

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

Mateus Eustáquio de Moura Lopes

**A microbiota tem papel essencial na ativação de
macrófagos e na resposta imune durante infecção
cutânea por *Leishmania major***

Belo Horizonte

2018

Mateus Eustáquio de Moura Lopes

A microbiota tem papel essencial na ativação de macrófagos e na resposta imune durante infecção cutânea por *Leishmania major*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia

Orientadora: Dra. Leda Quercia Vieira

Co-orientador: Dr. Matheus Batista Heitor Carneiro

Belo Horizonte

2018

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

AGRADECIMENTOS

Ao final de uma etapa é hora de reconhecer e agradecer àqueles que foram fundamentais para que tudo ocorresse da melhor maneira possível.

A professora Leda pela oportunidade de desenvolver este trabalho, por toda orientação neste período, pelo grande incentivo e pelo acolhimento no laboratório.

Brenda, muito obrigado por esses 7 anos juntos, por compartilhar todas alegrias e me ajudar a superar todas as dificuldades.

Ao Matheus por toda a orientação, ensinamentos, pela paciência em me ensinar e auxiliar em todos os experimentos, processos de formação como pesquisador, e principalmente pela amizade.

A todos integrantes do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia pelos momentos de aprendizado e também pelos momentos de distração. Também aos alunos colaboradores dos demais laboratórios.

A turma de Bases por fazerem o que era pra ser difícil se tornar fácil.

A todos os técnicos responsáveis pela manutenção e cuidados com os animais sem germes.

As agências de fomento, CNPq, CAPES e FAPEMIG, por fornecerem os recursos para a realização deste trabalho.

Aos meus pais: Maria e Márcio; aos meus irmãos: Ciro e Cássio, por todo apoio contribuírem para minha formação.

Índice

LISTA DE TABELAS E FIGURAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Relação de microbiota com o organismo hospedeiro	13
1.2. Relação entre a microbiota e o sistema imune	14
1.3. Espectro de ativação de macrófagos	16
1.4. Influência da microbiota na resposta imune durante processos infecciosos	18
1.5. Resposta imune a <i>Leishmania major</i> em camundongos	19
1.6. Papel da microbiota em infecções por <i>Leishmania major</i>	21
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. Objetivos geral.....	22
2.2. Objetivos específicos	22
3. HIPÓTESE	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1. Animais.....	23
4.2. Coleta e reconstituição de fezes.....	23
4.3. Reconstituição da microbiota.....	24
4.4. Depleção da microbiota intestinal.....	24

4.5. Obtenção de <i>Leishmania major</i> e cultivo do parasito	24
4.6. Antígenos de <i>Leishmania major</i>	25
4.7. Infecção por <i>Leishmania major</i>	25
4.8. Quantificação da carga parasitária por diluição limitante	26
4.9 Cultura de células do linfonodo poplíteo	27
4.10 Citometria de fluxo	27
4.11 Obtenção de macrófagos de medula óssea (BMDM) e infecção por <i>L. major</i>	29
4.12 Atividade da enzima arginase	30
4.13 Detecção de citocinas por ELISA	30
4.14 Produção <i>in vitro</i> de espécies reativas de oxigênio.....	31
4.15 Detecção de mRNA por transcriptase reversa (RT) e reação em cadeia da polimerase em tempo real (Q-PCR).....	31
4.16 Dosagem de óxido nítrico	33
4.17 Análise estatística	34
5. RESULTADOS	35
5.1. Ausência de microbiota reduz a capacidade de macrófagos desenvolverem uma resposta inflamatória.....	35
5.2 A ativação de macrófagos para o perfil associado ao reparo é potencializada na ausência de microbiota.....	38
5.3 A ativação regulatória de macrófagos é aumentada na ausência de microbiota	39
5.4 Depleção da microbiota por coquetel de antibióticos influencia o perfil de ativação dos BMDM .	40
5.5 Resistência à infecção por <i>L. major</i> é dependente da microbiota	41
5.6 Ausência da microbiota não altera o infiltrado de linfócitos e não prejudica a geração de resosta Th1 durante a infecção por <i>L. major</i>	42
5.7 O sistema imune fagocitário dos animais <i>germ free</i> é permissivo a infecção	46

5.8 Alterações na microbiota influenciam diretamente a infecção por <i>L. major</i>	50
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÃO	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

Lista de tabelas e figuras

Tabela 1. Lista de primers	33
Figura 1. Estratégia de <i>gates</i> para população de células linfóides	28
Figura 2. Estratégia de <i>gates</i> para população de células mielóides	28
Figura 3. Ativação clássica de macrófagos.	35
Figura 4. Produção de NO pelos macrófagos	36
Figura 5. Produção de ROS por macrófagos	37
Figura 6. Ativação alternativa de macrófagos	38
Figura 7. Ativação regulatória de macrófagos	39
Figura 8. Influência da depleção da microbiota sobre ativação de macrófagos	40
Figura 9. Influência da depleção da microbiota sobre a produção de ROS	41
Figura 10. Influência da microbiota na infecção por <i>L. major</i>	42
Figura 11. Infiltrado de linfócitos na pata dos animais durante a infecção por <i>L. major</i>	43
Figura 12. Infiltrado de linfócitos nos linfonodos dos animais durante a infecção por <i>L. major</i>	44
Figura 13. Dosagem de citocinas pelas células do linfonodo drenante durante infecção por <i>L. major</i>	45
Figura 14. Infiltrado de células mielóides na pata dos animais durante a infecção por <i>L. major</i>	47
Figura 15. Infiltrado de células mielóides não inflamatórias na pata dos animais durante a infecção por <i>L. major</i>	48
Figura 16. Infiltrado de células mielóides iNOS ⁺ na infecção por <i>L. major</i>	49
Figura 17. Desenvolvimento da infecção por <i>L. major</i> em animais colonizados pela microbiota	50
Figura 18. Influência da depleção da microbiota na infecção por <i>L. major</i>	51

Lista de abreviaturas

Abx: animais convencionais tratados com coquetel de antibióticos

cDNA: DNA complementar

CV: camundongo convencional

CXCL9: motivo C-X-C ligante 9 (quimiocina induzida por IFN- γ)

DEMEM: Meio Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

DEPC: dietilpirocarbonato

DNA: ácido desoxirribonucleico

DMSO: dimetilsulfóxido

DTT: ditioneitol

ELISA: Ensaio imunoenzimático (Enzima-Linked ImmunoSorbent Assay)

FIZZ1: molécula alfa 1 semelhante a resistina (encontrada na zona inflamatória)

FMT: transferência de microbiota fecal

GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GF: camundongo isento de germes

IFN- γ : interferon γ

Ig: imunoglobulina

IL-#: interleucina #

iNOS: óxido nítrico sintase indutível

LPS: lipopolissacarídeo

LTA: ácido lipoteicóico

mRNA: RNA mensageiro

MyD88: gene de resposta primária da diferenciação mieloide

NF κ B: fator nuclear cadeia leve kappa potenciador de células B

NK: célula exterminadoras naturais (Natural Killer)

NO: óxido nítrico

PBS: salina tamponada com fosfato 0,1M, pH= 7,3 (Phosphate Buffered Saline)

PCR: reação em cadeia da polimerase (Polimerase Chain Reaction)

Q-PCR: PCR em tempo real

RNA: ácido ribonucleico

RT- PCR: reação da transcriptase reversa seguida de PCR

ROS: espécies reativas de oxigênio

SOCS1: supressor da sinalização de citocinas 1

SPHK1: esfingosina cinase do tipo 1

Th#: células T auxiliares do tipo #

TLR: receptor do tipo toll

TNF: fator de necrose tumoral

U: unidades

YM1: proteína semelhante a quitinase 3

Resumo

A microbiota tem um papel central no desenvolvimento do sistema imune, na maturação e ativação das células imunes. Devido à influência da microbiota sobre o sistema imune, ela pode exercer um papel direto no processo de resposta contra agentes patogênicos. Animais isentos de germes (GF), podem ser mais resistentes ou suscetíveis a infecções em comparação aos animais convencionais (CV), que possuem a microbiota completa associada. A resistência e susceptibilidade são dependentes do patógeno causadores da infecção. A microbiota é extremamente importante no processo de eliminação da *Leishmania major in vivo*, já que camundongos SWISS/NIH GF são susceptíveis a esta infecção, apesar de polarizarem uma resposta Th1. O objetivo desse trabalho foi de melhor elucidar os mecanismos de suscetibilidade nesse modelo, onde hipotetizamos que macrófagos, importantes células hospedeiras da *L. major* possam apresentar um comprometimento em sua ativação e produção de moléculas efetoras que eliminem o parasito. Mostramos que os animais GF e CV apresentam um infiltrado de células linfóides semelhante, eles são incapazes de curar a lesão, e que o desenvolvimento de lesão crônica com maior carga parasitária está associada a uma maior quantidade de células mielóides infectadas na lesão em relação aos animais CV. A microbiota atua diretamente no espectro de ativação de macrófagos, células essas que apresentam plasticidade na ativação dependente de estímulos endógenos e exógenos, incluindo estímulos microbianos. A ausência de microbiota potencializa o perfil de ativação alternativo, caracterizado pela expressão das proteínas YM1, FIZZ1 e arginase I, e também o perfil regulatório de ativação, caracterizado pela IL-10 e SPHK1. Por outro lado, macrófagos de animais GF apresentam sua ativação clássica prejudicada, pois produzem menos IL-12, TNF, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico. Durante o desenvolvimento da infecção. Durante infecção *in vivo* os camundongos GF apresentam uma menor capacidade de eliminação do parasito, pois na lesão dos animais GF existe uma menor quantidade de macrófagos iNOS⁺. Enzima essa responsável pela produção de óxido nítrico, molécula microbicida responsável pela eliminação do parasito intracelular. As diferenças encontradas para ativação de macrófagos *in vitro* e para resposta deles *in vivo*, podem explicar o fato dos animais CV controlarem a lesão e os animais GF não.

Abstract

The microbiota plays a central role in immune system development, maturation and activation of immune cells. Due to the influence of the microbiota on the immune system, the commensal microorganisms can play a direct role in the immune response against pathogens. Germ free animals (GF), which do not have an associated microbiota, can be more resistant or more susceptible than conventional (CV) animals, which have the complete associated microbiota. The resistance or susceptibility are dependent on the pathogens that elicit the infection. The microbiota is important for *in vivo* elimination of *Leishmania major*, because GF Swiss/NIH mice are susceptible to the infection, regardless their capacity to polarize a Th1 immune response as the CV mice. The aim of our work is to better understand the mechanisms that might explain the susceptibility of GF mice even in a context of a Th1 immune response. We hypothesize that macrophages, relevant host cells for *L. major*, might present an impairment in their classic activation allowing the parasite growth. In our work we showed that GF and CV animals presented similar lymphoid infiltrate and the chronic lesions with a higher parasite load is associated with a higher quantity of infected myeloid cells. Macrophages are cells that present a broad spectrum of activation dependent on endogenous and exogenous stimuli, including microbial stimuli. Our data show that the absence of microbiota exacerbates the alternative activation profile, characterized by the YM1, FIZZ1 and arginase I expression, as well as the regulatory activation profile, characterized by IL-10 and SPHK1. On the other hand, macrophages derived from GF mice showed an impaired classical activation phenotype as they produce less IL-12, TNF, reactive oxygen species and nitric oxide.. During *in vivo* infection, the GF mice present a lower parasite elimination capacity, because in the lesion of GF animals there were lesser iNOS⁺ macrophages. This enzyme is responsible for the production of nitric oxide, the microbicidal molecule responsible for the elimination of the intracellular parasite. The differences found for the activation of macrophages *in vitro* and their response *in vivo* may explain the fact that CV animals control the lesion and the GF animals are not.

1. Introdução

1.1. Relação da microbiota com o organismo hospedeiro

Microrganismos entram em contato direto com o organismo de mamíferos logo após o nascimento. Porém desde o período de gestação produtos microbianos são passados da mãe para o feto e influenciam o seu desenvolvimento [1]. Após o nascimento esses microrganismos são capazes de colonizar as superfícies epiteliais dos tecidos do hospedeiro, epitélio intestinal e a pele por exemplo, compondo a microbiota do hospedeiro. O principal local de colonização e de maior interação entre microbiota e hospedeiro durante toda vida do indivíduo é o epitélio intestinal, considerando-se a extensão superficial e o número de microrganismos encontrados neste órgão. O tubo digestivo humano apresenta uma enorme comunidade microbiana e cerca de 10^{14} células de aproximadamente 700 a 1000 espécies de microrganismos estariam presentes neste ambiente [2, 3]. Outro órgão com extenso contato e que possui associado ao seu epitélio uma enorme e diversificada comunidade microbiana é a pele, porém é um ambiente mais inóspito que o intestino para a microbiota, devido ao pH desfavorável, exposição ao ar, e menor disponibilidade de nutrientes [4].

A relação da microbiota com o hospedeiro é simbiótica, os microrganismos obtém habitat com temperatura estável e rico em nutrientes, ao passo que o hospedeiro se beneficia pela ocupação protetora das suas superfícies, aumento da capacidade de digestão de fibras alimentares e da produção de vitaminas pela microbiota, desenvolvimento do sistema imune e sua resposta, além de outras diversas atuações no organismo hospedeiro [5, 6]. Devido à complexidade e variedade na composição da microbiota, essa relação é complexa, extremamente regulada, porém depende de fatores dos hospedeiros, dos microrganismos e também ambientais. Além dos fatores genéticos do hospedeiro, as condições nutricionais, o estresse e a obesidade são importantes para a manutenção do equilíbrio de interação entre as duas partes. A capacidade patogênica dos microrganismos é um fator importante para a manutenção dessa relação, assim como os benefícios da presença deles são importantes para seleção dos mesmos pelo organismo hospedeiro [3, 7].

Pesquisadores interessados em mostrar a relação entre a microbiota e os organismos hospedeiros se baseiam principalmente no uso de modelos animais para

caracterizar essa relação. Ferramentas importantes utilizadas nesses estudos são os animais *germ free* (GF), ou seja, que vivem na ausência de associação com microrganismos, animais gnotobióticos, ou seja, associados com microbiota conhecida em comparação aos animais convencionais (CV), que são os animais que possuem a microbiota normal e complexa. Por último, animais convencionais tratados com coquetel de antibióticos (Abx), que apresentam alterações específicas na microbiota ou depleção dela em sua totalidade [8-11]. Esses animais permitem a representação da fisiologia do organismo na ausência da microbiota e o estudo de interações entre populações da microbiota indígena e destas com o hospedeiro. Animais GF apresentam alterações em seus desenvolvimento e fisiologia, dentre os aspectos avaliados na ausência da microbiota, já foram relatadas alterações comportamentais, hepáticas, cardíacas, intestinais e respiratórias [5, 12]. Alguns grupos bacterianos específicos, ao colonizarem os animais GF ou animais tratados com antibióticos, são capazes de restabelecer a fisiologia do hospedeiro e, dependendo da idade em que o animal é colonizado, promovem um desenvolvimento normal no animal gnotobiótico [13-15]. A disbiose, quebra do equilíbrio entre a microbiota e o hospedeiro com consequente alteração da composição e diversidade microbiana, pode ser ocasionada por diversos fatores, dentre eles o uso de antibióticos, e ela é capaz de gerar um fenótipo semelhante ao que ocorre durante a ausência de microbiota [16].

1.2. Relação entre a microbiota e o sistema imune

A composição da microbiota e a quantidade de microrganismos presentes nela são reguladas pelo sistema imune do hospedeiro. Essa modulação é resultado de milhares de anos de interação que levaram à relação mutualística que existe entre microrganismos e o hospedeiro animal [5]. Devido ao íntimo contato entre microbiota e sistema imune, vários estudos descreveram mais a fundo essa relação. Componentes do sistema imune inato são os principais responsáveis por distinguir agentes comensais de agentes microrganismos com capacidade patogênica presentes na microbiota e também patógenos exógenos [17]. Os patógenos em sua maioria expressam fatores de virulência que são característicos de cada grupo, como moléculas de superfície, enzimas e toxinas que permitem a estes organismos entrarem nas células epiteliais, invadirem e colonizarem outros tecidos e assim desencadear uma inflamação que pode ser local ou sistêmica

[7]. Portanto, o controle da microbiota é essencial para manter a homeostase entre ela e o organismo hospedeiro.

Afim de manter a homeostase com a microbiota, limitar a inflamação gerada por ela e outros aspectos deletérios para o organismo, existem algumas formas do hospedeiro exercer o controle da comunidade microbiana. A produção de peptídeos antimicrobianos pelas células epiteliais atua no controle da comunidade microbiana [18]. No intestino, o muco auxilia no controle da inflamação e evita a translocação microbiana exercendo uma função de barreira [19]. O controle da microbiota também é estimulado pelo reconhecimento direto dos microrganismos, eles interagem com as células do hospedeiro pelo contato célula-célula ou pela produção de moléculas que serão reconhecidas pelo hospedeiro. Células intestinais, através da expressão dos receptores tipo Toll 2 e 4 (TLR 2 e 4), são capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), sendo que o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano se liga ao TLR4 e o ácido lipoteicóico (LTA) ao TLR2 [17, 20]. Os receptores do tipo Nod também são importantes no reconhecimento de produtos microbianos e auxiliam no controle da microbiota e inflamação intestinal [21, 22]. Os anticorpos produzidos no intestino auxiliam no reconhecimento da microbiota e controle dela pelas demais células do sistema imune, e impedem a adesão dos microrganismos aos epitélio intestinal [23-25]. A resposta imune adaptativa atua na regulação do controle microbiano e da homeostase através da produção de citocinas e não diretamente no controle microbiano [7, 26, 27]. O ambiente local também é essencial para o controle da população microbiana, a produção de citocinas como IL-18 e IL-22 por exemplo, são necessárias para um controle efetivo [28].

A microbiota exerce um papel essencial para o desenvolvimento do sistema imune e da sua capacidade de responder a diferentes processos que ocorrem no organismo. A influência da microbiota sobre o sistema imune ocorre mesmo antes do nascimento, através transferência de produtos microbianos da mãe para feto, que ocorre via anticorpos carreando produtos microbianos. A colonização de uma fêmea GF pela *Escherichia coli* HA107 durante a fase gestacional promove um aumento na população de células inatas linfóides do subtipo 3 (ILC3) e de células mononucleares intestinais (iMNC) dos filhotes [1]. A geração de células mielóides e o seu desenvolvimento são dependentes da microbiota, essa influência ocorre através do ganho sistêmico de seus produtos e metabólitos [29-32]. A presença da microbiota potencializa a resposta inflamatória e

auxilia diretamente na regulação da inflamação, influenciando também diretamente o padrão de produção de anticorpos e de citocinas [7]. A microbiota possibilita uma resposta inflamatória aguda, camundongos CV em modelos de choque séptico apresentam maior resposta inflamatória devido a maior produção de TNF e maior influxo celular para o local da inflamação, enquanto animais GF apresentam menor nível inflamatório devido a maior produção de IL-10 por esses animais em estado estacionário e também durante o processo inflamatório [33-35]. O reconhecimento da microbiota por células dendríticas e macrófagos promove a produção de IgA no intestino [24], além disso, animais GF apresentam menor quantidade de IgG no soro em relação aos animais CV [35]. Macrófagos intestinais são primados pela microbiota, o que possibilita uma rápida ativação e resposta efetora, além da distinção entre microrganismos patogênicos e não patogênicos [36]. A microbiota também promove a edição dos receptores das linfócitos B [23] e estimula a diferenciação de linfócitos TCD4⁺ no organismo hospedeiro [37], por outro lado animais GF têm um desenvolvimento atípico de alguns linfócitos T e B, apresentando uma menor população dessas células em seus linfonodos [37-39] e uma maior população de linfócitos T regulatórios [40].

1.3. Espectro de ativação de Macrófagos

Macrófagos são células do sistema imune fagocitário que possuem um amplo espectro de ativação, devido à sua plasticidade eles são capazes de exercer variadas funções e somado a isso eles residem em diferentes tecidos o que possibilita o contato com diferentes estímulos endógenos e exógenos tornando amplo o seu espectro de ativação [41, 42]. Os macrófagos residentes encontrados nos diversos tecidos do organismo possuem origem variada. Inicialmente ocorre uma onda de células precursoras do saco vitelínico para os demais tecidos, estas se estabelecem no feto dando origem a outras populações precursoras e vão originar os macrófagos do cérebro, chamados de micróglia. A segunda onda de precursores é a partir do fígado fetal, esses precursores vão originar os macrófagos dos demais tecidos e manter uma população de células precursoras em outros órgãos. O fígado nas fases iniciais do desenvolvimento, o baço e medula mantém essas populações precursoras ao longo da vida [43, 44]. Tecidos como epitélio intestinal e pele que estão em íntimo contato com a microbiota, patógenos e outros antígenos mantém a população de macrófagos residentes oriundas do fígado fetal, mas ao longo da vida essa população é substituída por macrófagos derivados de monócitos

provenientes da medula óssea [43, 45, 46]. Após processos inflamatórios e doenças, onde ocorre morte celular, os macrófagos que vão substituir os residentes também são derivados da medula óssea [45, 47, 48].

A classificação dos perfis de ativação dos macrófagos tem sido extensamente discutida, não se tem ainda definido um consenso para a classificação funcional dessas células. Baseando na plasticidade dessas células e os vários perfis de ativação, definimos que elas podem ser divididas em ao menos três subtipos [49, 50]. Na presença de LPS e interferon- γ (IFN- γ) eles assumem um perfil inflamatório denominado de ativação clássica [49]. Essa resposta é caracterizada pela produção de moléculas efetoras como óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS), das citocinas IL-12 e TNF, da quimiocina induzida por IFN- γ , CXCL9, e da proteína SOCS1 [50-53]. Outro perfil de ativação de macrófagos ocorre na presença de IL-4, está associado ao reparo tecidual, denominado de perfil alternativo [49, 54]. Os macrófagos alternativamente ativados são caracterizados, dentre outras, pela expressão das proteínas FIZZ1, proteína codificada pelo gene *Retnla*, encontrada na zona inflamatória e também conhecida como molécula alfa do tipo resistina (Relm- α), e a proteína YM-1, codificada pelo gene *Chi3l3*, que é um tipo de proteína semelhante à quitinase. Ambas proteínas estão associadas ao reparo tecidual [55, 56]. Além disso, os macrófagos alternativamente ativados diferem dos classicamente ativados pela produção da enzima arginase, já que os classicamente ativados não expressam essa enzima [50, 51, 54, 57]. O terceiro tipo de ativação é quando os macrófagos são chamados de regulatórios, eles podem ser induzidos na presença de LPS e prostaglandina E₂ (PGE₂), por IL-10 e imunocomplexos. Eles são caracterizados pela produção de IL-10 e também da enzima arginase I e pela esfingosina cinase tipo 1 (SPHK1) [49, 50, 58, 59]. Esse tipo celular tem papel importante no controle e redução da inflamação devido à produção de IL-10, que é capaz de estimular os macrófagos de forma autócrina, e também por inibirem a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e TNF por macrófagos e de moléculas efetoras, como óxido nítrico por exemplo [57, 58, 60].

Sabendo que a microbiota atua no desenvolvimento das células imunes e de sua participação na estimulação da ativação celular, alguns trabalhos mostraram a relação da microbiota e ativação de macrófagos. Os macrófagos de animais GF parecem ter uma maior capacidade resolutiva e associação a cicatrização, que ocorre na ativação

alternativa [61], por outro lado, eles apresentam uma menor capacidade de eliminar patógenos intracelulares [62], uma menor capacidade de fagocitose via receptores de complemento [63, 64], fenômenos relacionados à ativação clássica após estímulo inflamatório. Portanto, mais estudos são necessários para caracterizar a influência da microbiota no espectro completo de ativação dos macrófagos.

1.4. Influência da microbiota na resposta imune durante processos infecciosos

Devido à influência da microbiota no sistema imune e à íntima relação entre eles durante a inflamação, vários grupos tentam evidenciar a influência da microbiota durante processos infecciosos gerados por diferentes microrganismos com capacidade patogênica presentes na microbiota ou por patógenos não comensais. A disbiose é responsável por gerar uma desregulação da imunidade local e sistêmica causando prejuízos ao organismo. Por exemplo, quando o epitélio intestinal está lesado ocorre a translocação de microrganismos, ocasionando inflamação intestinal exacerbada, podendo levar à infecção sistêmica com consequente morte do hospedeiro se o microrganismos for patogênico. É o que pode ocorrer, por exemplo, com o *Bacteroides fragilis*, uma bactéria anaeróbica Gram-negativa presente no colón humano e extremamente adaptada a este ambiente que, em caso de lesão na mucosa intestinal, é capaz de penetrar através dessa lesão e gerar graves processos inflamatórios [37]. Processos infecciosos não intestinais também são capazes de gerar disbiose no organismo, amplificando o quadro patológico gerado pela infecção [65].

Produtos bacterianos, o lipopolissacarídeo (LPS) e o ácido lipoteicoico (LTA) por exemplo, presentes no soro são essenciais para eliminação de microrganismos patogênicos não simbiotes pelas células imunes. Neutrófilos têm sua capacidade de eliminar *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* aumentada por meio da sinalização por uma molécula proveniente da microbiota comensal [66]. Além disso, animais gnotobióticos mono-associados com *Lactobacillus delbrueckii* são mais resistentes à infecção por *Listeria monocytogenes* do que os animais GF, apresentando maior sobrevivência, menor infecção sistêmica, maior produção de citocinas pró-inflamatórias e maior capacidade de resolução da inflamação [67]. A associação tópica na pele com microrganismos benéficos auxiliam no controle da inflamação na pele e no controle da infecção por parasitos da pele [40, 65]. A transferência de microbiota fecal de

indivíduos saudáveis para receptores acometidos por infecção auxilia no controle da infecção por *Clostridium difficile* [68]. A terapia microbiana é uma importante ferramenta para modulação do sistema imune e pode ser utilizada como terapia em diversos quadros clínicos [6].

Usando os animais GF alguns estudos mostraram o papel da microbiota durante infecções por outros patógenos que não são bactérias [69]. Durante a infecção por *Giardia lamblia* os animais GF apresentam uma patologia menos severa, porém o parasito multiplica-se com sucesso no intestino do hospedeiro [70]. A ausência de microbiota também torna os camundongos susceptíveis a infecção por *Klebsiella pneumoniae* [71], e por outro lado, a ausência de microbiota pode estar relacionada à maior resistência a algumas infecções, como por exemplo por *Entamoeba histolytica* [72]. Entretanto, frente a infecção com *Trypanosoma cruzi* os animais GF se mostraram mais susceptíveis, apresentando maior taxa de mortalidade quando comparados aos animais CV [73]. Por outro lado, durante infecção por outro protozoário, *Leishmania major*, os animais GF apresentam uma maior susceptibilidade a infecção [74].

1.5. Resposta imune a *Leishmania major* em camundongos

O entendimento sobre a resposta imune durante infecções por parasitos intracelulares e até mesmo mecanismos da resposta imune em geral foram elucidados a partir de infecções experimentais por *L. major*. Neste modelo, a polarização para uma resposta Th1, está associada à resistência a infecção por *L. major*, enquanto que a polarização para Th2 está relacionada com a susceptibilidade a tais infecções, e a dicotomia Th1/Th2 a base para os estudos durante a infecção por *L. major* [75-77]. Entretanto, a resistência a infecção por *L. major* é dependente da cepa utilizada, pois mesmo havendo uma resposta Th1 o animal pode ser suscetível a infecção [78].

A resistência à infecção requer o desenvolvimento e manutenção de uma resposta Th1, caracterizada pela produção de IFN- γ após a produção inicial de IL-12 e TNF. Essas citocinas são determinantes para a manutenção, desenvolvimento e efetividade da resposta Th1 [79, 80]. Durante a fase inicial da infecção, as células dendríticas compõem a principal fonte de IL-12 [79], promovendo ativação de células *natural killer* (células NK) que serão as principais fontes responsáveis por produzir IFN- γ nos tempos iniciais promovendo o desenvolvimento de uma resposta Th1 [81]. Por outro lado, a

susceptibilidade à infecção por *L. major* está relacionada ao desenvolvimento de uma resposta Th2, caracterizada pela produção de IL-4, citocina que também atua na diferenciação de células Th0 em células Th2 e inibe a ativação das células do sistema imune inato, como macrófagos por exemplo, pelas citocinas pró-inflamatórias [82-84]. Além disso, a superprodução de IL-4 induzida em camundongos de uma linhagem resistente à infecção torna-os susceptíveis. No entanto, outros trabalhos sugerem que a susceptibilidade à infecção por *L. major* está mais relacionada a uma inabilidade em gerar uma resposta Th1 do que a uma resposta Th2 persistente induzida por IL-4 [84-86].

O IFN- γ é uma citocina essencial para a resistência a *L. major*, ele atua sinergicamente com TNF sobre as células do sistema imune inato, em macrófagos promovendo a produção de moléculas microbidas essenciais para eliminação de parasitos intracelulares [53, 87-89]. O principal mecanismo efetor utilizado por macrófagos para eliminar *L. major* é via atuação da enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS) que oxida o aminoácido L-arginina produzindo L-citrulina e NO, que será a molécula efetora responsável por eliminar os parasitos [53, 90, 91]. Além de NO, os macrófagos inflamatórios ou classicamente ativados, frente à infecção por *L. major*, produzem ROS, que não são essenciais para eliminação do parasito, mas são característicos do perfil de ativação necessário para que a resposta inflamatória ocorra [92]. A IL-4 produzida na resposta Th2 no modelo de susceptibilidade é capaz de inibir a produção de NO por macrófagos [57, 93]. Essa citocina induz uma enzima diferente, a arginase I, que também utiliza a L-arginina como substrato, porém ela quebra esse aminoácido em ureia e L-orinitina, que será utilizada na produção de poliaminas, e a *L. major* utiliza dessas moléculas para sua replicação no interior da célula [94, 95]. A expressão de arginase é especificamente induzida em macrófagos associados ao reparo e macrófagos regulatórios e também ocorre durante respostas Th2.

A IL-10 é outra citocina envolvida na susceptibilidade a infecção por *L. major*. A IL-10 atua sobre os macrófagos fazendo com que eles se tornem refratários aos efeitos ativadores do IFN- γ [96]. Por outro lado, nas infecções crônicas por *L. major*, as próprias células Th1 produtoras de IFN- γ são a principal fonte de IL-10. Este seria, portanto, um mecanismo que evita a exacerbação da resposta Th1 e do dano colateral causado por este tipo de resposta [97]. Além disso, tal mecanismo garante a persistência do patógeno no

organismo a longo prazo, o que permite a manutenção da resistência contra reinfecções, referida como imunidade concomitante [97].

1.6. Papel da microbiota em infecções por *Leishmania major*

A microbiota tem se mostrado essencial para uma resposta imune eficiente durante infecções por *Leishmania major*. Isso pode se dever ao fato de que a microbiota modula o desenvolvimento e ativação de células importantes para a resposta contra o parasito, como por exemplo os macrófagos e os linfócitos T CD4⁺. O quadro patológico da doença é dependente da forma em que ocorre a infecção, subcutânea na pata ou intradérmica na orelha de animais modelos [98]. A diversidade da microbiota no local de infecção pelo parasito é influenciada pela lesão, onde o local infectado e a pele adjacente tem a microbiota alterada [65].

Os animais GF apresentam maior carga parasitária na lesão por *L. major* independentemente se a infecção foi intradérmica [40] ou subcutânea [62]. Surpreendentemente, ambos os grupos desenvolveram mesma resposta Th1 frente à infecção na pata, de tal forma que, embora a ausência da microbiota não tenha impedido a polarização da resposta para o tipo 1, comprometeu a resolução da infecção [62]. No modelo de infecção intradérmica, camundongos CV apresentaram uma maior produção de IFN- γ e TNF, menor carga parasitária, porém uma maior lesão [40]. Essa diferença ocorre provavelmente devido a diferença de sítio de infecção, dose utilizada para realizar a infecção, fatores que determinam o infiltrado e perfil de produção de citocinas [99]. Além disso, camundongos de linhagens diferentes foram utilizados nesses trabalhos.

2. Objetivos:

2.1. Objetivo geral: Avaliar a influência da microbiota nos perfis de ativação de macrófagos e na infecção experimental por *Leishmania major*.

2.2. Objetivos específicos:

2.2.1. Caracterizar, *in vitro*, a influência da microbiota no espectro de ativação dos macrófagos derivados dos animais convencionais (CV) em isentos de germes (GF) em classicamente ativados, alternativamente ativados, e macrófagos regulatórios;

2.2.2. Avaliar desenvolvimento de lesões cutâneas, carga parasitária e atividade de arginase no sítio de infecção durante infecção *in vivo* pelos parasitos em camundongos GF e CV;

2.2.3. Caracterizar o infiltrado celular durante a infecção e as populações celulares relevantes para a infecção;

2.2.4. Avaliar a produção de citocinas nas culturas de células do linfonodo poplíteo, responsável por drenar o local de infecção;

2.2.5. Verificar se a modulação sobre a microbiota na idade adulta influencia o desenvolvimento da infecção.

3. Hipótese:

Ainda não está estabelecido qual o efeito da modulação exercida pela microbiota sobre componentes do sistema imune do hospedeiro, principalmente sobre os macrófagos que são uma importante célula hospedeira da *Leishmania*, e de que forma essa modulação pode alterar o curso de uma infecção, uma vez que a resposta adaptativa não está comprometida nesses animais quando infectados via subcutânea. Nossa hipótese é de que a microbiota irá modular o perfil de ativação de macrófagos e que durante a infecção por *Leishmania major* os macrófagos dos animais GF apresentem uma deficiência em eliminar o parasito, apesar de apresentarem uma resposta Th1.

4. Materiais e Métodos

4.1. Animais

Camundongos Swiss/NIH isentos de germes (*germ free* ou GF) foram originalmente obtidos da empresa Taconic (Madison, WI, EUA) e procriadas em isoladores flexíveis (Standard Safety Company, Palatine IL e Class Biological Clean Ltda), utilizando-se de técnicas de gnotobiologia [8]. Camundongos Swiss/NIH convencionais (CV) foram obtidos a partir da transferência de animais GF dos isoladores para as condições ambientais do biotério experimental, saindo, portanto, do ambiente estéril. Após duas gerações os animais CV estão aptos para serem utilizados. Fêmeas com idade variando entre 6 e 8 semanas foram utilizadas para os experimentos. Camundongos da linhagem BALB/c foram obtidos do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os camundongos foram mantidos em condições ambientais controladas e foram alimentados com ração autoclavável (Nuvilab, Curitiba, PR, Brasil) e água filtrada *ad libitum*, para os animais GF a ração autoclavável e a água filtrada foram previamente esterilizadas. Os animais foram mantidos no biotério do laboratório de Gnotobiologia e Imunologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG. Todos os procedimentos estavam em acordo com os protocolos éticos de números 110/2012 e 266/2017 aprovados pela Comissão de Ética No Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG).

4.2. Coleta e reconstituição de fezes

Fezes foram coletadas dos animais CV dentro do fluxo laminar em tubo de 2mL estéril (Axygen, Union City, CA, EUA). As fezes foram reconstituídas em Câmara Anaeróbia (Thermo, Wilmington, DE, EUA) do Laboratório de Ecologia Microbiana da UFMG, gentilmente cedida pelo Prof. Jacques Nicoli. Solução salina tamponada com fosfato (PBS), estéril e com pH 7,3, foi utilizada para diluir as fezes para concentração de 100mg/ml. Após a diluição a solução foi homogeneizada utilizando Vortex e filtrada usando Cell Strainer (BD, San Diego, CA, EUA) de 40µm.

4.3. Reconstituição da microbiota

Camundongos Swiss/NIH GF foram retirados dos isoladores e acondicionados em microisoladores estéreis. Os animais receberam por gavagem 100µL de fezes provenientes de animais CV de mesma idade. Esse procedimento foi feito uma vez por semana em duas semanas consecutivas. Para otimizar a reconstituição da microbiota, após a gavagem animais receptores de fezes foram alojados nas mesmas gaiolas que os doadores. A orelha esquerda dos animais receptores foram marcadas com um corte. Após duas semanas de alojamento conjunto os grupos de animais foram separados.

4.4. Depleção da microbiota intestinal

Camundongos Swiss/NIH convencionais (CV) foram tratados com coquetel de antibióticos na água fornecida para os animais *ad libitum*. O coquetel de antibióticos composto por 1g/L Metronidazol (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 1g/L Neomicina (Sigma), 1g/L Ampicilina (Sigma), 0,5g/L Vancomicina (Sigma) e 1,5g/L de sucralose (Linea, cidade, estado, país) foram diluídos em água autoclavada. Os animais controles receberam somente água autoclavada com 1,5g/L de sucralose.

4.5. Obtenção de *Leishmania major* e cultivo do parasito

A cepa MHOM/IL/80/Friedlin da espécie *Leishmania major* (Lm) foi utilizada juntamente com meio de cultura 199 (GIBCO, Grand Island, NY, EUA) complementado com 20% de soro fetal bovino inativado (Cultilab Campinas, SP, BR), 2mM de L-glutamina, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (GIBCO), 1% de glutamina (GIBCO) 200 mM, 1% de adenina (Sigma) 10mM em água, 0,2% de hemina (Sigma) 0,25% de NaOH 10mM, 0,1% biotina (Sigma) 0,1% de etanol 96%. O parasito foi isolado de patas infectadas de animais da linhagem BALB/c. Para isolamento do parasito, os animais infectados foram anestesiados com 100µL de solução anestésica contendo cloridrato de ketamina (Vertbrands Miramar, FL, EUA) 15mg/mL e cloridrato de xilasina (Vertbrands) 5mg/mL. As patas foram higienizadas com álcool 70% e, utilizando uma seringa de 1mL com agulha de 26G^{1/2} de calibre (SR, Pedro Rua Caballero, Paraguai) as patas foram puncionadas e o conteúdo transferido para placa de 96 poços (TPP, Trasadingen, Schaffhausen, Suíça) contendo 200µL de meio 199 completo. Em seguida, foram feitas diluições sucessivas na proporção de 1:10 a partir do

primeiro poço. A placa foi selada e mantida em estufa BOD (Quimis, Diadema, SP, Brasil) a 25°C.

Após 7 dias de cultura, recuperamos as formas promastigotas do parasito e transferimos para garrafas de cultura de 25mL (Jetbiofil, Guangzhou, China). As culturas de promastigotas foram mantidas em estufa BOD à 25°C, repicadas a cada dois ou três dias na proporção de 1:10 (Cultura de L.m: meio 199).

A cepa MHOM/IL/80/Friedlin da espécie *Leishmania major* (Lm) transfectada com plasmídeo contendo gene da proteína fluorescente vermelha (RFP), denominada *Leishmania major* RFP (Lm RFP), foi cedida pelo Dr David Sacks do National Institutes of Health (Bethesda, MD, EUA). As culturas desse parasito foram mantidas da mesma forma que o parasito selvagem, porém com adição de 50µg/mL geneticina (GIBCO) duas vezes por semana na cultura das formas promastigotas.

4.6. Antígenos de *Leishmania major*

Os antígenos foram obtidos a partir da fase promastigota estacionária do parasito geradas após cinco dias de cultura. As culturas em fase estacionária foram centrifugadas a 2.000 x g a 4° C por 15 minutos. O sobrenadante foi, então, desprezado e o sedimento diluído em aproximadamente 40 mL PBS. Este procedimento foi realizado por duas vezes para que qualquer resquício de meio de cultura 199 fosse removido. Após este procedimento o PBS foi desprezado e o sedimento armazenado a -20°C até o momento do preparo do antígeno. Após coleta de vários sedimentos oriundos de diferentes culturas do parasito os sedimentos foram descongelados em banho maria a 37°C e congelados em nitrogênio líquido; foram realizados sete ciclos de congelamento e descongelamento. Os sedimentos foram reunidos e uma amostra de 0,2 mL foi retirada para a realização da dosagem de proteína pelo método de Lowry [100]. A partir desta quantificação, foi feito o ajuste de concentração para 1 mg/mL e alíquotas foram armazenadas a - 20°C até o momento do uso.

4.7. Infecção por *Leishmania major*

Cultura das formas promastigotas foram repicadas cinco dias antes da utilização para obtenção de formas promastigotas metacíclicas infectantes obtidas na fase estacionária. Após a coleta das culturas, o líquido coletado foi centrifugado a 2000 x g

por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi, então, desprezado e o sedimento suspenso em aproximadamente 2 mL de PBS, sendo este transferido para um tubo contendo gradiente de Ficoll (Ficoll® 400-Sigma), o qual é composto por uma fase de Ficoll 20% e uma fase de Ficoll 10%. Este material foi centrifugado a 1.250 x g por 10 minutos a 4°C, e a fase superior, que contém as formas metacíclicas, foi coletada e lavada duas vezes com PBS antes de ser usada para a infecção. Após este procedimento o sedimento foi suspenso em 1 mL de PBS. Uma alíquota foi retirada e diluída em meio 199 e o número de parasitas foi estimado por contagem em câmara de Neubauer. A concentração foi acertada para 10⁶ parasitos em 40 µL de PBS para infecção *in vivo*.

Todos os grupos de animais Swiss/NIH CV e GF, Swiss/NIH CV tratados com antibióticos (Abx), GF com microbiota reconstituída (FMT) foram infectados na pata traseira direita para estabelecer um modelo de infecção subcutânea experimental *in vivo*. Seringa de 1mL com agulha de 30G^{1/2} de calibre (SR) foi utilizada para inocular a suspensão contendo os parasitos. Os animais foram infectados dentro do fluxo laminar do Laboratório de Ecologia Microbiana da UFMG, todos os grupos foram anestesiados com 100µL de solução anestésica contendo cloridrato de ketamina 15mg/mL e cloridrato de xilasina 5mg/mL. Todo material utilizado para infecção foi esterilizado previamente. A lesão induzida na pata desses camundongos foi acompanhada semanalmente, com o auxílio de um paquímetro (Mitutoyo Co Kawasaki, Kanagawa, Japão).

4.8. Quantificação da carga parasitária por diluição limitante

A técnica de diluição limitante foi utilizada para quantificação de parasitos. Diluições sucessivas foram feitas a partir dos homogenatos das patas infectadas dos camundongos experimentais. Primeiramente as amostras foram maceradas em um homogeneizador de tecidos estéril. O homogenato foi centrifugado a 100 x g por 4 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. Esse sobrenadante foi centrifugado a 2000 x g por 15 minutos. O sedimento foi suspenso em 200 µL de meio 199 (GIBCO). Em uma placa estéril de poliestireno com 96 poços (TPP), foram colocados 150 µL/poço de meio de meio 199 (GIBCO) completo, exceto na primeira coluna de poços, onde foram colocados 200 µL da suspensão do órgão macerado. Em seguida, foram feitas diluições sucessivas 1:4, tomando-se o cuidado de trocar o conjunto de ponteiros da pipeta multicanal a cada diluição para evitar o arraste de parasitas e um

consequente resultado falso-positivo. As placas foram mantidas a 25°C em estufa BOD e a leitura dos resultados foi feita de 10 dias após o início da cultura.

4.9. Cultura de células do linfonodo poplíteo

As células dos linfonodos e baços de animais infectados foram extraídas a partir da maceração desses órgãos. As células obtidas foram lavadas e suspensas a uma concentração de 5×10^6 células/mL de RPMI 1640 (Gibco), contendo 10% de soro bovino fetal, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina. Em seguida as células foram plaqueadas em 1 mL de meio RPMI completo por poço em placas de 24 poços (Costar). As células foram estimuladas com 50 µg/mL de antígeno de L.m ou L.m RFP (Ag). O sobrenadante da cultura foi coletado após 24h para dosagem de TNF (sendo armazenado a -80°C) ou 72h para a detecção de IFN- γ , IL-10, IL-12 e TGF- β (armazenado a -20°C).

4.10. Citometria de Fluxo

Patas dos animais controles não infectados e dos animais experimentais infectados foram coletadas após infecção por L.m e L.m RFP. As amostras foram pré-processadas e incubadas por 1h 30min em 1 mL de meio RPMI sem soro fetal bovino contendo 62,5 µg/mL de liberase TL (Roche, Mannheim, Alemanha) e 0,5 mg/mL de desoxiribonuclease I (Sigma). Após este período foi adicionado mais 1 mL de RPMI contendo 10% de soro fetal bovino por amostra. As amostras foram então maceradas, e o homogenato centrifugado a 400 x g por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, os precipitados das amostras foram incubados por 20 minutos a 4°C com anticorpo anti Fc- γ III/II CD16/32 (clone 2.4G2) e os seguintes marcadores de superfície: anti-Ly6G (clone 1A8); anti-Ly6C (clone HK1.4); anti-F4/80 (clone BM8) (eBioscience, San Diego, CA, EUA); anti-CD11c (clone HL3); anti-CD11b (clone M1/70); anti-NOS2 (clone CXNFT, eBioscience); anti-CD8 (clone 53-6.72); anti-CD3 (clone 145-2C11); anti-CD19 (1D3); anti-CD4 (clone GK1.5). Exceto quando especificado o contrário, todos os anticorpos utilizados foram da BD (BD). Em seguida, foi adicionado 1 mL de PBS a 4°C e as amostras foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos a 4°C para remoção de excesso de anticorpos. As amostras submetidas a marcação intracelular foram fixadas, permeabilizadas segundo kit do fabricante (BD). Em seguida, o anti-Foxp3 foi utilizado na para marcação intracelular por 40 minutos. Após o tempo de marcação foi adicionado

1 mL de PBS a 4°C e as amostras foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos a 4°C para remoção de excesso de anticorpos. As amostras foram adquiridas logo em seguida. Duzentas mil células foram adquiridas para cada amostra de pata, usando o citômetro de fluxo FACSCanto™ II (BD) e adquirimos toda a amostra. As análises foram realizadas no software FlowJo (Tree Star Inc Ashland, Oregon, EUA). Utilizamos um painel para separação das populações de células linfoides (Figura 1) e mielóides (Figura 2) [101, 102].

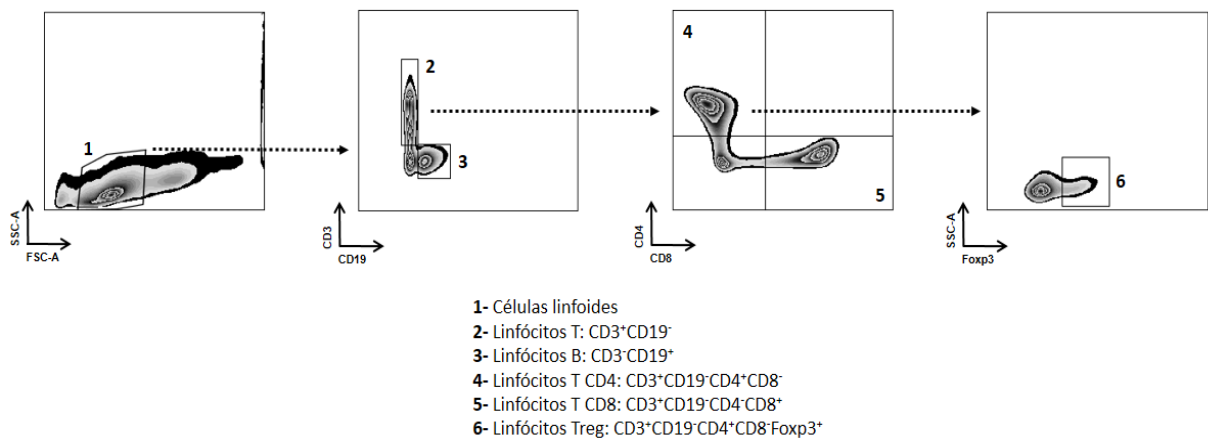


Figura 1: Estratégia de *gate* utilizada para análise das populações de células linfoides nos linfonodos drenantes e nas patas dos animais não infectados e infectados por *L. major*.

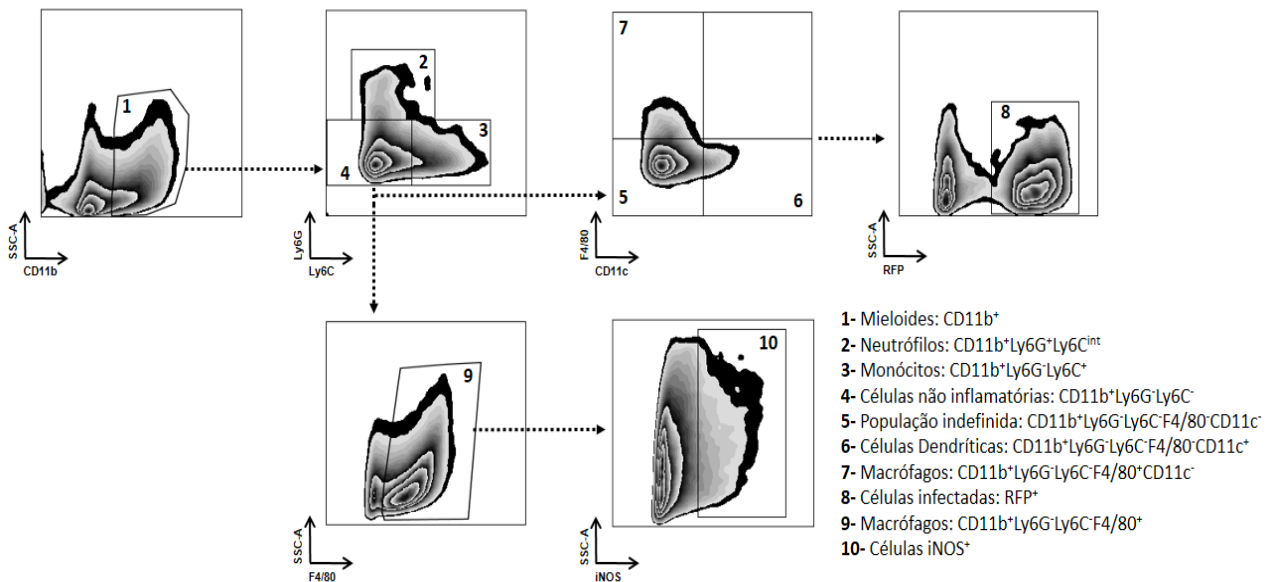


Figura 2: Estratégia de *gate* utilizada para análise das populações de células mielóides nas patas dos animais não infectados e infectados por *L. major*.

4.11. Obtenção de macrófagos de medula óssea (BMDM) e infecção por *L.major*

As células da medula óssea foram obtidas a partir do lavado do fêmur e tíbia dos camundongos SWISS/NIH CV, GF e Abx com PBS complementado com 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (GIBCO). As células precursoras da medula óssea foram incubadas em placa de Petri (JProlab, São José dos Pinhais, PR, Brasil) por nove dias em meio DMEM F12 (GIBCO) complementado com 10% de soro fetal bovino inativado, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina e 20% de sobrenadante de cultura de fibroblastos L929, que produzem o fator M-CSF responsável pela diferenciação das células precursoras em macrófagos. As células foram mantidas em 10 mL de meio DMEM F12 (GIBCO) por quatro dias, após esse período foram adicionados mais 5 mL do meio DMEM F12 (GIBCO). No sétimo dia de cultura, removeram-se 5 mL do sobrenadante da cultura e foram adicionados mais 5 mL de meio de cultura. Finalmente, após nove dias em cultura, os macrófagos foram removidos da placa com PBS gelado, a concentração celular foi ajustada para necessidade de cada ensaio a ser feito com os macrófagos obtidos. Durante todo o processo de diferenciação e para todos os ensaios as células foram incubadas em estufa de atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO₂ (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) [103].

As células foram plaqueadas nas concentrações adequadas de cada ensaio e foram deixadas na estufa por 16 horas em placas contendo meio de cultura DMEM F12 completo sem sobrenadante de cultura L929. Após esse período as células não aderentes foram removidas por lavagem dos poços com PBS aquecido a 37°C, procedimento repetido por três vezes. Novo meio DMEM F12 completo foi adicionado, agora sem o fator L929, assim como os estímulos: 50 U/mL de IFN-γ (BD), 100 ng/mL de LPS (InvivoGen), 40 U/mL de IL-4 (BD) ou 0,05 mg/ml de prostaglandina E2 (Cayman Michigan, EUA). Após 2 horas na presença destes estímulos, foi feita a infecção *in vitro* destas células nas seguintes proporções: 1 macrófago para 5 promastigotas metacíclicas de *Lm* ou *Lm* RFP. Após 24h foi feita a extração do RNA das células e coleta do sobrenadante para dosagem de TNF por ELISA, e após 48h realizamos ensaio da atividade de arginase e coleta do sobrenadante de cultura para posterior medição da produção de citocinas por ELISA.

4.12. Atividade da enzima arginase

A atividade de arginase foi mensurada a partir do lisado de macrófagos derivados de medula óssea ou a partir de células do homogenato das patas. As patas foram maceradas, como descrito anteriormente e, do homogenato obtido, 35 µL foram utilizados para o ensaio. As células que se encontravam no homogenato da pata ou os macrófagos derivados de monócitos de medula óssea ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram lisadas com 50 µL de Triton X-100 (Sigma) por 30 minutos em agitação. Após a lise, a arginase foi ativada com a adição de seus co-fatores: 50 µL de 10 mM MnCl_2 tamponado com 50 µL de 50 mM Tris HCl (pH 7,5) a 55°C por 10 minutos. Em seguida a amostra obtida foi transferida para outra placa de 48 poços em duas diferentes concentrações. Em um dos poços foi feita a transferência da amostra pura, 55 µL, e a partir desta foi feita uma diluição de 1:10 (5 µL de amostra + 45 µL de H_2O destilada). Para que fosse mensurada a atividade da enzima foi adicionado às amostras o seu substrato, 25 µL de 0,5 mM de L-arginina (Sigma) (pH 9,7), após o que as amostras foram incubadas a 37°C por 60 minutos. Em seguida a reação foi parada com a adição de 400 µL de uma mistura dos ácidos H_2SO_4 e H_3PO_4 em H_2O na proporção de 1:3:7. Foram então adicionados 25 µL de α -isonitrosopropiofenol (Sigma) 9% em etanol 100%. A placa foi então incubada a 95°C por 45 minutos. A curva padrão foi feita a partir de ureia (Sigma) 1 mg/mL diluído sucessivamente 1:2. Após os 45 minutos de incubação a 95°C, 100 µL de cada amostra foram transferidos para uma placa de 96 poços e foi realizada leitura em leitor de microplacas a 540 nm. O resultado é expresso como unidade de atividade de arginase por pata ou por 10^6 células. Cada unidade é definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 µmol ureia/minuto [57, 104].

4.13. Detecção de citocinas por ELISA

As dosagens de TNF, $\text{IFN-}\gamma$, IL-12p40 a partir do sobrenadante de cultura das células dos linfonodos foram feitas com a utilização de kits (BD) exclusivos para a detecção dessas citocinas e o procedimento foi feito exatamente como recomenda o fabricante. O limite de detecção foi de 32 pg/mL para as três citocinas.

4.14. Produção *in vitro* de espécies reativas de oxigênio (ROS)

As espécies reativas de oxigênio produzidas por BMDM foram dosadas após as células serem plaqueadas em placas de 96 poços opacas (NUNC Rochester, NY, EUA). Em cada poço foram colocadas 10^6 células. As células foram infectadas com formas amastigotas e promastigotas metacíclicas de *L. major*, cinco parasitos por célula (5:1). Além da infecção, os BMDM foram estimulados com 50 U/mL de IFN- γ (BD Bioscience), 100 ng/mL de LPS (InvivoGen San Diego, CA, EUA) e 1×10^7 partículas/50 μ L de Zymosan (Sigma), usado como controle positivo para produção de ROS. Em cada poço foi adicionado o luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona) (Sigma) na concentração de 0,05 mM. A leitura foi feita no luminômetro (Packard Waltham, MA, EUA), que mede a intensidade da luz produzida. A produção de ROS foi medida por duas horas, em intervalos de dois minutos entre cada medição. A detecção de radicais de oxigênio é feita pela reação do luminol com as espécies reativas de oxigênio emitindo luz. Em um primeiro passo, o luminol é reduzido por moléculas reativas, como OH \cdot , H $_2$ O $_2$ ou ONOO $^-$, que atacam sua ligação dinitrogênica adicionando mais dois oxigênios a um dos anéis, e depois é capaz de combinar com o O $_2^{\cdot-}$ emitir luz. Essa forma de radiação é captada pelo luminômetro e representada como unidades relativas de luz (RLU).

4.15. Detecção de mRNA por transcriptase reversa (RT) e reação em cadeia da polimerase em tempo real (Q-PCR)

4.15.1. Extração de mRNA

O RNA total foi isolado da cultura de macrófagos 24h após estímulo ou infecção *in vitro*. As patas foram coletadas e foi adicionado 1 mL de TRIZOL (Invitrogen) por 100 mg de tecido. Os tecidos foram triturados completamente até formar um homogenato. No caso da extração de RNA de cultura de macrófagos derivados de medula-óssea lisamos as células após 24h em cultura, com ou sem estímulo a partir da adição de 300 μ L de TRIZOL para 10^6 células. A extração do RNA se deu da mesma forma para o homogenato do tecido ou da cultura celular. Ambas as amostras foram primeiramente incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente, para permitir a completa dissociação de complexos nucleoprotéicos. Posteriormente, foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio (Merck Darmstadt, Hessen, Alemanha) para cada 1mL de TRIZOL utilizado. As amostras foram

homogeneizadas, incubadas a temperatura ambiente por 3 minutos e, então, centrifugadas a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a mistura foi separada em uma fase inferior cor de rosa composta por fenol-clorofórmio, uma fase intermediária e uma fase aquosa transparente superior. O RNA permaneceu na fase aquosa, a qual foi transferida para um novo microtubo de 2ml livre de DNase e RNase (Axygen). Para precipitar o RNA da fase aquosa, foram adicionados 500 µL de isopropanol (Merck) para cada 1mL de TRIZOL utilizado, a mistura foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. O RNA precipitado foi lavado em 1 mL de etanol (Merck) 75% em água tratada com DEPC (USB Corp, Cleveland, OH, EUA) e centrifugado a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e se permitiu que o precipitado secasse por 5 a 10 minutos. O RNA precipitado foi diluído em 50 µL de água de alta qualidade livre de RNase tratada com DEPC, e armazenado a -80°C. A quantificação de RNA foi realizada utilizando o espectrômetro NanoDrop 1000 (Thermo), nos comprimentos de onda de 260 e 280nm. Foram consideradas apropriadas as amostras que apresentaram uma relação ácido nucléico/proteína (OD260/OD280) com valores entre 1,6 e 2,0.

4.15.2. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada a partir do RNA extraído como indicado acima. Foi utilizado um volume final de reação de 25 µL, contendo 2 µg de RNA, 250 nM dNTPs (Promega Corp.), 10 mM TRIS-HCL (pH 8,3), 15 mM KCL, 6 nM MgCl₂, 10 mM DTT (GIBCO), RNAsin inibidor de RNase (Promega Corp. ,Madison, WI, EUA) e 0,75 pmoles de oligo (dT) 15 primer (Promega Corp.). A mistura foi levada a um termociclador (Eppendorf), onde as amostras foram incubadas inicialmente por 5 minutos a 70°C e 5 minutos a 4°C. Após tal incubação, foram adicionadas, a cada amostra, 50 U da enzima transcriptase reversa M-MLV (Promega Corp.). Em seguida a mistura foi incubada por 5 minutos a 23°C, 5 minutos a 4°C, 60 minutos a 37°C, 5 minutos a 90°C, e finalmente a 4°C até que as amostras fossem recolhidas do termociclador. O cDNA, produto da reação, foi armazenado a -20°C até sua amplificação.

4.15.3. Amplificação do cDNA por Q-PCR

A amplificação da expressão de mRNA específica foi realizada através de PCR em tempo real (RT-PCR) usando iniciadores com sequências específicas detalhadas na

tabela 1. As reações foram desenvolvidas sob um sistema de detecção de sequência ABI PRISM®7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) usando 20% da reação de cDNA em volume total de 10 µL de mistura de PCR. Todas as reações foram desenvolvidas em triplicatas usando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) de acordo com as especificações do fabricante. A quantificação relativa do produto foi determinada pelo método de limiar de ciclos para determinar o incremento em vezes do produto. O programa de PCR para amplificação de cDNA foi desenvolvido sob as seguintes condições: 2 minutos a 50°C, ativação da AmpliTaq (Applied Biosystems) a 95°C durante 10 minutos, desnaturação a 95°C por 15 segundos. Para o anelamento e extensão final, as amostras foram submetidas a 60°C por 1 minuto durante 45 ciclos. Para a geração da curva de dissociação, as amostras foram aquecidas a 95°C por 15 segundos, em seguida a 60°C por 5 segundos. Finalmente, as amostras foram esfriadas por 1 minuto a 4°C. O gene de interesse foi normalizado em relação à expressão do gene da β-actina, que é expresso de forma constitutiva, baseado no cálculo do $\Delta\Delta CT$. A mudança na expressão foi representada como relativa as células não estimuladas e não infectadas. As sequências dos primers utilizados nesse trabalho estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos primers

Gene	Forward	Reverse
iNOS	5'- CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC -3'	5'- GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG -3'
CXCL-9	5'- GGGATTGTAGTGGATCGTGC -3'	5'- GGAGTTCGAGGAACCCCTAGTG -3'
β- ACTINA	5'- AGGTGTGCACCTTTTATTGGTCTCAA -3'	5'- TGTATGAAGTTTGGTCTCCCT -3'
ARGINASE I	5'- CTGGCAGTTGGAAGCATCTCT -3'	5'- CTGGCAGTTGGAAGCATCTCT -3'
YM-1	5'-AGAAGGGAGTTTCAAACCTGGT-3'	5'-GTCTTGCTCATGTGTGTAAGTGA-3'
FIZZ1	5'- AATCCAGCTAACTATCCCTCCA -3'	5'- CAGTAGCAGTCATCCAGCA -3'
SPHK1	5'-ACAGCAGTGTGCAGTTGATGA-3'	5'-GGCAGTCATGTCGGTGATG-3'
IL-10	5'- CCAGTTTTACCTGGTAGAAGTGATG -3'	5'- TGTCTAGGTCTGGAGTCCAGCAGACTCAA -3'
SOCS1	5'-ACACTCACTTCCGCACCTTC-3'	5'-GAAGCCATCTCCACGCTG-3'

4.16. Dosagem de óxido nítrico

A dosagem de óxido nítrico (NO) foi feita a partir do sobrenadante de cultura dos BMDM. Os macrófagos de medula óssea foram incubados em placas de 48 poços por 48 horas na concentração de 1×10^6 células/mL. O sobrenadante destas culturas foi coletado e utilizado para dosagem de produção de nitrito (NO_2^-) pela reação de Griess e esta

dosagem foi utilizada como medida da produção de óxido nítrico [105]. Alíquotas de 50 μL dos sobrenadantes a serem dosados foram incubadas com 50 μL de solução de sulfanilamida 1% (Sigma) e 50 μL de solução de naftiletileno-diamina 1% (Sigma) diluídos em H_3PO_4 2,5% em temperatura ambiente por 5 minutos no escuro. A concentração do padrão de nitrito utilizado foi a partir de 250 μM , sendo feita diluição seriada até 1,95 μM . A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda 540nm.

4.17. Análise estatística

Os dados passaram por análise de normalidade, os paramétricos foram apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM) para cada grupo. Nos ensaios de cinética e múltiplos grupos foi realizado o teste Two-Way ANOVA, seguido do pós teste de Bonferroni para determinar diferenças entre os tempos e os grupos avaliados. Para determinar diferenças entre dois grupos, foi utilizado o teste *t* de Student. Os dados não paramétricos foram apresentados como mediana, o teste estatístico utilizado foi Mann-Whitney, para análises entre duas variáveis, e o Kruskal-Wallis, para análises entre três ou mais variáveis. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism versão 7 para Windows 10 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$ (assinalados com *).

5. Resultados

5.1. Ausência de microbiota reduz a capacidade de macrófagos desenvolverem um perfil clássico de ativação

Devido a influência da microbiota no desenvolvimento do sistema imune e sua capacidade de modulação da resposta imune, utilizamos macrófagos derivados de medula óssea (BMDM), *in vitro*, de animais CV e *germ free* (GF) para avaliar o perfil de ativação de macrófagos e a resposta efetora dessas células. Estimulamos *in vitro* essas células com fatores exógenos para induzir polarização nos diferentes perfis de ativação.

O primeiro perfil de ativação a ser avaliado foi o perfil inflamatório clássico, induzido por LPS e IFN- γ . Nós observamos que os macrófagos derivados dos animais GF produziram menor quantidade de IL-12p70 (Figura 3A) e TNF (Figura 3B) que células de camundongos CV. Analisando a expressão do mRNA da quimiocina CXCL9 (Figura 3C) e da proteína SOCS1, que são fatores marcadores da ativação induzida por LPS+IFN- γ , observamos que há uma menor expressão do mRNA desses marcadores nos macrófagos provenientes dos camundongos GF.

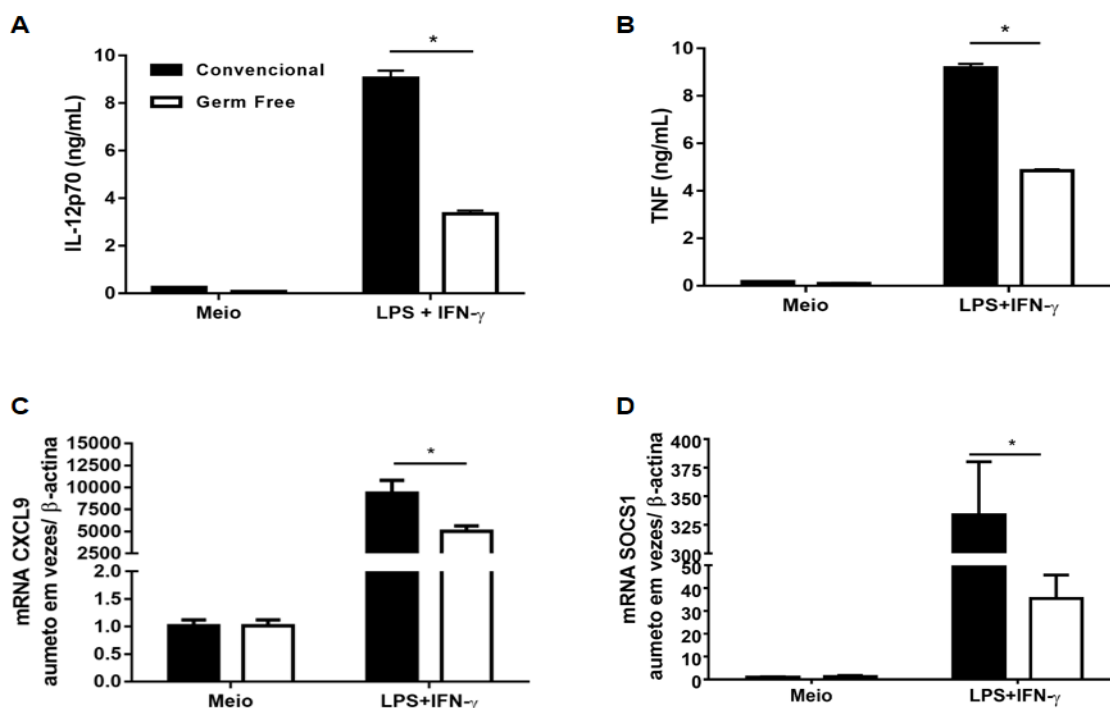


Figura 3: ELISA do sobrenadante de cultura de BMDM para dosagem de IL-12p70 (A) e TNF (B) após 48h e 24h de estímulo com LPS+IFN- γ , respectivamente. Expressão do mRNA da quimiocina CXCL9 (C) e da proteína SOCS1 (D) por PCR em tempo real 24h após estímulo com LPS+IFN- γ . * indica diferença estatística entre os dois grupos para os mesmos estímulos usando teste Two-way ANOVA e pós teste Bonferroni ($p < 0,05$). Os resultados são representativos de três experimentos desenvolvidos independentemente. N=3.

Outro importante produto da resposta inflamatória de macrófagos é a produção de moléculas microbicidas como, por exemplo, as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Portanto, decidimos avaliar a produção desses fatores pelos BMDM dos dois grupos na presença de LPS+IFN- γ . Notamos que os macrófagos do grupo GF (GF-M ϕ) apresentaram uma expressão reduzida do mRNA da enzima iNOS (Figura 4A), responsável pela produção do óxido nítrico (NO). Assim, decidimos avaliar a produção de NO, para isso dosamos a produção de nitrito (NO $_2^-$), produto da oxidação espontânea do NO. (Figura 4B). Similar à expressão do mRNA da iNOS, os GF-M ϕ produziram uma menor quantidade de NO $_2^-$.

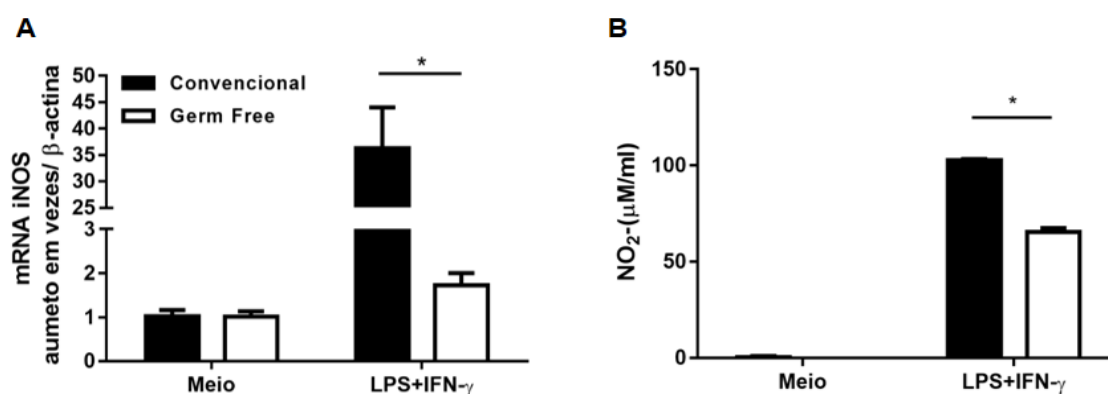


Figura 4: Expressão do mRNA da enzima iNOS (A) após 24h de estímulo com LPS+IFN- γ , a partir do lisado da cultura de BMDM. Dosagem da produção de nitrito (B) no sobrenadante de cultura de macrófagos pelo método de Griess, após 48h de estímulo com LPS + IFN- γ . * indica diferença estatística entre os dois grupos para os mesmos estímulos usando teste Two-way ANOVA e pós teste Bonferroni ($p < 0,05$). Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente. N=3.

As espécies reativas de oxigênio (ROS) podem ser produzidas a partir do radical superóxido, que por sua vez pode ser produzido pela redução do oxigênio pelas NADPH oxidases de fagócitos dependentes de NADPH. As ROS podem ser produzidas pelos macrófagos quando estimulados por LPS+IFN- γ e são importantes para induzir a morte de parasitos intracelulares. Nossos dados mostram que GF-M ϕ apresentaram uma capacidade microbicida prejudicada. Eles produzem menos ROS quando estimulados com Zymosan (Figuras 5A e 5B), que é um estímulo clássico para indução de produção de ROS. O mesmo fenômeno é observado para produção de ROS na presença de formas promastigotas de *Leishmania major* (Lm P) (Figuras 5C e 5D), na presença de LPS+IFN- γ , e das formas amastigotas com LPS+IFN- γ (Lm A+ LPS + IFN- γ) e promastigotas com LPS+IFN- γ (Lm P+LPS+IFN- γ) (Figuras 5E e 5F).

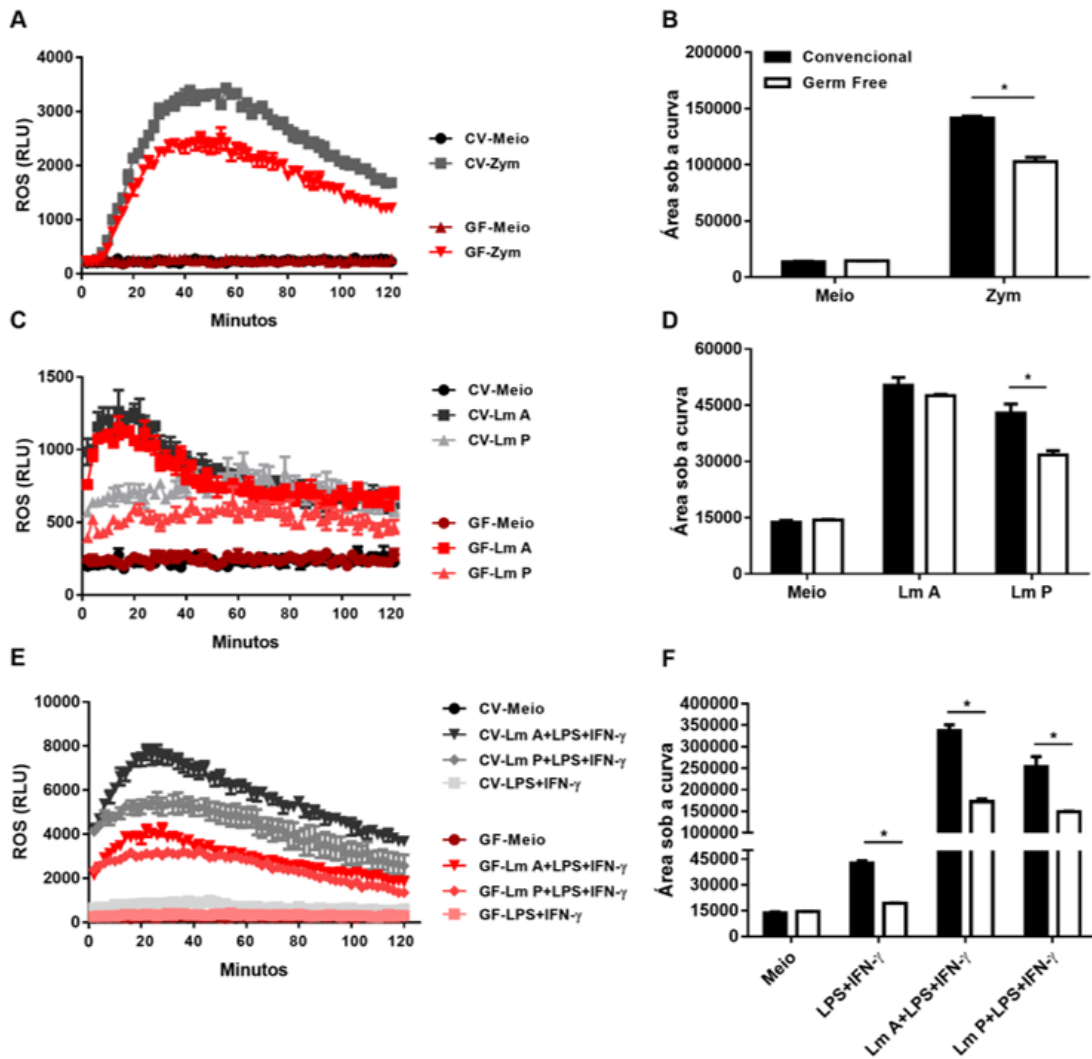


Figura 5: Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por BMDM estimulados ou não com Zymosan (Zym) (A e B); infectados ou não com formas amastigotas de *L. major* (Lm A) e promastigotas de *L. major* (Lm P) (C e D); estimulados ou não com LPS+IFN- γ , Lm A+LPS+IFN- γ e Lm P+LPS+IFN- γ (E e F) por 2h de estimulação com os estímulos citados acima. * indica diferença estatística entre os dois grupos para os mesmos estímulos usando teste Two-way ANOVA e pós teste Bonferroni ($p < 0,05$). Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente. N=3.

Portanto, notamos uma resposta inflamatória e função efetora reduzida nos macrófagos provenientes dos camundongos GF, devido a menor produção e expressão de marcadores desse perfil de ativação e também na menor produção de moléculas microbicidas. Consequentemente, é possível que os GF-M ϕ possam apresentar um comprometimento na eliminação de patógenos intracelulares.

5.2. A ativação de macrófagos para o perfil associado ao reparo é potencializada na ausência de microbiota

Os macrófagos na presença de IL-4 assumem um perfil de ativação associado ao reparo tecidual. Esse perfil é observado em processos de cicatrização e regeneração tecidual, porém durante processos infecciosos torna os macrófagos suscetíveis a infecções por parasitos intracelulares [75]. Para avaliarmos esse perfil, estimulamos *in vitro* os M ϕ de ambos os grupos e analisamos o padrão de expressão de genes relacionados a esse perfil de ativação. Dois dos fatores relacionados a este perfil de ativação são as proteínas FIZZ1 e YM1, cuja expressão é induzida por IL-4. A expressão do mRNA de FIZZ1 mostrou-se maior nos GF-M ϕ quando ativados por IL-4 (Figura 6A). A ausência de microbiota também interferiu da mesma maneira na expressão de YM1 (Figura 6B).

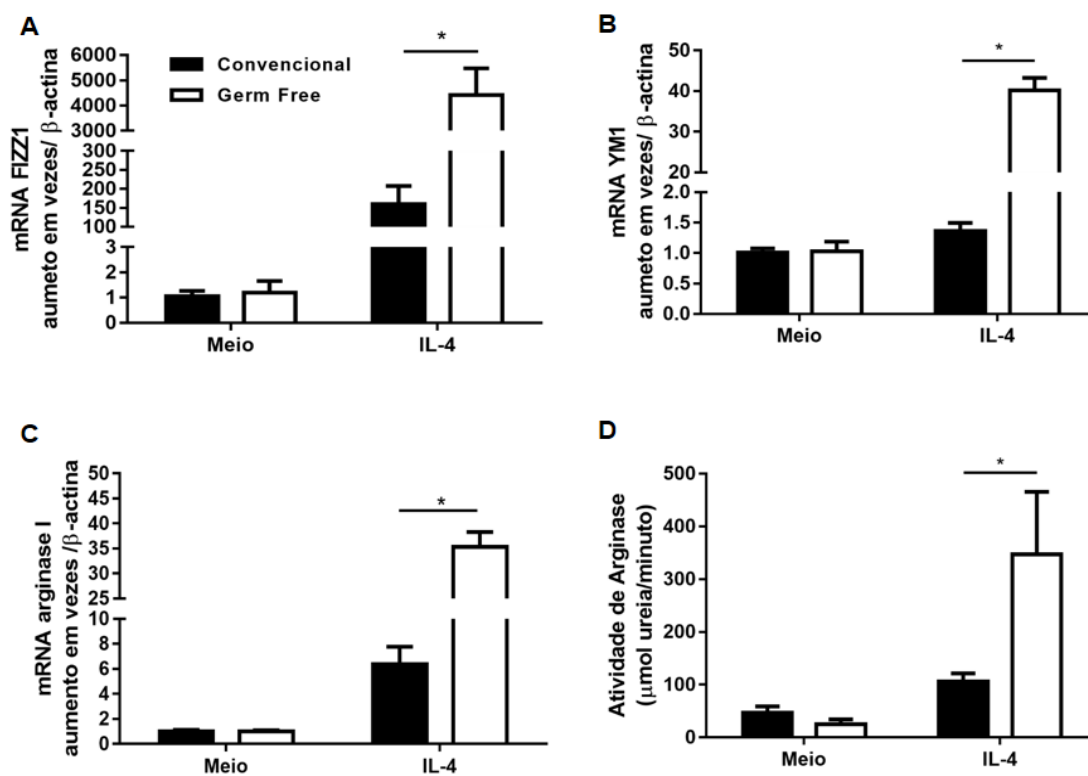


Figura 6: BMDM foram ativados com IL-4 e após 24h mensuramos a expressão de FIZZ1 (A), YM1 (B) e arginase I (C) por PCR em tempo real. Medida da atividade da enzima arginase (D) em BMDM após 48h de estímulo com IL-4. * indica diferença estatística entre os grupos de camundongos para os mesmos estímulos usando teste Two-way ANOVA e pós teste Bonferroni ($p < 0,05$). Os resultados são representativos de três experimentos desenvolvidos independentemente. N=3.

A enzima arginase I também é um marcador dos perfis de ativação não inflamatórios. GF-M ϕ estimulados com IL-4, apresentaram maior expressão do mRNA da enzima quando comparados ao outro grupo (Figura 6C). Além disso, a atividade da

enzima arginase mostrou-se maior nas células do grupo GF em relação ao grupo CV na presença de IL-4 (Figura 6D).

A partir dos dados mostrados até agora é possível ver uma distinção na ativação dos macrófagos para cada grupo. GF-M ϕ demonstram uma resposta polarizada no perfil de ativação associado ao reparo e uma menor capacidade inflamatória e efetora quando comparados aos CV-M ϕ .

5.3. A ativação regulatória dos macrófagos é aumentada na ausência de microbiota

Macrófagos, quando estimulados com PGE₂ + LPS, tornam-se ativados de forma regulatória, que é uma resposta anti-inflamatória que sucede a resposta inflamatória. Esse perfil de ativação é caracterizado pela produção de IL-10 e da esfingosina cinase tipo 1 (SPHK1). Na presença do estímulo de ativação regulatório, PGE₂+LPS, os GF-M ϕ exibiram uma maior expressão do mRNA de IL-10 (Figura 7A) e da SPHK1 (Figura 7B). Portanto, a ausência de microbiota potencializa o perfil regulatório de ativação dos M ϕ .

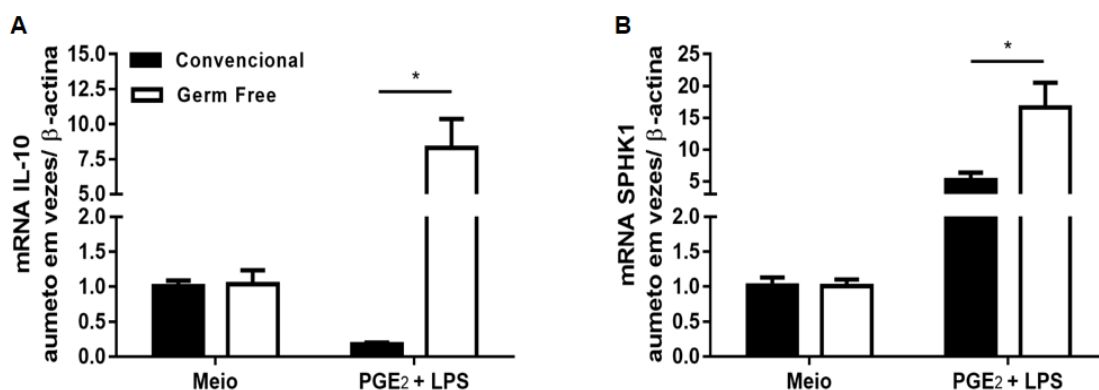


Figura 7: BMDM foram ativados com PGE₂+LPS e após 24h mensuramos a expressão do mRNA de IL-10 (A) e SPHK1 (esfingosina cinase tipo 1) (B) por PCR em tempo real. * indica diferença estatística entre os dois grupos para os mesmos estímulos usando teste Two-way ANOVA e pós teste Bonferroni (p<0,05). Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente. N=3.

A IL-10 é uma importante citocina anti-inflamatória, que atua na regulação da inflamação, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e moléculas efetoras de macrófagos. Logo, é possível que maior capacidade anti-inflamatória e regenerativa dos GF-M ϕ explique a reduzida capacidade inflamatória e efetora dessas células.

5.4. Depleção da microbiota por coquetel de antibióticos influencia o perfil de ativação dos BMDM

Devido à influência da microbiota no perfil de ativação dos macrófagos, decidimos avaliar se a microbiota uma vez estabelecida determina o perfil de ativação dos macrófagos. Para isso, depletamos a microbiota de animais CV com o tratamento por coquetel de antibióticos e avaliamos a resposta efetora dos BMDM do grupo CV e do grupo Abx.

Não observamos diferença na produção de NO_2^- (Figura 8A) pelos macrófagos dos dois grupos quando estimulados por LPS+IFN- γ . Por outro lado, os Abx-M ϕ apresentaram uma menor produção de ROS na presença de Zymosan (Figura 9A e B); infectados com as formas promastigotas de *L. major* (Lm P) e na presença dos estímulos por LPS+IFN- γ e infecção por Lm P simultaneamente (Figura 9C e D). Além disso, os Abx-M ϕ apresentaram uma maior atividade de arginase (Figura 8B) em relação aos CV-M ϕ na presença de IL-4.

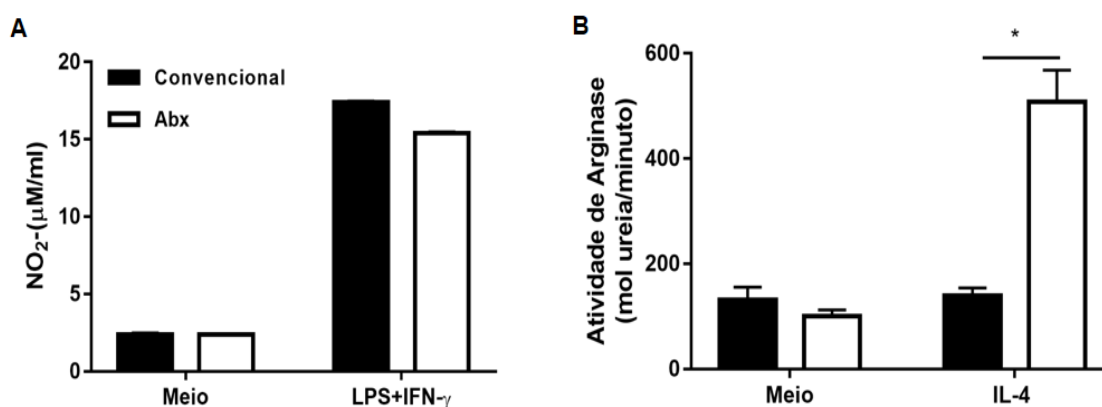


Figura 8: Dosagem da produção de Nitrito (A) no sobrenadante de cultura de BMDM pelo método de Greiss, após 48h de estímulo com LPS + IFN- γ . Medida da atividade da enzima arginase (B) em BMDM após 48h de estímulo com IL-4. * indica diferença estatística entre os dois grupos para os mesmos estímulos usando teste Two-way ANOVA e pós teste Bonferroni ($p < 0,05$). Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente. N=3.

Esses dados sugerem que a resposta efetora dos macrófagos é influenciada por alterações geradas na microbiota já estabelecida. Além disso, mostram que a influência da microbiota sobre a ativação dos macrófagos é um processo constante e não depende só de um primeiro contato com a microbiota.

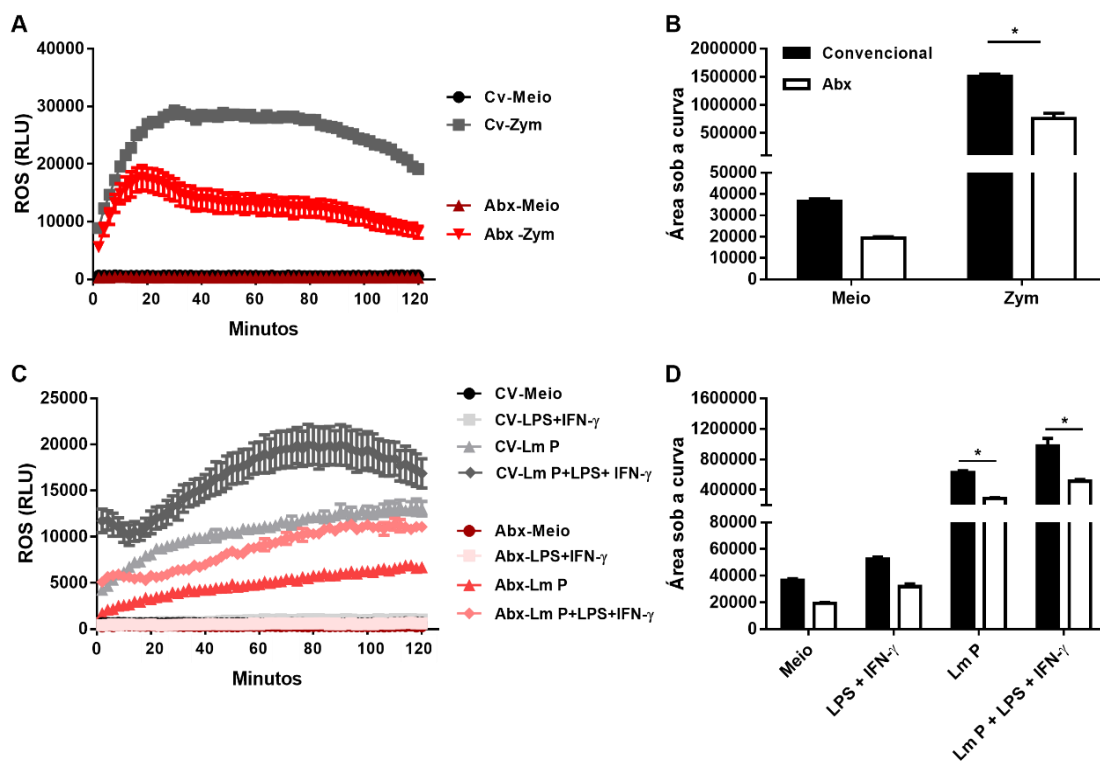


Figura 9: Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por BMDM estimulados ou não com Zymosam (A e B); (C e D) estimulados com LPS + IFN- γ , infectados ou não com formas promastigotas de *L. major* (Lm P) e infectados e estimulados com LPS + IFN- γ (Lm P+ LPS + IFN- γ) por 2h após estímulos. * indica diferença estatística entre os dois grupos para os mesmos estímulos usando teste Two-way ANOVA e pós teste Bonferroni ($p < 0,05$). Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos de forma independente. N=3.

5.5. Resistência à infecção por *L. major* é dependente da microbiota

Utilizamos o modelo de infecção por *L. major* para elucidar se a interferência da microbiota nos perfis de ativação de macrófagos e na resposta efetora dessas células poderia se relacionar com o fenótipo do desenvolvimento dessa doença em camundongos CV e GF, pois os macrófagos são importantes células hospedeiras para o parasito durante a infecção. Dados da literatura já mostraram que os animais GF e seus macrófagos são mais suscetíveis a infecção por *L. major* [62].

Camundongos GF quando infectados nas patas com 10^6 promastigotas metacíclicas de *L. major* desenvolveram uma lesão maior a partir da sexta semana após a infecção até a décima semana após infecção (Figura 10A). A quantificação da carga parasitária segue o mesmo perfil do curso de infecção, os camundongos GF apresentaram maior quantidade de parasitos na pata após seis semanas de infecção (Figura 10B). Esse fenômeno pode ser explicado pela maior atividade da enzima arginase nas patas após seis

semanas de infecção (Figura 10C), que indica uma maior disponibilidade de poliaminas, compostos que são utilizados pelos parasitos intracelulares para se multiplicarem [104].

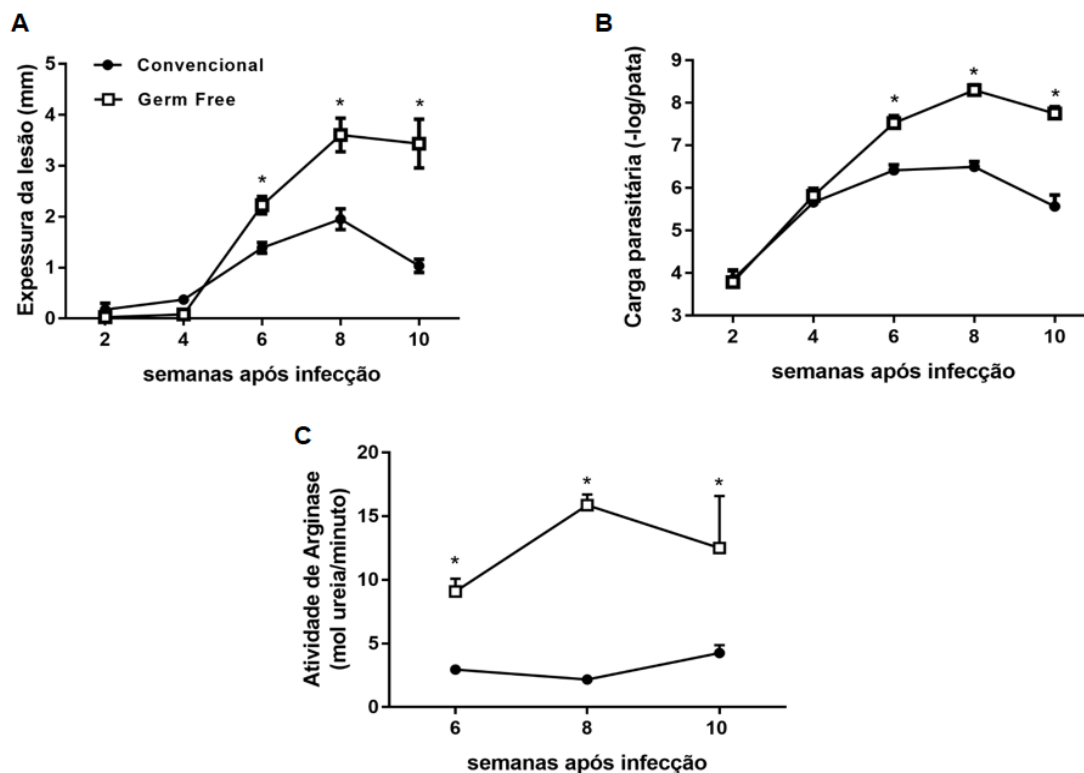


Figura 10: Desenvolvimento lesão na pata traseira dos animais foi monitorado a cada duas semanas até 10 semanas após a infecção (A). Quantificação da carga parasitária (B) usando o método de diluição limitante do macerado das patas infectadas. Cinética da atividade da enzima arginase (C) a partir do macerado das patas nos tempos de 6, 8 e 10 semanas após infecção. * indica diferença estatística entre os grupos de camundongos usando teste Two-way ANOVA e pós teste Bonferroni ($p < 0,05$). Os resultados são representativos de três experimentos desenvolvidos independentemente. Foram utilizados 3-5 animais por grupo, por tempo.

5.6. Ausência da microbiota não altera o infiltrado de linfócitos e não prejudica a geração de resposta Th1 durante a infecção por *L. major*

A resposta adaptativa é essencial no controle da infecção por *L. major*. A resistência a infecção por *L. major* está associada a uma resposta tipicamente Th1 na qual as células do sistema imune inato infectadas produzem citocinas pró-inflamatórias, como IL-12 e TNF, que vão promover a diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ Th0 em Th1, e conseqüentemente ativação das células do sistema imune inato, através da produção de IFN- γ , gerando uma resposta conjunta associada a resistência a infecção por *L. major*.

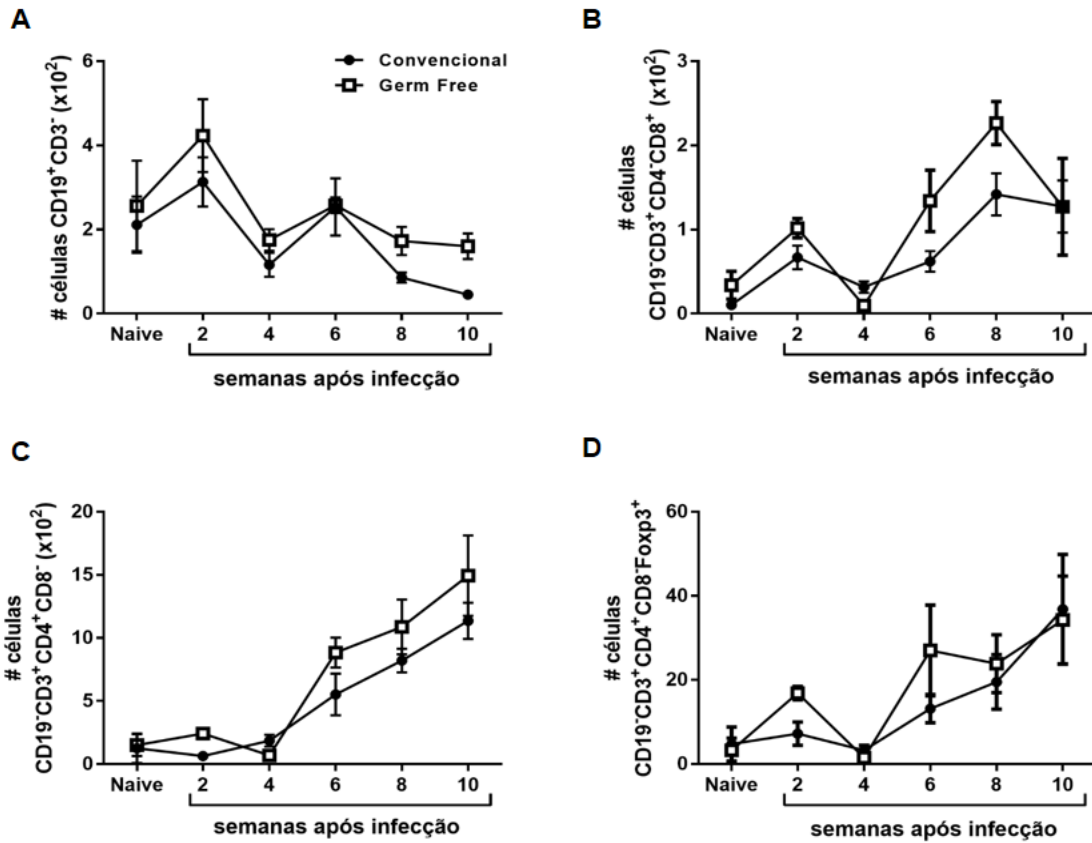


Figura 11: Número absoluto (#) de linfócitos nas patas dos animais não infectados e infectados da segunda até a décima semana após infecção. Linfócitos B (CD19⁺CD3⁻) (A), Linfócitos T CD8⁺ (CD19⁻CD3⁺CD4⁻CD8⁺) (B), Linfócitos T CD4⁺ (CD19⁻CD3⁺CD4⁺CD8⁻) (C), Linfócitos T regulatórios (CD19⁻CD3⁺CD4⁺CD8⁻Foxp3⁺) (D). * indica diferença estatística entre os grupos de camundongos usando teste Two-way ANOVA e pós teste Bonferroni (p<0,05). Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente. Foram utilizados 4-6 animais por grupo, por tempo.

Utilizando a técnica de citometria de fluxo caracterizamos as populações de linfócitos no local da lesão e no linfonodo poplíteo, local onde ocorre maior parte da apresentação de antígenos para os linfócitos e desenvolvimento da resposta adaptativa. Observamos que os animais GF apresentam quantidades similares de linfócitos B (Figura 11A), linfócitos T CD8⁺ (Figura 11B), linfócitos T CD4⁺ (Figura 11C) e linfócitos T regulatórios (Figuras 11D) na pata durante todo o curso de infecção. Também não observamos diferenças nas populações de linfócitos presentes no linfonodo poplíteo: linfócitos B (Figura 12A), linfócitos T CD8⁺ (Figura 12B), linfócitos T CD4⁺ (Figura 12C) e linfócitos T regulatórios (Figuras 12D).

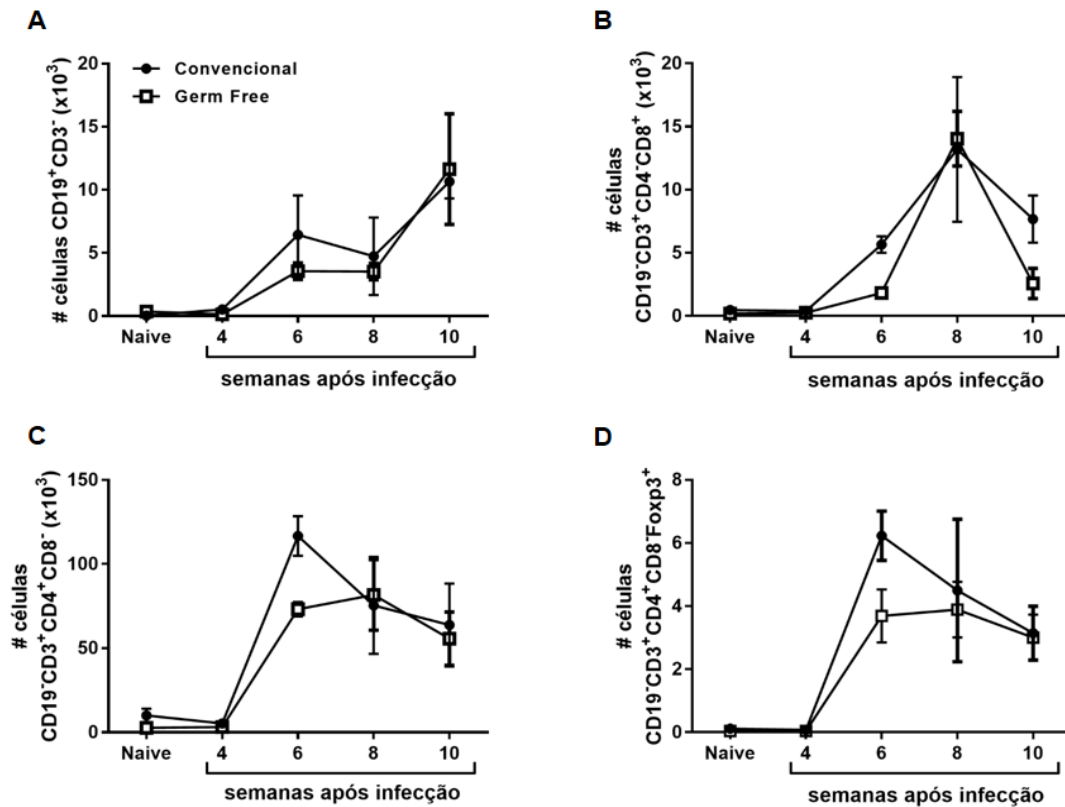


Figura 12: Número absoluto (#) de linfócitos nos linfonodos poplíteos dos animais não infectados e infectados da quarta até a décima semana após infecção. Linfócitos B (CD19⁺CD3⁻) (A), Linfócitos T CD8⁺ (CD19⁻CD3⁺CD4⁺CD8⁺) (B), Linfócitos T CD4⁺ (CD19⁻CD3⁺CD4⁺CD8⁻) (C), Linfócitos T regulatórios (CD19⁻CD3⁺CD4⁺CD8⁺Foxp3⁺) (D). * indica diferença estatística entre os grupos de camundongos usando teste Two-way ANOVA e pós teste Bonferroni (p<0,05). Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente. Foram utilizados 4-6 animais por grupo, por tempo.

Em seguida, através da cultura *ex-vivo* de células do linfonodo poplíteo dos animais infectados nós avaliamos a produção das citocinas características da resposta Th1. Observamos que os animais GF produzem níveis similares de IFN- γ (Figura 13A), TNF (Figura 13B) e IL-12p70 (Figura 13C) em relação aos animais CV em todos os tempos após infecção. Ou seja, os animais GF apresentam a mesma capacidade de produzir uma resposta Th1 que os animais CV e não apresentam diferenças no infiltrado de linfócitos durante a infecção. Estes dados sugerem que o mecanismo de susceptibilidade dos animais GF a infecção por *L. major* é independente da resposta imune adaptativa.

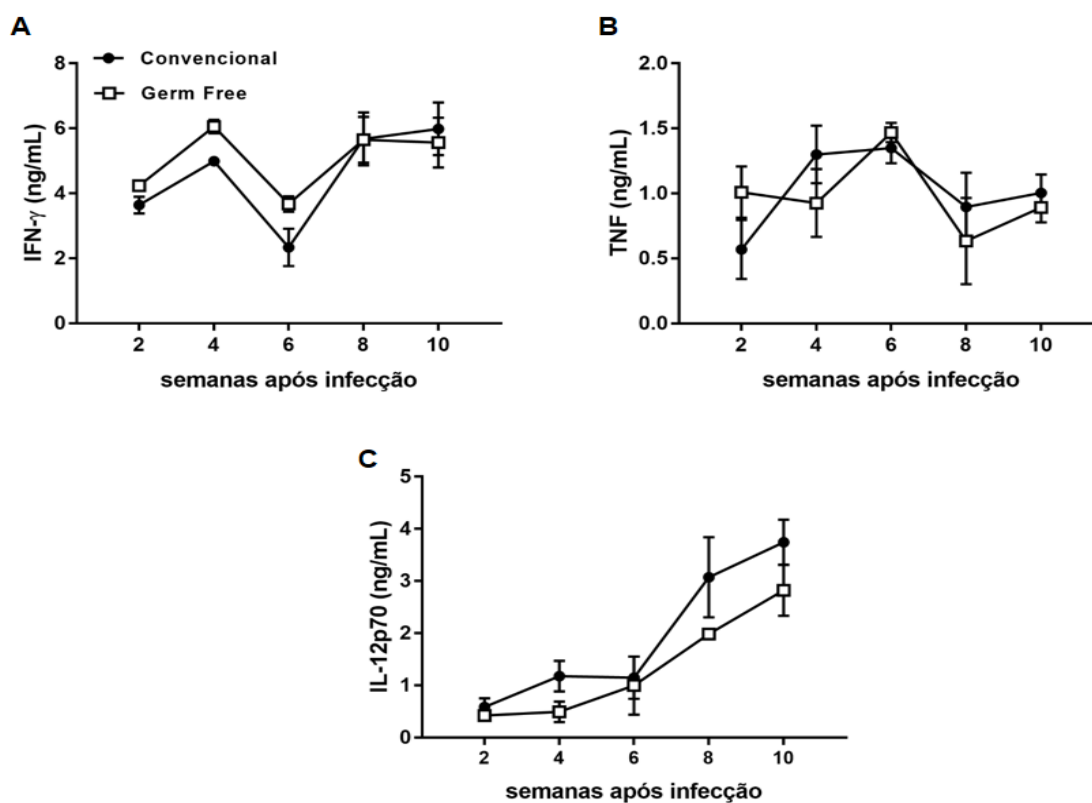


Figura 13: Dosagem das citocinas IFN- γ (A), TNF (B) e IL-12p70 (C) feitas por ELISA a partir do sobrenadante de cultura de células do linfonodo poplíteo de camundongos infectados 2, 4, 6, 8 e 10 semanas após infecção. ELISA realizadas 48h (IFN- γ e IL-12p70) e 24h (TNF) após o reestímulo com antígenos totais de *Leishmania major*. * indica diferença estatística entre os grupos de camundongos usando teste Two-way ANOVA e pós teste Bonferroni ($p < 0,05$). Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente. Foram utilizados 3-5 animais por grupo, por tempo.

5.7. O sistema imune fagocitário dos animais *germ free* é permissivo à infecção

Devido aos achados para resposta adaptativa, decidimos caracterizar as populações de células do sistema imune inato presentes na lesão durante a infecção por *L. major*. Os neutrófilos, monócitos e macrófagos compõem o sistema imune fagocitário e desempenham funções importantes na resposta imune inata contra patógenos intracelulares, dentre esses patógenos está a *L. major*.

Para avaliar a participação de cada célula durante a infecção, utilizamos uma linhagem de *Leishmania major* que expressa um plasmídeo que codifica proteína vermelha (Lm RFP⁺, ver materiais e métodos), permitindo assim avaliar as células infectadas por citometria de fluxo. O infiltrado de neutrófilos (Figura 14A) e monócitos (Figura 14C) não é diferente ao longo da infecção, exceto pela maior quantidade de neutrófilos na lesão dos animais GF observada na décima semana após infecção. A partir da sexta semana após infecção observamos uma maior quantidade de células mielóides não inflamatórias (NI) (Figura 14E) na lesão dos animais GF em comparação com os animais CV. Quando avaliamos a quantidade de células infectadas, RFP⁺ na lesão, observamos que os animais GF apresentam uma maior quantidade de neutrófilos infectados (Figura 14B) na décima semana após infecção. Quatro semanas após infecção os animais CV apresentaram uma maior quantidade monócitos infectados (Figura 14C) e na sexta semana após infecção são os animais GF que apresentaram uma maior quantidade de monócitos infectados. Os animais CV tendem a ter uma maior quantidade de células mielóides não inflamatórias infectadas na quarta semana após infecção (Figura 14F), similar ao que é observado para os monócitos infectados. Os animais GF apresentaram uma maior quantidade dessas células não inflamatórias infectadas na décima semana após infecção. Os dados mostram que, para essas três populações, os animais GF tendem a ter uma maior quantidade total de células infectadas da sexta até a décima semana após infecção.

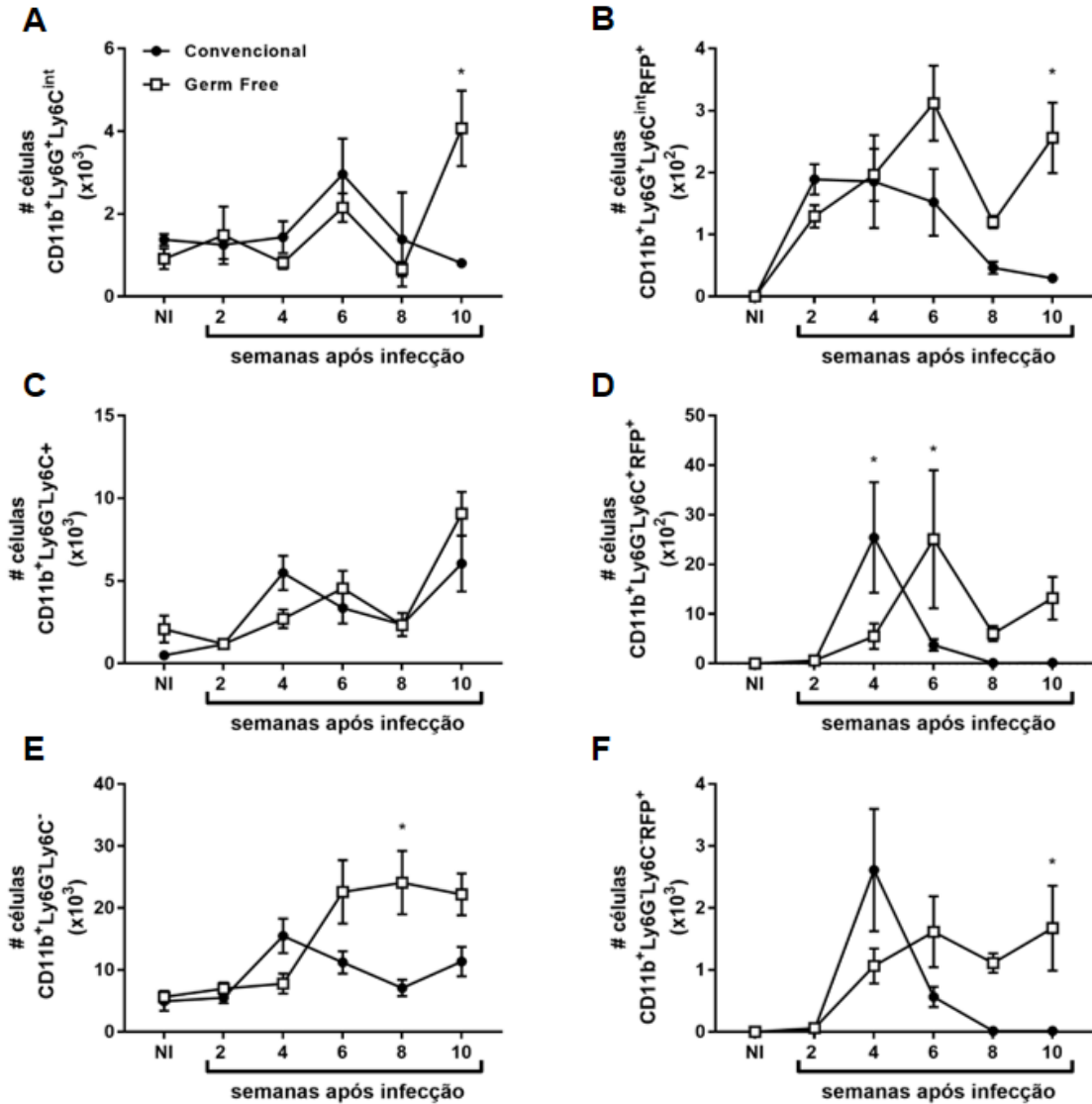


Figura 14: Número absoluto (#) de células do sistema imune inato (CD11b⁺) nas patas dos animais não infectados e infectados da segunda até a décima semana após infecção. (A) Neutrófilos (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{int}), (B) Neutrófilos infectados (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{int}RFP⁺), (C) Monócitos (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C⁺) e (D) Monócitos infectados (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C⁺RFP⁺), (E) Células não inflamatórias (CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C⁻) e (F) Células não inflamatórias (CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C⁻RFP⁺). RFP⁺: *Leishmania major* RFP⁺; * indica diferença estatística entre os grupos de camundongos usando teste Two-way ANOVA e pós teste Bonferroni (p<0,05). Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente. Foram utilizados 4-6 animais por grupo, por tempo.

A população de células mielóides não inflamatórias ainda foi analisada a fim de caracterizar quais tipos celulares seriam responsáveis pelas diferenças observadas. Então, subdividimos essa população celular de acordo com a expressão de F4/80, marcador para macrófagos, e CD11c, marcador de células dendríticas. Notamos que não houve diferença na quantidade de células dendríticas (Figura 15A) e de macrófagos (Figura 15C) durante a infecção. Porém, observamos um maior infiltrado de células duplo negativas para os

dois marcadores nos animais GF na oitava e décima semana após infecção (Figura 15E). Essa população celular ainda não foi caracterizada na literatura e uma forma de caracterizá-las seria utilizando outros marcadores. Além disso, os animais GF apresentaram uma maior quantidade de células dendríticas, macrófagos e células duplo negativas infectadas a partir da sexta semana após infecção.

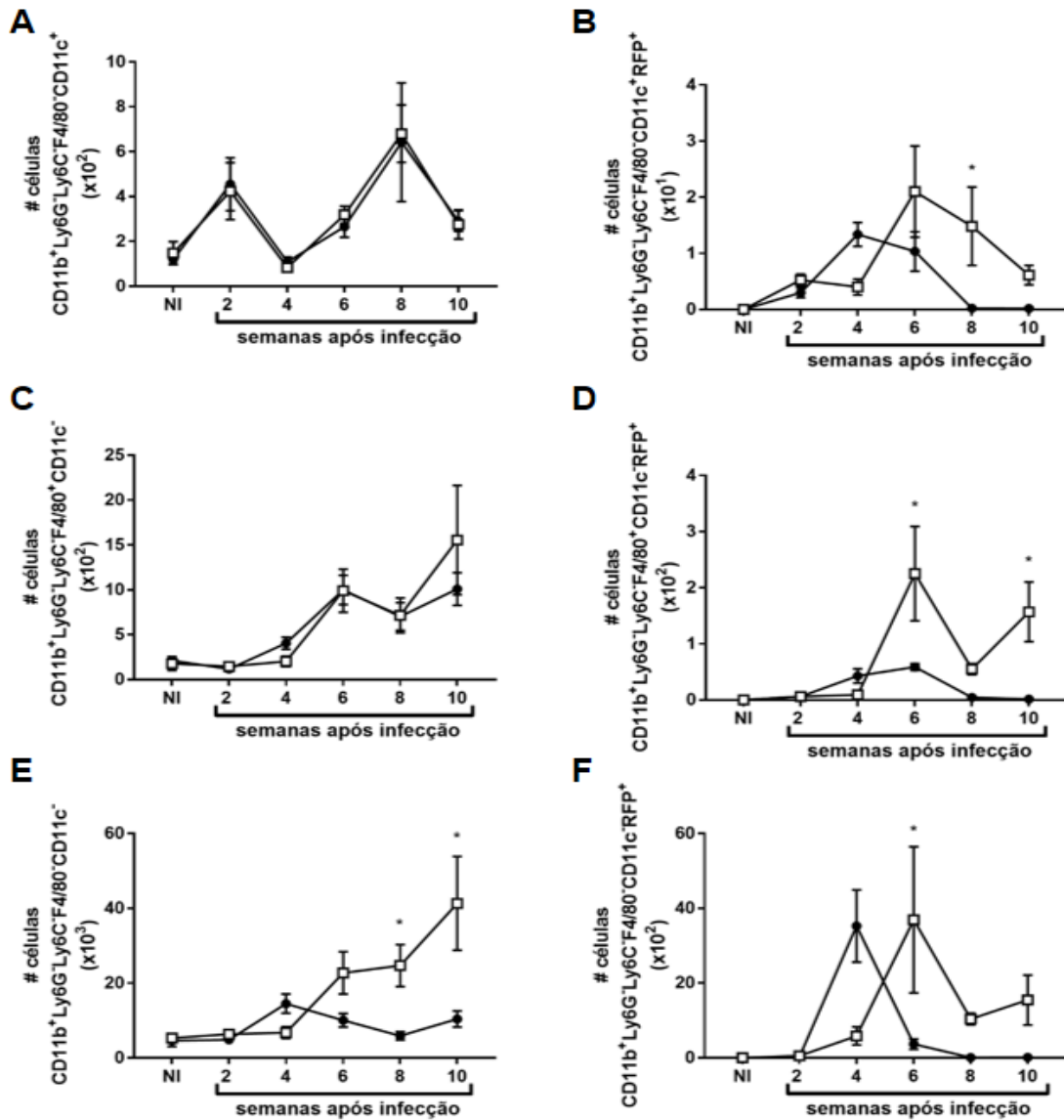


Figura 15: Número absoluto (#) de células dentro da população de não inflamatórias ($CD11b^+Ly6G^+Ly6C^-$) nas patas dos animais não infectados e infectados da segunda até a décima semana após infecção. **(A)** Células dendríticas ($CD11b^+Ly6G^+Ly6C^+F4/80^+CD11c^+$), **(B)** Células dendríticas infectadas ($CD11b^+Ly6G^+Ly6C^+F4/80^+CD11c^+RFP^+$), **(C)** Macrófagos ($CD11b^+Ly6G^+Ly6C^+F4/80^+CD11c^+$), **(D)** Macrófagos infectados ($CD11b^+Ly6G^+Ly6C^+F4/80^+CD11c^+RFP^+$), **(E)** População não definida ($CD11b^+Ly6G^+Ly6C^+F4/80^+CD11c^+$), **(F)** População não definida infectada ($CD11b^+Ly6G^+Ly6C^+F4/80^+CD11c^+RFP^+$). RFP^+ : *Leishmania major* RFP^+ ; * indica diferença estatística entre os grupos de camundongos usando teste Two-way ANOVA e pós teste Bonferroni ($p < 0,05$). Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente. Foram utilizados 4-6 animais por grupo, por tempo.

Avaliamos também o expressão de iNOS pelas células do sistema imune inato, pois ela é a enzima produz NO, molécula microbicida responsável por eliminar as formas intracelulares da *L. major*. Não observamos novamente diferenças no infiltrado celular seis semanas após infecção para neutrófilos (Figura 16A), monócitos (Figura 16C) e macrófagos (Figura 16E). Observamos que na sexta semana após infecção os animais GF apresentam uma menor quantidade de macrófagos iNOS⁺ (Figura 16F), porém, não observamos diferença nas populações de neutrófilos iNOS⁺ (Figura 16B) e monócitos iNOS⁺ (Figura 16D).

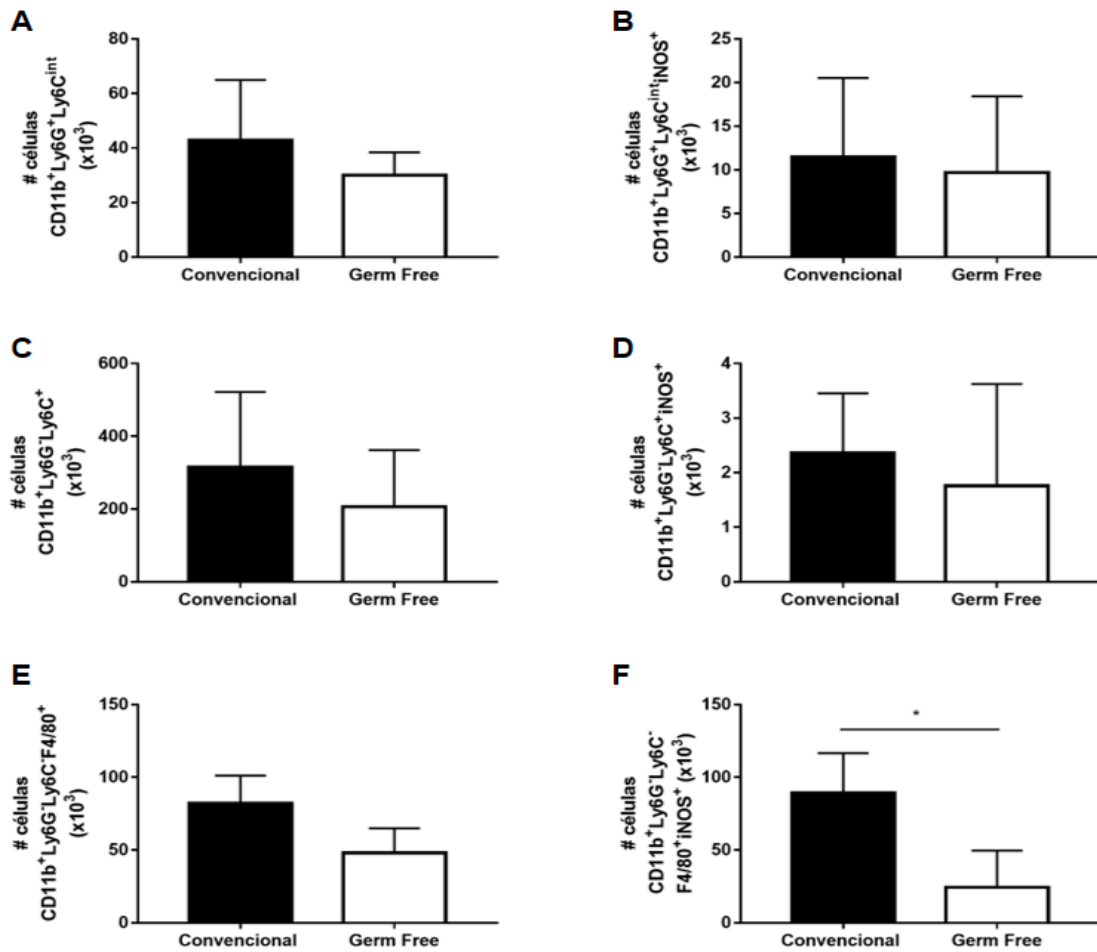


Figura 16: Número absoluto (#) de células do sistema imune inato (CD11b⁺) nas patas dos animais infectados seis semanas após infecção com *Lm* Wt. (A) Neutrófilos (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{int}), (B) Neutrófilos iNOS⁺ (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{int}iNOS⁺), (C) Monócitos (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C⁺) e (D) Monócitos iNOS⁺ (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C⁺iNOS⁺), (E) Macrófagos (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C⁺F4/80⁺) e (F) Macrófagos iNOS⁺ (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C⁺F4/80⁺iNOS⁺). * indica diferença estatística entre os grupos de camundongos usando teste *t*-Student ($p < 0,05$). Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente. Foram utilizados 4 animais por grupo.

As células dos animais GF apresentam uma mesma capacidade de migração para a lesão, porém apresentam uma maior quantidade de células do sistema imune fagocítico infectadas nos tempos tardios da infecção. Além disso, os camundongos sem germes apresentam uma menor quantidade de macrófagos capazes de eliminar o parasito intracelular, os macrófagos iNOS⁺.

5.8. Alterações na microbiota influenciam diretamente a infecção por *Leishmania major*

Visando aprofundar os estudos sobre o efeito da microbiota durante a infecção por *L. major*, decidimos promover alterações na microbiota dos camundongos antes de infectá-los e avaliar o desenvolvimento da infecção nesses grupos.

Primeiro, reconstituímos a microbiota de camundongos GF pela de transferência de microbiota fecal e coabitação com animais CV. O grupo de animais com microbiota reconstituída (FMT) foi mantido em coabitação com os animais CV antes da infecção por *L. major*. Observamos que a reconstituição total da microbiota foi capaz de reverter a susceptibilidade apresentada pelos animais GF, pois os animais FMT e CV apresentaram desenvolvimento semelhante da infecção (Figura 17A) e mesma carga parasitária (Figura 17B) nos tempos em que os animais GF apresentam maior quantidade de parasitos na lesão. Portanto, a reconstituição da microbiota é capaz de reverter a susceptibilidade dos animais GF.

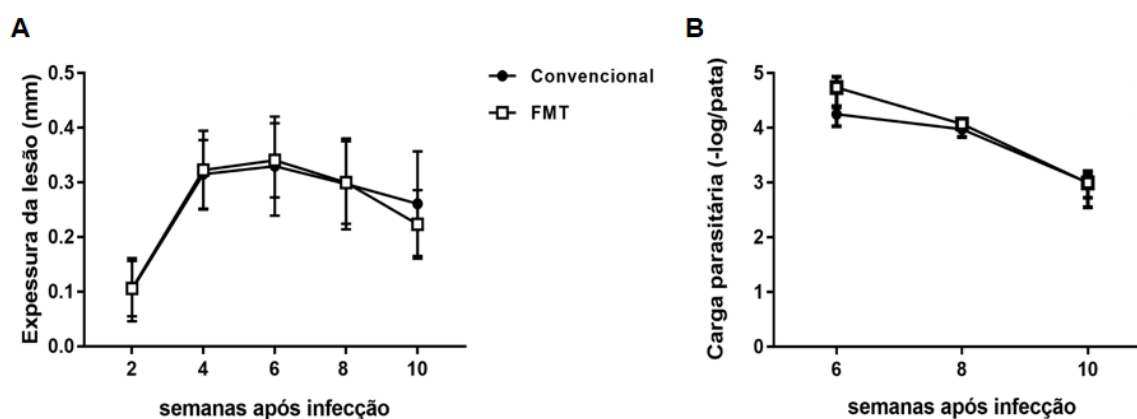


Figura 17: Desenvolvimento da infecção na pata traseira dos animais Swiss/NIH convencionais e FMT (Germ free) colonizados com microbiota fecal e co-habitados com os animais convencionais) foi monitorado a cada duas semanas até 10 semanas após a infecção e mensurada a espessura da lesão (A). Quantificação da carga parasitária (B) usando o método de diluição limitante do macerado das patas infectadas. * indica diferença estatística entre as linhagens de camundongos usando teste Two-way ANOVA e pós teste Bonferroni ($p < 0,05$). Os resultados são de um experimento. Foram utilizados 3-5 animais por grupo, por tempo.

Tratamos também os animais CV com coquetel de antibióticos antes de realizar a infecção por *L. major*. Os animais do grupo Abx apresentaram maior lesão (Figura 18A), maior carga parasitária (Figura 18B) e maior atividade de arginase na lesão (Figura 18C) na sexta semana após infecção. Estes dados sugerem que, mesmo em um animal que teve o contato com a microbiota desde o seu nascimento, uma alteração brusca na microbiota prejudica a reposta frente à infecção. Sugerem, também, que a microbiota é essencial para o desenvolvimento de uma resposta efetora capaz de controlar a infecção por *L. major*.

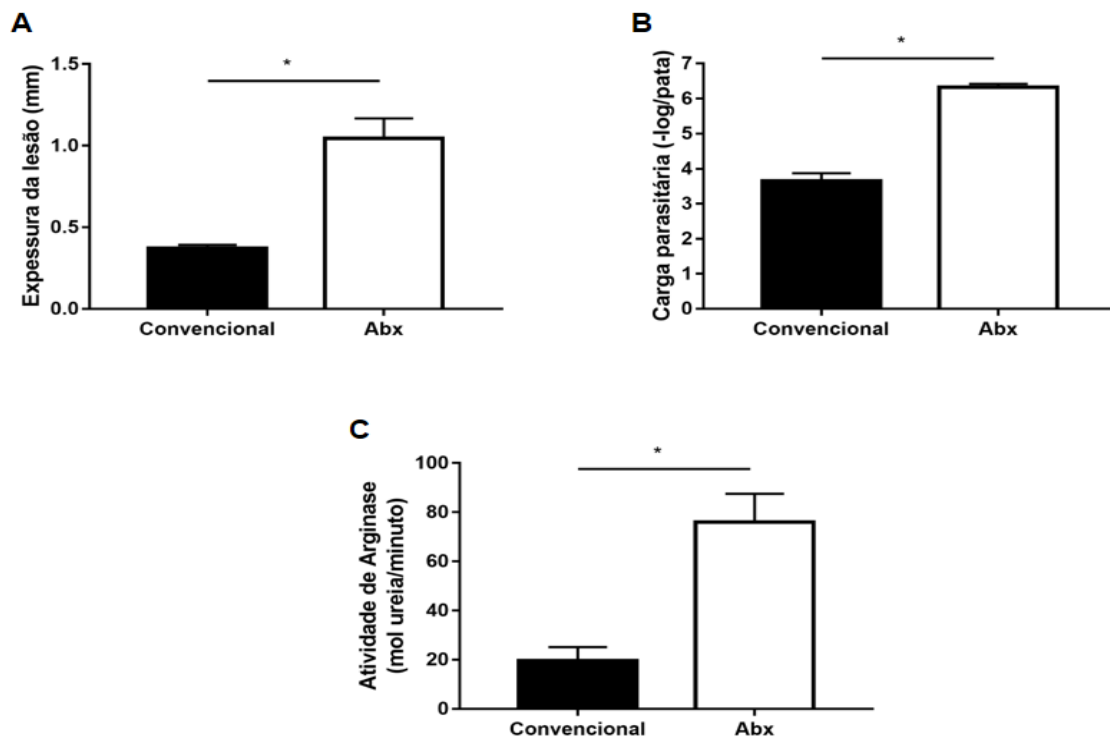


Figura 18: Espessura da lesão (A) após 6 semanas de em infecção na pata traseira dos animais Swiss/NIH convencionais e Abx. Quantificação da carga parasitária (B) usando o método de diluição limitante do macerado das patas infectadas. * indica diferença estatística entre os grupos de camundongos usando teste *t*-Student ($p < 0,05$). Os resultados representativos de dois experimentos independentes. Foram utilizados 4 animais por grupo.

6. Discussão

O microambiente em que os macrófagos se encontram é determinante para o processo de ativação, portanto a ativação dessas células é regulada por fatores endógenos do organismo mas também sofre enorme influência de fatores exógenos, possibilitando um amplo espectro de ativação e plasticidade na resposta [42, 51]. A microbiota tem se mostrado essencial no desenvolvimento do sistema imune e também importante para os processos de ativação celular e resposta inflamatória contra patógenos [7, 28, 98]. Nesse trabalho avaliamos o efeito modulador exercido pela microbiota sobre o espectro de ativação de macrófagos, e relacionamos a interação entre macrófagos e o parasito *Leishmania major* para determinar a importância da microbiota durante o processo infeccioso.

A microbiota mostrou-se relevante no processo de ativação e na resposta efetora de macrófagos. Observamos que a ausência de microbiota potencializa o perfil de ativação associado ao reparo dos GF-M ϕ , devido a maior expressão de FIZZ1, YM1 e arginase I, e maior atividade da enzima arginase (Figura 6). Os macrófagos provenientes dos animais GF também possuem uma capacidade aumentada de assumir um perfil anti-inflamatório, caracterizado pela maior expressão de IL-10 e SPHK1 quando ativados por PGE₂+LPS (Figura 7). O que pode indicar maior produção dessa citocina, que atua sobre os macrófagos inibindo a produção de TNF, IL-12 e óxido nítrico, ou seja, eles se tornam refratários aos efeitos ativadores da resposta inflamatória, com uma menor capacidade efetora dessas células [58, 60, 96]. Por outro lado, GF-M ϕ têm seu perfil de ativação inflamatório reduzido, uma vez que apresentaram menor produção das citocinas pró-inflamatórias IL-12, TNF e menor expressão de CXCL9 e SOCS1 (Figura 3). O acúmulo maior de poliaminas e redução da resposta microbicida devem-se aos fatos de que a L-arginina é um aminoácido que pode ser metabolizado via iNOS ou arginase I e de que já foi relatada uma competição pelo uso deste substrato comum pelas duas enzimas [52, 94]. Além disso, o TNF atua como inibidor pra atividade da arginase I e potencializa a produção de óxido nítrico em macrófagos [55]. Corroborando a ativação inflamatória reduzida nos GF-M ϕ , a resposta efetora gerada nessas células também é prejudicada na ausência da microbiota, já que elas produzem menor quantidade de NO e ROS, moléculas microbicidas (Figuras 4 e 5). Os macrófagos derivados dos animais Abx apresentaram uma resposta aos estímulos exógenos similar aos GF-M ϕ , eles apresentaram maior atividade da enzima arginase (Figura 9) e menor produção de ROS (Figura 10). Os dados

sugerem que a microbiota associada ao organismo é capaz de afetar os precursores de macrófagos na medula óssea, pois já foi descrito que a microbiota interfere nos precursores das células imunes na medula óssea, e que mesmo já tendo um contato com a microbiota ao longo do desenvolvimento até a fase adulta, a depleção da microbiota intestinal por coquetel de antibióticos altera a capacidade dos macrófagos derivados da medula óssea de reconhecerem os estímulos de ativação e se tornarem ativados. [29, 30, 32]

A caracterização fenotípica dos macrófagos de animais GF ou gnotobióticos vem sendo estudada por muitos anos [61, 63, 106, 107]. Embora existam dados sobre a influência da microbiota na resposta celular e dessa influência ser extremamente dependente do microambiente, a caracterização da ativação de macrófagos no modelo GF não havia ainda sido detalhadamente descrita. Os macrófagos peritoneais dos camundongos GF possuem uma menor capacidade de eliminar parasitos da espécie *L. major* [62] e uma menor capacidade de fagocitose [64]. Além disso, macrófagos da pele dos animais GF apresentam um perfil alternativo potencializado [61]. Portanto, a microbiota também influencia a resposta efetora de macrófagos circulantes presentes no organismo.

Componentes da microbiota exercem efeitos no sistema imune antes mesmo do nascimento e do estabelecimento da microbiota. Ocorre a transferência de produtos microbianos da mãe para o feto através dos anticorpos e também via amamentação [1]. Os produtos microbianos também são encontrados em grandes quantidades na circulação e também na periferia do organismo, até mesmo na medula óssea dos animais [29, 30, 32]. É possível que as diferenças descritas para os perfis de ativação analisados estejam relacionadas ao fato de os produtos microbianos atuarem na medula óssea e de alguma forma pré-ativarem os precursores dos macrófagos na medula óssea. Algumas dessas moléculas, por exemplo o lipopolissacáride (LPS) e ácido lipoteicóico (LTA), são agonistas de receptores do tipo Toll, que são responsáveis pelo reconhecimento de patógenos e também responsáveis pela ativação celular [20]. A ativação dos TLRs promove uma cascata de sinalização via MyD88 e NF κ B em macrófagos responsável por gerar uma resposta efetora caracterizada pela produção de óxido nítrico [108]. A microbiota, através dos seus produtos, também interfere na produção de células do sistema imune inato, macrófagos e neutrófilos por exemplo, na medula óssea [29].

Portanto, a microbiota é capaz de realizar sinalização para os precursores da medula óssea se diferenciarem em células do sistema imune e também interferem na sua capacidade de ativação e resposta efetora.

Estudos prévios mostram que, *in vivo*, os animais GF são mais susceptíveis à infecção por parasitas do gênero *Leishmania* do que os CV, logo, a microbiota parece ser um fator importante no controle dessas infecções [40, 62, 65]. Entretanto, existem poucos estudos na literatura focados no estudo da influência da microbiota durante a infecção por protozoários, principalmente por *Leishmania major*. Esses trabalhos já mostraram que camundongos GF são mais susceptíveis à infecção por *L. major*. Dados prévios de nosso grupo mostraram que na infecção subcutânea, na pata, por *L. major* camundongos GF, embora sejam capazes de produzir uma resposta Th1 como os animais CV, não conseguem controlar a replicação parasitária ou a inflamação [62]. Utilizamos o mesmo modelo *in vivo* de infecção por *L. major* para entender melhor se essa alteração de ativação e resposta efetora de macrófagos seria capaz de interferir no desenvolvimento da doença. Observamos que animais GF apresentaram maior lesão e maior carga parasitária na pata (Figura 10). A diferença na carga parasitária observada no sítio de infecção pode estar relacionada à maior atividade de arginase na pata dos animais GF (Figura 11), pois a maior atividade dessa enzima significa maior disponibilidade de poliaminas, compostos que são utilizados pelos parasitos intracelulares para se multiplicarem [109].

A resposta adaptativa Th1 é descrita como essencial para resistência a infecção por *L. major*, enquanto que uma resposta Th2 é associada a susceptibilidade a infecção por esse parasito [77, 82, 110]. Assim, embora fosse de se esperar que os animais GF apresentassem uma resposta Th1 deficiente ou reduzida, nossos dados mostraram que os animais GF são capazes de polarizar uma resposta Th1 (Figura 13) similar à do CV. Dados prévios do nosso grupo mostraram que a resposta Th2 é igual para os dois grupos durante a infecção [62], logo não ocorre a dicotomia Th1 e Th2 associada a resistência e susceptibilidade, respectivamente. Entretanto, mesmo no modelo de infecção de camundongos descritos previamente como resistentes a infecção por *L. major*, onde este dogma foi estabelecido, conforme a cepa do parasita utilizada para realizar a infecção ocorrerá um desenvolvimento diferente da infecção no qual há um aumento na produção de IL-10 nas lesões desses camundongos ditos resistentes e mesmo eles polarizando uma resposta Th1 eles não cicatrizam a lesão [78]. Além disso, o local utilizado para infecção

é determinante para o desenvolvimento da infecção, infiltrado celular e produção de citocinas [99], quando os animais são infectados com *L. major* na orelha o grupo GF apresenta maior carga parasitária no local da infecção, menor lesão e menor produção de IFN- γ e TNF seis semanas após infecção, ou seja eles apresentam uma menor capacidade de polarizar uma resposta Th1 [40].

Avaliamos também as populações de linfócitos presentes no local da infecção (Figura 12) e no linfonodo poplíteo, que é o linfonodo drenante do local da lesão (Figura 13). Observamos que não há diferenças na quantidade dos vários tipos de linfócitos nas patas e nos linfonodos dos animais. Esperávamos encontrar uma menor quantidade de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ nos órgãos dos animais GF, pois essas células desempenham papel fundamental no controle da infecção por *L. major* [111]. Além disso, esperávamos encontrar uma maior quantidade de linfócitos T regulatórios nos animais GF, pois é descrito na literatura que eles possuem uma maior quantidade dessas células em relação ao grupo de animais CV e também devido à maior quantidade de IL-10 produzida por esses animais em várias condições [33, 40, 67], além disso as células Tregs e a citocina IL-10 estão relacionadas à maior susceptibilidade à infecção por *Leishmania* [97, 112]. Porém, durante a infecção por *L. major* não há diferenças na quantidade de células Tregs e na produção de IL-10 entre os animais CV e GF [40]. Nossos dados sugerem que a susceptibilidade dos animais GF à infecção por *L. major* é independente da resposta imune adaptativa.

A resposta imune inata também é essencial para o controle da infecção por *L. major*. Os neutrófilos, monócitos e macrófagos compõem o sistema imune fagocitário e desempenham funções importantes na resposta imune inata contra patógenos intracelulares, dentre esses patógenos está a *L. major* [111]. Ao avaliarmos a presença dessas células na lesão dos animais CV e GF ao longo da infecção, observamos que a maior lesão dos animais GF pode estar relacionada ao maior infiltrado de neutrófilos na décima semana após infecção e também pela quantidade de células mielóides não inflamatórias (Figura 15) no local da infecção nos animais GF em comparação com os animais CV. A população de células mielóides não inflamatórias é composta por macrófagos, células dendríticas e células duplo negativas para F4/80 e CD11c (essa população celular ainda não foi caracterizada). Não observamos diferenças no infiltrado de células dendríticas e macrófagos ao longo da infecção entre os grupos, porém os

animais GF apresentam um aumento na quantidade de células não definidas a partir da sexta semana após infecção. Para caracterizar melhor essa população celular poderíamos adicionar marcações por outros anticorpos que definiriam melhor as populações de células dendríticas, macrófagos e monócitos [113, 114].

Os animais GF apresentaram uma maior quantidade de neutrófilos infectados (Figura 15B) na décima semana após infecção, o que pode estar associado somente ao aumento da quantidade dessas células na pata dos animais GF em relação ao animais CV. O maior infiltrado tardio de neutrófilos nos animais GF e consequentemente a maior quantidade dessas células infectadas nos animais GF foi surpreendente. Esse tipo celular é recrutado nos tempos iniciais de infecção [99, 115]. Porém já foi mostrado um pequeno aumento de células polimorfonucleares 10 semanas após infecção por *L. major* cepa FN no camundongo resistente a infecção por esse parasito, nós vemos esse aumento presente somente nos animais CV [102]. Esses neutrófilos podem ter sido recrutados nesse estágio da infecção por causa da infecção persistente e inflamação ainda presente na lesão dos animais GF. O infiltrado tardio de polimorfonucleares é mais pronunciado em modelo de camundongo infectado pela cepa SD de *L. major*: nesse modelo, o camundongo C57BL/6, que é resistente à infecção pela cepa FN, apresenta uma redução no infiltrado após 6 semanas de infecção e um aumento significativo na décima semana após infecção. Além disso, similar ao nosso trabalho, esse camundongo infectado com a cepa SD polariza uma resposta Th1 porém não é capaz de controlar a infecção [102]. A alta quantidade de neutrófilos na fase tardia da infecção pode também se dever a uma reduzida apoptose dessas células nos animais GF, pois a apoptose de neutrófilos durante infecção por *L. amazonensis* é mediada pelas espécies reativas de oxigênio [116] e os animais GF apresentam uma menor produção de ROS em relação ao CV durante estímulo inflamatório (Figura 5).

Os animais CV apresentaram uma maior quantidade de monócitos e macrófagos infectados (Figura 15D e 16D) na quarta semana após infecção e tendem a ter uma maior quantidade de células mielóides não definidas (Figura 16E) nesse mesmo tempo após infecção. Este fato justificaria os camundongos CV terem mantido uma carga parasitária semelhante aos animais GF até a quarta semana após infecção (Figura 11A). Os monócitos inflamatórios e os macrófagos são responsáveis por manter uma alta inflamação e carga parasitária nos animais resistentes à infecção por *Leishmania* nos

tempos iniciais da infecção, mantendo assim a similaridade de lesão e carga parasitária quando comparados aos camundongos susceptíveis à infecção pelo parasito (dados não publicados). Já os animais GF começam a apresentar maior carga parasitária em relação aos animais CV a partir da sexta semana após infecção (Figura 11B), que é quando eles apresentam uma maior quantidade de monócitos, macrófagos e células não definidas infectadas em relação ao grupo CV. Os animais GF também apresentaram uma menor quantidade de macrófagos iNOS⁺ seis semanas após infecção por *L. major* (Figura 17F), ou seja, eles apresentam uma menor quantidade de macrófagos potencialmente produtores de NO. O processo de eliminação do parasito ocorre principalmente através da produção do óxido nítrico [53, 90], o que explicaria a maior quantidade de macrófagos infectados nesses animais na sexta semana após infecção (Figura 16D) [53, 55, 117]. O mesmo não foi observado para os neutrófilos (Figura 17C) e monócitos (Figura 17D). Devido à estratégia de *gates* utilizada e marcações feitas não foi possível determinar a quantidade de células pertencentes a população não definida que são iNOS⁺.

Outro mecanismo que possivelmente interfere na diferença de ativação e capacidade efetora dos macrófagos em resposta a *L. major* é a ativação dos receptores TLR por componentes da microbiota. A ativação desses receptores, por exemplo TLR2 e TLR4, promove a cascata de sinalização até a ativação de MyD88 e NFκB. Essa via de sinalização é importante no processo de ativação de macrófagos, na produção de óxido nítrico, recrutamento de células inflamatórias e na eliminação da *L. major* através do reconhecimento do lipofosfoglicano (LPG) do parasito pelo TLR2. Portanto, os animais podem apresentar GF uma menor capacidade de eliminar os parasitos, pois eles não são primados por produtos microbianos via TLRs, e apresentam deficiências na ativação celular dependente de MyD88 e NFκB [29, 40, 71, 118-122].

A reconstituição total da microbiota mostrou que o animal GF ao ser colonizado pela microbiota, é capaz de responder à infecção por *L. major* de forma similar aos animais CV. Portanto, mesmo o animal tendo se desenvolvido até a idade adulta em condições axênicas, e que por isso apresenta todas as deficiências imunológicas e fisiológicas já mostradas na literatura, como a deficiência no recrutamento de leucócitos e na produção de anticorpos [12], tem seu fenótipo revertido pela colonização tardia. Os animais FMT apresentaram o mesmo desenvolvimento da lesão (Figura 18A) e mesma carga parasitária (Figura 18B) que os animais CV durante infecção por *L. major*. Naik *et*

al 2012 colonizaram o animal GF com um microrganismo simbiote da pele, *Staphylococcus epidermidis*, e infectaram esses animais com *L. major*. Estes autores observaram que os camundongos mono-associados se comportam de forma semelhante ao animal CV, apresentando a mesma lesão, carga parasitária e resposta celular no local da infecção [40]. Além disso, nosso grupo já havia descrito que a colonização de camundongos GF com *Lactobacillus delbrueckii* aumenta a produção de TNF pelas células peritoneais e do intestino, e IFN- γ por células do baço frente a um modelo de infecção por *Listeria monocytogenes*, tornando os animais mono-associados resistentes a infecção [67]. Portanto, o contato tardio com a microbiota é capaz de modular a resposta imune essencial para o controle da lesão e da carga parasitária durante a infecção.

Por outro lado, a depleção da microbiota intestinal, realizada através do tratamento de animais CV com coquetel de antibióticos (Abx), mostrou que a presença da microbiota intestinal é essencial para a resposta imune frente à infecção por *L. major*, mesmo ela ocorrendo na pele do animal. O grupo Abx, após 6 semanas de infecção por *L. major*, se mostrou mais susceptível à infecção, similar ao perfil visto nos animais GF (Figura 11), apresentando uma maior lesão (Figura 19A), maior carga parasitária (Figura 19B) e maior atividade de arginase na pata (Figura 19C) em relação ao grupo CV. O controle da microbiota sobre o sistema imune inicialmente foi considerado compartimentalizado, onde a microbiota intestinal interferia somente na resposta do sistema gastrointestinal e a microbiota da pele era a população microbiana com maior influência sobre a resposta imune da pele [40]. Porém, nossos dados mostram que a microbiota intestinal é importante no processo de resposta à infecção por *L. major* na pata e também na ativação dos macrófagos derivados da medula óssea. Logo, a microbiota intestinal tem uma atuação sistêmica.

7. Conclusão

Nossos dados mostram que componentes da resposta inflamatória inata, que é extremamente importante para a eliminação da *L. major*, estão reduzidos na ausência de microbiota. Também mostram que o perfil de ativação de macrófagos, importantes células hospedeiras da *L. major* durante a infecção, *in vitro*, pode ser alterado pela exposição prévia a componentes da microbiota, justificando a susceptibilidade a infecção pelo parasito nos animais deficientes para a microbiota. Uma vez que, *in vitro*, os macrófagos de camundongos GF apresentam menor potencial para eliminação da *L. major*. Durante a infecção, *in vivo*, os animais GF apresentaram uma menor quantidade de macrófagos iNOS⁺ e maior quantidade de macrófagos infectados na pata isso poderia explicar a maior susceptibilidade de camundongos GF neste modelo de infecção. Dessa forma, mesmo polarizando uma resposta Th1, com produção similar de IL-12, IFN- γ e TNF, os camundongos GF são incapazes de controlar a lesão e o parasitismo na pata pois apresentariam, mesmo *in vivo*, um comprometimento na resposta efetora das células do sistema imune inato, principalmente nos macrófagos, que apresentam uma produção reduzida de fatores microbicidas.

8. Referências Bibliográficas

1. Gomez de Agüero, M., S.C. Ganal-Vonarburg, T. Fuhrer, S. Rupp, Y. Uchimura, H. Li, A. Steinert, M. Heikenwalder, S. Hapfelmeier, U. Sauer, K.D. McCoy, and A.J. Macpherson, *The maternal microbiota drives early postnatal innate immune development*. Science, 2016. **351**(6279): p. 1296-302.
2. Eckburg, P.B., E.M. Bik, C.N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S.R. Gill, K.E. Nelson, and D.A. Relman, *Diversity of the human intestinal microbial flora*. Science, 2005. **308**(5728): p. 1635-1638.
3. Ley, R.E., D.A. Peterson, and J.I. Gordon, *Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine*. Cell, 2006. **124**(4): p. 837-48.
4. Belkaid, Y. and J.A. Segre, *Dialogue between skin microbiota and immunity*. Science, 2014. **346**(6212): p. 954-9.
5. Rook, G., F. Backhed, B.R. Levin, M.J. McFall-Ngai, and A.R. McLean, *Evolution, human-microbe interactions, and life history plasticity*. Lancet, 2017. **390**(10093): p. 521-530.
6. Prakash, S., L. Rodes, M. Coussa-Charley, and C. Tomaro-Duchesneau, *Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics*. Biologics, 2011. **5**: p. 71-86.
7. Belkaid, Y. and O.J. Harrison, *Homeostatic Immunity and the Microbiota*. Immunity., 2017. **46**(4): p. 562-576.
8. Pleasants, J.R., *Germfree animals and their significance*. Endeavour, 1973. **32**(117): p. 112-116.
9. Sedorf, H., N.W. Griffin, V.K. Ridaura, A. Reyes, J. Cheng, F.E. Rey, M.I. Smith, G.M. Simon, R.H. Scheffrahn, D. Woebken, A.M. Spormann, W. Van Treuren, L.K. Ursell, M. Pirrung, A. Robbins-Pianka, B.L. Cantarel, V. Lombard, B. Henrissat, R. Knight, and J.I. Gordon, *Bacteria from diverse habitats colonize and compete in the mouse gut*. Cell, 2014. **159**(2): p. 253-66.

10. Lundberg, R., M.F. Toft, B. August, A.K. Hansen, and C.H. Hansen, *Antibiotic-treated versus germ-free rodents for microbiota transplantation studies*. Gut Microbes, 2016. **7**(1): p. 68-74.
11. Vieira, E.C., J.R. Nicoli, T. Moraes-Santos, M.E. Silva, C.A. da Costa, W. Mayrink, and E.A. Bambilra, *Cutaneous leishmaniasis in germfree, gnotobiotic, and conventional mice*. Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo, 1987. **29**(6): p. 385-387.
12. Rooks, M.G. and W.S. Garrett, *Gut microbiota, metabolites and host immunity*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(6): p. 341-52.
13. Levy, M., E. Blacher, and E. Elinav, *Microbiome, metabolites and host immunity*. Curr Opin Microbiol, 2017. **35**: p. 8-15.
14. Martins, F.S., A.A. Silva, A.T. Vieira, F.H. Barbosa, R.M. Arantes, M.M. Teixeira, and J.R. Nicoli, *Comparative study of Bifidobacterium animalis, Escherichia coli, Lactobacillus casei and Saccharomyces boulardii probiotic properties*. Arch.Microbiol., 2009. **191**(8): p. 623-630.
15. Schabussova, I., K. Hufnagl, M.L. Tang, E. Hoflehner, A. Wagner, G. Loupal, S. Nutten, A. Zuercher, A. Mercenier, and U. Wiedermann, *Perinatal maternal administration of Lactobacillus paracasei NCC 2461 prevents allergic inflammation in a mouse model of birch pollen allergy*. PLoS.One., 2012. **7**(7): p. e40271.
16. Levy, M., A.A. Kolodziejczyk, C.A. Thaiss, and E. Elinav, *Dysbiosis and the immune system*. Nat Rev Immunol, 2017. **17**(4): p. 219-232.
17. Rakoff-Nahoum, S. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition of the indigenous microbial flora*. Mucosal.Immunol., 2008. **1 Suppl 1**: p. S10-S14.
18. Hooper, L.V. and A.J. Macpherson, *Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(3): p. 159-69.
19. McGuckin, M.A., S.K. Linden, P. Sutton, and T.H. Florin, *Mucin dynamics and enteric pathogens*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(4): p. 265-78.

20. Rakoff-Nahoum, S., J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg, and R. Medzhitov, *Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis*. Cell, 2004. **118**(2): p. 229-241.
21. Elinav, E., T. Strowig, A.L. Kau, J. Henao-Mejia, C.A. Thaiss, C.J. Booth, D.R. Peaper, J. Bertin, S.C. Eisenbarth, J.I. Gordon, and R.A. Flavell, *NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis*. Cell, 2011. **145**(5): p. 745-57.
22. Chen, L., J.E. Wilson, M.J. Koenigsnecht, W.C. Chou, S.A. Montgomery, A.D. Truax, W.J. Brickey, C.D. Packey, N. Maharshak, G.K. Matsushima, S.E. Plevy, V.B. Young, R.B. Sartor, and J.P. Ting, *NLRP12 attenuates colon inflammation by maintaining colonic microbial diversity and promoting protective commensal bacterial growth*. Nat Immunol, 2017. **18**(5): p. 541-551.
23. Kawamoto, S., M. Maruya, L.M. Kato, W. Suda, K. Atarashi, Y. Doi, Y. Tsutsui, H. Qin, K. Honda, T. Okada, M. Hattori, and S. Fagarasan, *Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis*. Immunity, 2014. **41**(1): p. 152-65.
24. Macpherson, A.J. and T. Uhr, *Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria*. Science, 2004. **303**(5664): p. 1662-5.
25. Boullier, S., M. Tanguy, K.A. Kadaoui, C. Caubet, P. Sansonetti, B. Corthesy, and A. Phalipon, *Secretory IgA-mediated neutralization of Shigella flexneri prevents intestinal tissue destruction by down-regulating inflammatory circuits*. J Immunol, 2009. **183**(9): p. 5879-85.
26. Suzuki, K., B. Meek, Y. Doi, M. Muramatsu, T. Chiba, T. Honjo, and S. Fagarasan, *Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(7): p. 1981-6.
27. Suzuki, K., S.A. Ha, M. Tsuji, and S. Fagarasan, *Intestinal IgA synthesis: a primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut*. Semin.Immunol., 2007. **19**(2): p. 127-135.

28. Thaïss, C.A., N. Zmora, M. Levy, and E. Elinav, *The microbiome and innate immunity*. Nature, 2016. **535**(7610): p. 65-74.
29. Balmer, M.L., C.M. Schurch, Y. Saito, M.B. Geuking, H. Li, M. Cuenca, L.V. Kovtonyuk, K.D. McCoy, S. Hapfelmeier, A.F. Ochsenbein, M.G. Manz, E. Slack, and A.J. Macpherson, *Microbiota-derived compounds drive steady-state granulopoiesis via MyD88/TICAM signaling*. J.Immunol., 2014. **193**(10): p. 5273-5283.
30. Khosravi, A., A. Yanez, J.G. Price, A. Chow, M. Merad, H.S. Goodridge, and S.K. Mazmanian, *Gut microbiota promote hematopoiesis to control bacterial infection*. Cell Host Microbe, 2014. **15**(3): p. 374-81.
31. Shi, C., T. Jia, S. Mendez-Ferrer, T.M. Hohl, N.V. Serbina, L. Lipuma, I. Leiner, M.O. Li, P.S. Frenette, and E.G. Pamer, *Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating toll-like receptor ligands*. Immunity, 2011. **34**(4): p. 590-601.
32. Iwamura, C., N. Bouladoux, Y. Belkaid, A. Sher, and D. Jankovic, *Sensing of the microbiota by NOD1 in mesenchymal stromal cells regulates murine hematopoiesis*. Blood, 2017. **129**(2): p. 171-176.
33. Souza, D.G., A.T. Vieira, A.C. Soares, V. Pinho, J.R. Nicoli, L.Q. Vieira, and M.M. Teixeira, *The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses*. J Immunol, 2004. **173**(6): p. 4137-46.
34. Amaral, F.A., D. Sachs, V.V. Costa, C.T. Fagundes, D. Cisalpino, T.M. Cunha, S.H. Ferreira, F.Q. Cunha, T.A. Silva, J.R. Nicoli, L.Q. Vieira, D.G. Souza, and M.M. Teixeira, *Commensal microbiota is fundamental for the development of inflammatory pain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(6): p. 2193-7.
35. Cisalpino, D., C.T. Fagundes, C.B. Brito, F.R. Ascencao, C.M. Queiroz-Junior, A.T. Vieira, L.P. Sousa, F.A. Amaral, L.Q. Vieira, J.R. Nicoli, M.M. Teixeira, and D.G. Souza, *Microbiota-Induced Antibodies Are Essential for Host Inflammatory Responsiveness to Sterile and Infectious Stimuli*. J Immunol, 2017. **198**(10): p. 4096-4106.

36. Franchi, L., N. Kamada, Y. Nakamura, A. Burberry, P. Kuffa, S. Suzuki, M.H. Shaw, Y.G. Kim, and G. Nunez, *NLRC4-driven production of IL-1beta discriminates between pathogenic and commensal bacteria and promotes host intestinal defense*. Nat Immunol, 2012. **13**(5): p. 449-56.
37. Mazmanian, S.K., C.H. Liu, A.O. Tzianabos, and D.L. Kasper, *An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system*. Cell, 2005. **122**(1): p. 107-118.
38. Naik, S., N. Bouladoux, J.L. Linehan, S.J. Han, O.J. Harrison, C. Wilhelm, S. Conlan, S. Himmelfarb, A.L. Byrd, C. Deming, M. Quinones, J.M. Brenchley, H.H. Kong, R. Tussiwand, K.M. Murphy, M. Merad, J.A. Segre, and Y. Belkaid, *Commensal-dendritic-cell interaction specifies a unique protective skin immune signature*. Nature, 2015. **520**(7545): p. 104-8.
39. Furusawa, Y., Y. Obata, and K. Hase, *Commensal microbiota regulates T cell fate decision in the gut*. Semin Immunopathol, 2015. **37**(1): p. 17-25.
40. Naik, S., N. Bouladoux, C. Wilhelm, M.J. Molloy, R. Salcedo, W. Kastenmuller, C. Deming, M. Quinones, L. Koo, S. Conlan, S. Spencer, J.A. Hall, A. Dzutsev, H. Kong, D.J. Campbell, G. Trinchieri, J.A. Segre, and Y. Belkaid, *Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals*. Science, 2012. **337**(6098): p. 1115-1119.
41. Stout, R.D., C. Jiang, B. Matta, I. Tietzel, S.K. Watkins, and J. Suttles, *Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences*. J.Immunol., 2005. **175**(1): p. 342-349.
42. Cohen, H.B. and D.M. Mosser, *Extrinsic and intrinsic control of macrophage inflammatory responses*. J Leukoc Biol, 2013. **94**(5): p. 913-9.
43. Ginhoux, F. and M. Guilliams, *Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis*. Immunity., 2016. **44**(3): p. 439-449.
44. Yona, S., K.W. Kim, Y. Wolf, A. Mildner, D. Varol, M. Breker, D. Strauss-Ayali, S. Viukov, M. Guilliams, A. Misharin, D.A. Hume, H. Perlman, B. Malissen, E. Zelzer,

and S. Jung, *Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis*. *Immunity*, 2013. **38**(1): p. 79-91.

45. Bain, C.C., C.A. Hawley, H. Garner, C.L. Scott, A. Schridde, N.J. Steers, M. Mack, A. Joshi, M. Guilliams, A.M. Mowat, F. Geissmann, and S.J. Jenkins, *Long-lived self-renewing bone marrow-derived macrophages displace embryo-derived cells to inhabit adult serous cavities*. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. ncomms11852.

46. Scott, C.L., S. Henri, and M. Guilliams, *Mononuclear phagocytes of the intestine, the skin, and the lung*. *Immunol Rev*, 2014. **262**(1): p. 9-24.

47. van de Laar, L., W. Saelens, S. De Prijck, L. Martens, C.L. Scott, G. Van Isterdael, E. Hoffmann, R. Beyaert, Y. Saeys, B.N. Lambrecht, and M. Guilliams, *Yolk Sac Macrophages, Fetal Liver, and Adult Monocytes Can Colonize an Empty Niche and Develop into Functional Tissue-Resident Macrophages*. *Immunity*, 2016. **44**(4): p. 755-68.

48. Kratoofil, R.M., P. Kubes, and J.F. Deniset, *Monocyte Conversion During Inflammation and Injury*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017. **37**(1): p. 35-42.

49. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. *Nat.Rev.Immunol.*, 2008. **8**(12): p. 958-969.

50. Edwards, J.P., X. Zhang, K.A. Frauwirth, and D.M. Mosser, *Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations*. *J.Leukoc.Biol.*, 2006. **80**(6): p. 1298-1307.

51. Murray, P.J., J.E. Allen, S.K. Biswas, E.A. Fisher, D.W. Gilroy, S. Goerdt, S. Gordon, J.A. Hamilton, L.B. Ivashkiv, T. Lawrence, M. Locati, A. Mantovani, F.O. Martinez, J.L. Mege, D.M. Mosser, G. Natoli, J.P. Saeij, J.L. Schultze, K.A. Shirey, A. Sica, J. Suttles, I. Udalova, J.A. van Ginderachter, S.N. Vogel, and T.A. Wynn, *Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines*. *Immunity.*, 2014. **41**(1): p. 14-20.

52. Munder, M., K. Eichmann, and M. Modolell, *Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive*

regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. J.Immunol., 1998. **160**(11): p. 5347-5354.

53. Assreuy, J., F.Q. Cunha, M. Epperlein, A. Noronha-Dutra, C.A. O'Donnell, F.Y. Liew, and S. Moncada, *Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of Leishmania major.* Eur.J.Immunol., 1994. **24**(3): p. 672-676.

54. Martinez, F.O., L. Helming, and S. Gordon, *Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective.* Annu.Rev.Immunol., 2009. **27**: p. 451-483.

55. Schleicher, U., K. Paduch, A. Debus, S. Obermeyer, T. König, J.C. Kling, E. Ribechini, D. Dudziak, D. Mougikakos, P.J. Murray, R. Ostuni, H. Korner, and C. Bogdan, *TNF-Mediated Restriction of Arginase 1 Expression in Myeloid Cells Triggers Type 2 NO Synthase Activity at the Site of Infection.* Cell Rep, 2016. **15**(5): p. 1062-1075.

56. Raes, G., B.P. de, W. Noel, A. Beschin, F. Brombacher, and G.G. Hassanzadeh, *Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages.* J.Leukoc.Biol., 2002. **71**(4): p. 597-602.

57. Corraliza, I.M., G. Soler, K. Eichmann, and M. Modolell, *Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages.* Biochem.Biophys.Res.Comm., 1995. **206**(2): p. 667-673.

58. Strassmann, G., V. Patil-Koota, F. Finkelman, M. Fong, and T. Kambayashi, *Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E2.* J.Exp.Med., 1994. **180**(6): p. 2365-2370.

59. MacKenzie, K.F., K. Clark, S. Naqvi, V.A. McGuire, G. Noehren, Y. Kristariyanto, M. van den Bosch, M. Mudaliar, P.C. McCarthy, M.J. Pattison, P.G. Pedrioli, G.J. Barton, R. Toth, A. Prescott, and J.S. Arthur, *PGE(2) induces macrophage IL-10 production and a regulatory-like phenotype via a protein kinase A-SIK-CRTC3 pathway.* J Immunol, 2013. **190**(2): p. 565-77.

60. Bogdan, C., Y. Vodovotz, and C. Nathan, *Macrophage deactivation by interleukin 10.* J.Exp.Med., 1991. **174**(6): p. 1549-1555.

61. Canesso, M.C., A.T. Vieira, T.B. Castro, B.G. Schirmer, D. Cisalpino, F.S. Martins, M.A. Rachid, J.R. Nicoli, M.M. Teixeira, and L.S. Barcelos, *Skin wound healing is accelerated and scarless in the absence of commensal microbiota*. J Immunol, 2014. **193**(10): p. 5171-80.
62. Oliveira, M.R., W.L. Tafuri, L.C. Afonso, M.A. Oliveira, J.R. Nicoli, E.C. Vieira, P. Scott, M.N. Melo, and L.Q. Vieira, *Germ-free mice produce high levels of interferon-gamma in response to infection with Leishmania major but fail to heal lesions*. Parasitology, 2005. **131**(Pt 4): p. 477-488.
63. Morland, B., A.I. Smievoll, and T. Midtvedt, *Comparison of peritoneal macrophages from germfree and conventional mice*. Infect.Immun., 1979. **26**(3): p. 1129-1136.
64. Morland, B. and T. Midtvedt, *Phagocytosis, peritoneal influx, and enzyme activities in peritoneal macrophages from germfree, conventional, and ex-germfree mice*. Infect Immun, 1984. **44**(3): p. 750-2.
65. Gimblet, C., J.S. Meisel, M.A. Loesche, S.D. Cole, J. Horwinski, F.O. Novais, A.M. Misic, C.W. Bradley, D.P. Beiting, S.C. Rankin, L.P. Carvalho, E.M. Carvalho, P. Scott, and E.A. Grice, *Cutaneous Leishmaniasis Induces a Transmissible Dysbiotic Skin Microbiota that Promotes Skin Inflammation*. Cell Host.Microbe, 2017. **22**(1): p. 13-24.
66. Clarke, T.B., K.M. Davis, E.S. Lysenko, A.Y. Zhou, Y. Yu, and J.N. Weiser, *Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity*. Nat Med, 2010. **16**(2): p. 228-31.
67. dos Santos, L.M., M.M. Santos, H.P. de Souza Silva, R.M. Arantes, J.R. Nicoli, and L.Q. Vieira, *Monoassociation with probiotic Lactobacillus delbrueckii UFV-H2b20 stimulates the immune system and protects germfree mice against Listeria monocytogenes infection*. Med.Microbiol.Immunol., 2011. **200**(1): p. 29-38.
68. van Nood, E., A. Vrieze, M. Nieuwdorp, S. Fuentes, E.G. Zoetendal, W.M. de Vos, C.E. Visser, E.J. Kuijper, J.F. Bartelsman, J.G. Tijssen, P. Speelman, M.G. Dijkgraaf, and J.J. Keller, *Duodenal infusion of donor feces for recurrent Clostridium difficile*. N Engl J Med, 2013. **368**(5): p. 407-15.

69. Vieira, L.Q., M.R. Oliveira, E. Neumann, J.R. Nicoli, and E.C. Vieira, *Parasitic infections in germfree animals*. Braz.J.Med.Biol.Res., 1998. **31**(1): p. 105-110.
70. Torres, M.R., M.E. Silva, E.C. Vieira, E.A. Bambilra, M.I. Sogayar, F.J. Pena, and J.R. Nicoli, *Intragastric infection of conventional and germfree mice with Giardia lamblia*. Braz.J.Med.Biol.Res., 1992. **25**(4): p. 349-352.
71. Fagundes, C.T., F.A. Amaral, A.T. Vieira, A.C. Soares, V. Pinho, J.R. Nicoli, L.Q. Vieira, M.M. Teixeira, and D.G. Souza, *Transient TLR activation restores inflammatory response and ability to control pulmonary bacterial infection in germfree mice*. J Immunol, 2012. **188**(3): p. 1411-20.
72. Phillips, B.P. and P.A. Wolfe, *The use of germfree guinea pigs in studies on the microbial interrelationships in amoebiasis*. Ann.N.Y.Acad.Sci., 1959. **78**: p. 308-314.
73. Duarte, R., A.M. Silva, L.Q. Vieira, L.C. Afonso, and J.R. Nicoli, *Influence of normal microbiota on some aspects of the immune response during experimental infection with Trypanosoma cruzi in mice*. J.Med.Microbiol., 2004. **53**(Pt 8): p. 741-748.
74. de Oliveira, M.R., W.L. Tafuri, J.R. Nicoli, E.C. Vieira, M.N. Melo, and L.Q. Vieira, *Influence of microbiota in experimental cutaneous leishmaniasis in Swiss mice*. Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo, 1999. **41**(2): p. 87-94.
75. Noben-Trauth, N., R. Lira, H. Nagase, W.E. Paul, and D.L. Sacks, *The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to Leishmania major*. J.Immunol., 2003. **170**(10): p. 5152-5158.
76. Jones, D., M.M. Elloso, L. Showe, D. Williams, G. Trinchieri, and P. Scott, *Differential regulation of the interleukin-12 receptor during the innate immune response to Leishmania major*. Infect.Immun., 1998. **66**(8): p. 3818-3824.
77. Park, A.Y., B.D. Hondowicz, and P. Scott, *IL-12 is required to maintain a Th1 response during Leishmania major infection*. J.Immunol., 2000. **165**(2): p. 896-902.
78. Anderson, C.F., S. Mendez, and D.L. Sacks, *Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of Leishmania major in C57BL/6 mice*. J Immunol, 2005. **174**(5): p. 2934-41.

79. McDowell, M.A., M. Marovich, R. Lira, M. Braun, and D. Sacks, *Leishmania priming of human dendritic cells for CD40 ligand-induced interleukin-12p70 secretion is strain and species dependent*. Infect.Immun., 2002. **70**(8): p. 3994-4001.
80. Heinzl, F.P., D.S. Schoenhaut, R.M. Rerko, L.E. Rosser, and M.K. Gately, *Recombinant interleukin 12 cures mice infected with Leishmania major*. J.Exp.Med., 1993. **177**(5): p. 1505-1509.
81. Scharon, T.M. and P. Scott, *Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to Leishmania major in mice*. J Exp Med, 1993. **178**(2): p. 567-77.
82. Chatelain, R., K. Varkila, and R.L. Coffman, *IL-4 induces a Th2 response in Leishmania major-infected mice*. J.Immunol., 1992. **148**(4): p. 1182-1187.
83. Noben-Trauth, N., W.E. Paul, and D.L. Sacks, *IL-4- and IL-4 receptor-deficient BALB/c mice reveal differences in susceptibility to Leishmania major parasite substrains*. J.Immunol., 1999. **162**(10): p. 6132-6140.
84. Noben-Trauth, N., P. Kropf, and I. Muller, *Susceptibility to Leishmania major infection in interleukin-4-deficient mice*. Science, 1996. **271**(5251): p. 987-90.
85. Kropf, P., R. Etges, L. Schopf, C. Chung, J. Sypek, and I. Muller, *Characterization of T cell-mediated responses in nonhealing and healing Leishmania major infections in the absence of endogenous IL-4*. J.Immunol., 1997. **159**(7): p. 3434-3443.
86. Mattner, F., G. Alber, J. Magram, and M. Kopf, *The role of IL-12 and IL-4 in Leishmania major infection*. Chem.Immunol., 1997. **68**: p. 86-109.
87. Liew, F.Y., Y. Li, and S. Millott, *Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of Leishmania major through the induction of nitric oxide*. J.Immunol., 1990. **145**(12): p. 4306-4310.
88. Liew, F.Y., Y. Li, and S. Millott, *Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine*. Immunology, 1990. **71**(4): p. 556-559.

89. Green, S.J., R.M. Crawford, J.T. Hockmeyer, M.S. Meltzer, and C.A. Nacy, *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J.Immunol.*, 1990. **145**(12): p. 4290-4297.
90. Liew, F.Y., S. Millott, C. Parkinson, R.M. Palmer, and S. Moncada, *Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine*. *J.Immunol.*, 1990. **144**(12): p. 4794-4797.
91. Holzmuller, P., R. Bras-Goncalves, and J.L. Lemesre, *Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in Leishmania*. *Parasitology*, 2006. **132 Suppl**: p. S19-S32.
92. Cassatella, M.A., F. Bazzoni, R.M. Flynn, S. Dusi, G. Trinchieri, and F. Rossi, *Molecular basis of interferon-gamma and lipopolysaccharide enhancement of phagocyte respiratory burst capability. Studies on the gene expression of several NADPH oxidase components*. *J.Biol.Chem.*, 1990. **265**(33): p. 20241-20246.
93. Bogdan, C., Y. Vodovotz, J. Paik, Q.W. Xie, and C. Nathan, *Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages*. *J.Leukoc.Biol.*, 1994. **55**(2): p. 227-233.
94. Modolell, M., I.M. Corraliza, F. Link, G. Soler, and K. Eichmann, *Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines*. *Eur.J.Immunol.*, 1995. **25**(4): p. 1101-1104.
95. Taub, D.D. and G.W. Cox, *Murine Th1 and Th2 cell clones differentially regulate macrophage nitric oxide production*. *J.Leukoc.Biol.*, 1995. **58**(1): p. 80-89.
96. Kane, M.M. and D.M. Mosser, *The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis*. *J.Immunol.*, 2001. **166**(2): p. 1141-1147.
97. Anderson, C.F., M. Oukka, V.J. Kuchroo, and D. Sacks, *CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis*. *J.Exp.Med.*, 2007. **204**(2): p. 285-297.

98. Lopes, M.E., M.B. Carneiro, L.M. dos Santos, and L.Q. Vieira, *Indigenous microbiota and Leishmaniasis*. Parasite Immunol., 2016. **38**(1): p. 37-44.
99. Ribeiro-Gomes, F.L., E.H. Roma, M.B. Carneiro, N.A. Doria, D.L. Sacks, and N.C. Peters, *Site-dependent recruitment of inflammatory cells determines the effective dose of Leishmania major*. Infect.Immun., 2014. **82**(7): p. 2713-2727.
100. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall, *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
101. Ribeiro-Gomes, F.L., N.C. Peters, A. Debrabant, and D.L. Sacks, *Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response*. PLoS Pathog, 2012. **8**(2): p. e1002536.
102. Charmoy, M., B.P. Hurrell, A. Romano, S.H. Lee, F. Ribeiro-Gomes, N. Riteau, K. Mayer-Barber, F. Tacchini-Cottier, and D.L. Sacks, *The Nlrp3 inflammasome, IL-1beta, and neutrophil recruitment are required for susceptibility to a nonhealing strain of Leishmania major in C57BL/6 mice*. Eur J Immunol, 2016. **46**(4): p. 897-911.
103. Zhang, X., R. Goncalves, and D.M. Mosser, *The isolation and characterization of murine macrophages*. Curr Protoc Immunol, 2008. **Chapter 14**: p. Unit 14 1.
104. Kropf, P., J.M. Fuentes, E. Fahnrich, L. Arpa, S. Herath, V. Weber, G. Soler, A. Celada, M. Modolell, and I. Muller, *Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo*. FASEB J., 2005. **19**(8): p. 1000-1002.
105. Green, L.C., D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnok, and S.R. Tannenbaum, *Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids*. Anal Biochem, 1982. **126**(1): p. 131-8.
106. Morland, B. and T. Midtvedt, *Phagocytosis, peritoneal influx, and enzyme activities in peritoneal macrophages from germfree, conventional, and ex-germfree mice*. Infect.Immun., 1984. **44**(3): p. 750-752.

107. Nicaise, P., A. Gleizes, C. Sandre, F. Forestier, R. Kergot, A.M. Quero, and C. Labarre, *Influence of intestinal microflora on murine bone marrow and spleen macrophage precursors*. Scand.J.Immunol., 1998. **48**(6): p. 585-591.
108. Hattori, Y., K. Kasai, K. Akimoto, and C. Thiemermann, *Induction of NO synthesis by lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus in J774 macrophages: involvement of a CD14-dependent pathway*. Biochem.Biophys.Res.Comm., 1997. **233**(2): p. 375-379.
109. Iniesta, V., J. Carcelen, I. Molano, P.M. Peixoto, E. Redondo, P. Parra, M. Mangas, I. Monroy, M.L. Campo, C.G. Nieto, and I. Corraliza, *Arginase I induction during Leishmania major infection mediates the development of disease*. Infect.Immun., 2005. **73**(9): p. 6085-6090.
110. Mattner, F., P.K. Di, and G. Alber, *Interleukin-12 is indispensable for protective immunity against Leishmania major*. Infect.Immun., 1997. **65**(11): p. 4378-4383.
111. Scott, P. and F.O. Novais, *Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(9): p. 581-92.
112. Belkaid, Y., K.F. Hoffmann, S. Mendez, S. Kamhawi, M.C. Udey, T.A. Wynn, and D.L. Sacks, *The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of Leishmania major in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure*. J.Exp.Med., 2001. **194**(10): p. 1497-1506.
113. Tamoutounour, S., M. Guillemins, S.F. Montanana, H. Liu, D. Terhorst, C. Malosse, E. Pollet, L. Ardouin, H. Luche, C. Sanchez, M. Dalod, B. Malissen, and S. Henri, *Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin*. Immunity., 2013. **39**(5): p. 925-938.
114. Romano, A., M.B.H. Carneiro, N.A. Doria, E.H. Roma, F.L. Ribeiro-Gomes, E. Inbar, S.H. Lee, J. Mendez, A. Paun, D.L. Sacks, and N.C. Peters, *Divergent roles for Ly6C+CCR2+CX3CR1+ inflammatory monocytes during primary or secondary infection of the skin with the intra-phagosomal pathogen Leishmania major*. PLoS.Pathog., 2017. **13**(6): p. e1006479.

115. Peters, N.C., J.G. Egen, N. Secundino, A. Debrabant, N. Kimblin, S. Kamhawi, P. Lawyer, M.P. Fay, R.N. Germain, and D. Sacks, *In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies*. *Science*, 2008. **321**(5891): p. 970-4.
116. Carneiro, M.B.H., E.H. Roma, A.J. Ranson, N.A. Doria, A. Debrabant, D.L. Sacks, L.Q. Vieira, and N.C. Peters, *NOX2-Derived Reactive Oxygen Species Control Inflammation during Leishmania amazonensis Infection by Mediating Infection-Induced Neutrophil Apoptosis*. *J Immunol*, 2018. **200**(1): p. 196-208.
117. Mattner, J., H. Schindler, A. Diefenbach, M. Rollinghoff, I. Gresser, and C. Bogdan, *Regulation of type 2 nitric oxide synthase by type 1 interferons in macrophages infected with Leishmania major*. *Eur.J.Immunol.*, 2000. **30**(8): p. 2257-2267.
118. de Veer, M.J., J.M. Curtis, T.M. Baldwin, J.A. DiDonato, A. Sexton, M.J. McConville, E. Handman, and L. Schofield, *MyD88 is essential for clearance of Leishmania major: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling*. *Eur.J.Immunol.*, 2003. **33**(10): p. 2822-2831.
119. Karmarkar, D. and K.L. Rock, *Microbiota signalling through MyD88 is necessary for a systemic neutrophilic inflammatory response*. *Immunology*, 2013. **140**(4): p. 483-92.
120. Rhee, S.H. and D. Hwang, *Murine TOLL-like receptor 4 confers lipopolysaccharide responsiveness as determined by activation of NF kappa B and expression of the inducible cyclooxygenase*. *J.Biol.Chem.*, 2000. **275**(44): p. 34035-34040.
121. Olekhovitch, R., B. Ryffel, A.J. Muller, and P. Bousso, *Collective nitric oxide production provides tissue-wide immunity during Leishmania infection*. *J Clin Invest*, 2014. **124**(4): p. 1711-22.
122. Lima-Junior, D.S., D.L. Costa, V. Carregaro, L.D. Cunha, A.L. Silva, T.W. Mineo, F.R. Gutierrez, M. Bellio, K.R. Bortoluci, R.A. Flavell, M.T. Bozza, J.S. Silva, and D.S. Zamboni, *Inflammasome-derived IL-1beta production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania*. *Nat Med*, 2013. **19**(7): p. 909-15.

