2007, um caso da doença foi relatado em Paraty, Rio de Janeiro (FIOCRUZ, 2007). Após mais de um século desde esse relato, investigações científicas apontam para a presença do vetor e do parasita na região Norte Fluminense, embora a incidência da patologia seja relativamente reduzida em comparação a outros estados. (CARVALHO; DIAS; RANGEL, 2014).





**Figura 2. Representação epidemiológica da disseminação da leishmaniose cutânea e visceral.** (A) O gráfico ilustra a disseminação global da leishmaniose cutânea, exibindo os novos casos reportados em 2020 e o estado de endemicidade por país. (B) A representação cartográfica apresenta a distribuição mundial da leishmaniose visceral, indicando o número de novos casos reportados em 2020, juntamente com o *status* de endemicidade por país.

### 1.3 Macrófagos

Os macrófagos são células mononucleadas presentes nos tecidos derivados de monócitos circulantes originários da medula óssea ou de células precursoras embrionárias do fígado fetal ou do saco vitelino (GORDON & PLÜDDEMANN, 2017a). Os BMMO (*Bone Marrow Macrophage Cells*) representam células primárias originárias da medula óssea que passam por diferenciação para se tornarem macrófagos em um ambiente controlado *in vitro*, mediante a presença de fatores de crescimento. Essencial para esse processo é o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), cuja presença é indispensável para a proliferação e diferenciação de progenitores mielóides, conduzindo assim à formação de células pertencentes à linhagem

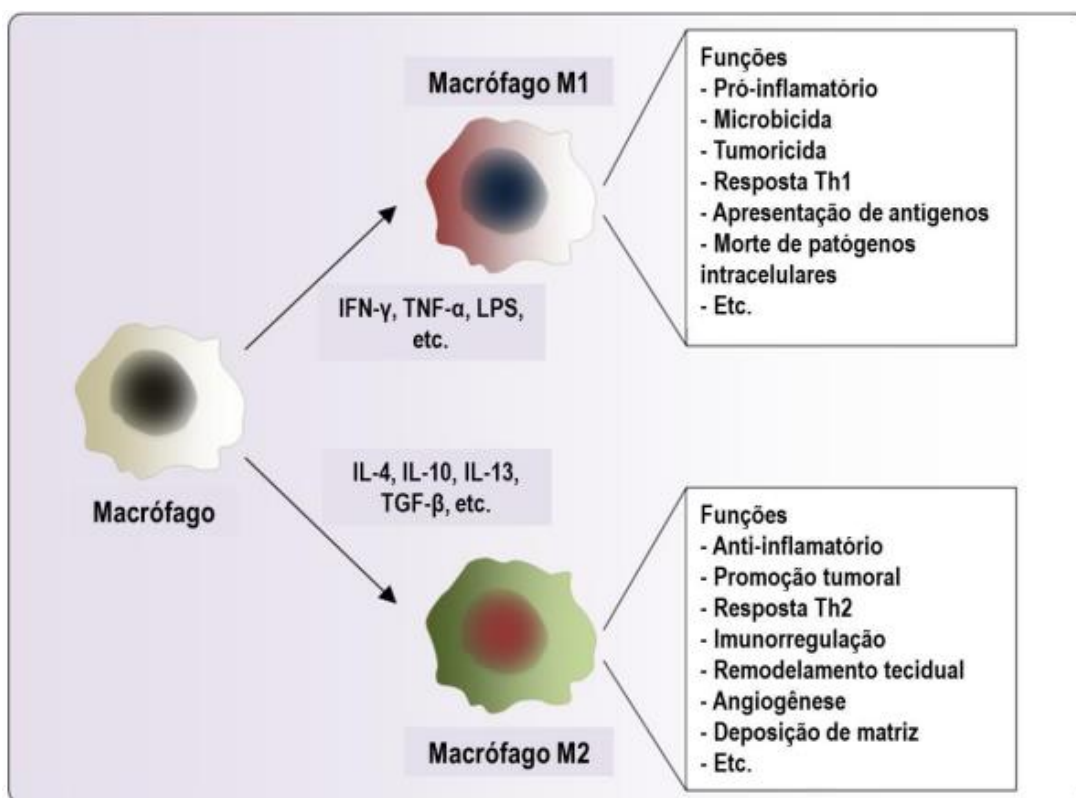
macrófago/monócito (MENDONZA *et al.*, 2022). Segundo o mesmo autor, ao contrário de muitas outras células primárias, os BMMO exibem homogeneidade e são adequados para o cultivo em placas de cultura.

Os macrófagos, sendo células especializadas, desempenham diversas funções no sistema imunológico, incluindo a fagocitose, a apresentação de antígenos e a produção de citocinas. Através de receptores, os macrófagos são capazes de reconhecer patógenos e destruí-los por agentes microbicidas (CASSADO *et al.*, 2011). Os macrófagos são células heterogêneas e participam da imunidade inata e adaptativa (GENTEK *et al.*, 2014), exercem papel crucial como efetores e reguladores significativos da inflamação (GEISSMANN *et al.*, 2010), são capazes de produzir substâncias microbicidas, como NO e espécies reativas de oxigênio (ROS) (WANDERLEY *et al.*, 2019), além de citocinas inflamatórias como TNF $\alpha$ / $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-18. ROS são substâncias químicas reativas produzidas através das reações de oxido-redução derivadas de uma porção do oxigênio consumido e da respiração aeróbia. Essas espécies reativas apresentam geralmente um número ímpar de elétrons na sua última camada eletrônica, portanto, também são conhecidas por radicais livres (DUARTE *et al.*, 2021), são produzidas durante o metabolismo oxidativo da célula, relacionado com a ativação da enzima NADPH oxidase (NOX), muito relacionada ao processo de fagocitose. Quando o macrófago fagocita o parasito, as amastigotas se estabelecem e essa enzima se monta no vacúolo parasitóforo (HORTA *et al.*, 2012). A redução dos níveis de óxido nítrico (NO) propicia a persistência e a replicação, assegurando a disseminação do parasito no hospedeiro (SEABRA *et al.*, 2002; DAMASCENO-SÁ *et al.*, 2021). Dessa forma, os macrófagos são células centrais na resposta contra patógenos, pois quando ativados, aumentam o metabolismo oxidativo através da ação da enzima NOX, expressam a enzima iNOS e ativam os mecanismos de produção de citocinas através da via do fator nuclear kB (NF-kB) e a via de inflamassomos associados a caspases inflamatórias como a caspase-1 (TOMIOTTO-PELLISSIER *et al.*, 2018). Os macrófagos são células profissionais fagocíticas (AMIT *et al.*, 2016). A fagocitose é mediada por reconhecimento, engolfamento, destruição e apresentação de antígenos via complexo principal de histocompatibilidade de classe II (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015). Estas células são os hospedeiros preferenciais da

infecção por *Leishmania*, pois comportam a diferenciação de amastigotas e sua proliferação intracelular. Os macrófagos exibem uma variedade de programas genéticos de ativação, sendo categorizados de forma linear como M1 (ativados de maneira clássica) ou M2 (ativados de maneira alternativa). Nos tecidos, os macrófagos adotam o fenótipo M1 quando estimulados por interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ou fator de necrose tumoral (TNF), além de ligantes dos *Toll-like receptors*, como o lipopolissacarídeo (LPS). (MOSSER & ZHANG, 2008), enquanto o fenótipo M2 é adquirido em resposta à ativação por interleucinas (ILs), tais como IL-4, IL-10 e IL-13 (Figura 3) (MOSSER & EDWARDS, 2008). As células do fenótipo M1 são capazes de produzir mais ROS, como NO via metabolismo da L-arginina pela enzima iNOS, que possui alta atividade microbicida, além de promover a diferenciação de linfócitos T naive para o perfil Th1 (MILLS *et al.*, 2014). A L-arginina é transformada pela enzima iNOS em óxido nítrico (NO) e citrulina (STUEHR *et al.*, 2001), e pela arginase-1 em ornitina e ureia. A ornitina atua como precursora na síntese de poliaminas (Mosser & Edwards, 2008). Essa transformação é regulada por uma complexa cadeia de transporte de elétrons que inclui os cofatores nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN), heme e (6R)-tetrahydrobiopterina (H4B), os quais são essenciais para a realização dessa reação (CINELLI *et al.*, 2021). A arginase-1 inibe a produção de NO pela iNOS ao competir pelo substrato L-arginina, desempenhando um papel importante na regulação equilibrada de L-arginina e no ciclo da ureia (CHANG *et al.*, 1998). Embora a produção de NO seja impulsionada pelo NADPH, o ciclo catalítico avança por meio de uma complexa sequência de transporte de elétrons que ocorre dentro e entre proteínas. O ciclo se inicia quando o NADPH se associa ao domínio redutase, desencadeando a redução termodinamicamente favorável do FAD adjacente em um processo de dois elétrons (CINELLI *et al.*, 2021).

A ativação microbicida dos macrófagos estimula a expressão da iNOS, resultando na produção subsequente de NO. Este fenômeno representa um dos principais mecanismos subjacentes à atividade microbicida dos macrófagos, desempenhando um papel ativo na resposta imune contra protozoários intracelulares no contexto da imunidade celular autônoma (DE GROOTE & FANG, 1995). A principal molécula reativa de nitrogênio é o NO

(CARNEIRO *et al.*, 2016). NO e superóxido são produzidos durante a fase inicial da infecção como parte da explosão oxidativa de macrófagos em resposta a fagocitose e são importantes para o controle da infecção de *Leishmania* (CARNEIRO *et al.*, 2016).



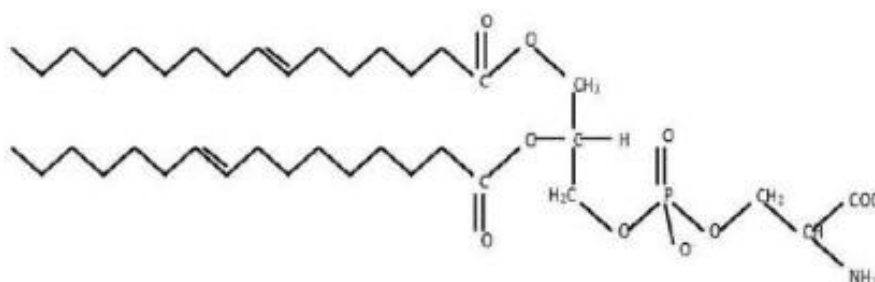
**Figura 3: Polarização e atribuições distintas dos macrófagos M1 e M2.** A ativação de macrófagos M1 ocorre em resposta a estímulos como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , LPS, entre outros, enquanto a ativação de macrófagos M2 ocorre em resposta a IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ , entre outras citocinas. Esses macrófagos manifestam funções diversas. Figura adaptada de SAQIB *et al.* (2018).

#### 1.4 Fosfatidilserina

Com a formação dos corpos apoptóticos, ocorre uma modificação na composição celular, resultando na geração de moléculas quimioatraentes e na exposição de ligantes de endocitose. Isso facilita o reconhecimento dos corpos apoptóticos por células fagocíticas, como os macrófagos. Dessa forma, a célula é fagocitada e removida sem desencadear uma resposta inflamatória prejudicial (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972). A alteração mais minuciosamente investigada na estrutura da membrana plasmática refere-se à perda da sua assimetria lipídica. Nesse contexto, um evento notável ocorre, caracterizado

pela exposição da fosfatidilserina (PS). Este último é considerado um dos sinais mais extensivamente descritos no que diz respeito ao reconhecimento de células que estão passando pelo processo de apoptose (FADOK *et al.*, 2000; UCHIDA *et al.*, 1998).

Em células apoptóticas, a fosfatidilserina (PS) é exposta para o meio extracelular sendo indispensável para o reconhecimento e eliminação dessas células (WANDERLEY; DAMATTA; BARCINSKI, 2020). A PS é um tipo de fosfolípido presente na membrana plasmática. Esta biomembrana é formada por uma bicamada de fosfolípidos, normalmente contendo fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, PS, fosfatidilinositol, esfingomiéline e glicolípidos (NAGATA *et al.*, 2020). Na membrana plasmática, a camada de lípidios voltada para o interior celular apresenta elementos distintos da camada voltada para o ambiente extracelular. A disparidade na composição entre essas camadas cria uma assimetria que resulta em uma diferença de potencial elétrico, estabelecendo condições cruciais para diversos processos biológicos (KIHARA & IGARASHI, 2004). A discrepância no potencial elétrico é predominantemente associada à PS, devido à sua carga negativa e à sua localização predominante na face citosólica da bicamada. Do ponto de vista estrutural, a PS assemelha-se a outros fosfolípidos, apresentando duas caudas hidrofóbicas de hidrocarbonetos, glicerol e um grupo polar (Figura 4). A PS está voltada normalmente para o meio intracelular em células viáveis (ALBERTS *et al.*, 2017).



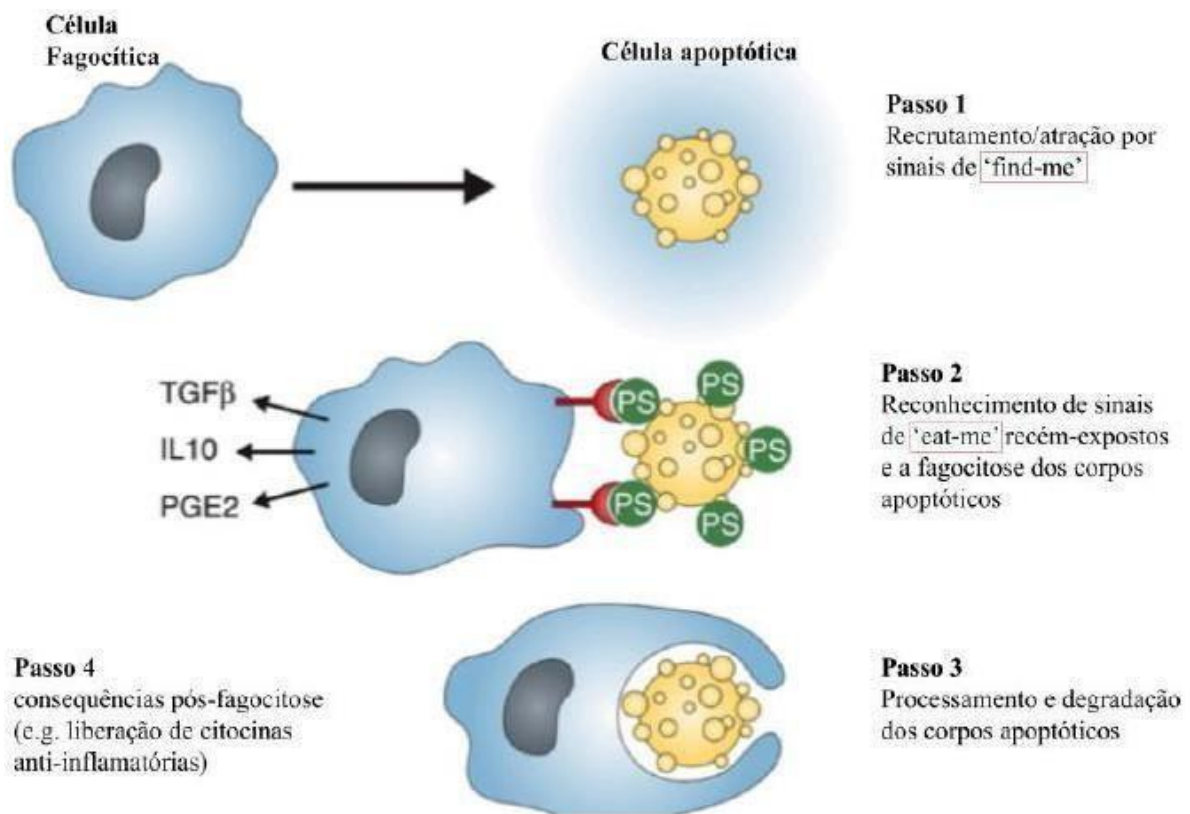
**Figura 4. Estrutura da fosfatidilserina** – Composta por duas caudas de hidrocarbonetos hidrofóbicas, glicerol, um grupo fosfato e a serina. Fonte: CASSILY, 2018.

O reconhecimento da PS exposta por células do tecido e células imunes desencadeia a fagocitose do alvo celular, bem como a ativação anti-



inflamatória e respostas imunossupressoras pelo fagócito (Figura 5). As consequências do reconhecimento da PS na regulação da inflamação sistêmica favorecem o estabelecimento do parasito e sua reprodução. A exposição de PS é a principal sinalização de corpos apoptóticos para fagocitose. O mecanismo de exposição da PS por parasitos viáveis é denominado “mimetismo apoptótico” (BARCINSKI *et al.*, 2003). O mimetismo apoptótico é caracterizado como um mecanismo largamente utilizado por patógenos intracelulares para estabelecimento e disseminação da infecção (WANDERLEY; DAMATTA; BARCINSKI, 2020). Formas amastigotas e promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* apresentam a PS em sua superfície. Consequentemente, auxilia na desativação do macrófago e permite o estabelecimento e manutenção da infecção. Ou seja, o mimetismo apoptótico é a capacidade que *Leishmania* tem de expressar moléculas de superfície semelhantes às expressas por células apoptóticas, permitindo que o macrófago reconheça esse parasito e o fagocite sem gerar uma resposta inflamatória prejudicial (WANDERLEY *et al.*, 2006). A exposição de PS nas duas formas de *Leishmania* é capaz de modular a resposta imune do hospedeiro, favorecendo a infecção e o estabelecimento da doença. As promastigotas PS-positivas são responsáveis por regular negativamente a produção de NO (WANDERLEY *et al.*, 2009). O NO é produzido pela enzima *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), a qual é expressa em macrófagos microbicidas (ADAMNS, 1990). Para que a produção de NO seja induzida é necessário a oxidação do nitrogênio terminal da guanina de L-arginina por NADPH realizado pela iNOS (CARNEIRO *et al.*, 2016).

A PS exposta na infecção de células dendríticas nas amastigotas de *L. amazonensis* não possuem papel de indução de fagocitose, porém possui papel importante na apresentação do antígeno e indução da proliferação das células TCD4<sup>+</sup> (BIRGE *et al.*, 2016).



**Figura 5. Etapas envolvidas no processo de apoptose.** Os sinais "find-me" liberados por células apoptóticas atraem fagócitos para a célula em apoptose. Os fagócitos usam receptores de engolfamento em sua superfície para acionar sinais de "eat-me" fagocitando células apoptóticas. Esse processo de reconhecimento e fagocitose estimula a liberação de citocinas antiinflamatórias, como fator de transformação do crescimento beta (TGF-β), Interleucina 10 (L-10) e prostaglandina E2 (PGE2). Figura adaptada de RAVICHANDRAN, 2010.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Determinar se amastigotas de *L. amazonensis* alteram a produção de NO, a expressão da iNOS e a produção de ROS em macrófagos ativados antes ou após a infecção.

### **2.2 Objetivos específicos**

Avaliar a produção de NO e a expressão da iNOS em macrófagos infectados;

Avaliar se a PS exposta em amastigotas modula a produção de NO e ROS em macrófagos infectados e ativados

## **3 METODOLOGIA**

### **3.1 Parasitos**

As formas amastigotas dos parasitos da espécie *L. amazonensis*, cepa LV78 (MPRP/BR/72/M1845) foram purificadas e mantidas através de passagens em camundongos BALB/c com inóculo de  $1 \times 10^7$  na pata.

### **3.2 Animais e aspectos éticos:**

Camundongos BALB/c foram utilizados para extração da medula óssea e infectados para a manutenção e obtenção de formas amastigotas. Todos os animais foram utilizados com idade até 8 semanas, e foram derivados do biotério da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Biotério UENF). Os animais foram mantidos em gaiolas contendo água e ração. Os protocolos para obtenção dessas células foram avaliados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRJ – MAC047

### **3.3 Obtenção de formas amastigotas:**

Os camundongos foram sacrificados com lesões visíveis e as patas foram retiradas, desinfetadas com álcool e a pele, pus, ossos e tecido necrosado

(observando diferença entre pus e lesão) foram retirados. O tecido foi colocado em macerador com 10 mL de meio DMEM gelado. Após a maceração, a suspensão foi recolhida em tubos de 50 mL e centrifugada a 50 x g por 10 segundos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e transferido para outro tubo de 50 mL, o qual foi centrifugado a 1750 x g por 17 min a 4°C. O pellet foi ressuspensão em 10 mL de meio DMEM gelado. A suspensão foi lavada 3 vezes a 1750 x g por 17 min a 4°C com DMEM gelado. O pellet foi ressuspensão em 10 mL de meio DMEM suplementado com 4% de soro fetal bovino (SFB). Posteriormente, levamos ao shaker por 2 h, à 34°C com 50 rpm de agitação (alternativamente, colocamos no forno de hibridização em rotação). A suspensão foi lavada 2 vezes a 1750 x g por 17 min a 4°C, utilizando DMEM gelado. A suspensão foi incubada overnight à 37°C em estufa e , posteriormente lavada 3 vezes a 1750 x g por 17 min a 4°C, utilizando DMEM gelado. Finalmente, as células foram ressuspensas em 10 mL de meio DMEM suplementado com 4% SFB e as formas amastigotas foram contadas e mantidas no gelo até o uso.

### **3.4 Avaliação da exposição de PS das amastigotas**

Para confirmar a exposição da fosfatidilserina nas amastigotas purificadas de camundongos BALB/c foi realizada a análise por citometria de fluxo com iodeto de propídio (PI) e anexina-FITC (item 3.9). O marcador nuclear fluorescente PI (Sigma, Molecular Probes) foi usado na concentração de 2 µg/mL para a discriminação das células não viáveis que possuem a membrana plasmática comprometida. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (FACS Calibur/Cytek) através do software FlowJo SE/Cytek.

### **3.5 Macrófagos derivados de medula óssea**

Para obtenção de BMMΦ, camundongos de linhagem BALB/c foram sacrificados e as tíbias e fêmur foram removidos e livres de músculos e tendões. Os ossos foram removidos, mantendo-se as epífises e a integridade do osso. Os ossos foram mantidos em etanol 70% por 2-3 minutos em seguida passados para uma placa de Petri estéril, as epífises foram removidas e a medula recolhida, injetando 5 mL de DMEM contendo 10% de

SFB dentro de cada osso. A coloração do osso passa de avermelhado para branco leitoso, a fim de confirmar que todo o sangue tenha saído. As células foram homogeneizadas e cultivadas em placas de Petri na concentração de  $2 \times 10^6$ /mL em 10 mL de meio DMEM contendo 10% de SFB e 20 ng/mL de M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As placas foram incubadas em estufa à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 10 dias. No quinto dia, foi retirado 5 mL do volume de meio de cada placa e adicionado mais 5 mL de meio DMEM completo contendo M-CSF. Os macrófagos (MΦ) foram utilizados após 10 dias de diferenciação.

### **3.6 Plaqueamento dos macrófagos**

Todo o meio da placa contendo os macrófagos foi retirado e 5 mL de PBS foi usado para lavar as células duas vezes. Posteriormente, o PBS foi retirado e acrescido 5 mL de HANK'S sem cálcio e magnésio, suplementado com EDTA. As placas foram deixadas em gelo por 30 min. Em seguida, 20 mL de meio DMEM foi colocado em dois tubos e todo o conteúdo da placa retirado. A suspensão foi centrifugada a 700g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspenso em 2 mL de meio DMEM, homogenizado e contado para plaqueamento dos macrófagos em placa de 24 poços ( $5 \times 10^5$  MΦ/poço), contendo lamínulas redondas de 13 mm<sup>2</sup> estéreis. O meio DMEM completo foi utilizado para incubar os MΦ em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> *overnight* a fim de promover a adesão celular nas lamínulas.

### **3.7 Ativação de macrófagos**

Os macrófagos foram ativados antes ou após a infecção com diferentes concentrações de ativadores: 200 ng/mL de LPS e 20 ng/mL de INF-γ; 100 ng/mL de LPS e 10 ng/mL de INF- γ; 100 ng/mL de LPS e 1 ng/mL de INF- γ; 50 ng/mL de LPS e 1 ng/mL de INF- γ; 50 ng/mL de LPS e 0,1 ng/mL de INF- γ para os testes de ativação dos macrófagos. Para os experimentos de avaliação de NO e expressão de iNOS foi utilizado a concentração de 200 ng/mL de LPS e 20 ng/mL de INF-γ. Para o experimento de avaliação da ROS foi utilizado a concentração de 50 ng/mL de LPS e 1 ng/mL de INF- γ.

### **3.8 Infecção dos macrófagos**

Após a contagem das formas amastigotas, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos, 1000g e ressuspensa em PBS contendo 2  $\mu$ L de CFSE, deixada em estufa durante 30 min à 37°C. Em seguida, foi acrescentado 1 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Os BMM $\Phi$  foram plaqueados em placas de 24 poços ( $5 \times 10^5$  M $\Phi$ /poço) contendo lamínulas redondas de 13 mm<sup>2</sup> estéreis. Utilizou-se para isso meio DMEM completo, e os M $\Phi$  foram incubados em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> *overnigh* para a adesão celular nas lamínulas. As formas amastigotas purificadas de lesões de camundongos BALB/c foram contadas e lavadas em PBS gelado para interação. De acordo com o número de macrófagos, sendo 3:1 de amastigota.

### **3.9 Bloqueio da PS**

Para o bloqueio com anexina-V, os parasitos foram suspensos em tampão de ligação (100 mM NaCl, 10 mM HEPES e 2 mM CaCl<sub>2</sub>) sem e com a presença de 0,5  $\mu$ g/mL de anexina-V e incubados por 30 minutos a 4°C.

### **3.10 Dosagem de NO**

A produção de NO foi avaliada indiretamente pela concentração de nitrito no meio através do reagente de Griess. Depois das interações com os parasitos, 50  $\mu$ L do sobrenadante de cada poço foi misturado com a mesma proporção de reagente de Griess (1:1) em uma placa de 96 poços. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm de absorvância. A concentração de nitrito foi calculada a partir da curva-padrão usando nitrito de sódio diluído em DMEM (Seabra *et al.*, 2002).

### **3.11 Microscopia de fluorescência**

Após a fixação com formoldeído a 4%, as células foram lavada 3x com PBS. As células foram permeabilizadas em Triton X-100 2% por 10 min e lavadas 3x com PBS. Em seguida, as células foram incubadas em cloreto de

amônio 50mM por 30 min, lavadas 2x com PBS e 1x com PBS + BSA 3%. As células foram incubadas com o anticorpo primário (anti-inos rabbit) durante 1 h. O anticorpo foi diluído na proporção de 1:200 em PBS + BSA 3% . As células foram lavamos 3x em PBS + BSA. A lamínula foi incubada com o anticorpo secundário (40 uL) por 1 h. A lamínula foi lavada novamente 3x com PBS + BSA, montada com 10 uL de Prolong gold contendo DAPI (marcador que se liga ao material genético) e incubada *overnight* para análise na microscopia. Todas as amostras foram observadas em microscópio óptico de fluorescência Axioplan (Zeiss MrC5) através do programa Axiovision v4.6.

### **3.12 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)**

Os macrófagos foram infectados com as amastigotas tratadas com bloqueadores de PS e ativados com LPS e IFN- $\gamma$ . Após tempos definidos, as células foram lavadas e incubadas com diclorofluoresceína na concentração de 10  $\mu$ M por 30 minutos a 37°C. Após lavagens das células com PBS, as células foram removidas da placa de cultura de 6 poços e a emissão de fluorescência foi quantificada por citometria de fluxo (FACS Calibur/Cytek) através do software FlowJo SE/Cytek.

### **3.13 Análise estatística**

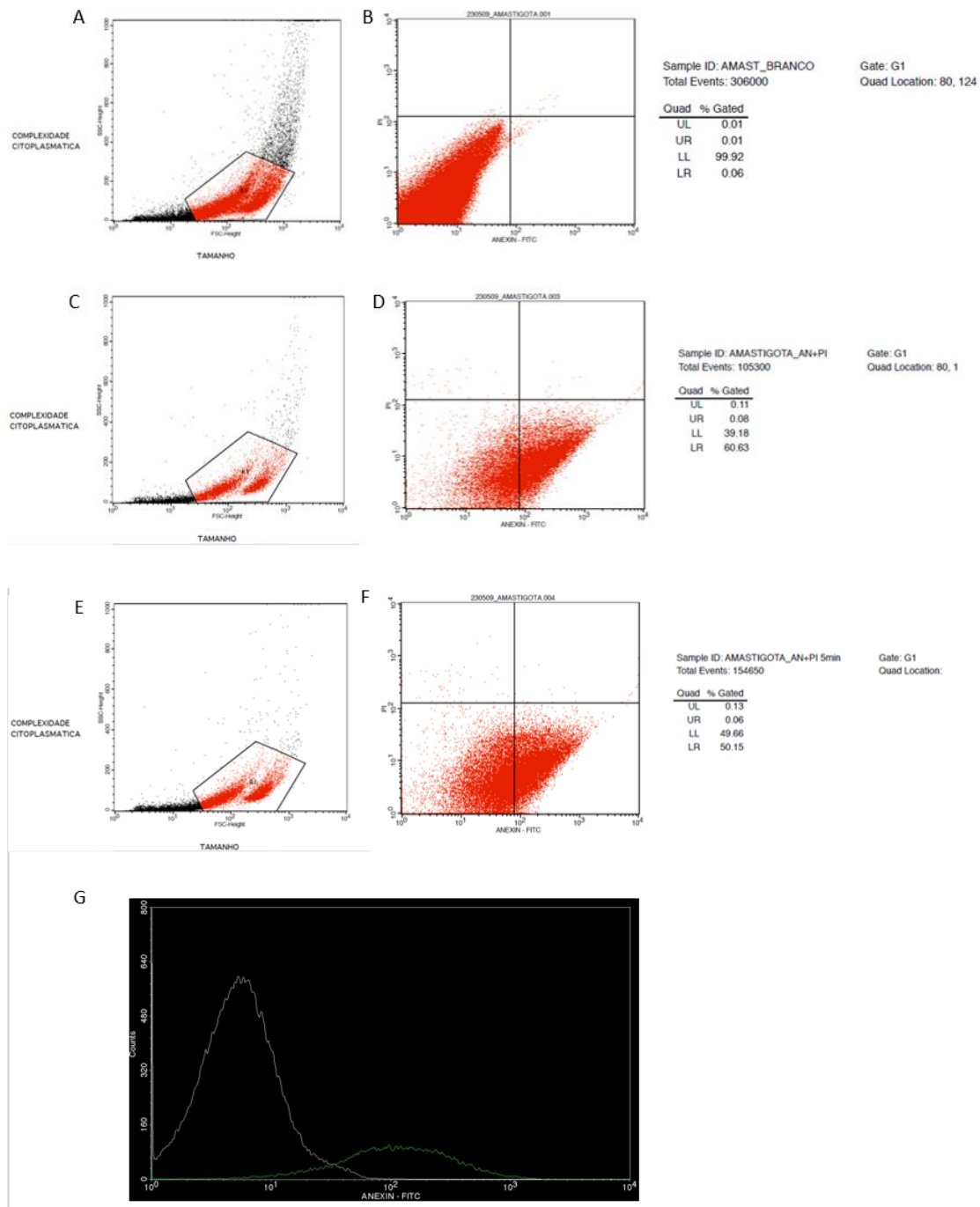
Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism (versão 9.0. 2020). Em todos os dados obtidos foi aplicado o teste Two-way ANOVA e o pós-teste foi realizado pelo método de Tukey (Tukey's Multiple Comparison Test) com  $P < 0,05$ .

## **4- RESULTADOS**

Para confirmar a exposição da fosfatidilserina nas amastigotas purificadas de camundongos BALB/c foi realizada a análise por citometria de fluxo com iodeto de propídio (PI) e Anexina-FITC (Figura 6). Para cada amostra utilizamos os parâmetros de tamanho, granulosidade (complexidade) e intensidade relativa de fluorescência para os marcadores PI e anexina-FITC.

Inicialmente, as amostras do controle incubadas somente com tampão de cálcio foram usadas para estabelecermos os eventos analisados (gate) no *dot-plot* de tamanho (FSC - *Forward Scatter*) com complexidade (SSC - *Side Scatter*). Isso permitiu definir a população de interesse (amastigotas) em todas as amostras examinadas, excluindo eventos fora do gate, como células mortas e debris (Figura 6 A, C, E). Foi possível observar nos *dot-plots* da região 1 (R1) a fluorescência dos eventos sem (Figura 6 B) e com os marcadores PI e anexina-FITC (Figura 6 D, F). Na figura 6B, observamos que as amastigotas não emitiram fluorescência, pois não foram incubadas com os marcadores. Quando as amastigotas foram incubadas com os dois marcadores, observamos que 60% das células marcaram para anexina-V e todas estavam viáveis devido a ausência de sinal para PI. Quanto as amastigotas foram incubadas por mais 5 minutos com PI houve uma leve redução de amastigota anexina-V positiva (Figura 6 F). A figura 6 G mostra um histograma no qual a linha cinza representa a fluorescência de anexina-FITC (Figura 6 B, sem marcação) e a linha verde representa a fluorescência de anexina-FITC da figura 6 D, com claro deslocamento para a direita de fluorescência. Os resultados indicam que as amastigotas expuseram PS.

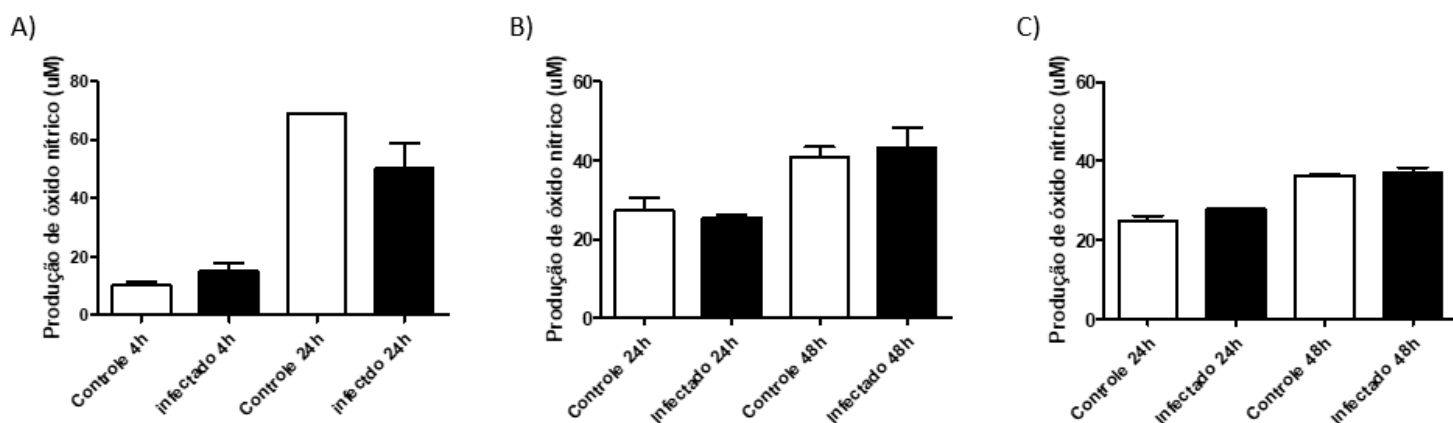




**Figura 6. Análise por citometria de fluxo da exposição de fosfatidilserina de amastigotas de *Leishmania amazonensis* purificadas de lesões da pata de camundongo. (A) Dot-plot de complexidade por tamanho de amastigotas. O gate R1 compreende as amastigotas (vermelho – população analisada) excluindo os eventos de pequeno tamanho e de maior complexidade (preto). (B) Dot-plot de iodeto de propídeo (PI) x Anexina-V (anexina-FITC) de amastigotas sem marcação (gate R1), onde 99% dos eventos são duplos negativos. (C) Dot-plot de complexidade por tamanho de amastigotas com marcadores (PI e anexina-FITC). O gate R1 compreende as amastigotas (vermelho) que foram analisadas em “D”. (D) Dot-plot de PI x anexina-FITC de amastigotas com marcação (gate R1), onde 61% dos eventos são negativos**

para PI e positivos para anexina-FITC. (E) *Dot-plot* de complexidade por tamanho de amastigotas com marcadores incluindo PI por mais 5 minutos de incubação. O gate R1 compreende as amastigotas (vermelho) que foram analisadas em “F”. (F) *Dot-plot* de PI x anexina-FITC de amastigotas com marcação (gate R1), onde 50% dos eventos são negativos para PI e positivos para anexina-FITC. (G) Histograma de evento por anexina-FITC dos *dot-plots* “B” (cinza) e “D” (verde) mostrando a exposição de fosfatidilserina quando anexina-FITC e PI foram adicionados nas amastigotas. Note a positividade para anexina-FITC das amastigotas, indicando a exposição de fosfatidilserina.

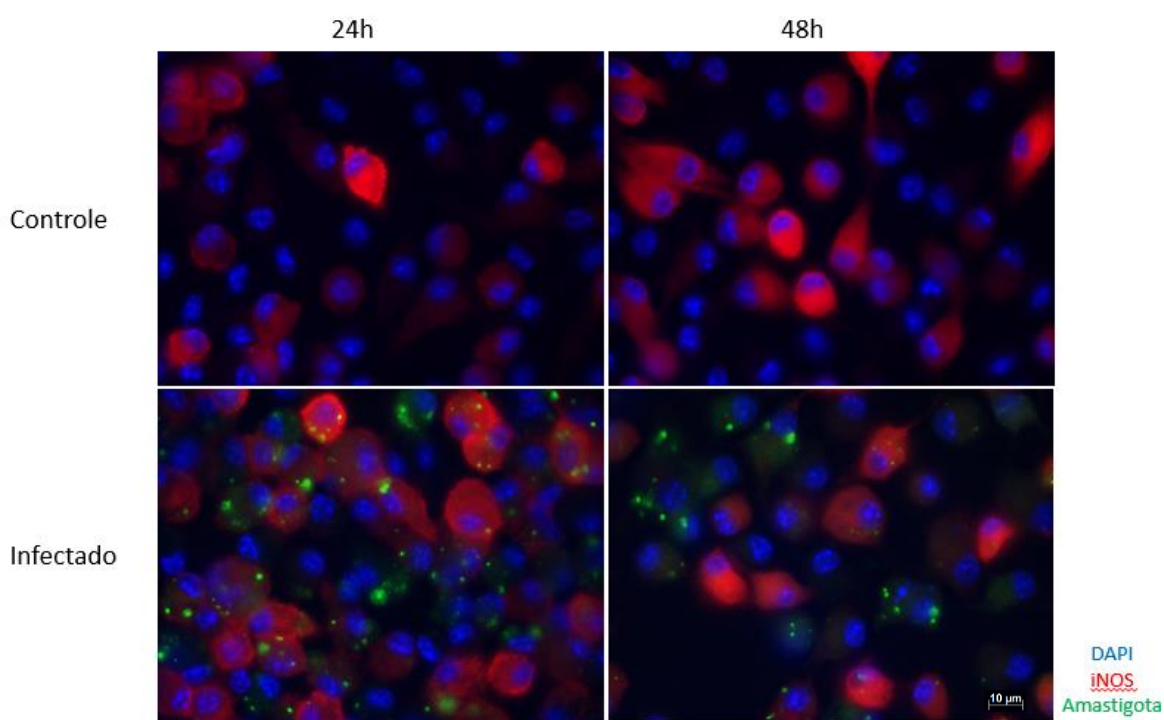
Para entender como as amastigotas modularam a resposta microbicida dos macrófagos, analisamos a produção de óxido nítrico no sobrenadante da cultura de macrófagos ativados 24 h antes e infectados com amastigotas. No experimento 1, observamos que a infecção com amastigotas por 4 h resultou em produção similar de óxido nítrico em relação ao controle infectado (Figura 7 A). No entanto, após 24 h de infecção com amastigotas observamos tendência de redução na produção de óxido nítrico (Figura 7 A). No entanto, nos experimentos 2 e 3 (Figura 7 B e C) não foram encontradas diferenças estatísticas significativas na produção de óxido nítrico entre não infectado (controle) e infectado, tanto com 24 h e 48 h. Esse dado sugere que a infecção por amastigota não foi capaz de inibir a produção de óxido nítrico quando a ativação dos macrófagos foi realizada 24 h antes da infecção.



**Figura 7. Produção de óxido nítrico de macrófagos derivados de medula óssea ativados 24 h antes da infecção com amastigotas de *Leishmania amazonenses* por 4, 24 e 48 h. Macrófagos não infectados ativados (controle - coluna branca) e infectados ativados (coluna preta) (A) Experimento 1. Macrófagos infectados por 4 e 24 h. (B) Experimento 2. Macrófagos infectados por 24 e 48 h. (C) Experimento 3. Macrófagos infectados por 24 e 48 h. Note que houve tendência de inibição de produção de óxido nítrico no Experimento**

1, mas nos Experimentos 2 e 3 a produção de óxido nítrico ficou similar ao da infecção.

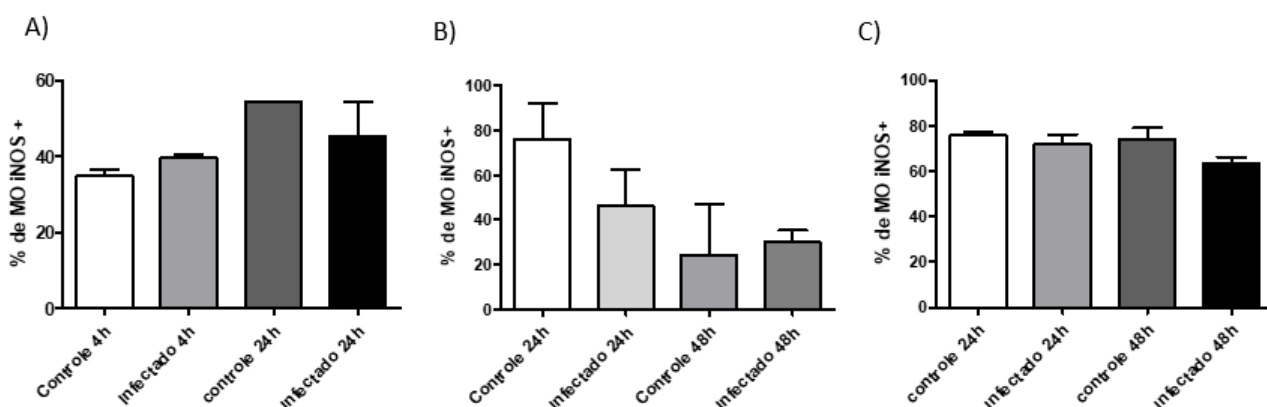
O próximo passo foi verificar se a infecção modulava a expressão de iNOS nos macrófagos. A técnica de microscopia de fluorescência foi realizada marcando os macrófagos para iNOS e as amastigotas com CFSE. A partir de uma análise qualitativa, observa-se que os macrófagos expressaram iNOS de forma heterogênea. No grupo infectado, observa-se a presença de amastigota em macrófagos iNOS positivos e negativos (Figura 8).



**Figura 8. Microscopia de fluorescência de macrófagos derivados de medula óssea ativados 24 h antes da infecção com amastigotas de *Leishmania amazonenses* por 24 e 48 h e marcados para iNOS (vermelho), amastigotas (verde) e núcleo de macrófagos (azul - DAPI). Macrófagos apresentam heterogeneidade na expressão de iNOS tanto no controle como no infectado com 24 e 48 h de cultivo. Amastigotas infectaram macrófagos iNOS positivos e negativos.**

Imagens obtidas na microscopia de fluorescência foi quantificada avaliando a porcentagem de macrófagos iNOS positivos. No experimento 1, o grupo controle ativado por 4 h (Figura 9 A - coluna branca) teve em torno de 35% de macrófagos iNOS positivos. No grupo 4 h de infectado, a porcentagem de macrófagos iNOS positivo foi para cerca de 40% (Figura 9 A - coluna cinza). O grupo controle de 24 h (Figura 9 A - coluna cinza escura) teve aumento para

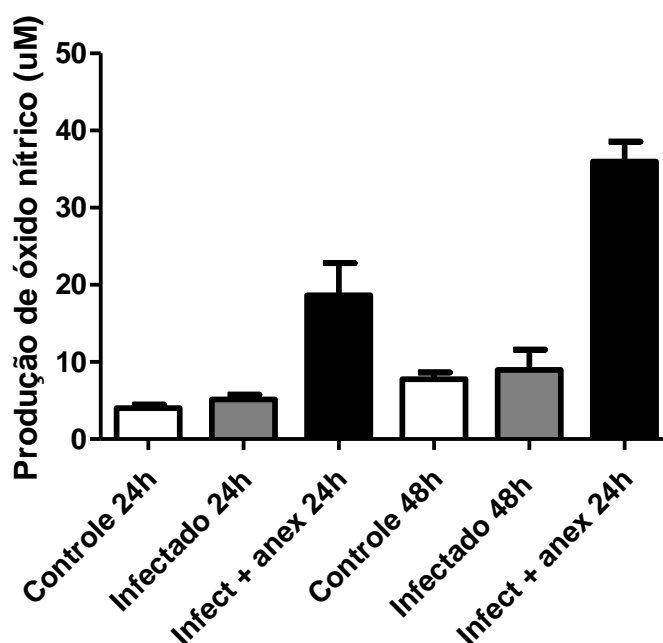
cerca de 50%. No grupo de macrófagos ativado e infectado por 24 h houve uma tendência de redução da porcentagem de macrófagos iNOS positivos (Figura 9 A - coluna preta). No experimento 2, a porcentagem de macrófagos ativado que expressaram iNOS foi de 80% e após a infecção detectamos uma redução para 40% de macrófagos expressando iNOS. No grupo controle ativado por 48 h a porcentagem de macrófagos iNOS positivos foi de 20% e após a infecção subiu para 35% (Figura 9B). No experimento 3, a porcentagem de macrófagos iNOS positivos não infectados foi de 75% em 24 h, mantendo valor similar após a infecção (Figura 9 C). Com 48 h de cultivo, o grupo de macrófagos ativado não infectado apresentou 75% de macrófagos iNOS positivos e como a infecção houve tendência de redução da porcentagem de macrófagos iNOS positivos para cerca de 70% (Figura 9C).



**Figura 9: Porcentagem de macrófagos iNOS positivos ativados 24 h antes da infecção com amastigotas de *Leishmania amazonenses* por 4, 24 e 48 h.** (A) Experimento 1. Macrófagos infectados por 4 e 24 h. (B) Experimento 2. Macrófagos infectados por 24 e 48 h. (C) Experimento 3. Macrófagos infectados por 24 e 48 h. Note que houve tendência de manutenção da porcentagem de expressão de iNOS nos experimentos 1 e 3 e tendência de redução da expressão de iNOS no experimento 2.

Um novo experimento foi realizado infectando os macrófagos não ativado com amastigotas controle e previamente tratadas com anexina-V. Os macrófagos foram ativado com INF-  $\gamma$  e LPS em concentrações mais baixas que usadas nos primeiros experimentos após a infecção. Objetivamos verificar se a infecção inibia a produção de óxido nítrico quando os macrófagos foram

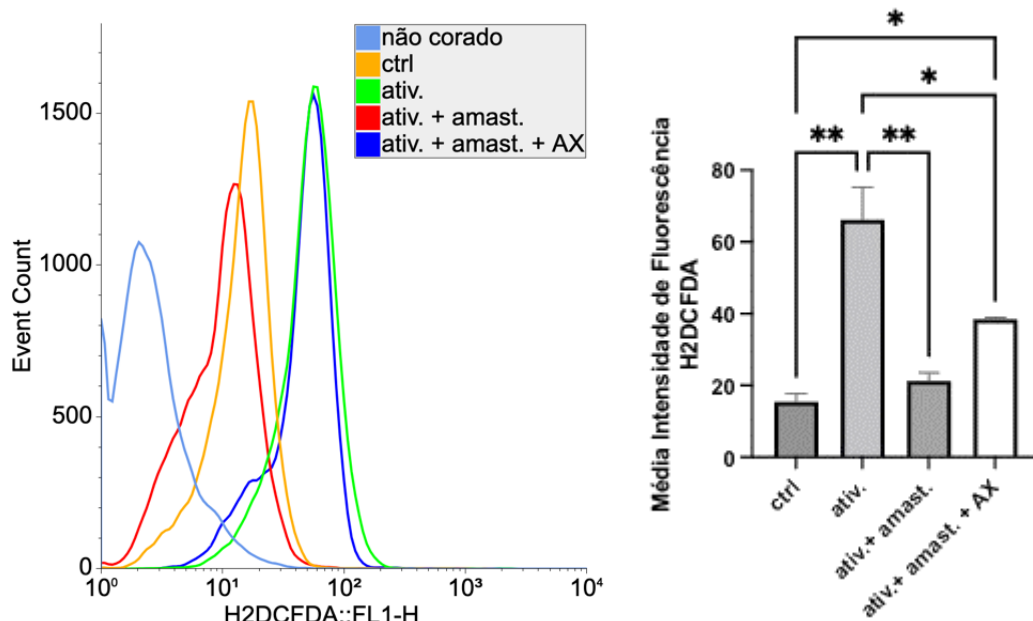
ativados após a infecção. Nota-se na figura 10, que houve baixa produção de óxido nítrico nos macrófagos controle com 24 h de infecção, e valor similar nos macrófagos infectados. Porém quando as amastigotas foram tratadas com anexina-V, houve aumento considerável da produção de óxido nítrico pelos macrófagos. O mesmo padrão de produção de óxido nítrico dos macrófagos se repetiu no grupo de 48 h, aumentando consideravelmente para cerca de 35  $\mu\text{M}$  quando as amastigotas foram tratadas com anexina-V. No entanto, a infecção não inibiu a produção de óxido nítrico (Figura 10).



**Figura 10: Produção de óxido nítrico de macrófagos derivados de medula óssea ativados após a infecção com amastigotas de *Leishmania amazonenses* por 24 e 48 h com e sem bloqueio da fosfatidilserina por anexina-V.** Macrófagos não infectados ativados (controle - coluna branca 24 e 48 h); infectados ativados sem bloqueio de fosfatidilserina (coluna cinza 24 e 48 h) e infectados ativados com bloqueio de anexina-V (coluna preta 24 e 48 h).

A avaliação de ROS foi analisada por citometria de fluxo. O experimento foi realizado com 6 amostras em triplicata, ativando os macrófagos depois da infecção. Diclorofluoresceína foi utilizada como agente de detecção de ROS. Macrófagos ativados não infectados produziram altos níveis de ROS. No entanto, macrófagos infectados e ativados tiveram redução da produção de ROS. Porém, macrófagos infectados com amastigotas bloqueadas com anexina-V tiveram a produção de ROS similar a macrófagos ativados não

infectados (Figura 11). Isso sugere que a exposição de PS do parasito modula negativamente a produção de ROS.



**Figura 11: Análise de citometria para avaliação de produção de radicais de oxigênio em macrófagos derivados de medula óssea ativados após a infecção com amastigotas de *Leishmania amazonenses* por 24 h com e sem bloqueio da fosfatidilserina por anexina-V. Histograma: ctrl – macrófagos controle; ativ. – macrófagos ativados com interferon gama e LPS; amast. – macrófagos infectados com amastigotas; AX – amastigotas pré-tratadas com anexina V; H2DCFDA – diclocrofluoresceína. Note como a infecção reduziu a produção de radicais de oxigênio, e que a inibição da produção de radicais de oxigênio foi parcialmente revertida com o bloqueio da fosfatidilserina. Média e desvio padrão de 1 experimento em triplicata. \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ , pelo teste One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey.**

## 5- DISCUSSÃO

De acordo com a OMS, a leishmaniose é uma doença negligenciada devido à falta de investimento significativo no desenvolvimento de medicamentos e estratégias terapêuticas, apesar de sua prevalência e incidência global. Portanto, é crucial compreender os vários mecanismos empregados pelo parasito para infectar e se alojar em hospedeiros vertebrados, a fim de progredir no desenvolvimento de abordagens de controle para essa enfermidade. O mimetismo apoptótico desempenha um papel crucial

no estabelecimento de infecções intracelulares (BIRGE *et al.*, 2016; BARCINSKI *et al.*, 2003). No entanto, os mecanismos relacionados à sua atuação não são totalmente esclarecidos. Além disso, a infecção associada a esse processo se apresenta como um modelo de grande relevância no estudo da resposta imune antiparasitária e na dinâmica da relação parasito-hospedeiro, podendo gerar informações que podem ser exploradas para outras doenças causadas por protozoários. Para contribuir com essa temática, utilizamos macrófagos ativados antes e depois da infectados para avaliação da produção de NO, expressão da iNOS e avaliação de ROS com e sem bloqueio da PS. Inicialmente, confirmamos a exposição de PS em amastigotas. Para compreender a produção de NO de macrófagos, ativamos os macrófagos antes da infecção com amastigotas, e verificamos que o parasito não modulou essa resposta microbicida. A expressão de iNOS em macrófagos foi heterogênea. Localizamos macrófagos iNOS positivos e negativos infectados com amastigotas e detectamos que a infecção de macrófagos ativados 24 h antes resultou em uma tendência de redução da expressão de iNOS. A produção de NO em macrófagos ativados depois da interação não alterou com a infecção, mas o bloqueio da PS aumentou a produção de NO dos macrófagos. A produção de ROS de macrófagos ativados depois da interação mostrou que a infecção reduziu a produção de ROS e o bloqueio da PS de amastigotas reverteu essa modulação negativa da produção de ROS causada pela infecção. A pesquisa com macrófagos ativados revelou que a exposição de PS em amastigotas foi confirmada. Ao ativar os macrófagos antes da infecção, o parasito não afetou a resposta microbicida de produção de NO. A expressão heterogênea de iNOS em macrófagos sugeriu uma redução quando ativados 24 h antes da infecção. Após a interação, a produção de NO não foi afetada pela infecção, mas o bloqueio da PS aumentou essa produção. Quanto às ROS, a infecção diminuiu sua produção, revertida pelo bloqueio da PS em amastigotas. Esses resultados oferecem *insights* cruciais sobre os mecanismos na resposta imune à leishmaniose.

A identificação do mimetismo apoptótico foi estabelecida ao observar o papel da PS como um fator de virulência em amastigotas de *L. amazonensis* (DE FREITAS BALANCO *et al.*, 2001; WANDERLEY *et al.*, 2009), esse fato foi confirmado em outras infecções parasitárias intracelulares, como as causadas

por *Toxoplasma gondii* (SEABRA *et al.*, 2004) e *Trypanosoma cruzi* (DAMATTA *et al.*, 2007). Segundo, UCKER *et al.* (2012) a PS é um dos principais marcadores associados ao mimetismo apoptótico. No presente trabalho, inicialmente, conduzimos uma análise por citometria de fluxo com o objetivo de verificar se as amastigotas estavam expondo PS. Em seguida, realizamos o bloqueio utilizando anexina-V e os dados foram confirmados, tendo cerca de 61% das amastigotas expondo a PS. Este resultado corrobora com estudos anteriores que mostram a capacidade da amastigota em expor PS possibilitando a proposta do conceito de mimetismo apoptótico (WANDERLEY *et al.*, 2006). Esse processo ocorre quando os parasitos expõem em sua superfície PS, sendo reconhecidos por fagócitos. Essas moléculas facilitam a infecção e modulam negativamente a atividade inflamatória das células hospedeiras (WANDERLEY *et al.*, 2006). O iodeto de propídio (PI) é uma sonda fluorescente essencial para a avaliação da integridade da membrana plasmática celular. Portanto, se a célula incorporar o PI, é possível inferir que ocorreu uma deterioração na integridade da membrana plasmática. Isso ocorre porque, em condições normais, as células são impermeáveis ao PI (VERMES *et al.*, 1995). O mecanismo ligado à exposição de PS nas membranas dos parasitos *Leishmania* ainda não é completamente compreendido. No entanto, é conhecido que o aumento da exposição de PS ocorre devido à ativação dos macrófagos pela ação de citocinas produzidas pelos linfócitos T CD4 após a infecção (WANDERLEY *et al.*, 2006). O resultado obtido por nós indica que o parasito pode modular a resposta imunológica, promovendo a sua sobrevivência no hospedeiro como demonstrado (WANDERLEY *et al.*, 2019).

Macrófagos ativados antes da interação e infectados não tiveram alteração da produção de NO, diferentemente do que era esperado, tendo em vista que a exposição de PS acarretaria na indução de TGF- $\beta$  e na regulação negativa da expressão da enzima iNOS (SEABRA *et al.*, 2004). Dessa forma, haveria diminuição da expressão de iNOS e, conseqüentemente, diminuição da produção de NO. Porém, como não houve alteração na produção de NO sugere-se que a exposição de PS não tenha sido suficiente a ponto de inibir ou modular a expressão da iNOS e a conseqüente produção de NO. Além disso, como os macrófagos foram ativados para perfil M1 24 h antes da infecção pode



ser que o parasito não seja capaz de reverter este perfil do macrófago, tendo em vista que já estão microbicidas.

Os resultados obtidos da expressão da iNOS foram avaliados qualitativamente, confirmando que a população de macrófagos de medula é mais homogênea como descrito por MENDONZA *et al.* (2022). Além disso, detectamos que a infecção com amastigotas de macrófagos ativados 24 h antes gerou uma tendência de redução da expressão de iNOS, como descrito por PADRÃO *et al.* (2014), a exposição de PS regula negativamente a produção de NO. Dessa forma, sugere-se que a exposição de PS das amastigotas tenha causado essa tendência de modulação negativamente da expressão de iNOS nos macrófagos infectados.

Observamos que não houve inibição da produção de NO em macrófagos infectados e ativados depois da infecção, o que não corroborou com os dados de WANDERLEY *et al.*, 2006. Porém, com o bloqueio da PS detectamos aumento da produção de NO dos macrófagos. Esse aumento da produção de NO após bloqueio da PS exposta pela amastigota indica que esse fosfolípido tem ação antiinflamatória modulando negativamente a expressão de iNOS. Dessa forma, se faz necessário a repetição destes experimentos para confirmação dos dados.

Analisamos através de citometria de fluxo a produção de ROS de macrófagos ativados após a interação e os dados indicam que a infecção por amastigota reduziu a produção de ROS. Porém, com a utilização da anexina-V para o bloqueio da PS de amastigotas, houve uma reversão da modulação negativa da produção de ROS causada pela infecção. Estes resultados estão de acordo com o que era esperado, já que a exposição de PS ocasiona uma resposta imunossupressora (WONG *et al.*, 2010) sugerindo que a exposição de PS das amastigotas tem um papel importante no controle da produção de ROS.

A partir desses resultados, é necessário repetir os experimentos para confirmar os dados achados bem como analisar outras vias microbicidas, além de NO e ROS. Talvez, ao utilizar a anexina-V para bloquear a PS nas amastigotas e ativar as células depois da infecção com concentrações inferiores ocorra inibição da produção de NO com modulação da expressão de iNOS.

## **6- CONCLUSÃO**

De acordo com os dados obtidos podemos concluir que o parasito não inibe a produção de NO. Porém, partindo do pressuposto que o bloqueio de PS com anexina-V, o macrófago foi capaz de responder mais efetivamente, através de mecanismo microbicidas como produção de NO e ROS, reforçamos a importância da exposição de PS como mecanismo evasivo. Estes resultados contribuem identificando mecanismos de inibição de sistema microbicidas de macrófago, atualmente ainda não esclarecidos. Sendo assim, posteriormente podemos sugerir novas estratégias de intervenção no estabelecimento e disseminação do parasito.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. **Molecular basis of macrophage activation: Diversity and its origins**. In: LEWIS, C. E.; MCGEE, J. O'D. (Eds.). *The Macrophage*. New York: IRL Press, 1992. p. 75-114.
- AGÊNCIA FIOCRUZ. **Caso de infecção por *Leishmania amazonensis* é identificado no RJ**. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/caso-de-infec%C3%A7%C3%A3o-por-leishmania-amazonensis-%C3%A9-identificado-no-rj>. Acesso em: [26 de abril de 2024]
- AKHOUNDI, M. et al. **A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies**. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 10, n. 3, e0004349, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- AMIT, I.; WINTER, D. R.; JUNG, S. **The role of the local environment and epigenetics in shaping macrophage identity and their effect on tissue homeostasis**. *Nature Immunology*, Nature Publishing Group, 2016.
- BARCINSKI, M. A. et al. **The role of apoptotic mimicry in host-parasite interplay: Is death the only alternative for altruistic behavior?** *Kinetoplastid Biol Dis*, v. 2, n. 1, 2003.
- BIRGE, R. B. et al. **Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and câncer**. *Cell Death and Differentiation*, Nature Publishing Group, 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, [s.n.].
- BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. **Leishmaniasis**. *The Lancet*, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.
- CARNEIRO, P. P. et al. **The role of nitric oxide and reactive oxygen species in the killing of *Leishmania braziliensis* by monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis**. *PLoS ONE*, v. 11, n. 2, 2016.
- CASSADO, A. DOS A. et al. **Cellular renewal and improvement of local cell effector activity in peritoneal cavity in response to infectious stimuli**. *PLoS ONE*, v. 6, n. 7, 2011.

- CASSILLY, C. D.; REYNOLDS, T. B. PS, **It's Complicated: The Roles of Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine in the Pathogenesis of *Candida albicans* and Other Microbial Pathogens.** *Journal of fungi* (Basel, Switzerland), v. 4, n. 1, 28, 2018. <https://doi.org/10.3390/jof4010028>
- CHANG, E. C. **Distinguishing between optimism and pessimism: A second look at the "optimism-neuroticism hypothesis."** In: HOFFMAN, R. R.; SHERRIK, M. R.; WARM, J. S. (Eds.). *Viewing psychology as a whole: The integrative science of William N. Dember.* Washington, DC: American Psychological Association, 1998. p. 415 — 432.
- CINELLI, M. A. et al. **Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition.** *Medicinal research reviews*, v. 40, n. 1, p. 158–189, 2020. <https://doi.org/10.1002/med.21599>
- COURRET, N. et al. **Kinetics of the intracellular differentiation of *Leishmania amazonensis* and internalization of host MHC molecules by the intermediate parasite stages,** 2001.
- DE GROOTE, M. A.; FANG, F. C. **NO inhibitions: Antimicrobial properties of nitric oxide. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 21, Suppl 2, p. S162–S165, 1995. [https://doi.org/10.1093/clinids/21.supplement\\_2.s162](https://doi.org/10.1093/clinids/21.supplement_2.s162)
- DUARTE, E. S. M; ADESSE, D. **Toxoplasma gondii. Parasites and Parasitic Diseases,** 2017.
- EDIDIN, M.; SESSIONS, V. A. **Heterogeneity in the plasma membrane lipids of eukaryotic cells. Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 414, p. 8–18, 1983. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1983.tb31670.x>
- FADOK, V. A. et al. **A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells.** *Nature*, v. 405, p. 85–90, 2000.
- GENTEK, R.; MOLAWI, K.; SIEWEKE, M. H. **Tissue macrophage identity and self-renewal,** 2014.
- GEISSMANN, F. et al. **Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells.** *Science*, v. 327, n. 5966, p. 656–661, 2010. <https://doi.org/10.1126/science.1178331>
- GORDON, S.; PLÜDDEMANN, A. **Tissue macrophages: Heterogeneity and functions.** *BMC Biology*, BioMed Central Ltd., 2017a.

- HAANEN, C.; VERMES, I. **Apoptosis and inflammation. Mediators of inflammation**, v. 4, n. 1, p. 5–15, 1995. <https://doi.org/10.1155/S0962935195000020>
- HORTA, M. F. et al. **Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. Journal of Parasitology Research**, 2012.
- JENKINSON, C. P.; GRODY, W. W.; CEDERBAUM, S. D. **Comparative properties of arginases. Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 114, n. 1, p. 107–132, 1996. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(95\)02138-8](https://doi.org/10.1016/0305-0491(95)02138-8)
- KAYE, P.; SCOTT, P. **Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface**, 2011.
- KIHARA, A.; IGARASHI, Y. **Cross talk between sphingolipids and glycerophospholipids in the establishment of plasma membrane asymmetry. Molecular biology of the cell**, v. 15, n. 11, p. 4949–4959, 2004. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-06-0458>
- LEVENTIS, P. A.; GRINSTEIN, S. **The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. Annual Review of Biophysics**, 2010.
- LORETE-TERRA, A. R. DE M. et al. **In vitro activity on Leishmania amazonensis promastigote forms of a new Co (II) coordination complex. Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 14653–14668, 2021.
- MILLS, C. D.; LEY, K. **M1 and M2 Macrophages: The Chicken and the Egg of Immunity. Journal of Innate Immunity**, v. 6, n. 6, p. 716-726, 2014. <http://dx.doi.org/10.1159/000364945>.
- MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. **Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958–969, 2008. <https://doi.org/10.1038/nri2448>
- NAGATA, S.; SAKURAGI, T.; SEGAWA, K. **Flippase and scramblase for phosphatidylserine exposure. Current Opinion in Immunology**, Elsevier Ltd, 2020.
- PADRÃO, J. da C. et al. **Toxoplasma gondii infection of activated J774-A1 macrophages causes inducible nitric oxide synthase degradation by**

- the proteasome pathway.** Parasitology international, v. 63, n. 5, p. 659–663, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.05.003>
- PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. **Leishmania and the macrophage: A multifaceted interaction.** Future Microbiology, Future Medicine Ltd., 2015.
- RAVICHANDRAN, K. **Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums,** 2010.
- SEABRA, S. H.; DE SOUZA, W.; DAMATTA, R. A. **Toxoplasma gondii partially inhibits nitric oxide production of activated murine macrophages.** Experimental Parasitology, v. 100, n. 1, p. 62–70, 2002. <https://doi.org/10.1006/expr.2001.4675>
- SEABRA, S. H. et al. **Toxoplasma gondii partially inhibits nitric oxide production of activated murine macrophages.** Experimental parasitology, v. 100, n. 1, p. 62–70, 2002. <https://doi.org/10.1006/expr.2001.4675>
- SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. **Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: A review.** Mem Inst Oswaldo Cruz, [s.l.].
- TOMIOTTO-PELLISSIER, F. et al. **Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons.** Frontiers in Immunology, Frontiers Media S.A., 2018.
- WANDERLEY, J. L. M. et al. **Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of leishmaniasis.** PLoS ONE, v. 4, n. 5, 29 maio 2009.
- WANDERLEY, J. L. M. et al. **CD4+ T cell-dependent macrophage activation modulates sustained PS exposure on intracellular amastigotes of Leishmania amazonensis.** Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 9, n. APR, 2019.
- WANDERLEY, J. L. M. et al. **Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of Leishmania (L) amazonensis in mammalian hosts** 1. The Journal of Immunology, 2006.
- WATABE-UCHIDA, M. et al.  **$\beta$ -Catenin–vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells.** Journal of Cell Biology, v. 142, p. 847–857, 1998.

WHO. **Leishmaniasis.** Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1). Acesso em: 21 jun. 2022.

ZHAO, Y. et al. **Inhibition of transmissible gastroenteritis virus infection in vitro by recombinant porcine lactoferrin.** *Antiviral Research*, v. 69, n. 3, p. 165–173, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2005.11.002>

ZOHAIB, A. et al. **Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Humans and Livestock, Pakistan, 2015-2017.** *Emerging infectious diseases*, v. 26, n. 4, p. 773–777, 2020. <https://doi.org/10.3201/eid2604.191154>