



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

Leonardo Gomes Vaz

**TNFR1, O MAESTRO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO NA
INFECÇÃO POR *Leishmania amazonensis***

Belo Horizonte — MG

2021

Leonardo Gomes Vaz

**TNFR1, O MAESTRO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO NA
INFECÇÃO POR *Leishmania amazonensis***

Versão final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de título de Doutor em Ciências.

Profa. Dra. Leda Quercia Vieira (Orientadora)

Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia Departamento de Bioquímica e Imunologia
Universidade Federal de Minas Gerais

Dr. Flávio Almeida Amaral (Coorientador)

Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte — MG

2021

043

Vaz, Leonardo Gomes.

TNFR1, o maestro do processo inflamatório na infecção por *Leishmania amazonensis* [manuscrito] / Leonardo Gomes Vaz. – 2021.

79 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Leda Quercia Vieira. Coorientador: Dr. Flávio Amaral.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Receptores do Fator de Necrose Tumoral. 3. *Leishmania*. 4. Macrófagos. 5. Óxido Nítrico Sintase. I. Vieira, Leda Quercia. II. Amaral, Flávio Almeida. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE LEONARDO GOMES VAZ. Aos nove dias do mês de julho de 2021 às 13:30 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Google Meet”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “TNFR1, o maestro do processo inflamatório na infecção por *Leishmania amazonensis*”, requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Leda Quercia Vieira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli (Fiocruz, MG), aprovado; Dr. Luís Henrique Franco (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. João Santana da Silva (Universidade de São Paulo - Rib. Preto), aprovado; Dra. Claudia Ida Brodskyn (Fiocruz, BA), aprovado; Dr. Flávio Almeida Amaral - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Leda Quercia Vieira - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

- APROVADO
 REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 09 de julho de 2021.

Lis Antonelli
 Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli (Fiocruz, MG)

Luís Henrique Franco
 Dr. Luís Henrique Franco (UFMG)

João Santana da Silva
 Dr. João Santana da Silva (Universidade de São Paulo - Rib. Preto)

Claudia Ida Brodskyn
 Dra. Claudia Ida Brodskyn (Fiocruz, BA)

Flávio Almeida Amaral
 Dr. Flávio Almeida Amaral - Coorientador (UFMG)

Leda Quercia Vieira
 Dra. Leda Quercia Vieira - Orientadora (UFMG)

Leonardo Gomes Vaz

Aos que não estão aqui, mas ainda sim, fazem parte de mim

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, fonte de amor inesgotável cuja inteligência nos proporciona grandes mistérios que tentamos desvendar ininterruptamente. Aos meus pais, Rosângela e Armando e também à Soraya. Aos meus irmãos Thiago, Guilherme, Amanda e Jonathan, bem como os cunhados Dayane, Marquinhos e Paula por me incentivarem a progredir sempre. Aos meus sobrinhos queridos João Victor, Iago, Rafaella e Vítor que tanto me ensinam. Em cada etapa já superada desta existência tem uma grande parte de vocês.

À minha esposa Michelle que todos os dias me impele a melhorar, na área profissional, mas principalmente no aspecto humano. Aos meus sogros, Joana e Carlos pelo apoio nas horas mais difíceis e também pelos momentos felizes que me proporcionaram. Ao meu cunhado Léo pela amizade, minha cunhada Camilla pelas boas conversas e incentivo incondicional. A todos os parentes que vieram com o casamento, cada um é uma dádiva em minha vida.

Aos meus avós José (*in memorian*), Yvone, Waldemar e Aurora (*in memorian*) pelo exemplo de caráter reto, honesto, o qual sou imensamente grato. Obrigado pelos bons conselhos, puxões de orelha e, principalmente, pelo carinho.

À Professora Leda Quercia Vieira pela orientação, pela oportunidade no seu laboratório e a boa convivência. Com ela aprendi a trabalhar no ramo da pesquisa científica com ética, moral, humildade e muita dedicação.

Aos professores, funcionários e alunos do Departamento de Bioquímica e Imunologia pela contribuição na minha formação acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro ao longo dos dois anos do meu mestrado.

Aos membros que compõem essa banca, pela oportunidade de discussão deste trabalho e pela possibilidade de enriquecimento do mesmo.

À Caroline Diniz pela ajuda nestes experimentos infundáveis.

Aos demais membros e amigos do LAGI, Liliane, Diego, Ana Clara, Ana Elisa e Lucas, obrigado pela ajuda, disponibilidade e pelos bons momentos de convivência.

"Uma lei, já o dissemos, rege a evolução do pensamento, como evolução física dos seres e dos mundos; a compreensão do universo se desenvolve com os progressos do espírito humano.

Essa compreensão geral do universo e da vida foi expressa de mil maneiras, sob mil formas diversas no passado. Ela o é hoje em outros termos mais latos, e o será sempre com mais amplitude, à medida que a humanidade for subindo os degraus de sua ascensão.

A Ciência vê alargar-se, sem cessar, seu campo de exploração. Todos os dias, com auxílio de seus poderosos instrumentos de observação e análise, descobre novos aspectos da matéria, da força e da vida; mas o que esses instrumentos verificam já há muito tempo havia que o espírito o discernira, porque o voo do pensamento precede e excede os meios de ação da ciência positiva. Os instrumentos nada seriam sem a inteligência, sem vontade que os dirige.

A Ciência é incerta e mutável, renova-se sem cessar. Os seus métodos, teorias e cálculos, com grande custo arquitetados, desabam ante uma observação mais atenta ou uma indução mais profunda, para darem lugar a novas teorias, que não terão maior estabilidade. A teoria do átomo indivisível, por exemplo, que, há dois mil anos, servia de base a Física e a Química, é atualmente qualificada como hipótese e puro romance pelos nossos químicos mais eminentes.

Quantas decepções análogas não têm demonstrado no passado a fraqueza do espírito científico, que só chegará à realidade quando se elevar acima da miragem dos fatos materiais para estudar as causas e as leis!

Dessa maneira foi que a Ciência pôde determinar os princípios imutáveis da Lógica e das matemáticas. Não sucede o mesmo nos outros campos de investigação. A maior parte das vezes, o sábio para eles leva os seus preconceitos, tendências, práticas rotineiras, todos os elementos de uma individualidade acanhada, como se pode verificar no domínio dos estudos psíquicos, principalmente na França, onde até agora poucos sábios houve bastante corajosos e suficientemente ilustrados para seguirem a estrada já amplamente traçada pelas mais belas inteligências de outras nações.

Não obstante, o espírito humano avança passo a passo no conhecimento do ser e do universo; o nosso saber, quanto à força e à matéria modifica-se dia a dia; a individualidade humana revela-se com aspectos inesperados. À vista de tantos fenômenos verificados experimentalmente, em presença dos testemunhos que de toda parte se acumulam, nenhum espírito perspicaz pode continuar a negar a realidade da outra vida, a esquivar-se às consequências e às responsabilidades que ela acarreta.

O que dizemos da Ciência poder-se-ia, igualmente, dizer das filosofias e das religiões que se têm sucedido através dos séculos. Constituem elas outros tantos estágios ou trechos percorridos pela humanidade, ainda criança, elevando a planos espirituais cada vez mais vastos e que se ligam entre si. No seu encadeamento, essas crenças diversas nos aparecem como desenvolvimento gradual do ideal divino, que o pensamento reflete, com tanto mais brilho e pureza quanto mais delicado e perfeito se vai tornando.

É essa razão porque as crenças e os conhecimentos de um tempo ou de um meio parecem, para o tempo ou meio onde reinam, a representação da verdade tal qual a podem alcançar e compreender os homens dessa época, até que o desenvolvimento das suas faculdades e consciências os torne capazes de perceber uma forma mais elevada, uma radiação mais intensa dessa verdade."¹

¹ DENIS, Léon. O problema do ser, do destino e da dor: os testemunhos, os fatos, as leis: estudos experimentais sobre os aspectos ignorados do ser humano; as personalidades duplas; a consciência profunda; a renovação da memória; as vidas anteriores e sucessivas etc. 32. ed. 4. imp. — Brasília: FEB, 2014, pág. 19-20.

RESUMO

TNF é uma citocina pleiotrópica envolvida na inflamação, defesa de hospedeiro, degradação e reparo de tecidos, dentre outras funções. TNF atua através de dois receptores cognatos, sendo que o TNFR1 parece ser o mais efetivo no combate a parasitos intracelulares, incluindo *Leishmania*. Estudos acerca da *L. major* elucidaram a dicotomia T_H1/M1-T_H2/M2. Células T_H2, através da secreção de IL-4 e IL-13, ativam macrófagos via IL-4R α , levando a metabolização de L-arginina pela arginase 1 que produz poliaminas, essenciais para replicação parasitária. Assim, T_H2/M2 é um modelo clássico de suscetibilidade. Por outro lado, células T_H1 ativam macrófagos através de IFN- γ , que induz a expressão de iNOS e metaboliza L-arginina em citrulina e óxido nítrico, um gás com propriedades leishmanicida. Portanto, a polarização T_H1/M1 é um clássico modelo de resistência à *Leishmania*. A ausência de TNF prejudica a sinalização via seus receptores e a ativação M1, essencial para o controle do parasito. Entretanto, qual o impacto do TNFR1 na infecção por *L. amazonensis*? Nossos dados revelam a importância do TNFR1 para a expressão de iNOS e produção de NO por fagócitos mononucleares que levam ao controle da lesão. Embora a expressão de TNFR1 por camundongos selvagens não seja suficiente para eliminar o parasito, este receptor auxilia no controle da replicação parasitária. Mais, em modelos de infecção por *Leishmania*, a cura estéril dificilmente é alcançada. Recentemente, NO foi implicado na alteração metabólica de células do sistema imune, diminuindo a produção de citocina, o que leva a fase resolutive do processo inflamatório. Observamos um grande infiltrado inflamatório, especialmente com grande número de linfócitos no local da infecção na ausência do TNFR1. Além disto, os poucos linfócitos no sítio de infecção de camundongos selvagens eram em parte regulatórios, correlacionados com altos níveis de IL-10 na fase crônica da infecção. Também, no tempo final de infecção, macrófagos apresentaram o fenótipo M2, evitando imunopatologias. Concluimos que para o controle parasitário e o reparo tecidual ocorrerem com sucesso durante a infecção por *L. amazonensis*, quiça para processos inflamatórios em geral, diferentes tipos de respostas imunológicas devem ser montadas, macrófagos de diferentes fenótipos devem aparecer de forma coordenada no tempo apropriado a cada um e o TNF, via TNFR1, parece ser o maestro do processo inflamatório.

Palavras chaves: TNFR1, TNF, *Leishmania*, macrófagos, polarização, iNOS.

ABSTRACT

TNF is pleiotropic cytokine involved in inflammation, host defense, tissue degeneration, tissue regeneration among other functions. TNF acts through two cognate receptors. TNFR1 seems to be more effective against intracellular parasites, including *Leishmania*. Studies about *L. major* elucidated the T_H1/M1-T_H2/M2 dichotomy. T_H2 cells, through IL-4 and IL-13 secretion, activate macrophages through the IL-4 receptor alpha chain leading to the metabolization of L-arginine by arginase I and production of polyamines, required to parasite replication. So, T_H2/M2 is a classical model of susceptibility. On the other hand, T_H1 cells activate macrophages through IFN- γ , which induces iNOS expression. iNOS, metabolizes L-arginine into citrulline and nitric oxide (NO). NO is a leishmanicidal gas. So, T_H1/M1 polarization is the classical model of resistance to *Leishmania*. Absence of TNF impairs signaling through its receptor and M1 activation, essential to control the parasite. However, what is the impact of TNFR1 on the infection by *L. amazonensis*? Our data reveal the importance of TNFR1 in iNOS and NO production expression by mononuclear phagocytes that leads to lesion control. Although expression of TNFR1 by wild type mice is not enough to eliminate the parasite, this receptor mediates control of parasite replication. Indeed, in *Leishmania* models of infection, sterile cure is not achieved. Recently NO was implicated in rewiring cells of the immune system by diminishing pro-inflammatory cytokine production that leads to the resolution phase of the inflammatory process. We observed a large inflammatory infiltrate, especially a larger number of lymphocytes at the site of infection in the absence of TNFR1. Furthermore, the few lymphocytes at the site of infection of wild type were regulatory T cells mainly, correlating with high levels of IL-10 at the chronic phase of infection. At the later time points macrophages present M2 phenotype, controlling immunopathology. We conclude that for successful clearance and wound healing during leishmaniasis, different phenotypes of macrophages need to appear coordinately in the appropriate time. TNF, through TNFR1, seems to act as this conductor.

Key words: TNFR1, TNF, *Leishmania*, macrophages, polarization, iNOS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Filogenia do gênero <i>Leishmania</i>	16
Figura 2. Formas evolutivas de <i>Leishmania</i>	18
Figura 3. Espectro de ativação de macrófagos.....	22
Figura 4. Modalidades de sinalização e bioatividades dos receptores de TNF.	27
Figura 5. TNF bloqueia a sinalização de IL-4 e confere resistência a <i>L. major</i>	30
Figura 6. A importância do NO no término da resposta imunológica.....	31
Figura 7. TNFR1 orquestra a expressão de iNOS e arginase 1 durante o processo inflamatório. 46	
Figura 8. TNFR1 auxilia no controle da carga parasitária total.	48
Figura 9. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos TNFR1 ^{-/-} são mais suscetíveis à infecção por <i>L. amazonensis</i> do que os selvagens.	49
Figura 10. A inibição da arginase 1 aumenta resistência dos camundongos TNFR1 ^{-/-} à infecção por <i>L. amazonensis</i>	51
Figura 11. TNFR1 ^{-/-} é importante para terminação do processo inflamatório ocasionado pela infecção por <i>L. amazonensis</i>	53
Figura A1. Expressão de iNOS e arginase 1 dentro da população de células dendríticas.	70
Figura A2. Expressão de iNOS e arginase 1 dentro da população de células dendríticas com a inibição de arginase 1.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ARG1:** Arginase 1 enzyme (Enzima arginase 1)
- BMDM:** Bone marrow derived macrophages (Macrófagos derivados da medula óssea)
- CL:** Cutaneous leishmaniasis (Leishmaniose cutânea)
- DC:** Dendritic cell (Células dendríticas)
- DCL:** Diffuse cutaneous leishmaniasis (Leishmaniose cutânea difusa)
- IFN:** Interferon
- iNOS:** inducible Nitric Oxide Synthase (Óxido nítrico sintase indutível)
- IRF:** Interferon regulatory factor (Fator regulador de interferon)
- K_M:** Constante de Michaelis-Menten
- LCL:** Leishmaniose cutânea localizada
- LmFn:** *Leishmania major* cepa MHOM/IL/80/Friedlin
- LmSd:** *Leishmania major* cepa MHOM/SN/74/SD
- L-NIL:** L-N⁶-(1-Iminoethyl)lysine [L-N⁶-(Iminoetil)lisina]
- L-NOR:** L-norvaline (L-norvalina)
- LPS:** Lipopolysaccharide (Lipopolissacarídeo)
- MCL:** Mucocutaneous leishmaniasis (Leishmaniose mucocutânea)
- MHC:** Major histocompatibility complex (Complexo principal de histocompatibilidade)
- NK:** Natural killer cell (células natural killer)
- NO:** Nitric oxide (Óxido nítrico)
- NOHA:** N^ω-hydroxy-L-arginine (N^ω-hidroxi-L-arginina)
- NTD:** Neglected tropical diseases (Doenças tropicais negligenciadas)
- PBS:** Phosphate buffer saline (Tampão fosfato salina)
- PKDL:** Post-kala-azar dermal leishmaniasis (Leishmaniose dérmica pós-calazar)
- RFP:** Red fluorescent protein (Proteína fluorescente vermelha)
- ROS:** Reactive oxygen species (Espécies reativas de oxigênio)
- SEM:** Standard error mean (Erro padrão da média)
- SOCS:** Suppressor of cytokine signaling (Supressor da sinalização de citocinas)
- STAT:** Signal transducer and activator of transcription (Ativadores de transdução de sinais de transcrição)

T_H: T helper cells (células T auxiliares)

T_{H1}: Type 1 T helper cells (Células T auxiliares do tipo 1)

T_{H2}: Type 2 T helper cells (Células T auxiliares do tipo 2)

TLR: Toll like receptor (Receptor tipo Toll)

TNF: Tumor necrose factor (Fator de necrose tumoral)

TNFR1: Receptor tipo 1 do TNF

TNFR2: Receptor tipo 2 do TNF

Treg: regulatory T cells (Células T auxiliares regulatórias)

VL: Visceral leishmaniasis (Leishmaniose visceral)

V_{max}: Velocidade máxima de catálise

WHO: World Health Organization (Organização mundial de saúde)

SUMÁRIO

1. Introdução -----	15
1.1. Leishmanioses	15
1.2. Respostas imunológicas e as leishmanioses.....	19
1.3. A importância do TNF na resistência às leishmanioses	26
1.4. Os receptores do TNF na infecção por Leishmania	30
2. Objetivos -----	33
3. Materiais e Métodos -----	34
3.1. Animais	34
3.2. Parasitos	34
3.3. Obtenção de macrófagos de medula óssea (BMDM)	35
3.4. Ativação de macrófagos obtidos a partir da medula óssea de camundongos	36
3.5. Avaliação do índice de infecção de macrófagos de medula óssea (BMDM) infectados por Leishmania e obtenção de sobrenadante para dosagem de nitrito ...	36
3.6. Obtenção de sobrenadante para detecção de citocinas e proteínas para dosagem da atividade de arginase	37
3.7. Infecção dos camundongos	38
3.8. Quantificação de parasitos	39
3.9. Dosagem da atividade da enzima arginase.....	39
3.10. Extração de tecido para dosagem de citocinas na lesão	40
3.11. Detecção de citocinas por ELISA	41
3.12. Citometria de fluxo	41
3.13. Análise estatística.....	42
4. Resultados -----	44
4.1. TNFR1 orchestra a expressão de iNOS e arginase 1 durante o processo inflamatório.....	44
4.2. TNFR1 auxilia no controle da carga parasitária total.	47
4.3. macrófagos derivados da medula óssea de camundongos TNFR1-/- são mais suscetíveis à infecção por L. amazonensis por produzirem menos óxido nítrico.	49
4.4. A inibição da arginase 1 aumenta resistência dos camundongos TNFR1-/- à infecção por L. amazonensis.	50
4.5. A presença do TNFR1 é importante para o término do processo inflamatório ocasionado pela infecção por L. amazonensis.	52
5. Discussão -----	54

6. Conclusão -----	59
7. Referências -----	60
8. Apêndice A -----	70
9. Apêndice B -----	71
10. Anexo A -----	72

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmanioses

Leishmanioses são um complexo de doenças cujos agentes etiológicos, parasitos do gênero *Leishmania*, são transmitidos durante o repasto sanguíneo dos vetores infectados — fêmeas do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (DESJEUX, 2004). Quatro formas clínicas distintas da doença já foram descritas: a leishmaniose visceral (VL); leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL); leishmaniose cutânea (CL); e leishmaniose mucocutânea (MCL). Após o inóculo do parasito, os indivíduos podem permanecer assintomáticos por período indeterminado, sendo considerados naturalmente resistentes; ou manifestarem os sintomas da doença, variando com o grau de suscetibilidade inerente aos acometidos. Espécie do parasito, variação genética do hospedeiro, dose e local da infecção e a resposta imunológica apresentada são fatores que contribuem para a resistência ou variados graus de suscetibilidade dos indivíduos, acarretando na grande gama de manifestações clínicas e diversidade de sintomas apresentados no decurso da leishmaniose (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

Atualmente, o gênero *Leishmania* está subdividido em três subgêneros: *Leishmania* (*Leishmania*), *Leishmania* (*Viannia*) e *Leishmania* (*Sauroleishmania*), diferenciadas entre si pela porção que colonizam do trato digestório do hospedeiro invertebrado, dado suportado por análise filogenética baseada na sequência de DNA (Figura 1) (CROAN; MORRISON; ELLIS, 1997; NOYES et al., 2002). *Leishmania* são parasitos heteroxênicos, as fêmeas de flebotomíneos os adquirem durante a hematofagia, a partir de mamíferos infectados. Dentro do hospedeiros invertebrados, os parasitos são afilados, flagelados e móveis, encontram-se no trato digestório do vetor invertebrado, forma denominada promastigota. Esta é a forma infectante do parasito (BATES, 1994). Já nos hospedeiros vertebrados, os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam-se de forma ovoide e com flagelo interno, encontradas em macrófagos e outras células fagocitárias do hospedeiro vertebrado, forma denominada amastigota (HANDMAN; BULLEN, 2002).

As amastigotas livres ou interiorizadas em células fagocitárias, usualmente presentes na pele do hospedeiro vertebrado infectado, alcançam o trato intestinal dos insetos logo após o repasto sanguíneo. Uma vez neste ambiente, a temperatura mais baixa e o pH elevado em relação a pele dos mamíferos desencadeiam o desenvolvimento dos parasitos, acompanhado de uma série de alterações morfológicas denominada metaciclogênese. Após alguns dias da instalação no hospedeiro invertebrado, a taxa de replicação decresce, os parasitos se alongam e adquirem alta motilidade e, portanto, se tornam migratórios; assim alcançam a forma promastigota metacíclica, infectante, que será transmitida ao hospedeiro vertebrado na próxima alimentação do vetor (Figura 2). (BATES, 2007; BATES; ROGERS, 2004, BLUM, 1993, SACKS; KAMHAWI, 2001).

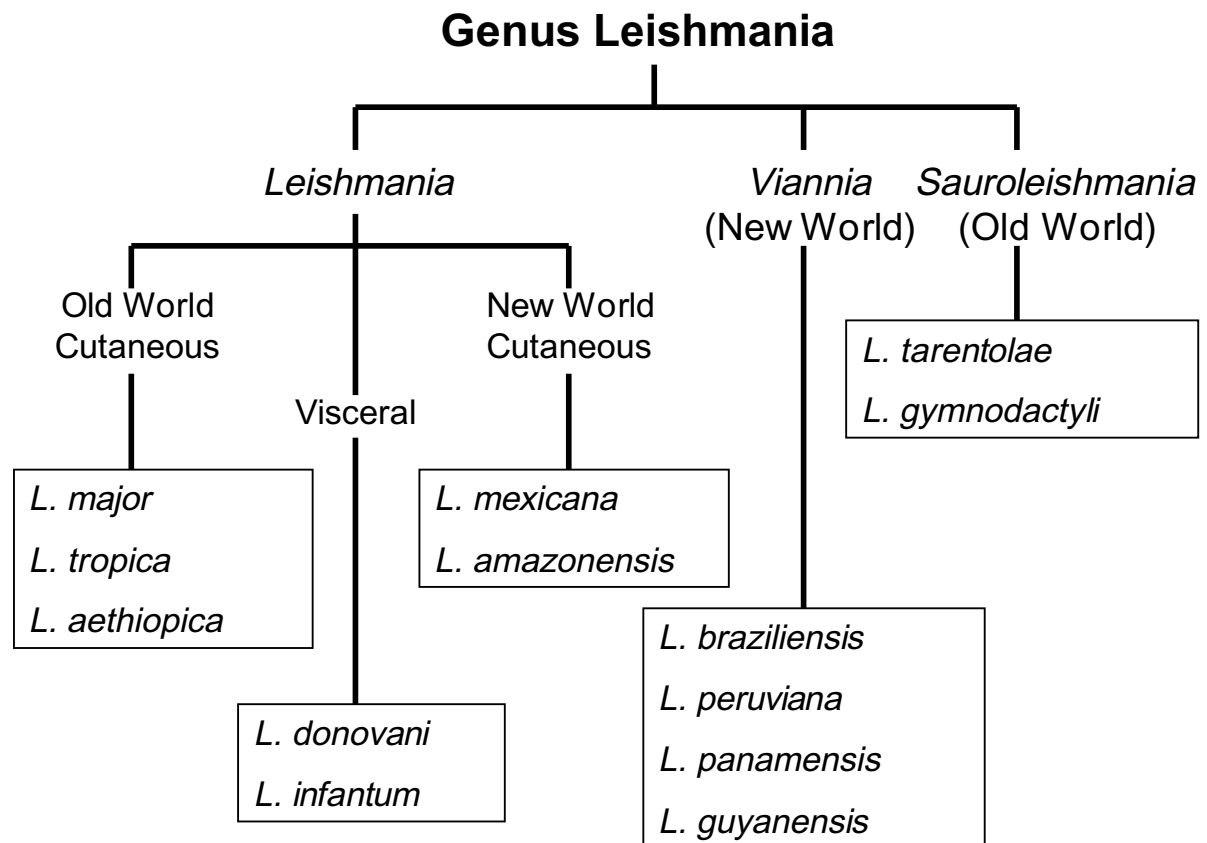


Figura 1. Filogenia do gênero *Leishmania*.

A filogenia do gênero *Leishmania* baseada na porção que porção que colonizam o trato digestório do hospedeiro invertebrado, corroborado por análise genéticas (BATES, 2007, p. 1008).

Em seres humanos, os parasitos do gênero *Leishmania* podem ocasionar leishmaniose com distintas manifestações clínicas que, ainda, são subdivididas. A CL pode apresentar-se

como lesão única, nodular ou ulcerativa, bem determinada; lesões múltiplas, geralmente nódulos, ao longo do corpo (BARRAL et al., 1995), desenvolvidas, principalmente, em indivíduos imunossuprimidos. Estas subformas são denominadas leishmaniose cutânea localizada (LCL) e leishmaniose cutânea difusa (DCL) respectivamente. As principais espécies do parasito relacionados à cutânea são: *Leishmania major*, *L. tropica* e *L. aethiopica*, no Velho Mundo; e *L. mexicana* e *L. amazonensis* no Novo Mundo. Já as espécies *L. donovani* e *L. infantum* estão associadas à forma visceral da doença, ambas são encontradas no Velho Mundo, mas apenas a segunda é endêmica do Novo Mundo (BATES, 2007, CROAN; MORRISON; ELLIS, 1997, DESJEUX, 2004).

As leishmanioses são endêmicas das regiões tropicais e subtropicais, com cerca de um bilhão de pessoas vivendo em área de risco e, conseqüentemente, geradora de um alto custo econômico. Estima-se que a incidência anual seja de 30.000 novos casos de LV e mais de 250.0000 novos casos de CL no mundo (WHO, 2020). Há registros da doença em 102 países, sendo que 83% dos casos de VL ocorrem em apenas 10 países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal, Quênia, Somália, Sudão, Sudão do Sul e Uganda. Já mais de 70% dos casos de CL ocorrem em sete países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã (República Islâmica do), Iraque, Paquistão e República Árabe Síria (WHO, 2020). Estimam-se cerca seiscentos e trinta óbitos anualmente causados pela forma visceral, com a taxa de fatalidade acima de 3% que vem crescendo a cada ano (WHO, 2020). As demais formas, embora não gerem mortalidade, impactam na morbidade das referidas doenças. Apesar de toda a abrangência das leishmanioses e seus impactos na população mundial, as pesquisas e o combate contra a doença são negligenciados pelos órgãos de saúde e institutos de pesquisa, portanto se enquadram na categoria de doenças tropicais negligenciadas (NTD) (ALVAR et al., 2012).

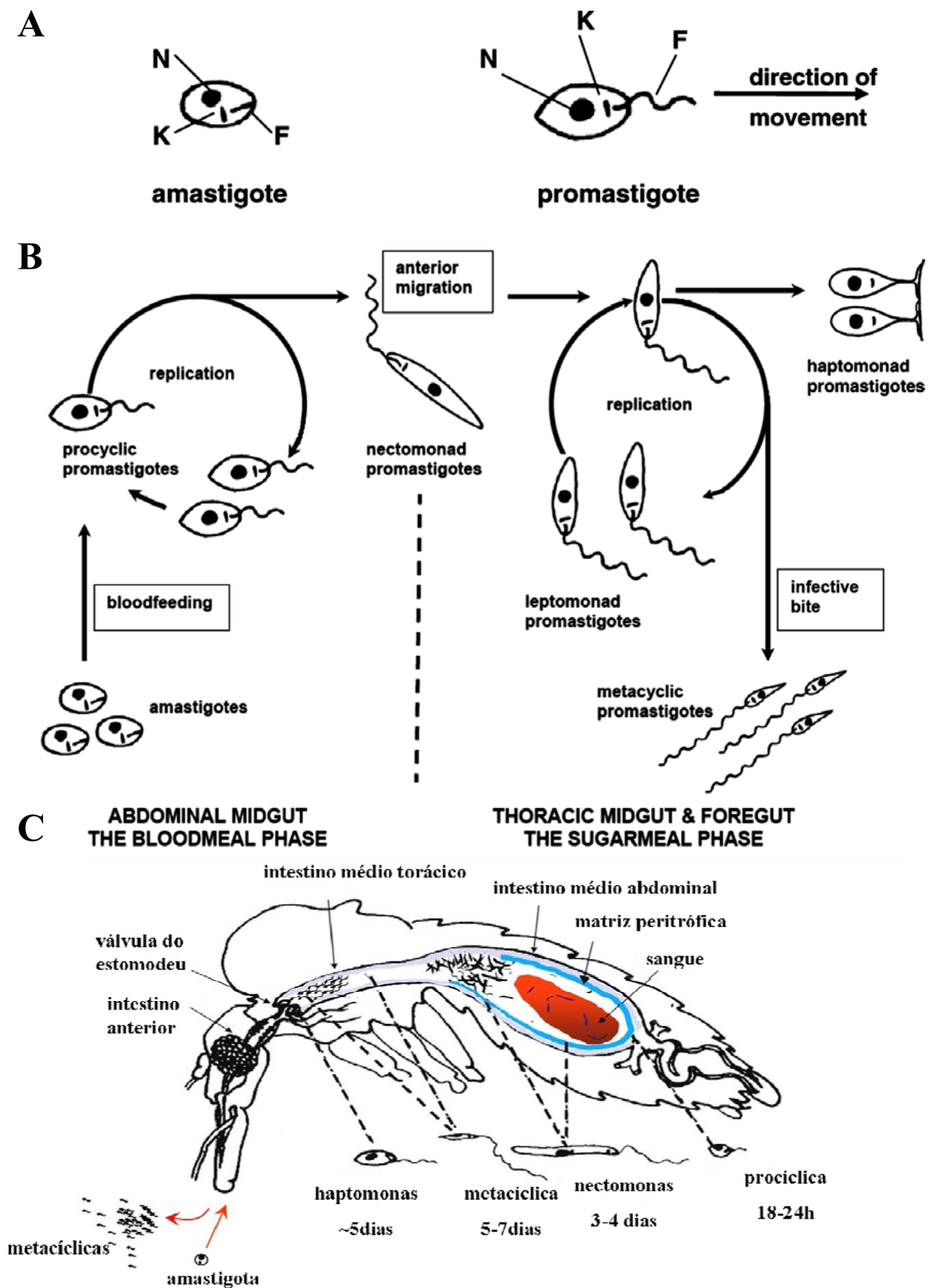


Figura 2. Formas evolutivas de *Leishmania*.

(A) Amastigota e promastigota. (B) Metaciclogênese esquematizada (BATES, 2007, p. 1100). (C) Desenho esquemático do desenvolvimento do parasito no hospedeiro invertebrado (PIRES, 2014, p. 22).

1.2. Respostas Imunológicas e as Leishmanioses

Estudos têm sido realizados no intuito de estabelecer uma padronização nas nomenclaturas dos fenótipos de macrófagos para melhor entendê-las. A partir deles, verificou-se o conceito de espectro desta população, em cujas extremidades encontram-se os macrófagos denominados M1 e M2. Em camundongos, o fenótipo M2 se divide em três grupos. O primeiro, denominado M(IL-4), é caracterizado pela ativação dos fatores de transcrição STAT6 e pela alta expressão do gene para SOCS2 e arginase 1 (*Arg1*). O segundo é o M(IC), expressando as interleucinas (IL)10 e 6 e a enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS). A terceira e última, chamada de M(IL-10), apresenta o fator de transcrição STAT3 ativo, expressa SOCS3, além da produção de IL-10 bem caracterizada (MURRAY et al., 2014).

O fenótipo M1 também se divide em três, sendo o primeiro M(LPS), caracterizado pela ativação dos fatores de transcrição STAT1, STAT6 e produção de TNF, IL-6 e IL-27, ainda uma expressão dos genes SOCS1, *Arg1* e o da enzima iNOS. O segundo, denominado M(LPS + IFN- γ), apresenta, além de todos os marcadores da linhagem anterior, a produção das citocinas IL-23 e IL-12, com a expressão de iNOS bem mais robusta que o anterior. O último, do outro ponto extremo do espectro, chamado de M(IFN- γ), apresenta expressão de SOCS1, uma forte ativação de STAT1, bem como robusta expressão da enzima iNOS, não expressando ativamente o gene *Arg1* (Figura 3) (MURRAY et al., 2014).

A polarização de macrófagos refere-se ao modo como os macrófagos foram ativados em um determinado ponto no espaço e no tempo, não sendo fixa, uma vez que os macrófagos são suficientemente plásticos para integrarem múltiplos sinais como os de microrganismos, citocinas, tecidos saudáveis ou danificados. Portanto, não há, em absoluto, populações variadas de macrófagos e, sim, fenótipos distintos quando na presença de determinados estímulos, abrangendo um largo espectro de ativação (MURRAY et al., 2014; MURRAY, 2017). A ativação de macrófagos é associada a uma alteração substancial na expressão gênica dependente do estímulo, muitas vezes com alguns marcadores sendo encontrados em mais de

um fenótipo. Sugere-se, então, que se utilize o máximo de marcadores possíveis para a caracterização macrofágica, desde fatores de transcrição ativadas no interior celular até combinações de marcadores de superfície celular.

Em homeostasia, os macrófagos residentes da pele expressam altos níveis de mRNA para codificação de IL-10, apresentam alta capacidade de fagocitose e baixa capacidade de apresentação de antígeno, o que sugere uma alta capacidade de eliminação de patógenos sem ativação da resposta imunológica (TAMOUTOUNOUR et al., 2013). IL-10 ativa a cascata de sinalização IL-10/STAT3 ao se ligar ao seu receptor (IL-10R), levando a fosforilação dos homodímeros de STAT3, que se translocam para o núcleo, onde ativam genes alvos, incluindo o gene para cadeia α do receptor de IL-4 (IL-4R α), o que sugere um aumento da sensibilidade a estímulos M2. Uma vez na pele, parasitos do gênero *Leishmania* são fagocitadas pelas células de Langerhans, macrófagos residentes e células dendríticas (LANG et al., 2002).

Em infecções por *Leishmania*, enquanto as células dendríticas fagocitam os parasitos e migram para o linfonodo drenante, os macrófagos residentes fagocitam e eliminam parte dos parasitos. Os parasitos que permanecem viáveis dão continuidade à resposta imune. Assim, os macrófagos residentes podem ser, na ausência ou mesmo em baixos níveis de TNF, ativados em M2 pelo IL-4R α por ação da IL-4 e IL-13 liberadas por eosinófilos e células T. Após a ligação da IL-4 ou IL-13 ao IL-4R α ocorre a fosforilação de STAT6 que, translocado para o núcleo, ativa genes correlacionados aos macrófagos M2, dentre eles se destaca o gene *Arg-1* (RUTSCHMAN et al., 2001). A sinalização via IL-4R α é importante para o reparo tecidual por controlar a montagem de fibras colágenas (KNIPPER et al., 2015). A enzima arginase 1 catalisa a hidrólise de L-arginina em ureia e L-ornitina, que pode ser processada em L-prolina pela ornitina aminotransferase. Ainda, a L-ornitina pode ser descarboxilada pela ornitina descarboxilase em poliaminas (putrescina, espermidinas e esperminas) essenciais para o reparo tecidual. Entretanto, poliaminas são também utilizadas para replicação parasitária, para depressão do sistema imunológico e, posteriormente, podem diminuir a produção de óxido nítrico (NO). Assim, quando arginase 1 é ativada precocemente durante a infecção por

Leishmania, o parasito se aproveita desta maquinaria para persistir no hospedeiro (BOGDAN, 2001; KROPF et al., 2005; WU; MORRIS, 1998).

Macrófagos M2 são fundamentais no entendimento da suscetibilidade observada em camundongos BALB/c. Durante a infecção por *L. major*, camundongos BALB/c apresentam produção contínua de IL-4, impossibilitando a produção de NO pelos macrófagos e favorecendo a metabolização da L-arginina pela enzima arginase 1, expressa também em células dendríticas nas mesmas condições. Dessarte, ocorre a produção de poliaminas, essenciais na replicação parasitária (CORRALIZA et al., 1995; MODOLELL et al., 1995; MUNDER et al., 1999).

Por outro lado, macrófagos residentes podem ser ativados em M1 através da ação do IFN- γ em sinergia com TNF, que são capazes de induzir a produção de NO pela indução da enzima iNOS e controlar a infecção por *Leishmania* (GREEN et al., 1990a; 1990b; LIEW; LI, MILLOTT, 1990). iNOS é uma isoforma indutível de NOS que catalisa a oxidação da L-arginina em L-citrulina e NO com a formação do intermediário N^o-hidroxi-L-arginina (NOHA) (BOUCHER et al., 1999; BUGA et al., 1999; TENU et al., 1999). NO é um gás lipofílico que migra pelas células, interagindo com um grande número de alvos em outras células e até mesmo outros tecidos. O NO reage com superóxido para gerar as espécies reativas de nitrogênio como, peroxinitrito (ONOO⁻), dióxido de nitrogênio (NO₂) e trióxido de nitrogênio (N₂O₃), substâncias potencialmente danosas a DNA, a proteínas e a lipídeos que, por isso, confere proteção contra diversos parasitos intracelulares, dentre eles parasitos do gênero *Leishmania* (BRONTE; ZANOVELLO, 2005; JOURD'HEUIL et al., 1999; WINK et al., 2011).

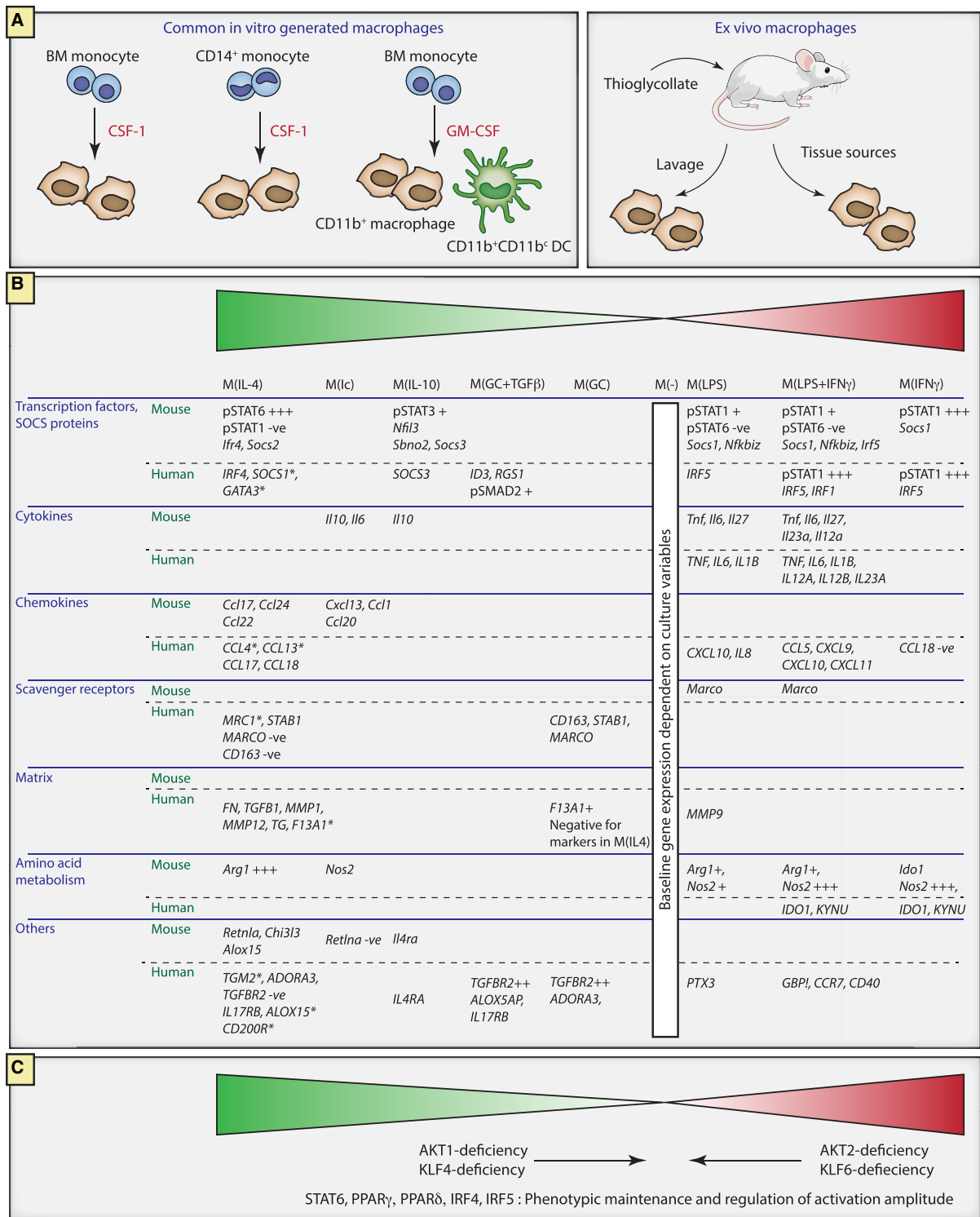


Figura 3. Espectro de ativação de macrófagos.

(A) Exemplos de preparações de macrófagos amplamente utilizadas. (B) Sistemas de marcadores para macrófagos ativados. (C) Usando a genética para auxiliar em estudos de ativação de macrófagos (MURRAY et al., 2014, p. 340).

Macrófagos M1 e M2 tem o metabolismo dependente da L-arginina extracelular, a atividade de ambas as enzimas, iNOS e arginase 1, características de macrófagos M1 e M2 respectivamente, depende de fonte extracelular de L-arginina (CARNEIRO et al., 2015; OHMORI; SCHREIBER; HAMILTON, 1997). Na competição pelo substrato, a arginase 1 tem vantagem. Embora iNOS apresente maior afinidade pela L-arginina (K_m aproximadamente 10-50 $\mu\text{mol/L}$) que a arginase 1 (K_m aproximadamente 1-5 mmol/L), a velocidade máxima de catálise da arginase em pH fisiológico ($V_{\text{max}} \approx 1400 \mu\text{mol/min por mg}$) é quase mil vezes maior que da iNOS ($V_{\text{max}} \approx 1,3 \mu\text{mol/min por mg}$) (BRONTE; ZANOVELLO, 2005; KRATOCHVILL et al., 2015; SCHLEICHER et al., 2016). Portanto, a arginase 1 utiliza a L-arginina mais rapidamente que a iNOS, suprimindo a atividade desta última. Na verdade, a interação entre arginase 1 e iNOS vai além do fato de competirem pelo mesmo substrato, a reação de oxidação catalizada pela iNOS tem como intermediário NOHA, um potente inibidor da arginase 1 (BUGA et al., 1996).

A ativação de macrófagos M1 e M2 ocorre principalmente através das células T dos diferentes perfis imunológicos. Em meados da década de 1980, com os avanços dos estudos imunobiológicos, identificaram-se dois grupos distintos de célula T auxiliares (helper CD4⁺ T cell — T_H) baseados nos perfis de atividades de interleucinas, expressão proteica e de fatores de transcrição. Em modelos de infecção com *L. major*, o mais bem caracterizado modelo de infecção intracelular, um grupo identificado foi denominado células T auxiliares do tipo 1 (T_{H1}), associados à resistência, e o outro, células T auxiliares do tipo 2 (T_{H2}), associados à suscetibilidade (MOSMANN et al., 1986). Células T_{H1} e T_{H2} são as principais ativadoras de macrófagos M1 e M2 respectivamente ao longo da infecção.

Nestes estudos, observou-se que camundongos C57BL/6 são naturalmente resistentes à infecção por *L. major*, pois apresentam a resposta imune protetiva T_{H1}, iniciada pela produção de IL-12 por células dendríticas (MCDOWELL et al., 2002). Esta citocina promove a ativação de células *natural killer* (células NK), que são as principais fontes de interferon- γ (IFN- γ) nos tempos iniciais, desencadeando, assim, a resposta T_{H1} (SCHARTON; SCOTT,

1993). A resistência conferida pela resposta T_H1 advém da ativação de macrófagos por células T auxiliares produtoras de $IFN-\gamma$, que os induzem a produzir NO e os tornam aptos a matar o parasito (GREEN et al., 1990b). Outro sinal indispensável à síntese de NO na morte dos parasitos é a citocina TNF, que atua em sinergia com o $IFN-\gamma$ (GREEN et al., 1990a), crucial para o controle do parasitismo no modelo em questão, no qual não parece ser relevante a produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) (ASSREUY et al., 1994; LIEW; LI; MILLOTT, 1990). A importância da produção de NO no controle da infecção também foi observada em modelos de infecção por *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi* (LANGERMANS et al., 1992; VESPA; CUNHA; SILVA, 1994). Por outro lado, quando infectados por *L. major*, camundongos BALB/c apresentam a resposta imune T_H2 , caracterizada pela produção das citocinas IL-4, IL-5, GM-CSF e IL-13 (ALEXANDER; BROMBACHER, 2012; LOCKSLEY et al., 1987; MOSMANN et al., 1986).

Como dito anteriormente, durante a infecção de macrófagos por *L. major*, a principal enzima produtora de NO é a iNOS, que, assim como a enzima arginase 1, tem como substrato a L-arginina. (GREEN et al., 1990b). Logo, o equilíbrio da expressão entre iNOS e arginase 1 leva ao favorecimento da replicação parasitária, quando aumentada a expressão de arginase 1; em contrapartida, quando a expressão de iNOS é aumentada ocorre a morte do parasito. Ainda, quando a via da arginase 1 prevalece, ocorre a imunossupressão de células T no sítio inflamatório que diminui a produção de $IFN-\gamma$, favorecendo a persistência da infecção (MODOLELL et al., 2009). Assim, a resposta imunológica de perfil T_H1 interfere no mecanismo de ativação de macrófagos, favorecendo a expressão de iNOS que, conseqüentemente, aumenta a produção de NO, através da ação sinérgica de $IFN-\gamma$ e TNF. Por outro lado, a resposta de perfil T_H2 também interfere no mecanismo de polarização de macrófagos, contudo inibindo a produção de NO, aparentemente, em consequência da produção de IL-4 (TAUB; COX, 1995).

Não obstante a dicotomia T_H1/T_H2 elucidar os modelos de resistência e suscetibilidade nas infecções pela cepa Fn de *L. major* (MHOM/IL/80/Friedlin) (LmFn), ela não se aplica a todas as cepas desta espécie, tampouco a outras espécies de *Leishmania*. Estudos sobre a infecção com a cepa Sd de *L. major* (MHOM/SN/74/SD) (LmSd) revelaram que

camundongos C57BL/6 apresentam altos níveis de IL-12, portanto apresentam uma forte resposta T_H1 com altos níveis de IFN- γ , porém, além de não ocorrer a cura das lesões neste modelo, observa-se a persistência do parasito e a falta de controle da lesão nas orelhas de camundongos infectados com LmSd ao longo de todo o tempo experimental. Interessantemente, foi observado nas infecções *in vitro* por LmSd que os parasitos persistem apenas nos macrófagos M2 (ANDERSON; MENDEZ; SACKS, 2005; LEE et al., 2018), sendo os macrófagos M1 capazes de eliminar os parasitos LmSd. Entretanto, isso não ocorre *in vivo*. Assim infere-se que a polarização T_H1 não seja tão robusta quanto na infecção por LmFn. Neste caso, atribui-se a suscetibilidade à células T auxiliares que produzem IL-10 e IFN- γ simultaneamente já nos tempos iniciais da infecção (ANDERSON et al., 2007). Já para a cepa BH49 (que parece ser uma *L. major*) (MHOM/BR/1971/BH49) não é requerido IFN- γ para a resolução das lesões, pois essa cepa apresenta baixa infectividade (SILVA et al., 2009). Assim, temos uma variada gama de fatores que influenciam no desenvolvimento da doença.

Fatores de resistência e suscetibilidade identificados no modelo *L. major* não foram suficientes para elucidar o complexo panorama da infecção por *L. amazonensis*. O paradigma T_H1/T_H2 não explica a progressão da doença, pois há evidências que levam a acreditar que citocinas destes dois perfis, além de outros, atuem de forma independente e simultânea neste modelo. Assim, identificar os fatores que equilibram os mecanismos efetores e a regulação da resposta imune ante a infecção por *L. amazonensis* é crucial para melhor compreensão e, conseqüentemente, à descoberta de alvos terapêuticos, a fim de desenvolver tratamentos eficazes.

O microambiente gerado na infecção por *L. amazonensis*, com baixos níveis de IFN- γ , IL-4, TNF, na presença de IL-10, parece favorecer a replicação parasitária através da inibição da enzima iNOS, devido à ativação de macrófagos pender para o fenótipo M2, mais precisamente o subtipo M(IL-10), que expressa níveis intermediários de arginase 1 e iNOS (BALESTIERI et al., 2002). Mesmo produzindo mais IFN- γ e IL-12 e expressando mais iNOS nesta infecção, camundongos IL-10^{-/-} não controlam a lesão (JONES et al., 2002). O

IFN- γ , citocina central na resolução da infecção por *L. major*, teve a função protetora observada apenas na fase crônica da infecção por *L. amazonensis* (CARNEIRO et al., 2015; COLMENARES et al., 2003; PINHEIRO; ROSSI-BERGMANN, 2007). Intrigantemente, baixos níveis de IFN- γ favorecem a replicação de amastigotas *in vitro* no interior de macrófagos (QI et al., 2004, nossos resultados não publicados). Com os baixos níveis de TNF produzidos por camundongos infectados por *L. amazonensis* há o impedimento da produção de NO, disponibilizando L-arginina para síntese de poliaminas, utilizadas pelo parasito para se reproduzir (WANASEN et al., 2007).

Camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis*, quando tratados com IL-1 β , apresentam recrudescimento da lesão e elevada carga parasitária. Células dendríticas destes animais, *in vitro*, incubadas com células T *naïve*, induzem uma população de células T auxiliares caracterizada como IFN- γ^{low} , IL-10 $^{\text{high}}$ e IL-17 $^{\text{high}}$ e o aumento da produção de IL-17 estaria correlacionado com a diminuição de IFN- γ (XIN; LI; SOONG, 2007). Assim, durante a infecção por *L. amazonensis*, não se observa uma forte polarização T_H1 nem mesmo T_H2, mas, sim, uma resposta mista entre estes dois perfis imunológicos, o que, conseqüentemente, prejudica a polarização de macrófagos neste modelo (JI et al., 2002). [\(clique aqui para assistir ao video ilustrativo\)](#)²

1.3. A Importância do TNF na Resistência às Leishmanioses

Atualmente se sabe que apresentar a resposta T_H1 contra parasitos intracelulares não confere necessariamente resistência. Por exemplo, camundongos deficientes de TNF mesmo apresentando uma forte resposta T_H1 não são resistentes à infecção por *L. major*, pois falham em controlar o parasitismo e reparar a lesão causada por *L. major* e sucumbem rapidamente à infecção, mesmo com suas células do linfonodo apresentando alta produção de IFN- γ após estímulo antigênico (WILHELM et al., 2001). Então, para elucidar melhor a resistência e suscetibilidade em infecções por *Leishmania*, faz-se necessário melhor entender os mecanismos envolvidos nas respostas imunológicas e como eles estão envolvidos na ativação

² <https://www.youtube.com/watch?v=Udb5JdqDkZA&feature=youtu.be>

de macrófagos. Assim, os diversos estudos acerca do papel do TNF na resposta imune à *Leishmania* acabaram por contribuir amplamente com o melhor entendimento sobre os mecanismos de ativação dos macrófagos.

O TNF é uma citocina pleiotrópica, ou seja, possui diversas funções biológicas (Figura 4). Dentre elas, o TNF é responsável pela promoção da inflamação, pois induz a produção de quimiocinas e favorece a citotoxicidade celular, ativando e recrutando linfócitos T e macrófagos durante a resposta imune inicial. Tratamentos com TNF recombinante resultaram na redução da lesão e carga parasitária (TITUS; SHERRY; CERAMI, 1989; LIEW, et al., 1991), bem como o tratamento com anticorpos anti-TNF agravaram os sintomas da doença (THEODOS et al., 1991; TITUS; SHERRY; CERAMI, 1989). O TNF, em sinergia com o IFN- γ , induz a síntese de NO que leva à morte da *L. major* (LIEW; LI; MILLOTT, 1990). Ainda, o TNF desempenha uma importante função bloqueando a polarização de macrófagos para o perfil M2, favorecendo, assim, a polarização M1, tanto por efeitos diretos de sua ação quanto por inibir a produção ou os efeitos das citocinas IL-4 e IL-13 (KRATOCHVILL et al., 2015; MURRAY, 2017).

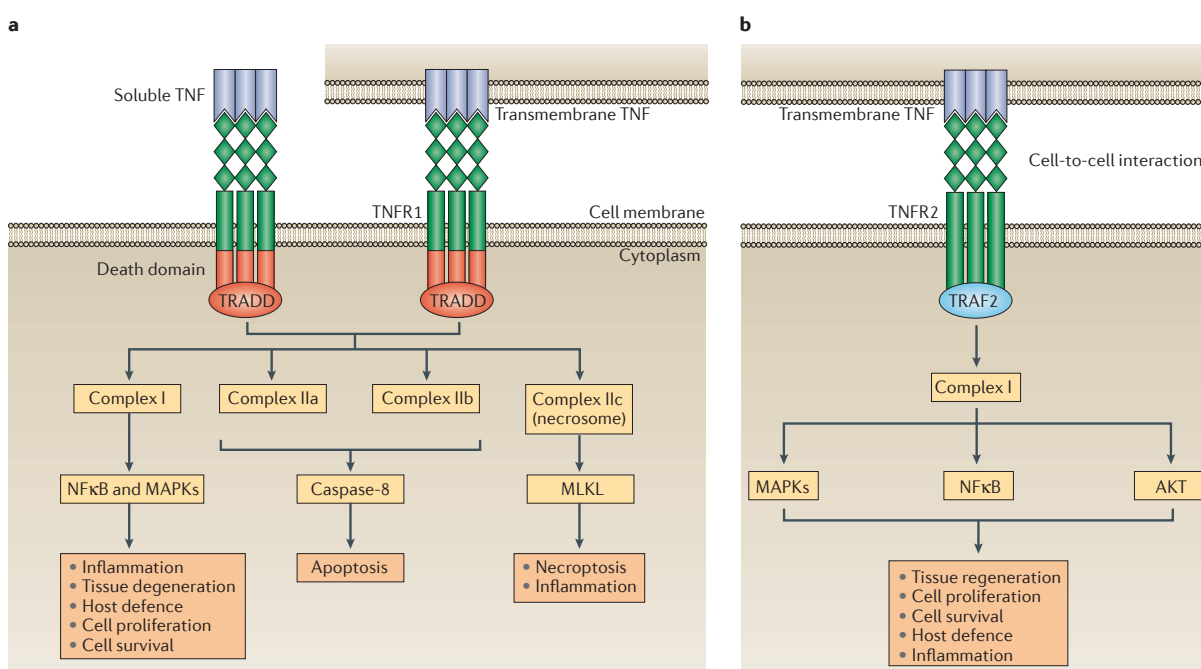


Figura 4. Modalidades de sinalização e bioatividades dos receptores de TNF.

(A) A sinalização do receptor 1 do TNF (TNFR1) é ativada tanto pelo TNF solúvel quanto pelo transmembrana. TNFR1 carrega um domínio de morte que recruta a proteína adaptadora do domínio de morte associada a TNFR1 (TRADD). (B) O TNFR2 é proposto para ser totalmente ativado principalmente pelo TNF transmembrana, no contexto de interações célula a célula. O TNFR2 medeia principalmente bioatividades homeostáticas, incluindo regeneração de tecidos, proliferação celular e sobrevivência celular (KALLIOLIAS; IVASHKIV, 2016, p. 51).

A ação sinérgica entre o TNF e IFN- γ é conhecida desde 1990, mas ainda não se tem conhecimento como cada uma destas citocinas atua na expressão de iNOS e produção de NO. A ativação celular por TNF e LPS induz, cada estímulo com sua própria cinética e magnitude, a ativação de AP1 e NF κ B em macrófagos, que leva a baixos níveis de mRNA para iNOS, contudo quando combinados com IFN- γ os níveis de mRNA para iNOS aumentam (SALIM; SERSHEN; MAY, 2016). De fato, camundongos deficientes de IFN- γ não expressam iNOS durante a infecção por *L. amazonensis* (CARNEIRO et al., 2015; CARNEIRO et al., 2020). Talvez, sem a sinalização para IFN- γ não ocorra a formação ou fosforilação de dímeros de STAT1 e a ativação do fator de transcrição IRF1, essencial para a expressão de iNOS (OHMORI; SCHREIBER; HAMILTON, 1997).

Apesar de células mieloides de camundongos deficientes de TNF expressarem iNOS quando infectados com *L. major*, estas células não produzem NO devido ao fato do TNF inibir a transcrição do gene *Arg1* ao diminuir a acetilação da histona H3 da região promotora ou de *enhancer* deste gene, prevalecendo a atividade da arginase 1 em detrimento a da iNOS. Portanto, a sinalização do TNF impede que o fator de transcrição STAT6 se ligue à cromatina, sem alterar o perfil de produção de citocinas ou ativação de fatores de transcrição, conferindo resistência a *L. major* por ativar macrófagos para o fenótipo M1, fenótipo produtor de NO no sítio de infecção. Camundongos BALB/c são suscetíveis a infecção por *L. major* por expressarem uma forte resposta T_{H2}, sendo que a depleção do gene *Arg1* de células mielóides de camundongos BALB/c foi suficiente para lhes conferir resistência contra *L. major* (Figura 5) (SCHLEICHER et al., 2016). Assim, evidencia-se que apenas uma forte resposta T_{H1} e ativação M1 não são suficientes para conferir resistência às leishmanioses, sendo necessário o TNF, que atua como potente inibidor da ativação M2 (KRATOCHVILL et al., 2015; MURRAY, 2017).

Camundongos deficientes de TNF de fato sucumbem rapidamente à infecção por LmFn apesar da forte resposta T_{H1} (FROMM et al., 2015; WILHELM et al., 2001). Camundongos C57BL/6 quando infectados por *L. amazonensis* na orelha desenvolvem

necrose, mas quando infectados nas patas, as lesões se desenvolvem e são controladas e, apesar da persistência do parasito e de um inchaço moderado, a cura clínica acontece (CARGNELUTTI et al. 2014; CÔRTEZ et al., 2000). A falta de um modelo de resistência para *L. amazonensis* pode advir do fato de que este parasito induz baixos níveis de TNF (HORTA et al.; 2012). Em acordo com esta hipótese, as observações de que a depleção de STAT6 aumentou a resistência de camundongos nas infecções por *L. amazonensis*. Neste trabalho, controversamente a depleção de STAT6 aumenta o número e a frequência de monócitos permissivos e não auxilia na eliminação dos parasitos, apesar de ter aumentado a expressão iNOS nesta população e ter controlado melhor as lesões (CARNEIRO et al., 2020).

A iNOS é a principal enzima produtora de NO, principal substância leishmanicida (THEODOS et al., 1991), por isso, buscam-se terapias capazes de induzir a expressão de iNOS, a produção de NO e, assim, eliminar o parasito. Entretanto, em leishmanioses, a cura estéril nem sempre é alcançada, ou seja, a eliminação completa dos parasitos nem sempre ocorre, muitas vezes os parasitos persistem em número controlado e em equilíbrio com o hospedeiro. Em muitos casos, não há sequer diferença na carga parasitária entre camundongos resistentes e suscetíveis (RITTER et al., 2004; (OLIVEIRA et al., 2012; VIERA et al, 1996). Atualmente, além da função microbicida do NO, foi evidenciada a sua importância para que a inflamação termine, restabelecendo a homeostase no tecido. NO é capaz de diminuir a expressão da enzima aconitase 2, o que interrompe o ciclo do ácido cítrico e promove a via glicolítica. Em infecções por *L. major*, ao se alcançar o número de células produtoras de NO requerido para tal mudança metabólica, cerca de 5000 células produtoras de NO por mm³, ocorre a alteração metabólica, passando de oxidação fosforilativa para glicolítico. Assim, diminui-se a produção de citocinas inflamatórias, interrompendo o processo inflamatório, o que evita uma eventual imunopatologia (Figura 6) (PALMIERI et al., 2020; POSTAT et al., 2018).

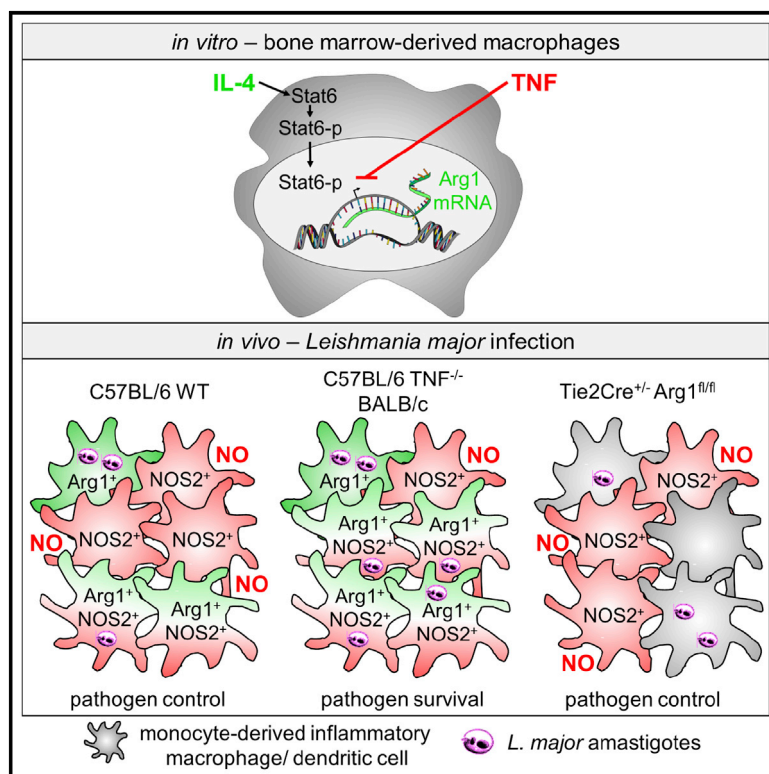


Figura 5. TNF bloqueia a sinalização de IL-4 e confere resistência a *L. major*.

Em cima: O TNF impede a ligação de STAT-6 à cromatina, interrompendo a sinalização via IL-4 e, consequentemente, a expressão da enzima arginase 1. Abaixo: a depleção do gene *Arg1* confere resistência a camundongos naturalmente suscetíveis à *L. major* (SCHLEICHER, et al., 2016).

1.4. Os Receptores do TNF na Infecção por *Leishmania*

O papel dos receptores do TNF (TNFR1 e TNFR2) nas infecções por *L. major* também tem sido investigado. Estudos com camundongos TNFR2^{-/-} apresentam divergências, muitas delas podem ser devidas à cepa do parasito ou mesmo ao fundo genético do camundongo utilizado. Em alguns estudos, os camundongos TNFR2^{-/-} apresentam apenas um atraso no início do controle da infecção em relação aos camundongos selvagens, sem maiores alterações (NASHLEANAS; KANALY; SCOTT, 1998). Em outros, TNFR2^{-/-} apresentam grandes lesões como as dos TNF^{-/-} e TNFR1^{-/-}, mas, diferente destes, eventualmente controlam a infecção. Camundongos deficientes nos dois receptores do TNF (TNFRp55p75^{-/-}) ou apenas do TNFR1 apresentam cursos de infecção muito similares aos TNF^{-/-}. Camundongos C57BL/6 deficientes de TNFR1 (TNFR1^{-/-}) não controlam a lesão causada por *L. major*, mas controlam o parasitismo (FROMM et al., 2015; VIEIRA et al., 1996). Estudos acerca do perfil imunopatológico, também neste modelo murino, permitiram a caracterização das lesões.

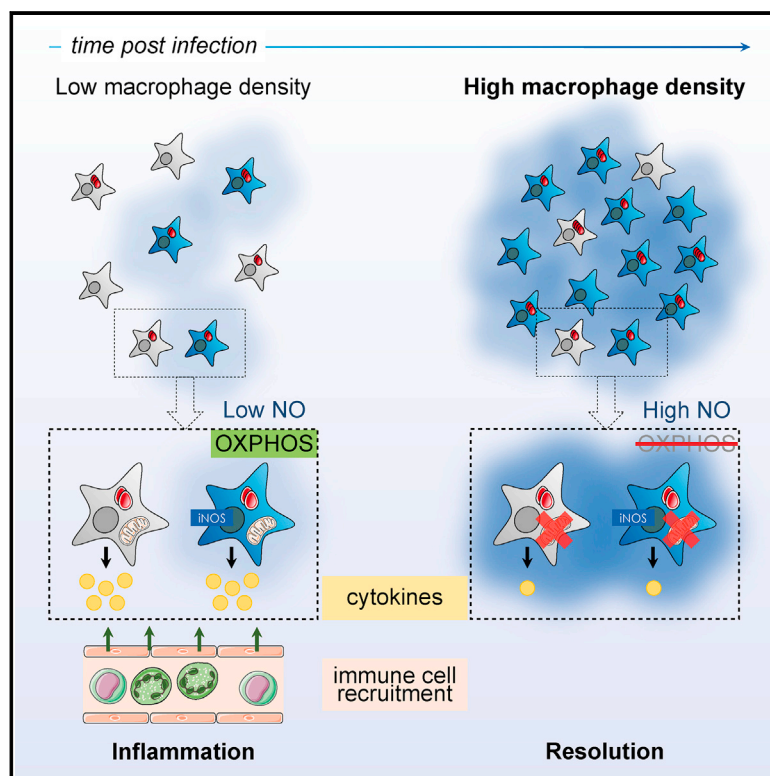


Figura 6. A importância do NO no término da resposta imunológica.

Desenho esquemático evidenciando a importância de se alcançar o quórum necessário de células produtoras de NO para desencadear o término da resposta imunológica (POSTAT, et al., 2018).

Atribuiu-se a falta do controle da lesão à incapacidade do camundongo $TNFR1^{-/}$ de regular a inflamação, devido à baixa taxa de apoptose em fases avançadas da infecção. A baixa taxa de apoptose em diversas doenças infecciosas parece ser devida à ausência do $TNFR1$ (NAUDÉ et al., 2011), majoritariamente em linfócitos (KANALY et al., 1999). A partir do exposto, é patente a falta de controle da infecção por *L. major* nos camundongos $TNFR1^{-/}$, cujo infiltrado inflamatório — com alta taxa de células T auxiliares, células T citotóxicas e $Ly6G^{+}$ — é caracterizado por liberação contínua de mediadores de inflamação ($IFN-\gamma$ e TNF). A carga parasitária não explica a lesão exacerbada, pois é igual à de camundongos selvagens (OLIVEIRA et al., 2012), reiterando a falta de regulação da lesão.

Pouco se sabe da importância da sinalização pelo receptor 1 do TNF na infecção pelas demais cepas de *L. major* ou por *L. amazonensis*. Quanto à *L. amazonensis*, um único estudo revelou a falta de controle das lesões nas patas nos tempos finais de infecção. A análise histológica das lesões mostrou uma inflamação grave dez semanas após a infecção de camundongos $TNFR1^{-/}$ e selvagens. Já na décima quinta semana após o inóculo, os animais

selvagens apresentaram uma redução na inflamação, o mesmo não ocorrendo com os TNFR1^{-/-}, que ao contrário, apresentaram massiva perda de tecido (CARGNELUTTI et al. 2014).

Novos estudos acerca do TNF em modelos de leishmanioses são necessários, pois os trabalhos indicam que a virulência das espécies de *Leishmania* está associada à diminuição ou mesmo inibição da ativação do fenótipo em M1 no local de infecção, acarretando menores índices de células produtoras de NO que, além de favorecer a persistência do parasito, não promove a resolução da inflamação. Como o TNFR1 parece ser mais proeminente que o TNFR2 nestes modelos de infecção, faz-se mister estudar melhor se o TNFR1 está diretamente envolvido na patogenicidade da *L. amazonensis*.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar o papel do TNFR1 na inibição da expressão de arginase 1 e indução da síntese de óxido nítrico nas lesões durante a infecção por *Leishmania amazonensis*, associando estes marcadores à suscetibilidade ou à resistência do hospedeiro bem como a participação do óxido nítrico para desencadear a resolução da inflamação em camundongos.

Objetivos específicos:

- Analisar a infecção de macrófagos *in vitro*, determinando o fenótipo associado à permissividade e resistência à *L. amazonensis* e a capacidade responsiva das células de camundongos TNFR1^{-/-} e selvagens ativados com IFN- γ e LPS, IL-4 e IL-10;
- Avaliar, *in vitro* e *ex vivo*, dentre as células mieloides a frequência de células positivas para arginase 1 e iNOS em camundongos TNFR1^{-/-} e selvagens;
- Analisar o desenvolvimento de lesões cutâneas em camundongos TNFR1^{-/-} e selvagens infectados com *L. amazonensis*;
- Analisar a carga parasitária nas lesões cutâneas dos camundongos TNFR1^{-/-} e selvagens infectados com *L. amazonensis*;
- Determinar o perfil das citocinas produzidas por camundongos TNFR1^{-/-} e selvagens infectados com *L. amazonensis*;
- Avaliar o perfil do infiltrado celular nas lesões cutâneas de camundongos TNFR1^{-/-} e selvagens infectados com parasitos *L. amazonensis*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Camundongos C57BL/6JUnib selvagens (C57BL/6) foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais. Camundongos C57BL/6 deficientes do receptor 1 (p55) do TNF (Tnfr1^{tm1Imx}, TNFRp55^{-/-}, TNFR1^{-/-}) foram obtidos originalmente dos Drs. Klaus Pfeffer (Institute of Medical Microbiology, Dusseldorf, Alemanha) e Phillip Scott (University of Pennsylvania, PA, EUA) (PFEFFER et al., 1993) e mantidos em colônia no biotério de criação do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB-UFMG em microisoladores ventilados, recebendo ração, cama e água estéreis. Para experimentos de inibição da enzima arginase 1, foi administrada L-Norvalina (L-NOR) (250 mg/L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) na água destes camundongos e administrada na ao longo do tempo experimental (POLIS et al., 2018).

Estes animais foram mantidos sob condições de temperatura e fotoperíodo controladas, em espaço com barreiras ambientais. Foi oferecida ração convencional para camundongos (Labina, Purina, Paulínea, SP, Brasil) e água filtrada *ad libitum*. Camundongos fêmeas com idade entre quatro a seis semanas foram utilizados ao início dos experimentos. Todos os procedimentos foram executados de acordo com os protocolos institucionais e internacionais que regulam a experimentação em animais (Protocolo CEUA nº 336/2012).

3.2. Parasitos

Leishmania amazonensis (IFLA/BR/67/PH8) foram mantidas em 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 100 µg/mL de estreptomicina (GIBCO), 1% de glutamina (GIBCO) 200 mM, 1% de adenina (Sigma-Aldrich) 10 mM em água, 0,2% de hemina (Sigma-Aldrich) 0,25% de NaOH 10mM, 0,1% biotina (Sigma-Aldrich). Os parasitos que expressam proteína fluorescente vermelha (RFP) (*L*

amazonensis-RFP) foram mantidas em meio 199 (GIBCO) completo suplementado com 0,01% de geneticina (GIBCO, e foram fornecidos pelo Dr. David Sacks (NIAID, NIH, Bethesda, EUA).

As culturas foram mantidas em estufa BOD (Quimis, Diadema, SP, Brasil) a 25°C, e repicadas a cada dois ou três dias, até no máximo 10 repiques. Após a décima passagem, os parasitos foram novamente isolados das patas de camundongos BALB/c, previamente infectados. Para o isolamento das culturas, os animais foram anestesiados com 100 µL de solução anestésica contendo cloridrato de cetamina (Vertbrands, Jacareí, SP, Brasil) a 100 mg/kg e cloridrato de xilazina (Vertbrands) a 10 mg/kg, e tiveram suas patas higienizadas com álcool. Em seguida, com o auxílio de uma seringa contendo uma agulha de calibre 26 G^{1/2}, através da punção das patas, o conteúdo da seringa foi transferido para o primeiro poço de uma placa de 96 poços (TPP, Trasadingen, Schaffhausen, Suíça) contendo 200 µL de meio 199 complet. Posteriormente, foram transferidos 50 µL do conteúdo do primeiro poço para o segundo poço e deste para o terceiro, e assim sucessivamente. A placa foi, então, selada e mantida em estufa BOD a 25°C. Após sete dias, formas promastigotas de *Leishmania* foram recuperadas da placa e mantidas em garrafas de cultura de 25 cm³ (Jetbiofil, Guangzhou, China).

3.3. Obtenção de Macrófagos de Medula Óssea (BMDM)

As células da medula óssea dos camundongos C57BL/6 selvagens e TNFR1^{-/-} foram obtidas a partir do lavado do fêmur e tibia com solução tampão fosfato salina (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). Finalmente, após sete 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) (ZHANG; GONÇALVES; MOSSER, 2008).

3.4. Ativação de Macrófagos Obtidos a Partir da Medula Óssea de Camundongos

Após a obtenção dos macrófagos derivados da medula óssea dos camundongos, 1×10^6 macrófagos foram ressuspensos em 2 mL de meio DMEM F12 (GIBCO) completo sem sobrenadante de cultura L929 em tubos de cultura (Jetbiofil) com os seguintes estímulos: 50 ng/mL de IFN- γ (BD) e 10 ng/mL de TNF (PreproTech, Ribeirão Preto, SP, Brasil), para ativação M1, ou 10 ng/mL de IL-4 (BD) e 10 ng/mL de IL-10, para ativação M2, e mantidos em estufa 37°C em atmosfera úmida e 5% de CO₂ até o dia seguinte. Quando necessário, os macrófagos foram tratados com 20 mg/mL (80 mM) e o inibidor seletivo de iNOS, L-N⁶-(Iminoetil)lisina (L-NIL), (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA) ou 2,343 mg/mL (20 mM) de L-NOR (Sigma Aldrich) durante a ativação.

3.5. Avaliação do Índice de Infecção de Macrófagos de Medula Óssea (BMDM) Infectados por *Leishmania* e Obtenção de Sobrenadante para Dosagem de Nitrito

Após a obtenção dos macrófagos derivados da medula óssea dos camundongos, 3×10^5 macrófagos foram ressuspensos em 150 μ L de meio DMEM F12 (GIBCO) completo sem sobrenadante de cultura L929 e colocados sobre lamínula em placas de 24 poços (KASVI, São José dos Pinhais, PR, Brasil) e mantidas em estufa 37°C por 2 horas em placas, após este período foram adicionados mais 150 μ L de meio DMEM F12 (GIBCO) completo sem sobrenadante de cultura L929. Após esse período foram feitas as infecções *in vitro* na proporção de três parasitos (promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*) por macrófago e incubados por 4 horas.

Após 4 horas de infecção, os parasitos não interiorizados foram removidos por lavagem dos poços com PBS aquecido a 37°C, procedimento repetido por três vezes. No tempo de 4 horas as células foram fixadas e coradas para contagem de parasitos interiorizados como controle de fagocitose. Para os demais tempos, novo meio DMEM F12 (GIBCO) completo sem o fator L929 foi adicionado junto aos estímulos: 2,5 ng/mL de IFN- γ (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA), 100 ng/mL de LPS (InvivoGen, San Diego, CA, EUA) e 40 U/mL de IL-4 (BD) e mantidos ao longo do tempo experimental, lavadas e fixadas e coradas para contagem de parasitos nestas células.

As lamínulas foram coradas utilizando-se o sistema de coloração hematológica Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil). O número de amastigotas e macrófagos infectados foi determinado pela contagem de pelo menos 300 células por amostra. Os resultados foram expressos como índice de infecção: (porcentagem de células infectadas x número de amastigotas)/número total de células.

Em todos os tempos do ensaio foram coletados os sobrenadantes para avaliação da produção óxido nítrico através da dosagem de nitrito presente na cultura.

3.6. Obtenção de Sobrenadante para Detecção de Citocinas e Proteínas para Dosagem da Atividade de Arginase

Para a obtenção de sobrenadantes para a dosagem de citocinas e óxido nítrico, após a obtenção dos macrófagos derivados da medula óssea dos camundongos, 5×10^5 macrófagos foram ressuspensos em 500 μ L de meio DMEM F12 (GIBCO) completo sem sobrenadante de cultura L929 e colocados em placas de 48 poços (Jetbiofil) e mantidos em estufa 37°C por 2 horas.

Após este período, foram infectados na proporção cinco 5 parasitos (promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*) por macrófagos e incubados por 4 horas em estufa 34°C e lavadas três vezes com PBS aquecido a 37°C para remoção dos parasitos extracelulares e novamente incubadas em meio DMEM F12 (GIBCO) completo sem o fator L929, junto aos estímulos: 2,5 ng/mL de IFN- γ (BD), 100 ng/mL de LPS (InvivoGen) e 40 U/mL de IL-4 (BD) e mantidos ao longo do tempo experimental.

Após 24 horas foi coletado o sobrenadante para dosagem de TNF por ELISA. Com 48 horas realizamos ensaio da atividade de arginase e coleta do sobrenadante de cultura para posterior medição da produção das demais citocinas por ELISA e também para a dosagem de nitrito.

3.7. Infecção dos Camundongos

Para realização das infecções foram utilizadas 1×10^4 formas promastigotas metacíclicas dos parasitos, com cinco dias de cultura. As promastigotas metacíclicas foram obtidas por separação de parasitos da fase estacionária através de gradiente de densidade como descrito anteriormente (SPÄTH; BEVERLEY, 2001). Em síntese, as culturas de *Leishmania* em fase estacionária foram centrifugadas a 2000 x g a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi, então, desprezado e o sedimento recuperado em 2 mL de PBS, sendo este transferido para um tubo contendo gradiente de Ficoll (Ficoll® 400, Sigma-Aldrich), o qual é composto por uma fase de Ficoll 20% e outra fase de Ficoll 10%. Esse material foi centrifugado a 1100 x g por 10 minutos a 4°C, e a fase contendo as formas metacíclicas foi coletada e lavada duas vezes com PBS antes de ser usada para a infecção. O volume do inóculo injetado na patas dos camundongos foi de 40 μ L por pata. A lesão induzida nesses camundongos foi acompanhada semanalmente, com o auxílio de paquímetro analógico (Mitutoyo Co., Kawasaki, Kanagawa, Japão).

3.8. Quantificação de Parasitos

A quantificação de parasitos foi realizada pela técnica de diluição limitante (VIEIRA et al., 1996), em que 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 50 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 400 μ L de meio de 199 (GIBCO). Em uma placa estéril de poliestireno com 96 poços e fundo chato (TPP), foram colocados 150 μ L/poço de meio de Grace's (GIBCO) completo, exceto na primeira coluna de poços, onde foram colocados 200 μ L 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 7-14 dias após o início da cultura.

3.9. Dosagem da Atividade da Enzima Arginase

A atividade de arginase *ex vivo* foi mensurada a partir do lisado de células do homogenato das patas e *in vivo* a partir da lise das células aderidas após 48 horas de infecção (CORRALIZA et al., 1994), com algumas modificações (KROPF et al., 2005). As patas e orelhas, infectadas ou não, foram maceradas, como descrito anteriormente, e do homogenato obtido, 35 μ L foram utilizados para o ensaio. As células que se encontravam no homogenato foram lisadas com 50 μ L de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) a 0,1% por 30 minutos em agitação. Os macrófagos da cultura de 48 horas também foram lisados com 50 μ L de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) a 0,1% por 30 minutos em agitação, a partir de então os protocolos seguem iguais. Após a lise, ativou-se as enzimas com a adição de seus co-fatores: 50 μ L de 10 mM $MnCl_2$ e 50 μ L de 50 mM TrisHCl (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 mensurar a atividade da enzima foi adicionado às amostras o seu substrato, 50 μL de L-arginina a 0,5 mM (Sigma-Aldrich) (pH 9,7) e as amostras foram incubadas a 37°C por 60 minutos. Em seguida a reação foi parada com a adição de 400 μL de uma solução de ácidos ($\text{H}_2\text{SO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$) na proporção de 1:3:7 respectivamente. Foram então adicionados 25 μL de α -isonitrosopropiofenol (Sigma Aldrich) 9% em etanol 100%. A placa foi então incubada a 95°C por 45 minutos. A curva padrão foi feita a partir de uréia (Sigma Aldrich) 1 mg/mL diluída 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 órgão. Cada unidade é definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μmol uréia/minuto.

3.10. Extração de Tecido para Dosagem de Citocinas na Lesão

Nos tempos determinados para o estudo das lesões, os camundongos foram eutanasiados como descrito acima e as patas dos camundongos infectados e não infectados foram retiradas e congeladas a -70°C para posterior dosagem de citocinas. Após o descongelamento dos tecidos, as patas foram pesadas e foi adicionada solução para extração de citocinas: uma cápsula do inibidor de proteases (ROCHE, Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) diluída em 50 mL de PBS, na proporção de 1000 μL desta solução para 50 mg de tecido. O tecido foi, então, macerado com homogeneizador elétrico e centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido, e congelado a -70°C até a realização do teste de ELISA. Dosagem de Nitrito

A síntese de óxido nítrico foi estimada a partir da dosagem de nitrito encontrada nos sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados com *Leishmania* ou não na presença de diversos estímulos pelo método de Griess. Em cultura, o radical $\bullet\text{NO}$ é oxidado a NO_2^- . O NO_2^- , quando reage com o Griess, gera uma coloração púrpura cuja intensidade é medida por espectrofotometria (545 nm) (GREEN et al., 1982).

50 μ L das amostras foram colocadas em uma placa de 96 poços e o padrão nitrito de sódio (250 μ M), que foi diluído (1:2) nos poços posteriores. Poços em branco consistiam apenas de meio DMEM F12 (GIBCO) completo. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de solução de Griess em todos os poços ocupados da placa. A placa foi mantida no escuro por 10 minutos e a densidade ótica foi determinada por leitura em espectrofotômetro (Microplate Spectrophotometer System, modelo SPECTRAmax 340, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

3.11. Detecção de Citocinas Por Elisa

As dosagens de IL-10 foram obtidas a partir do homogenato de tecido descrito acima 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.

3.12. Citometria de Fluxo

Patas de camundongos C57BL/6 selvagens e TNFR1^{-/-} foram coletadas após infecção por e *L. amazonensis*. As amostras foram cortadas em pedaços menores e incubadas por 90 minutos em 1 mL de meio RPMI (GIBCO) sem SFB contendo 62,5 μ g/mL de liberase TL (Roche) e 0,5 mg/mL de desoxiribonuclease I (Sigma Aldrich). Após este período foi adicionado mais 1 mL de RPMI 10% SFB por amostra. As amostras foram então maceradas, e o homogenato centrifugado a 400 x g por 10 minutos a 4°C.

Posteriormente, as células foram incubados por 30 minutos com a sonda DAF-FMTM diacetato (Invitrogen) (1 μ M) estufa de atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO₂, lavadas com três vezes com PBS e novamente incubadas em atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO₂ por mais 30 minutos. Na sequência, as células foram lavadas e mantidas por 20 minutos a 4°C com o kit para avaliação de viabilidade celular LIVE/DEADTM (Life Technologies, Grand

Island, NY, EUA) seguindo as especificações do fabricante junto ao anticorpo anti-Fc- γ III/II CD16/32 (clone 2.4G2) com as seguintes combinações de anticorpos monoclonais fluorescentes: Super Bright 645 anti-CD11b (clone M1/70) (Invitrogen); Pacific Orange anti-CD45 (clone 30-F11) (Invitrogen); PerCP-Cy5.5 anti-Ly6C (clone HK1.4) (BD); Super Bright 600 anti-Ly6G (clone 1A8-Ly6g) (Invitrogen); APC-Cy7 anti-MHC II (clone M5/114.15.2) (BD); PE-Cy7 anti-F4/80 (clone BM8) (BD); PE anti-TNFR1 (clone HM104) (Invitrogen) (exceto quando utilizados parasitos RFP⁺).

Em seguida, adicionou-se 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, este procedimento foi repetido por três vezes. Em seguida, as células foram permeabilizadas com Perm/Wash Buffer™ (BD) e marcadas por 45 minutos a 4°C com o anticorpo anti Fc- γ III/II CD16/32 (clone 2.4G2) a combinação de anticorpos monoclonais fluorescentes: Alexa Fluor 700 anti-Arginase 1 (clone A1EXF5) (Invitrogen); APC anti-iNOS (clone CXNFT) (BD).

Em seguida, adicionou-se 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, repetiu-se este procedimento por três vezes. Então, as amostras foram adquiridas e as células totais foram adquiridas para cada amostra, usando o citômetro de fluxo LSRFortessa™ (BD). As análises foram realizadas no software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA).

3.13. Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM) para cada grupo. Nos ensaios de cinética de produção de citocinas foi realizado o teste Two-Way ANOVA, seguido de Sidak para determinar diferenças entre os tempos e os grupos avaliados. Para determinar diferenças entre os grupos, foi utilizado o teste t de Student usando distribuição bi-caudal com amostras não pareadas, após a aplicação do teste de normalidade e verificação da simetria dos dados. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo

programa GraphPad Prism versão 6.00 para IOS. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. TNFR1 Orquestra a Expressão de iNOS E Arginase 1 Durante o Processo Inflamatório.

Para avaliar o impacto do receptor 1 do TNF no modelo de infecção subcutâneo por *L. amazonensis*, medimos as lesões das patas dos camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} semanalmente após a infecção com 1x10⁴ promastigotas metacíclicas (Figura 7A). As lesões se desenvolveram similarmente até oitava semana, a partir da nona os camundongos selvagens conseguiram controlar a lesão, enquanto que nos TNFR1^{-/-} as lesões continuaram a se desenvolver até o fim do tempo experimental (Figura 7B).

Nos tempos de 6, 9 e 12 semanas após a infecção avaliamos o perfil do infiltrado das células mieloides (neutrófilos e fagócitos mononucleares) por citometria. O número de CD11b⁺CD45⁺ (células mieloides) vivas (LIVE/DEAD⁻) foi similar entre os grupos ao longo dos tempos experimentais bem como a frequência de células CD11b⁺CD45⁺Ly6G⁺ (neutrófilos) e de CD11b⁺CD45⁺Ly6C⁺MHC-II⁺F4/80⁻ (células dendríticas, população P2). Já os monócitos CD11b⁺CD45⁺Ly6C⁺MHC-II⁻ (população P1) foram mais abundantes nos camundongos TNFR1^{-/-} na primeira semana, mas nos tempos subsequentes foram similares entre os grupos. Por fim, as células CD11b⁺CD45⁺Ly6C⁺MHC-II⁺F4/80⁺ (macrófagos, população P3) apresentaram frequências similares no primeiro tempo experimental entre os grupos, porém nos tempos de 9 e 12 semanas após a infecção, foram mais frequentes nas lesões dos camundongos selvagens (Figura 7C).

Interessantemente, P3 foi o grupo celular que apresentou a maior frequência de células TNFR1⁺ no ponto de inflexão da inflamação, cerca de 40% de P3 expressavam TNFR1 no tempo de 9 semanas após a infecção (Figura 7C). Também avaliamos a expressão das enzimas arginase 1 (ARG1) e iNOS em cada uma das subpopulações de fagócitos mononucleares e observamos que a expressão iNOS, com a coexpressão ou não de arginase 1, foi mais frequente em P3 nos camundongos selvagens no tempo de 9 semanas de infecção do que nos camundongos TNFR1^{-/-} (Figura 7D). Em P2, observou-se maior frequência de células

iNOS⁺ARG1⁻ nas patas dos camundongos selvagens em relação aos camundongos TNFR1^{-/-} (Figura A1, apêndice 1). Já em P3, as células iNOS⁻ARG1⁺ apresentaram frequência similares até a nona semana após a infecção, sendo que na décima segunda semana de infecção, estas células aumentaram nos camundongos selvagens e foram mais abundantes que nos TNFR1^{-/-} (Figura 7D). Nenhuma correlação entre a expressão de TNFR1 e iNOS foi observada.

Coletivamente, estes dados sugerem o TNFR1 é fundamental para o controle da lesão na infecção por *L. amazonensis* por ser necessário para a expressão de iNOS em células dendríticas e, principalmente, em macrófagos, conferindo resistência ao hospedeiro.

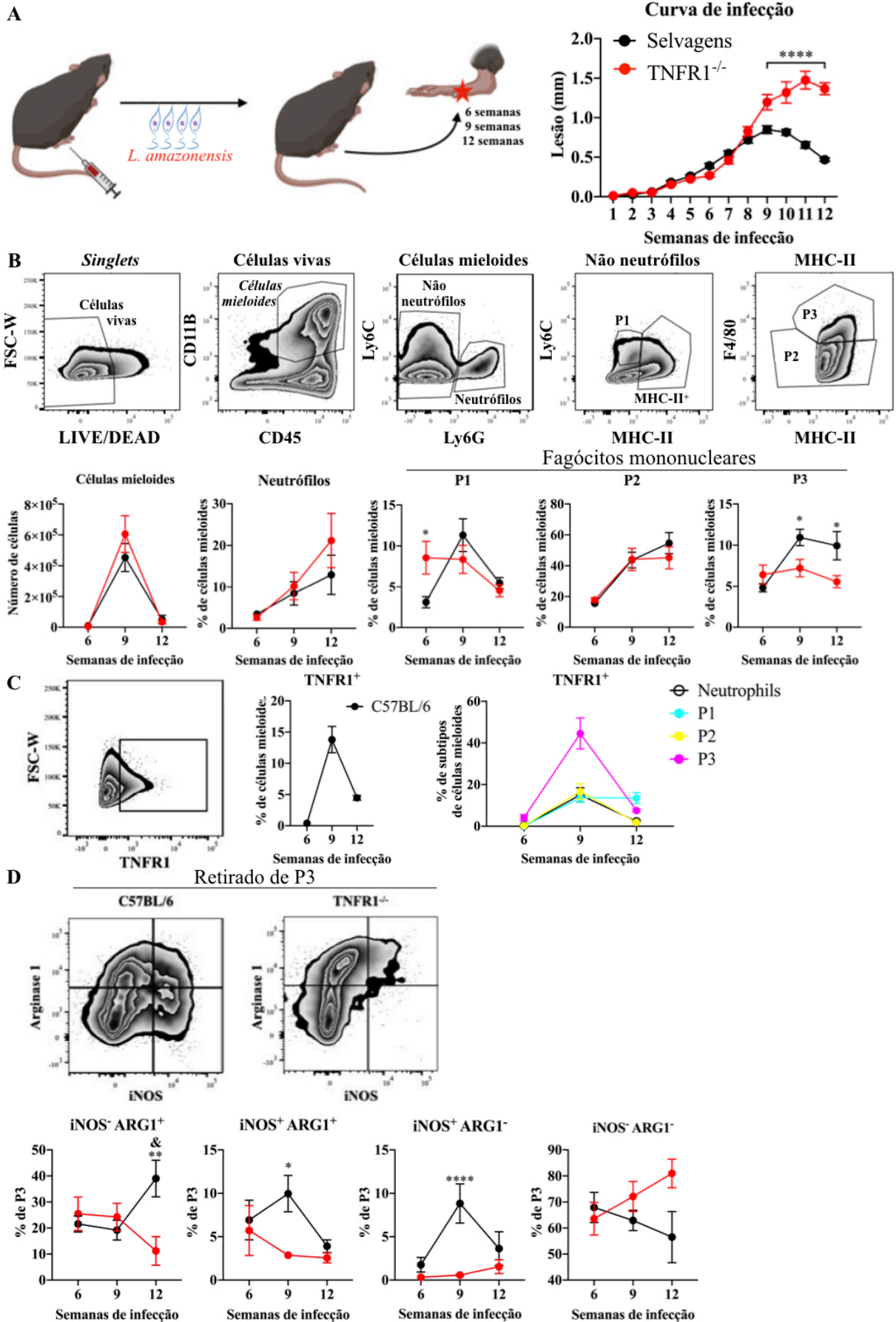


Figura 7. TNFR1 orchestra a expressão de iNOS e arginase 1 durante o processo inflamatório.

4.2. TNFR1 Auxilia no Controle da Carga Parasitária Total.

Pela técnica de diluição seriada foi possível analisar a carga parasitária total das patas dos camundongos. Observamos que carga parasitária se desenvolve de modo similar nos dois grupos experimentais, contudo, com 12 semanas de infecção, camundongos selvagens apresentaram menor carga parasitária que os camundongos TNFR1^{-/-} (Figura 8A).

Apesar da carga parasitária ser menor nos camundongos selvagens na décima segunda semana em relação aos TNFR1^{-/-}, não observamos, por citometria de fluxo, diferenças no número nem na frequência de células mieloides infectadas. A frequência de neutrófilos e de fagócitos mononucleares entre os grupos estudados também foi similar (Figuras 8B e 8C).

Utilizamos a sonda DAF-FMTM diacetato para avaliarmos a frequência de células produtoras de óxido nítrico e a intensidade desta produção, contudo não observamos diferença na frequência dos subtipos de fagócitos mononucleares produtores de óxido nítrico ou na intensidade de produção óxido nítrico por estas células (Figuras 8D e 8E)

Coletivamente, estes dados revelam que o TNFR1 auxilia no controle da carga parasitária total, pois na presença deste receptor a carga parasitária nas patas é menor nos tempos finais de infecção, apesar deste controle não corresponder no nível das células mieloides e seus subtipos.

(A) Desenho experimental. Camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} foram infectados na pata traseira com 1x10⁴ promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* selvagens ou que expressavam RFP. O tamanho das lesões foi mensurado semanalmente. Infiltrado inflamatório nas patas infectadas foi caracterizado na sexta, nona ou décima segunda semana após a infecção. (B) Em cima: Zebra plots da estratégia de *gate* utilizada para analisar neutrófilos e fagócitos mononucleares (P1, P2 e P3) extraídos das patas infectadas dos camundongos por citometria de fluxo. Abaixo: Número absoluto de células mieloides e os percentuais de neutrófilos e monócitos mononucleares nas patas de camundongos selvagens (círculos pretos) ou TNFR1^{-/-} (círculos vermelhos) avaliados por citometria de fluxo. A pata inteira foi utilizada para extração e de células e todas foram adquiridas nas análises por citometria de fluxo. Média de 2 experimentos independentes. (C) Zebra plot e quantificação das células mieloides e seus subgrupos expressando TNFR1 em camundongos selvagens. (D) Em cima: Zebra plots mostrando a células P3 de acordo com a expressão de arginase 1 e iNOS. Abaixo: Percentual de células P3 de acordo com a expressão de arginase 1 e iNOS de camundongos selvagens (círculos pretos) ou TNFR1^{-/-} (círculos vermelhos). Resultados do *pool* de dois experimentos independentes. n = 3-5 camundongos por tempo experimental. Dados são a média ± SEM. *p = 0,05; **p = 0,01; ****p = 0,0001; & p = 0,05 entre o mesmo grupo experimental.

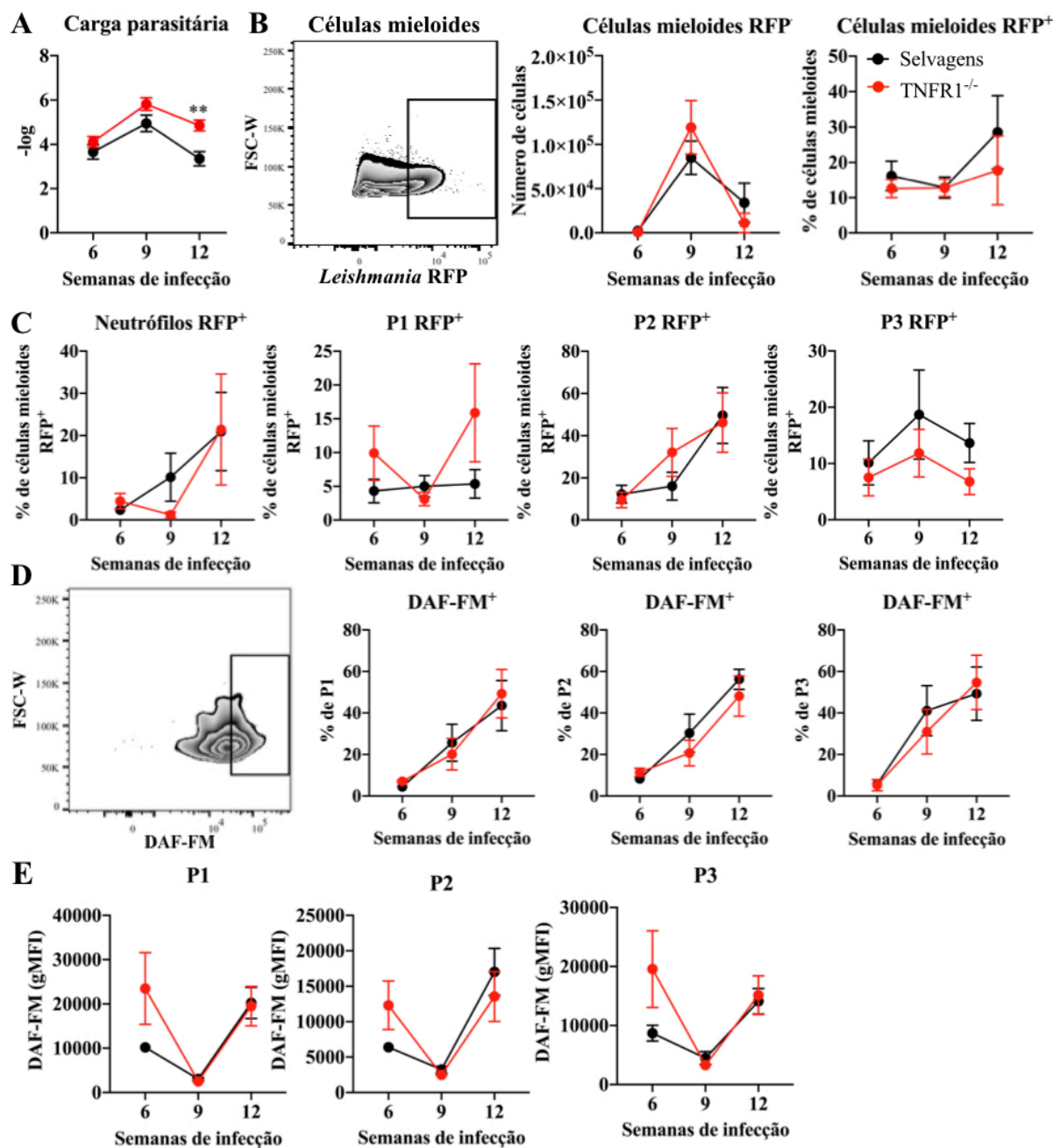


Figura 8. TNFR1 auxilia no controle da carga parasitária total.

(A) Carga parasitária total das patas infectadas com 1×10^4 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* RFP⁺. (B) Número total e frequência de células mieloides infectadas (RFP⁺). (C) Subtipos de células mieloides infectadas. (D) Frequência dos subtipos de fagócitos mononucleares positivos para sonda DAF-FMTM diacetato, marcador de óxido nítrico total. (E) Média geométrica da intensidade de fluorescência nos subtipos de fagócitos mononucleares. Resultado do *pool* de dois experimentos independentes. n = 3-5 camundongos por tempo experimental. Dados são a média \pm SEM. **p = 0,01.

4.3. Macrófagos Derivados da Medula Óssea de Camundongos TNFR1^{-/-} são mais Suscetíveis à Infecção Por *L. amazonensis* por Produzirem Menos Óxido Nítrico.

Os macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) dos camundongos TNFR1^{-/-} são mais suscetíveis à infecção por *L. amazonensis* que os de camundongos selvagens, pois o produto das diferenças entre o número de amastigotas e a frequência de BMDMs infectados resultou em um maior índice de infecção dos tempos de 48 e 72 horas (Figura 9A).

BMDMs estimulados por IFN- γ e LPS dos camundongos TNFR1^{-/-} produzem menos óxido nítrico do que BMDMs de camundongos selvagens quando infectados por *L. amazonensis*, sendo este um fator que explicaria a maior susceptibilidade dos BMDMs TNFR1^{-/-} e quiçá dos próprios camundongos deficientes deste receptor (Figura 9B).

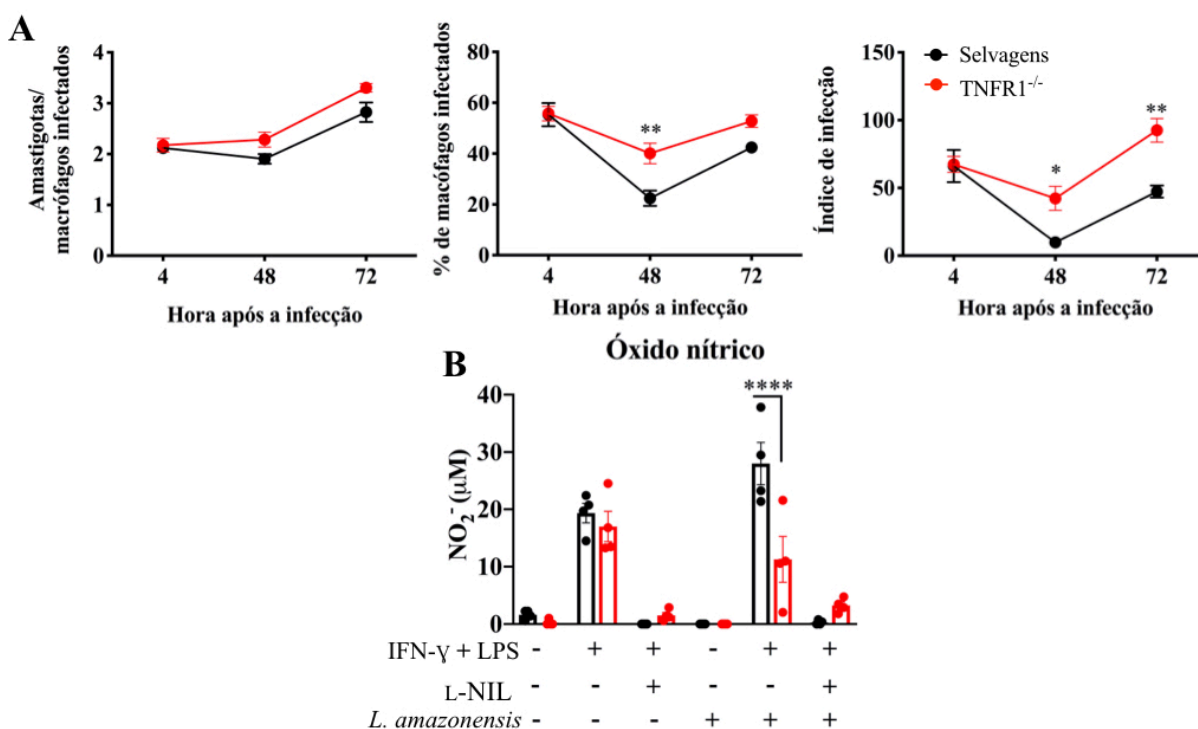


Figura 9. Macrófagos Derivados de Medula Óssea de Camundongos TNFR1^{-/-} são mais Suscetíveis à Infecção por *L. amazonensis* do que os Selvagens.

(A) Os macrófagos foram cultivados na presença de *L. amazonensis* por 4, 24 e 72 horas para avaliação da infecção por microscopia ótica. (B) Avaliação da produção de nitrito do sobrenadante das culturas de macrófagos estimulados ou não com IFN- γ e LPS e na presença ou não de L-NIL, um inibidor da enzima iNOS pelo método de Griess. Resultados da média de dois experimentos independentes. n = 3-5 camundongos por tempo experimental. Dados são a média \pm SEM. *p = 0,05; **p = 0,01; ****p = 0,0001.

4.4. A Inibição da Arginase 1 Aumenta Resistência dos Camundongos TNFR1^{-/-} à Infecção por *L. amazonensis*.

A atividade da enzima arginase não difere entre os camundongos C57BL/6 selvagens e TNFR1^{-/-} ao longo de todo o tempo experimental, tampouco entre os BMDMs das duas linhagens, quaisquer que sejam as condições (Figura 10A e 10B). Entretanto, a inibição da enzima pela utilização de L-norvalina (L-NOR) aumenta a resistência dos camundongos TNFR1^{-/-} à infecção por *L. amazonensis*, diminuindo a lesão e a carga parasitária no tempo final e (Figura 9C).

A inibição da arginase 1 não alterou os índices de células mieloides e seus subtipos, entre eles os neutrófilos e fagócitos mononucleares, assim como não interferiu na expressão das enzimas iNOS e arginase 1 em P3 e P2 no tempo de 9 semanas de infecção (Figura 10D, 10E e A2).

Coletivamente, estes dados indicam que a inibição da enzima arginase 1 aumenta, por si só, a resistência dos camundongos TNFR1^{-/-}, ou seja, sem alterar os demais para parâmetros analisados.

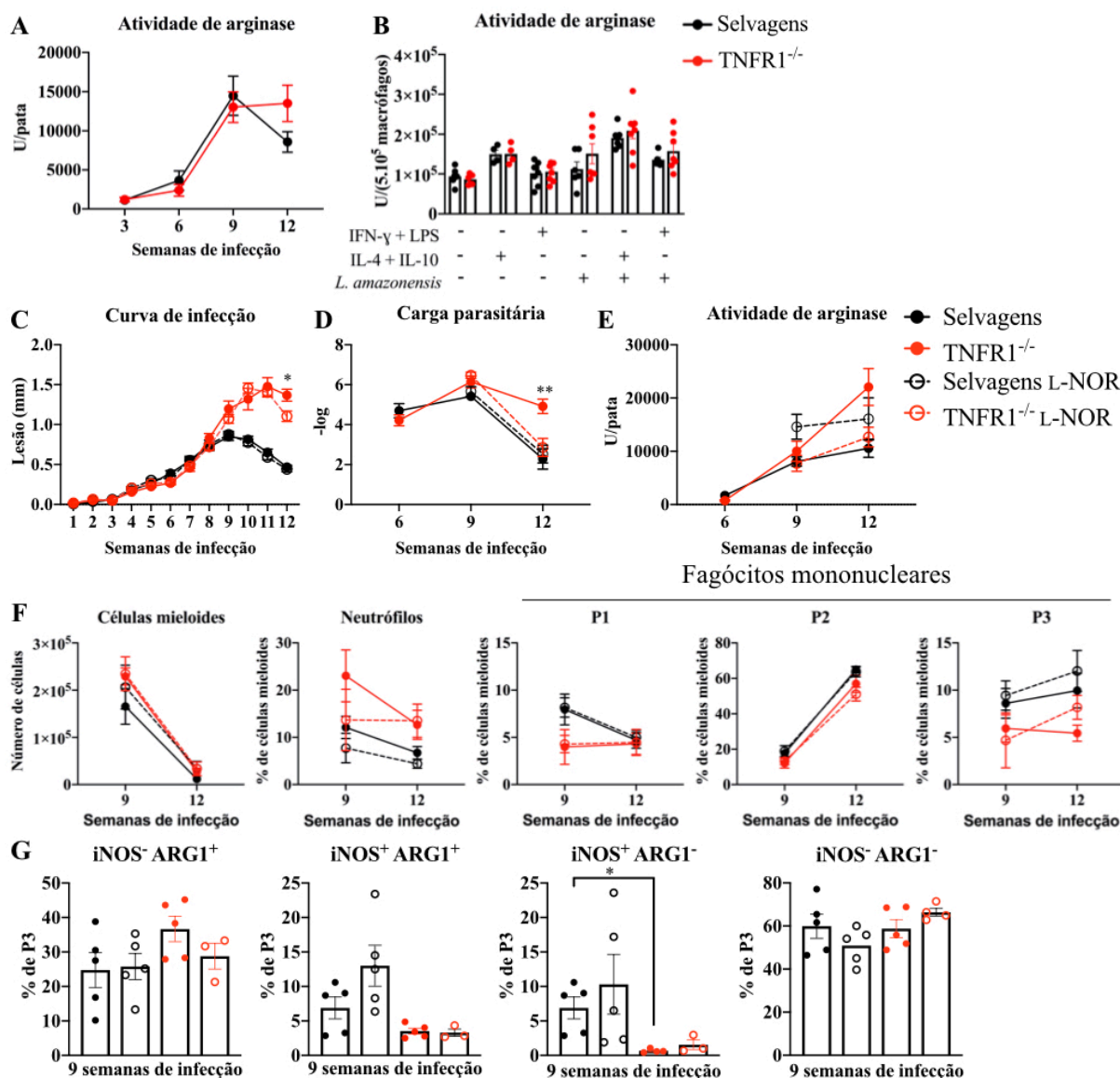


Figura 10. A inibição da arginase 1 aumenta resistência dos camundongos TNFR1^{-/-} à infecção por *L. amazonensis*.

(A) Avaliação da atividade de arginase nas patas infectadas de camundongos selvagens (círculos pretos) ou TNFR1^{-/-} (círculos vermelhos) com 1x10⁴ promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*. (B) Atividade de arginase em macrófagos estimulados com IL-4 e IL-10 ou IFN- γ e LPS infectados ou não com *L. amazonensis*. (C) O tamanho das lesões foi mensurado semanalmente. (D) Carga parasitária total de patas de camundongos tratados com o inibidor da arginase 1 L-NOR ou não. (E) Avaliação da atividade de arginase das patas de camundongos tratados com o inibidor da arginase 1 L-NOR ou não. (F) Número absoluto de células mieloides e os percentuais de neutrófilos e fagócitos mononucleares nas patas de camundongos selvagens (círculos pretos) ou TNFR1^{-/-} (círculos vermelhos) tratados ou não com L-NOR avaliados por citometria de fluxo. (G) Percentual de células P3 de acordo com a expressão de arginase 1 e iNOS de camundongos tratados ou não com L-NOR. A pata inteira foi utilizada para extração e de células e todas foram adquiridas nas análises por citometria de fluxo. Percentual de células P3 de acordo com a expressão de arginase 1 e iNOS. Média de 1 experimentos. n = 3-5 camundongos por tempo experimental. Dados são a média \pm SEM. *p = 0,05.

4.5. A Presença do TNFR1 é Importante para o Término do Processo Inflamatório Ocasionado pela Infecção por *L. amazonensis*.

Em seguida, avaliamos também impacto do receptor 1 do TNF nas populações de células linfoides ao tempo de 12 semanas após a infecção subcutânea por *L. amazonensis*. Observamos maior número de células CD45⁺, TCRβ⁺, tanto TCD8⁺ quanto TCD4⁺ nos camundongos TNFR1^{-/-} (Figura 11B). Entretanto, a frequência destas células no infiltrado inflamatório foi similar entre os dois grupos (Figura 11C).

Quando analisamos as células TCD4⁺ regulatórias, observamos que estavam mais frequentes nas lesões dos camundongos selvagens do que nas lesões dos camundongos TNFR1^{-/-} (Figura 11E). Ainda, esta diferença se refletiu na produção de IL-10, que foi maior também nos camundongos selvagens no tempo final de infecção (Figura 11F).

Logo, estes dados indicam que o TNFR1 é importante para resolução da resposta inflamatória, evidenciada pelo menor número de células T na lesão, maior frequência de células T regulatórias e maior produção de IL-10 no tempo final de infecção.

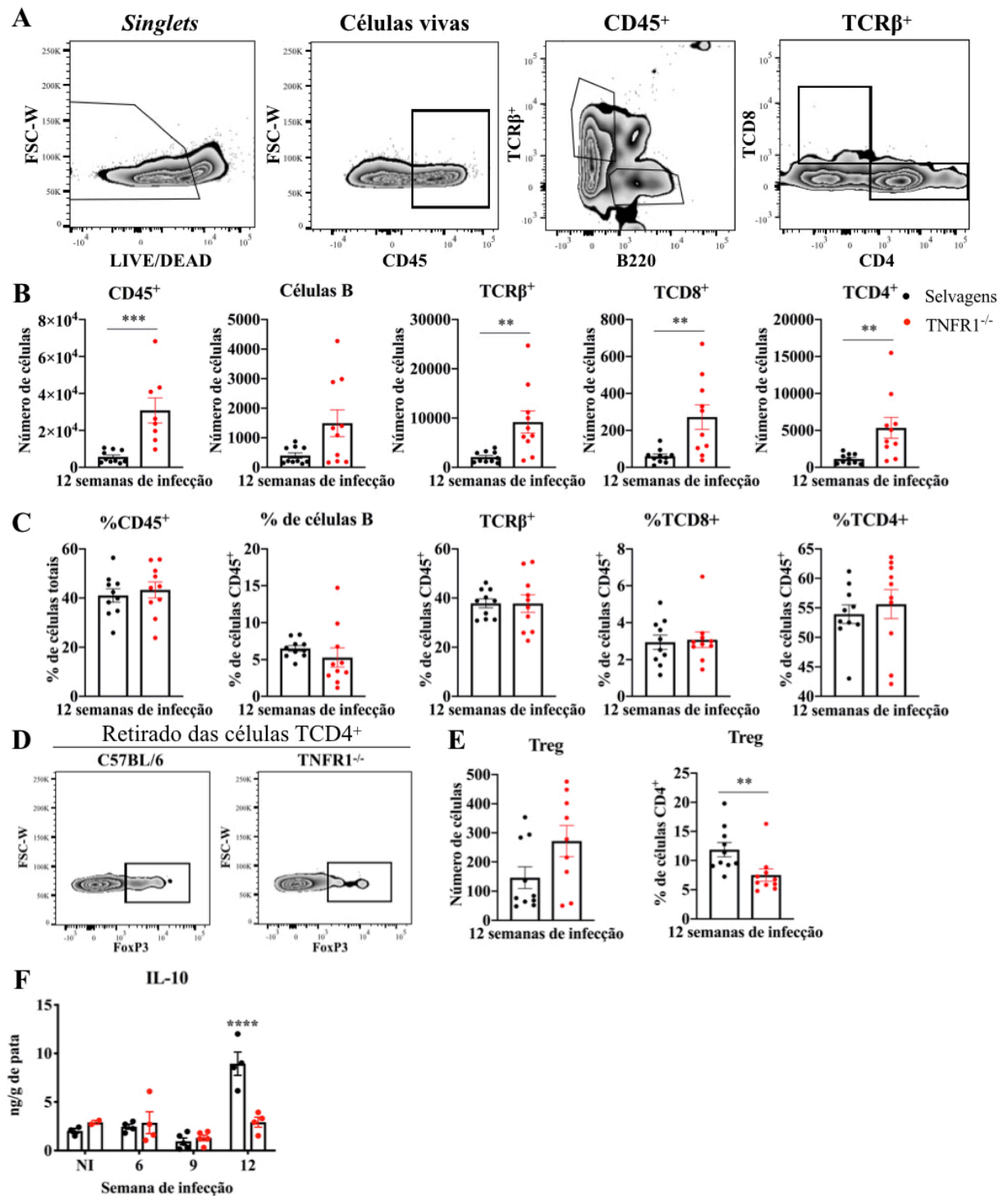


Figura 11. TNFR1^{-/-} é importante para terminação do processo inflamatório ocasionado pela infecção por *L. amazonensis*.

(A) Zebra plots da estratégia de gate utilizada para analisar células B e T extraídas das patas infectadas dos camundongos por citometria de fluxo. (B) Número absoluto e (C) percentual de células CD45⁺, células B, células TCRβ⁺, linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺ nas patas de camundongos selvagens (círculos pretos) ou TNFR1^{-/-} (círculos vermelhos) avaliados por citometria de fluxo. A pata inteira foi utilizada para extração e de células e todas foram adquiridas nas análises por citometria de fluxo. (D) Zebra plot e quantificação das células TCD4 regulatórias. (E) Avaliação da produção de IL-10 por ELISA nas patas dos camundongos. Resultados do pool de dois experimentos independentes. n = 3-5 camundongos por tempo experimental. Dados são a média ± SEM. **p = 0,01; ***p = 0,001; ****p = 0,0001.

5. DISCUSSÃO

A necessidade da ação conjunta do TNF e IFN- γ para ativação de mecanismos efetores contra parasitos intracelulares é conhecida há tempos (GREEN et al., 1990a). Macrófagos e outros fagócitos quando estimulados por estas duas citocinas expressam iNOS, uma enzima com alta capacidade de produção de NO, um gás liofílico que apresenta toxicidade contra diversos parasitos intracelulares, inclusive aqueles do gênero *Leishmania* (KARUPIAH et al., 1993; NATHAN; HIBBS, 1991). Através da sinalização via IFN- γ , ocorre a fosforilação de dímeros de STAT1 e a ativação do fator de transcrição IRF1, essencial para a expressão de iNOS (OHMORI; SCHREIBER; HAMILTON, 1997). Entretanto, a expressão de iNOS não necessariamente resulta em produção de NO, para tanto se faz necessário o TNF; uma citocina pleiotrópica. Dentre suas funções, o TNF se destaca como potente agente pró-inflamatório capaz de ativar diversas células do sistema imune, principalmente, favorecendo ativação macrófagos para o fenótipo M1, uma vez que o TNF inibe a sinalização IL-4R α , via de ativação M2 (KRATOCHVILL et al., 2015; SCHLEICHER et al., 2016). Logo, camundongos deficientes de TNF são suscetíveis a infecção por *L. major*, assim como camundongos deficientes do TNFR1 que, interessantemente, são capazes de controlar o parasitismo, mas não a lesão (FROMM et al., 2015; VIEIRA et al., 1996; WILHELM et al., 2001).

Camundongos TNFR1^{-/-} mantêm forte inflamação na fase crônica quando infectados por *L. major* e *L. amazonensis*, o que sugere que essa imunopatologia seja desencadeada pela infecção é a provável causa de suscetibilidade destes animais (CARGNELUTTI et al. 2014; OLIVEIRA et al., 2012). Diante da complexidade inerente à inflamação por *Leishmania*, cuja atividade do TNF parece estar intrinsecamente associada, principalmente via receptor 1, questionou-se a atuação do TNFR1 na infecção por *L. amazonensis*.

A infecção com 1×10^4 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* nas pata revelou que o TNFR1 é essencial para cura clínica da lesão neste modelo bem como no caso de infecção por *L. major* (OLIVEIRA et al., 2012; VIERA et al, 1996). Na décima quinta semana de infecção, camundongos TNFR1^{-/-} apresentam massiva perda de tecido com áreas

características de necrose e maior infiltrado inflamatório, evidenciando a continuidade do processo inflamatório (CARGNELUTTI et al. 2014). Nos tempos analisados, não encontramos diferenças no número de células mielóides presente nas lesões, mesmo na décima segunda semana após a infecção, quando o experimento foi interrompido. Entretanto, o infiltrado de células mielóides não apresentou a mesma composição, sendo que na nona semana após a infecção a frequência de macrófagos na lesão dos camundongos selvagens era aproximadamente 50% maior que nas lesões dos TNFR1^{-/-} e 78% na décima segunda semana. Macrófagos são as principais células envolvidas nas infecções por *Leishmania*, pois são as células hospedeiras do parasito bem como as células efetoras na eliminação do parasito (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015).

Além disso, dentre as células mielóides, os macrófagos foram as células que mais expressaram TNFR1 no auge da inflamação, cerca de 45% dos macrófagos totais dos camundongos selvagens expressavam TNFR1 na nona semana de infecção. Apesar de não haver correlação entre a expressão de TNFR1 e iNOS por macrófagos, na nona semana de infecção poucos macrófagos dos camundongos TNFR1^{-/-} expressavam iNOS, sendo que 2,87% destes expressavam iNOS conjuntamente a arginase 1. Já entre os macrófagos dos camundongos selvagens, a expressão exclusiva de iNOS foi observada em 9,96% desta população, outros 8,85% dos macrófagos selvagens coexpressavam iNOS e arginase 1, dados bem similares ao observado nas infecções por *L. major* com camundongos selvagens e deficientes de TNF (SCHLEICHER et al., 2016). Assim, temos que no pico da infecção, macrófagos de camundongos selvagens apresentam o fenótipo M1 em maior proporção do que nos camundongos TNFR1^{-/-}, o que explicaria o subsequente controle da lesão pelos selvagens e a falha neste controle por parte dos camundongos deficientes do receptor 1.

Uma vez observada a maior expressão de iNOS pelos macrófagos dos camundongos selvagens, buscou-se avaliar a capacidade dos macrófagos em eliminar o parasito na presença ou não do TNFR1. Então, infectaram-se macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) dos dois grupos experimentais com *L. amazonensis*. Com isto, observou-se que os macrófagos dos

diferentes grupos possuem capacidade fagocítica similar. Os resultados obtidos *in vitro* corroboram aqueles *ex vivo* referentes à frequência de macrófagos do fenótipo M1. Ambos os camundongos apresentam macrófagos do fenótipo M1 com a mesma capacidade de eliminar o parasito, por isso, o mesmo número de amastigotas é encontrado no interior dos macrófagos. Contudo, o fenótipo M1 é mais frequente entre os macrófagos de camundongos selvagens, portanto, menor a porcentagem de macrófagos infectados. Aliás, reforçando a maior capacidade de se ativarem em M1, macrófagos dos camundongos selvagens estimulados com IFN- γ e TNF infectados com *L. amazonensis* produzem maiores quantidade de NO, fato evidenciado pela mensuração indireta de nitrito. Resultados similares foram obtidos com camundongos TNF^{-/-} infectados com *L. major*, que revelou a importância desta citocina para macrófagos M1 expressarem iNOS sem expressarem arginase 1, ou seja, na ponta do espectro M1 — M(IFN- γ), capazes de produzirem grandes quantidades de NO (MURRAY et al., 2014; SCHLEICHER et al., 2016).

Entretanto, experimentos *ex vivo* evidenciaram não haver diferenças na carga parasitária das patas até a nona semana de infecção, no tempo de doze semanas de infecção, porém, o parasitismo foi maior nas patas dos camundongos TNFR1^{-/-}. Para ver em quais células estes parasitos se encontravam, utilizou-se uma *L. amazonensis* que expressa proteína fluorescente vermelha (Red fluorescent protein — RFP). A análise mostrou não haver diferenças em nenhuma das subpopulações de células mieloides. Corroborando este resultado, observou-se através da utilização da sonda DAF-FMTM diacetato, captadora de NO, frequências similares dos subtipos de células mieloides produtoras de NO entre camundongos selvagens e deficientes de TNFR1, que apresentaram, ainda, a mesma capacidade de produção deste gás. Fato digno de nota é que células positivas para esta proteína não necessariamente representam parasitos viáveis, pois mesmo após a eliminação do parasito a proteína vermelha pode se manter detectável no interior das células. Ainda, a concentração de sonda DAF-FMTM diacetato utilizada (1 μ M) pode ter sido baixa, não permitindo se observar diferenças. Ademais, a questão da eliminação do parasito é secundária, pois estudos *ex vivo* já revelam que nem sempre a diferença entre os modelos de resistência e de suscetibilidade estão

associados à carga parasitária, sendo o parasitismo, inclusive, bastante similar entre modelos resistentes e suscetíveis em alguns casos (OLIVEIRA et al., 2012; VIEIRA et al., 1996).

Apesar de não encontrarmos diferenças na atividade de arginase entre os grupos, inibiu-se a atividade da arginase 1 com L-NOR para avaliação dos impactos na infecção, uma vez que a enzima arginase 1 compete com a iNOS pela L-arginina e favorece a replicação do parasito. A inibição da arginase 1 não gerou impacto algum na resposta dos camundongos selvagens. Tem-se que a infecção por *L. amazonensis* induz pouco TNF (HORTA et al., 2012), a simples inibição não foi o suficiente para aumentar a capacidade de eliminação do parasito, uma vez que, sem maiores níveis de TNF, faltaram maiores estímulos para ativação do fenótipo M1. Entretanto, a inibição da arginase 1 diminuiu a carga parasitária e melhorou a lesão nos camundongos TNFR1^{-/-} no tempo final de infecção. A inibição pela L-NOR não altera, obviamente, a expressão de iNOS, contudo pode favorecer a atividade desta enzima, que foi muito pouco expressa em fagócitos mononucleares. Assim, a inibição da arginase 1 favoreceu a atividade da enzima iNOS, principalmente naqueles fagócitos mononucleares que coexpressam iNOS e arginase 1, levando a produção NO a níveis suficientes para controlar o parasito igualmente aos camundongos selvagens, o que refletiu na diminuição da lesão. Isto sem alterar o perfil do infiltrado inflamatório ou mesmo a expressão destas enzimas por parte dos fagócitos (BOGDAN, 2001; CHANG; LIAO; KUO, 1998; GRIFFITH; STUEHR, 1995).

Não obstante a maior expressão de iNOS por parte dos camundongos selvagens ou mesmo as melhoras clínicas observadas em camundongos TNFR1^{-/-} quando inibida a atividade da arginase 1, o parasito persiste. Assim como comumente acontece em casos de leishmanioses, a cura estéril quase nunca ocorre, mesmo em modelos de resistência (AEBISCHER; MOODY; HANDMAN, 1993). Logo é factível questionar o nosso entendimento acerca das doenças parasitárias e buscar ampliar os conhecimentos para explicar aquilo que foge do que temos ciência. Recentemente, elucidou-se a importância do NO para a resolução da inflamação. Atingido o quórum necessário de células produtoras de NO, altera-se o estado metabólico celular, passando de oxidação fosforilativa para glicolítico pela

interrupção do ciclo de Krebs, o que diminui a atividade celular, inclusive diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (PALMIERI et al., 2020; POSTAT et al., 2018).

Condizente com esta informação, através da avaliação da população de células linfoides constatou que o TNFR1, diferentemente do observado para células mieloides, é importante para reduzir o número de células T, tanto as células TCD8⁺ quanto as TCD4⁺, muito embora não altere a frequência destas células no sítio de infecção. Sabe-se que o TNFR1 é fundamental para induzir apoptose em células T que leva ao controle da lesão, evitando uma imunopatologia (KANALY et al., 1999), portanto é crível ser este o motivo da redução número de células linfoides observada. Além disto, o TNFR1 foi importante para o aumento da frequência de células T regulatórias bem como do aumento dos níveis da citocina antiinflamatória IL-10 no sítio de infecção, indicativos do estágio resolutivo da inflamação.

Assim, tem-se que o TNFR1 é importante para expressão de iNOS pelos fagócitos mononucleares e que, apesar de não ser suficiente para eliminar o parasito, a importância do NO na infecção por *L. amazonensis* se destaca no auxílio ao término da inflamação, evitando danos no tecido oriundo de uma imunopatologia. Inclusive, grande parte da população de macrófagos ao final da infecção apresenta o fenótipo M2, apresentando IL-4R α cuja sinalização leva a expressão do gene *Plod2*, codificante para lisil hidroxilase 2, responsável pela formação de fibras colágenas necessárias para o reparo tecidual (KNIPPER et al., 2015).

6. CONCLUSÃO

A dicotomia T_H1 -M1/ T_H2 -M2 explica muito bem os mecanismos envolvidos na resistência e na suscetibilidade a infecção por *L. major*, especialmente a cepa MHOM/IL/80/Friedlin. Por isso, silenciosamente se infundiu um pensamento maniqueísta acerca da imunologia das doenças parasitária, em que a resposta T_H1 -M1 seria a desejada para eliminar o parasito e conferir resistência, enquanto a T_H2 -M2 deveria ser evitada, pois favorece a replicação parasitária. Porém estudos com outras espécies de *Leishmania* ou camundongos mutantes como os deficientes para TNF evidenciaram que apenas a ativação T_H1 -M1 não é suficiente para conferir resistência. Tampouco que a resistência esteja associada à capacidade de eliminar os parasitos. Muito além disso, em modelos animais, ficou evidenciado que o processo inflamatório deve percorrer todas as fases. A inicial necessita de macrófagos M1 capazes de expressarem iNOS e produzirem NO. Para tanto, a sinalização de TNF via TNFR1 se faz mister, pois, o TNF não só atua em sinergia com IFN- γ para expressão de iNOS como também é um potente inibidor do fenótipo M2. Assim, além dos macrófagos assumirem o fenótipo M1, eles de fato atuam como macrófagos M1, ou seja, possuem os marcadores clássicos do fenótipo M1 em pleno funcionamento. Contudo, em uma segunda fase, após o controle do parasitismo, o processo inflamatório precisa ser interrompido, marcadores inflamatórios e citocinas pró-inflamatórias precisam dar lugar àqueles associados à resolução da inflamação, àqueles do fenótipo M2. Assim, além de evitar uma possível imunopatologia, permite que lesão seja reparada e ocorra a cura clínica. Em suma, para o controle parasitário e o reparo tecidual ocorrerem com sucesso durante a infecção por *L. amazonensis*, quiçá para processos inflamatórios em geral, diferentes tipos de respostas imunológicas devem ser montadas, macrófagos de diferentes fenótipos devem aparecer de forma coordenada, no tempo apropriado a cada um, e o TNFR1, quando ligado ao TNF, parece ser este maestro do processo inflamatório.

7. REFERÊNCIAS

- AEBISCHER, T.; MOODY, S. F.; HANDMAN, E. Persistence of virulent *Leishmania major* in murine cutaneous leishmaniasis: a possible hazard for the host. *Infect. Immun.*, v. 61, n. 1, p. 220–226, 1993.
- AGGARWAL, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 3, n. 9, p. 745–756, 2003.
- AGGARWAL, B. B.; KOHR, W. J.; HASS, P. E.; MOFFAT, B.; SPENCER, S. A.; HENZEL, W. J.; BRINGMAN, T. S.; NEDWIN, G. E.; GOEDDEL, D. V.; HARKINS, R. N. Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.*, v. 260, n. 4, p. 2345–2354, 1985.
- AGGARWAL, B. B.; MOFFAT, B.; HARKINS, R. N. Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. *J. Biol. Chem.*, v. 259, n. 1, p. 686–691, 1984.
- AFONSO, L. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect. Immun.*, v. 61, n. 7, p. 2952–2959, 1993.
- ALEXANDER, J.; BROMBACHER, F. T helper1/T helper2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: is this paradigm still relevant? *Front. Immunol.*, v. 3, n. 80. p. 1–13, 2012.
- ALLENBACH, C.; LAUNOIS, P.; MUELLER, C.; TACCHINI-COTTIER, F. An essential role for transmembrane TNF in the resolution of the inflammatory lesion induced by *Leishmania major* infection. *Eur. J. Immunol.*, v. 38, n. 3, p. 720–731, 2008.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN, Boer M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLOS ONE*, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ANDERSON, C. F.; MENDEZ, S.; SACKS, D. L. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *J. Immunol.*, v. 174, n. 5, p. 2934–2941, 2005.
- ANDERSON, C. F.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. J.; SACKS, D. CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.*, v. 204, n. 2, p. 285–297, 2007.
- ASSREUY, J.; CUNHA, F. Q.; EPPERLEIN, M.; NORONHA-DUTRA, A.; O'DONNELL, C. A.; LIEW, F. Y.; MONCADA, S. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *Eur. J. Immunol.*, v. 24, n. 3, p. 672–676, 1994.

BALESTIERI, F. M.; QUEIROZ, A. R.; SCAVONE, C.; COSTA, V. M.; BARRAL-NETTO, M.; ABRAHAMSOHN, Ide A. *Leishmania* (L.) *amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes.Infect.*, v. 4, n. 1, p. 23-29, 2002.

BARRAL, A.; COSTA, J. M.; BITTENCOURT, A. L.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *Int. J. Derm.*, v. 34, n. 7, p. 474-479, 1995.

BATES, P. A. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. *Exp. Parasitol.*, v. 79, n. 2, p. 215-218, 1994.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int. J. Parasitol.*, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.

BATES, P.; ROGERS, M. New Insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of *Leishmania*. *Curr. Mol. Med.*, v. 4, n. 6, p. 601-609, 2004.

BELKAID, Y.; PICCIRILLO, C. A.; MENDEZ, S.; SHEVACH, E. M.; SACKS, D. L. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*, v. 420, n. 6915, p. 502-507, 2002.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunol.*, v. 2, n. 10, p. 907-916, 2001.

BLUM, J. J. Introductory Remarks: Symposium on Differentiation of Trypanosomatids. *J. Euk. Microbiol.*, v. 40, n. 2, p. 196-196, 1993.

BOUCHER, J. L.; CUSTOT, J.; VADON, S.; DELAFORGE, M.; LEPOIVRE, M.; TENU, J. P.; YAPO, A.; MANSUY, D. N omega-hydroxyl-L-arginine, an intermediate in the L-arginine to nitric oxide pathway, is a strong inhibitor of liver and macrophage arginase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 203, n. 3, p. 1614-1621, 1994.

BRONTE, V.; ZANOVELLO, P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nature Reviews Immunology*, v. 5, n. 8, p. 641-654, ago. 2005.

BUGA, G. M.; SINGH, R.; PERVIN, S.; ROGERS, N. E.; SCHMITZ, D. A.; JENKINSON, C. P.; CEDERBAUM, S. D.; IGNARRO, L. J. Arginase activity in endothelial cells: inhibition by NG-hydroxy-L-arginine during high-output NO production. *Am. J. Physiol.*, v. 271, n. 5 Pt 2, p. H1988-98, 1996.

BUXBAUM, L. U. Type I IFNs promote the early IFN-gamma response and the IL-10 response in *Leishmania mexicana* infection. *Parasite Immunol.*, v. 32, n. 2, p. 153-160, 2010.

CARGNELUTTI, D. E.; SALOMÓN, M. C.; CELEDON, V.; CUELLO-CARRIÓN, F. D.; GEA, S.; Di GENARO, M. S.; SCODELLER, E. A. Impact of tumor necrosis factor receptor p55 deficiency in susceptibility of C57BL/6 mice to infection with *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, vol. 49, n. 2, p. 271-275, 2014.

CARNEIRO, M. B. H.; LOPES, M. E. DE M.; VAZ, L. G.; SOUSA, L. M.; DOS SANTOS, L. M.; DE SOUZA, C. C.; CAMPOS, A. C. A.; GOMES, D. A.; GONÇALVES, R.; TAFURI, W.; VIEIRA, L. Q. IFN- γ -Dependent Recruitment of CD4(+) T Cells and Macrophages Contributes to Pathogenesis During *Leishmania amazonensis* Infection. *J. Interf. Cytok. Res.*, v. 35, n. 12, p. 935–947, 2015.

CARNEIRO, M. B.; LOPES, M. E.; HOHMAN, L. S.; ROMANO, A.; DAVID, B. A.; KRATOFIL, R.; KUBES, P.; WORKENTINE, M. L.; CAMPOS, A. C.; VIEIRA, L. Q.; PETERS, N. Th1-Th2 Cross-Regulation Controls Early *Leishmania* Infection in the Skin by Modulating the Size of the Permissive Monocytic Host Cell Reservoir. *Cell Host & Microbe*, 2020.

CARLSEN, E. D.; HAY, C.; HENARD, C. A.; POPOV, V.; GARG, N. J.; SOONG, L. *Leishmania amazonensis* amastigotes trigger neutrophil activation but resist neutrophil microbicidal mechanisms. *Infect. Immun.*, v. 81, n. 11, p. 3966-3974, 2013.

CHANG, C.-I.; LIAO, J. C.; KUO, L. Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 274, n. 1, p. H342–H348, 1998.

COLMENARES, M.; KIMA, P. E.; SAMOFF, E.; SOONG, L.; MCMAHON- PRATT, D. Perforin and gamma interferon are critical CD8+ T-cell-mediated responses in vaccine-induced immunity against *Leishmania amazonensis* infection. *Infect. Immun.*, v. 71, n. 6, p. 3172-3182, 2003.

CORRALIZA, I. M.; CAMPO, M. L.; SOLER, G.; MODOLELL, M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J. Immunol. Methods*, v. 174, n. 1-2, p. 231–235, 1994.

CORRALIZA, I. M.; SOLER, G.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 206, n. 2, p. 667-673, 1995.

CÔRTEZ, D. F.; CARNEIRO, M. B. H.; SANTOS, L. M.; SOUZA, T. C. O.; MAIOLI, T. U.; DUZ, A. L. C.; RAMOS-JORGES, M. L.; AFONSO, L. C. C.; CARNEIRO, C.; VIEIRA, L. Q. Low and high-dose intradermal infection with *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* in C57BL/6 mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 105, n. 6, p. 736–745, 2010.

CROAN, D. G.; MORRISON, D. A.; ELLIS, J. T. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1997.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.

FROMM, P. D.; KLING, J. C.; REMKE, A.; BOGDAN, C.; KÖRNER, H. Fatal Leishmaniasis in the Absence of TNF Despite a Strong Th1 Response. *Front. Microbiol.*, v. 6, 2015.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GREEN, S. J.; CRAWFORD, R. M.; HOCKMEYER, J. T.; MELTZER, M. S.; NACY, C. A. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN- γ -stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor- α . *J. Immunol.*, v. 145, n. 12, p. 4290-4297, 1990a.

GREEN, S. J.; MELTZER, M. S.; HIBBS, J. B., Jr.; NACY, C. A. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J. Immunol.*, v. 144, n. 1, p. 278-283, 1990b.

GRIFFITH, O. W.; STUEHR, D. J. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 57, n. 1, p. 707-736, 1995.

HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Tren. Parasitol.*, v. 18, n. 8, p. 332-334, 2002.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. *Sem. Immunol.*, v. 26, n. 3, p. 253-266, 2014.

HORTA, M. F.; MENDES, B. P.; ROMA, E. H.; NORONHA, F. S. M.; MACEDO, J. P.; OLIVEIRA, L. S.; DUARTE, M. M.; VIEIRA, L. Q. Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. *J. Parasitol. Res.*, v. 2012, n. 1, supplement 1, p. 203818-11, 2012.

HU, X.; LI, B.; LI, X.; ZHAO, Z.; WAN, L.; LIN, G.; YU, M.; WANG, J.; JIANG, X.; FENG, W.; QIN, Z.; YIN, B.; LI, Z. Transmembrane TNF- α promotes suppressive activities of myeloid-derived suppressor cells via TNFR2. *J. Immunol.*, v. 192, n. 3, p. 1320-1331, 2014.

JI, J.; MASTERSON, J.; SUN, J.; SOONG, L. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J. Immunol.*, v. 174, n. 11, p. 7147-7153, 2005.

JI, J.; SUN, J.; QI, H.; SOONG, L. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 66, n. 4, p. 338-345, 2002.

JONES, D. E.; ACKERMANN, M. R.; WILLE, U.; HUNTER, C. A.; SCOTT, P. Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. *Infect. Immun.*, v. 70, n. 4, p. 2151-2158, 2002.

JOURD'HEUIL, D.; MIRANDA, K. M.; KIM, S. M.; ESPEY, M. G.; VODOVOTZ, Y.; LAROUX, S.; MAI, C. T.; MILES, A. M.; GRISHAM, M. B.; WINK, D. A. The oxidative and nitrosative chemistry of the nitric oxide/superoxide reaction in the presence of bicarbonate. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 365, n. 1, p. 92–100, 1999.

KALLIOLIAS, G. D.; IVASHKIV, L. B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nature Rev. Rheumatol*, v. 12, n. 1, p. 49–62, 2016.

KANALY, S. T.; NASHLEANAS, M.; HONDOWICZ, B., SCOTT, P. TNF receptor p55 is required for elimination of inflammatory cells following control of intracellular pathogens: *J. Immunol.*, v. 163, no. 7, p. 3883-3889, 1999.

KARUPIAH, G.; XIE, Q. W.; BULLER, R. M.; NATHAN, C.; DUARTE, C.; MACMICKING, J. D. Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase. *Science*, v. 261, n. 5127, p. 1445–1448, 1993.

KNIPPER, J. A.; WILLENBORG, S.; BRINCKMANN, J.; BLOCH, W.; MAASS, T.; WAGENER, R.; KRIEG, T.; SUTHERLAND, T.; MUNITZ, A.; ROTHENBERG, M. E.; NIEHOFF, A.; RICHARDSON, R.; HAMMERSCHMIDT, M.; ALLEN, J. E.; EMING, S. A. Interleukin-4 Receptor α Signaling in Myeloid Cells Controls Collagen Fibril Assembly in Skin Repair. *Immunity*, v. 43, n. 4, p. 803–816, 2015.

KRATOCHVILL, F.; NEALE, G.; HAVERKAMP, J. M.; VAN DE VELDE, L.-A.; SMITH, A. M.; KAWAUCHI, D.; MCEVOY, J.; ROUSSEL, M. F.; DYER, M. A.; QUALLS, J. E.; MURRAY, P. J. TNF Counterbalances the Emergence of M2 Tumor Macrophages. *Cell reports*, v. 12, n. 11, p. 1902–1914, 2015.

KROPF, P.; FUENTES, J. M.; FÄHNRIK, E.; ARPA, L.; HERATH, S.; WEBER, V.; SOLER, G.; CELADA, A.; MODOLELL, M.; MULLER, I. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *FASEB J.*, v. 19, n. 8, p. 1000–1002, 2005.

LANG, R.; PATEL, D.; MORRIS, J. J.; RUTSCHMAN, R. L.; MURRAY, P. J. Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *J. Immunol.*, v. 169, n. 5, p. 2253–2263, 2002.

LANGERMANS, J. A.; VAN DER HULST, M. E.; NIBBERING, P. H.; HIEMSTRA, P. S.; FRANSEN, L.; VAN, Furth R. IFN-gamma-induced L-arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor- α . *J. Immunol.*, v. 148, n. 2, p. 568-574, 1992.

LEE, S. H.; CHARMOY, M.; ROMANO, A.; PAUN, A.; CHAVES, M. M.; COPE, F. O.; RALPH, D. A.; SACKS, D. L. Mannose receptor high, M2 dermal macrophages mediate nonhealing *Leishmania major* infection in a Th1 immune environment. *J. Exp. Med.*, v. 215, n. 1, p. 357-375, 2018.

- LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J. Immunol.*, v. 145, n. 12, p. 4306–4310, 1990.
- LOCKSLEY, R. M.; HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J.; GARDNER, K. D., Jr. Murine cutaneous leishmaniasis : Susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. *Annales de l'Institut Pasteur / Immunol.*, v. 138, n. 5, p. 744-749, 1987.
- MAIOLI, T. U.; TAKANE, E.; ARANTES, R. M. E.; FIETTO, J. L. R.; AFONSO, L. C. C. Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice. *Parasitol. Res.*, v. 94, n. 3, p. 207–212, 2004.
- MATTNER, J.; SCHINDLER, H.; DIEFENBACH, A.; ROLLINGHOFF, M.; GRESSER, I.; BOGDAN, C. Regulation of type 2 nitric oxide synthase by type 1 interferons in macrophages infected with *Leishmania major*. *Eur. J. Immunol.*, v. 30, n. 8, p. 2257-2267, 2000.
- MCDOWELL, M. A.; MAROVICH, M.; LIRA, R.; BRAUN, M.; SACKS, D. *Leishmania* Priming of Human Dendritic Cells for CD40 Ligand-Induced Interleukin-12p70 Secretion Is Strain and Species Dependent. *Infect. Immun.*, v. 70, n. 8, p. 3994–4001, 2002.
- MODOLELL, M.; CORRALIZA, I. M.; LINK, F.; SOLER, G.; EICHMANN, K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur. J. Immunol.*, v. 25, n. 4, p. 1101-1104, 1995.
- MODOLELL, M.; CHOI, B. S.; RYAN, R. O.; HANCOCK, M.; TITUS, R. G.; ABEBE, T.; HAILU, A.; MULLER, I.; ROGERS, M. E.; BANGHAM, C. R.; MUNDER, M.; KROPF, P. Local suppression of T cell responses by arginase- induced L-arginine depletion in nonhealing leishmaniasis. *PLoS. Negl. Trop. Dis.*, v. 3, n. 7, p. e480, 2009.
- MORRISON, D. A.; EVOLUTION, J. E. M. B. A.; 1997. Effects of nucleotide sequence alignment on phylogeny estimation: a case study of 18S rDNAs of apicomplexa. *Mol. Biol. Evol.*, vol. 14, n. 4, p. 428–441, 1997.
- MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.*, v. 136, n. 7, p. 2348-2357, 1986.
- MUNDER, M.; EICHMANN, K.; MORAN, J. M.; CENTENO, F.; SOLER, G.; MODOLELL, M. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J. Immunol.*, v. 163, n. 7, p. 3771-3777, 1999.
- MURRAY, P. J. Macrophage Polarization. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 79, n. 1, p. 541-566, 2017.
- MURRAY, P. J.; ALLEN, J. E.; BISWAS, S. K.; FISHER, E. A.; GILROY, D. W.; GOERDT, S.; GORDON, S.; HAMILTON, J. A.; IVASHKIV, L. B.; LAWRENCE, T.; LOCATI, M.;

MANTOVANI, A.; MARTINEZ, F. O.; MEGE, J.-L.; MOSSER, D. M.; NATOLI, G.; SAEIJ, J. P.; SCHULTZE, J. L.; SHIREY, K. A.; et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, v. 41, p. 14–20, 2014.

NASHLEANAS, M.; KANALY, S.; SCOTT, P. Control of *Leishmania major* infection in mice lacking TNF receptors. *J. Immunol*, v. 160, n. 11, p. 5506–5513, 1998.

NATHAN, C. F.; HIBBS, J. B., Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin. Immunol.*, v. 3, n. 1, p. 65–70, 1991.

NAUDÉ, P. J. W.; BOER, DEN, J. A.; LUITEN, P. G. M.; EISEL, U. L. M. Tumor necrosis factor receptor cross-talk. *FEBS J.*, v. 278, n. 6, p. 888–898, 2011.

NOYES, H.; PRATLONG, F.; CHANCE, M.; ELLIS, J.; LANOTTE, G.; DEDET, J.P. A previously unclassified trypanosomatid responsible for human cutaneous lesions in Martinique (French West Indies) is the most divergent member of the genus *Leishmania* ss. *Parasitol.*, v. 124, n. 01, p. 17–24, 2002.

OHMORI, Y.; SCHREIBER, R. D.; HAMILTON, T. A. Synergy between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in transcriptional activation is mediated by cooperation between signal transducer and activator of transcription 1 and nuclear factor kappaB. *J. Biol. Chem.* v. 272, n. 23, p. 14899–14907, 6 jun. 1997.

OLIVEIRA, C. F.; MANZONI-DE-ALMEIDA, D.; MELLO, P. S.; NATALE, C. C.; SANTIAGO, H. C.; MIRANDA, L. S.; FERRAZ, F. O.; DOS SANTOS, L. M.; TEIXEIRA, M. M.; ARANTES, R. M.; VIEIRA, L. Q. Characterization of Chronic Cutaneous Lesions from TNF-Receptor-1-Deficient Mice Infected by *Leishmania major*. *Clin. Dev. Immunol.*, v. 2012, p. 1–12, 2012.

PALMIERI, E. M.; GONZALEZ-COTTO, M.; BASELER, W. A.; DAVIES, L. C.; GHESQUIÈRE, B.; MAIO, N.; RICE, C. M.; ROUAULT, T. A.; CASSEL, T.; HIGASHI, R. M.; LANE, A. N.; FAN, T. W.-M.; WINK, D. A.; MCVICAR, D. W. Nitric oxide orchestrates metabolic rewiring in M1 macrophages by targeting aconitase 2 and pyruvate dehydrogenase. v. 11, n. 1, p. 698–17, 2020.

PFEFFER, K.; MATSUYAMA, T.; KÜNDIG, T. M.; WAKEHAM, A.; KISHIHARA, K.; SHAHINIAN, A.; WIEGMANN, K.; OHASHI, P. S.; KRÖNKE, M.; MAK, T. W. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell*, v. 73, n. 3, p. 457–467, 1993.

PINHEIRO, R. O.; ROSSI-BERGMANN, B. Interferon-gamma is required for the late but not early control of *Leishmania amazonensis* infection in C57BL/6 mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 1, p. 79–82, 2007.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future microbiol.*, v. 10, n. 1, p. 111–129, 2015.

POLIS, B.; SRIKANTH, K. D.; ELLIOTT, E.; GIL-HENN, H.; SAMSON, A. O. L-Norvaline Reverses Cognitive Decline and Synaptic Loss in a Murine Model of Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics*, v. 15, n. 4, p. 1036–1054, 2018.

POSTAT, J.; OLEKHNOVITCH, R.; LEMAÎTRE, F.; BOUSSO, P. A Metabolism-Based Quorum Sensing Mechanism Contributes to Termination of Inflammatory Responses. *Immunity*, v. 49, n. 4, p.654-665, 2018.

QI, H.; JI, J.; WANASEN, N.; SOONG, L. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immun.*, v. 72, n. 2, p. 988-995, 2004.

RITTER, U.; LECHNER, A.; SCHARL, K.; KIAFARD, Z.; ZWIRNER, J.; KÖRNER, H. TNF controls the infiltration of dendritic cells into the site of *Leishmania major* infection. *Med. Microbiol. Immunol.*, v. 197, n. 1, p. 29–37, 2008.

RITTER, U.; MATTNER, J.; ROCHA, J. S.; BOGDAN, C.; KÖRNER, H. The control of *Leishmania* (*Leishmania*) *major* by TNF in vivo is dependent on the parasite strain. *Microbes Infect.*, v. 6, n. 6, p. 559–565, 2004.

RUTSCHMAN, R.; LANG, R.; HESSE, M.; IHLE, J. N.; WYNN, T. A.; MURRAY, P. J. Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. *J. Immunol.*, v. 166, n. 4, p. 2173–2177, 2001.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular Aspects of Parasite-Vector and Vector-Host Interactions in Leishmaniasis 1. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 55, n. 1, p. 453–483, 2001.

SALIM, T.; SERSHEN, C. L.; MAY, E. E. Investigating the Role of TNF- α and IFN- γ Activation on the Dynamics of iNOS Gene Expression in LPS Stimulated Macrophages. *PLOS ONE*, v. 11, n. 6, p. e0153289, 2016.

SCHARTON, T. M.; SCOTT, P. 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.*, v. 178, n. 2, p. 567-577, 1993.

SCHARTON-KERSTEN, T.; AFONSO, L. C.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; SCOTT, P. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *J. Immunol.*, v. 154, n. 10, p. 5320–5330, 1995.

SCHLEICHER, U.; PADUCH, K.; DEBUS, A.; OBERMEYER, S.; KÖNIG, T.; KLING, J. C.; RIBECHINI, E.; DUDZIAK, D.; MOUGIAKAKOS, D.; MURRAY, P. J.; OSTUNI, R.; KÖRNER, H.; BOGDAN, C. TNF-Mediated Restriction of Arginase 1 Expression in Myeloid Cells Triggers Type 2 NO Synthase Activity at the Site of Infection. *Cell Rep*, v. 15, n. 5, p. 1062–1075, 2016.

SILVA, S. O.; WU, A. A.; EVANS, D. A.; VIEIRA, L. Q.; MELO, M. N. *Leishmania* sp. isolated from human cases of cutaneous leishmaniasis in Brazil characterized as *Leishmania major*-like. *Acta Trop.*, v. 112, n. 3, p. 239-248, 2009.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 3, p. 239-251, 2004.

SPÄTH, G. F.; BEVERLEY, S. M. A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. *Exp. Parasitol.*, v. 99, n. 2, p. 97-103, 2001.

TARTAGLIA, L. A.; WEBER, R. F.; FIGARI, I. S.; REYNOLDS, C.; PALLADINO, JR. M. A.; GOEDDEL, D. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 88, n. 20, p. 9292, 1991.

TARTAGLIA, L. A.; GOEDDEL, D. V. Two TNF receptors. *Immunol. Today*, v. 13, n. 5, p. 51-153, 1992.

TAMOUTOUNOUR, S.; GUILLIAMS, M.; MONTANANA SANCHIS, F.; LIU, H.; TERHORST, D.; MALOSSE, C.; POLLET, E.; ARDOUIN, L.; LUCHE, H.; SANCHEZ, C.; DALOD, M.; MALISSEN, B.; HENRI, S. Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity*, v. 39, n. 5, p. 925-938, 2013.

TAUB, D. D.; COX, G. W. Murine Th1 and Th2 cell clones differentially regulate macrophage nitric oxide production. *J. Leukoc. Biol.*, v. 58, n. 1, p. 80-89, 1995.

TENU, J. P.; LEPOIVRE, M.; MOALI, C.; BROLLO, M.; MANSUY, D.; BOUCHER, J. L. Effects of the new arginase inhibitor N(omega)-hydroxy-nor-L-arginine on NO synthase activity in murine macrophages. *Nitric Oxide*, v. 3, n. 6, p. 427-438, dez. 1999.

THEODOS, C. M.; POVINELLI, L.; MOLINA, R.; SHERRY, B.; TITUS, R. G. Role of tumor necrosis factor in macrophage leishmanicidal activity in vitro and resistance to cutaneous leishmaniasis in vivo. *Infect. Immun.*, v. 59, n. 8, p. 2839-2842, 1991.

TITUS, R. G.; SHERRY, B.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.*, v. 170, n. 6, p. 2097-2104, 1989.

TRACEY, D.; KLARESKOG, L.; SASSO, E. H.; SALFELD, J. G.; TAK, P. P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol. Therap.*, v. 117, n. 2, p. 244-279, 2008.

VAN ZANDBERGEN, G.; BOLLINGER, A.; WENZEL, A.; KAMHAWI, S.; VOLL, R.; KLINGER, M.; MÜLLER, A.; HÖLSCHER, C.; HERRMANN, M.; SACKS, D.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. *Leishmania* disease development depends on the presence of

apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 103, n. 44, p. 13837-13842, 2006.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J. Immunol. Methods*, v. 243, n. 1-2, p. 167–190, set. 2000.

VESPA, G. N.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect. Immun.*, v. 62, n. 11, p. 5177-5182, 1994.

VIEIRA, L. Q.; GOLDSCHMIDT, M.; NASHLEANAS, M.; PFEFFER, K.; MAK, T.; SCOTT, P. Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. *J. Immunol.*, v. 157, n. 2, p. 827–835, 1996.

WANASEN, N.; MACLEOD, C. L.; ELLIES, L. G.; SOONG, L. L-arginine and cationic amino acid transporter 2B regulate growth and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes in macrophages. *Infect. Immun.*, v. 75, n. 6, p. 2802- 2810, 2007.

WILHELM, P.; RITTER, U.; LABBOW, S.; Donhauser, N .; Röllinghoff, M.; Bogdan, C.; Körner, H. Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. *J. Immunol.*, v. 166, n. 6, p. 4012–4019, 2001.

WINK, D. A.; HINES, H. B.; CHENG, R. Y. S.; SWITZER, C. H.; FLORES-SANTANA, W.; VITEK, M. P.; RIDNOUR, L. A.; COLTON, C. A. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *J. Leuk. Biol.*, v. 89, n. 6, p. 873–891, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators . *Wkly. Epidemiol. Rec.*, v. 95, n. 22, p. 265–289, 2020.

WU, G.; MORRIS, S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.*, v. 336 (Pt 1), p. 1–17, 1998.

XIN, L.; LI, K.; SOONG, L. Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Mol. Immunol.*, v. 45, n. 12, p. 3371- 3382, 2008.

XIN, L.; LI, Y.; SOONG, L. Role of interleukin-1beta in activating the CD11c(high) CD45RB(-) dendritic cell subset and priming *Leishmania amazonensis*-specific CD4(+) T cells in vitro and in vivo. *Infect. Immun.*, v. 75, n. 10, p. 5018-5026, 2007.

ZHANG, X.; GONÇALVES, R.; MOSSER, D. M. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr. Protoc. Immunol.*, 2008. **Chapter 14**: p. Unit 14.1.

8. APÊNDICE A

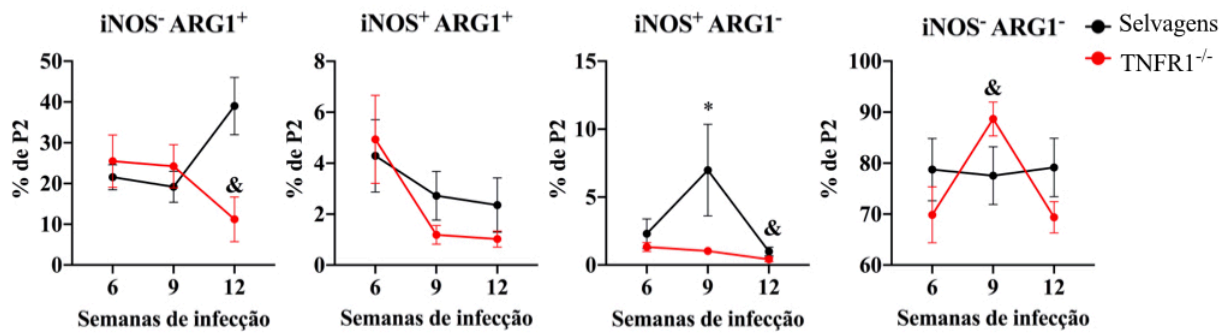


Figura A1. Expressão de iNOS e arginase 1 dentro da população de células dendríticas.

(A) Percentual de células P2 de acordo com a expressão de arginase 1 e iNOS de camundongos selvagens (círculos pretos) ou TNFR1^{-/-} (círculos vermelhos). Resultados do pool de dois experimentos independentes. n = 3-5 camundongos por tempo experimental. Dados são a média ± SEM. *p = 0,05; & p = 0,05 entre o mesmo grupo experimental.

9. APÊNDICE B

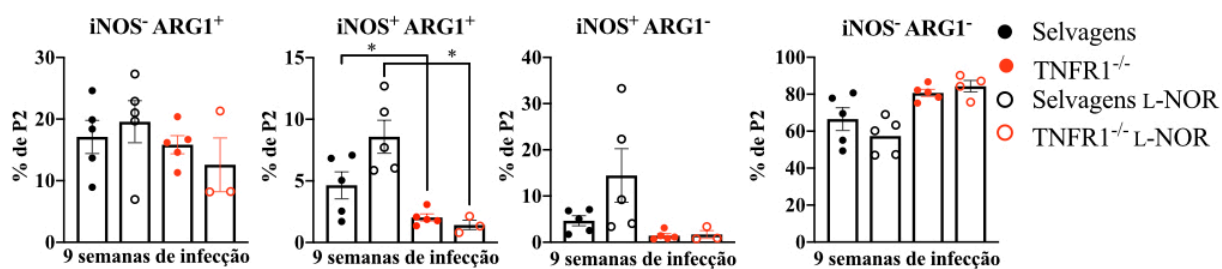


Figura A2. Expressão de iNOS e arginase 1 dentro da população de células dendríticas com a inibição de arginase 1.

(A) Percentual de células P2 de acordo com a expressão de arginase 1 e iNOS de camundongos selvagens (círculos pretos) ou TNFR1^{-/-} (círculos vermelhos) tratados ou não com L-NOR com nove semanas de infecção. A pata inteira foi utilizada para extração e de células e todas foram adquiridas nas análises por citometria de fluxo. Percentual de células P3 de acordo com a expressão de arginase 1 e iNOS. Média de 1 experimento. n = 3-5 camundongos por tempo experimental. Dados são a média ± SEM. *p = 0,05.

10. ANEXO A

ARTICLE IN PRESS

Cytokine xxx (xxxx) xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cytokine

Regulation of macrophage subsets and cytokine production in leishmaniasis

M.B. Carneiro^{a,b,1}, L.G. Vaz^{c,1}, L.C.C. Afonso^{d,1}, M.F. Horta^{c,1}, L.Q. Vieira^{c,*}^a Snyder Institute for Chronic Diseases, Department of Microbiology, Immunology and Infectious Diseases, Cumming School of Medicine, University of Calgary, Calgary, AB T2N 4Z6, Canada^b Department of Comparative Biology and Experimental Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Calgary, Calgary, AB T2N 4Z6, Canada^c Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil^d Departamento de Ciências Biológicas/Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Leishmania
Wound healing macrophages
Suppressive macrophages
Inflammatory macrophages
Monocytes
Monocyte-derived macrophages
M1
M2
Leishmaniasis

ABSTRACT

Macrophages are host cells for parasites of the genus *Leishmania* where they multiply inside parasitophorous vacuoles. Paradoxically, macrophages are also the cells responsible for killing or controlling parasite growth, if appropriately activated. In this review, we will cover the patterns of macrophage activation and the mechanisms used by the parasite to circumvent being killed. We will highlight the impacts of the vector bite on macrophage activation. Finally, we will discuss the ontogeny of macrophages that are infected by *Leishmania* spp.

1. Introduction

Macrophages are remarkably versatile cells responsible for a number of functions in vertebrate organisms, due to their plasticity when activated by pathogen-associated molecular patterns or other ligands, such as cytokines. A hallmark function of this cell is the clearance of pathogens by phagocytosis along with their extermination through several microbicidal mechanisms. Despite this eminent attribute, macrophages are the cells in which *Leishmania* ultimately multiply. *Leishmania* bind to different receptors, some of them still unknown, which trigger production of microbicides but may also favor their growth. Below, we will describe the many ways macrophages can be activated during infection with *Leishmania* and how this activation can be regulated, particularly by the sandfly bite, circumventing the macrophage noxious responses. We will not cover the roles of purines and ATP on infections with *Leishmania*, since they have been recently reviewed [1].

2. Macrophage activation: Definitions

In their seminal paper, Mills et al [2] defined M1 macrophages as those from Th1-prone mouse strains, and M2 macrophages from Th2-

pronemouse strains. These authors have clearly shown that macrophages from C57BL/6 (Th1) mice readily produce NO *in vitro* in response to IFN- γ , LPS or both. Macrophages from BALB/c (Th2) mice produce ornithine in response to either IFN- γ or LPS and produce less NO than C57BL/6 when activated with both stimuli. Hence, these authors proposed that metabolism of arginine to citrulline and NO is prevalent in M1 macrophages, while ornithine and urea are preferably produced from arginine in M2 macrophages. Since then, several studies have demonstrated that the plasticity of macrophages is indeed more complex than previously anticipated, leading to the subdivision of M2 macrophages into several other polarization phenotypes such as M2a, M2b and M2c subsets. In fact, M2 are heterogenous macrophages expressing different programs of activation that range from the genes involved in tissue repair and resolution to immunosuppression and immunoregulation. To make matters even more confusing, several markers of the original M1 subset have been shown to be expressed in the new M2 subsets, making it necessary to re-analyze previous studies in the face of new discoveries. In response to the ever-increasing complexity of the subject, several considerations over nomenclature that define macrophage phenotypes have been made [3–6]. Despite these efforts, it remains difficult to categorize macrophages in several studies due to lack

* Corresponding author.

E-mail address: lqvieira@ufmg.br (L.Q. Vieira).¹ All authors contributed equally.<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155309>

Received 5 May 2020; Received in revised form 18 September 2020; Accepted 19 September 2020

Available online 14 December 2020

1043-4666/Crown Copyright © 2020 Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

of information of the stimulation conditions and the small numbers of markers evaluated. This is especially true for studies evaluating macrophage phenotypes *in vivo*. In this review we opted to use a more general nomenclature proposed in Mosser and Edwards [3] and will refer to macrophages as inflammatory, wound healing or suppressive depending not only on the markers analyzed but also on their possible function. We will, when relevant, outline the source, differentiation conditions and protocols of activation. Importantly, we will consider the species of *Leishmania* used to infect macrophages since they differ significantly in their interaction with the host cell.

3. Action triggers reaction

The mechanisms of cell invasion by intracellular parasites have been recently thoroughly reviewed [7]. Although neutrophils [8] - and possibly other cell types [7,9] may be the first shelters for *Leishmania* promastigotes, macrophages (embryonic or monocyte-derived) are the final destination for all species of this genus [10,11]. Metacyclic promastigotes and amastigotes are ingested by macrophages by phagocytosis [12,13]. Phagocytosis of promastigotes or amastigotes is a pattern recognition receptor-mediated activation, which triggers several responses in macrophages. These responses include the activation of inflammasomes (reviewed in [14]), production of microbicides, as well as the production of cytokines that further activate these cells in an autocrine or paracrine manner, amplifying their killing potential [15,16].

Macrophages can kill amastigotes, if properly activated, but chronic leishmaniasis attests that they can also be harmless for the parasite. Thus, in entering these cells, parasites switch off or tone down several responses commonly activated by microorganisms which would otherwise kill them. Ingeniously, *Leishmania* not only impair these processes but also take advantage of some of them to multiply and survive. The consequences of this killer/host duality are thus dependent on the abilities of the parasites to exploit and subvert macrophage activation and microbicidal/micro biostatic mechanisms, which, in turn, are vastly dependent on parasite species, host genetic background and immune status.

Macrophage invasion by *Leishmania* is triggered by the interaction of parasite surface molecules with particular receptors on the host cell (reviewed in [7]), which also triggers a number of signaling pathways, some of which directed to the production of cytokines and microbicidal molecules, such as NO and ROS (reviewed in [17]). To avoid being killed by ROS, *Leishmania* relies in an arsenal of antioxidants, such as trypanothione/trypanothione reductase, the peroxidases trypanothione and peroxiredoxin, trypanothione S-transferase, superoxide dismutase, 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin, a plant-like ascorbate peroxidase and the pentose phosphate pathway (reviewed in [18]). Parasites lacking these antioxidants are more sensitive to ROS and less virulent [19,20].

Promastigotes and amastigotes can also inhibit the activity of protein kinase C [21–23], which phosphorylates the NOX2 p47 subunit [24]. This effect is accomplished by LPG in promastigotes [22,25], but by unknown mechanisms in amastigotes. The maturation of NOX2 gp91 subunit depends on the availability of heme [26]. *L. pifanoi* amastigotes induce the expression of heme oxygenase-1, critical for heme degradation, thus preventing NADPH oxidase assembly [27]. Moreover, *L. donovani* amastigote disruption of phagosomal lipid raft integrity may also interfere with NADPH oxidase assembly [21]. Decrease in superoxide production can also be due to attenuation of inositol-phosphate accumulation and calcium release in the infected macrophage [28]. Decrease in enzymatic activity of NADPH oxidase was also observed in monocytes from patients infected with *L. donovani* compared to healthy individuals [29,30].

Leishmania also subvert NO-mediated killing. Macrophages infected with *L. amazonensis* downregulate LPS-induced NO production [31]. Indeed, this species can induce miRNA expression in macrophages, which decreases the expression of iNOS mRNA and protein, in a process

dependent on parasite arginase. Arginase activity leads to the production of polyamines, favoring parasite replication [32]. LPG and glyco-inositolphospholipids inhibit the expression of iNOS and leishmanicidal activity [33,34]. The fact that LPG inhibits PKC [35] and stimulates ERK [36] may contribute to the downregulation of iNOS. Inhibition of PKC may be achieved by generation of ceramide [37], which occurs in macrophages infected with *L. donovani* [37], *L. amazonensis* [9] and *L. mexicana* [38] also inhibit binding of NF- κ B p65/p50 to the iNOS promoter. In *L. amazonensis* this is mediated by the activation of the NF- κ B p50/p50 complex in macrophages, a transcription repressor that competes with NF- κ B p65/p50 through PI3K/Akt pathway, decreasing iNOS transcription [39]. Degradation of NF- κ B p65 was also observed in amastigote-infected macrophages, possibly due to proteolytic cleavage. Besides decreasing NF- κ B p65 levels, the cleavage of NF- κ B p65 by gp63 generates fragments that form a new NF- κ B complex with NF- κ B p50, repressing iNOS transcription [40].

Leishmania not only express arginase [41], but also upregulate host arginase I (Arg1) activity, favoring polyamine synthesis [42–44]. In addition of promoting proliferation of the parasite, polyamines are substrates for synthesis of antioxidants [45,46]. Parasite surface sialic acid can also bind to sialic acid binding immunoglobulin-like lectin receptors, which dampen levels of ROS and NO, promote a Th2-dominant cytokine response and facilitate multiplication of *L. donovani* amastigotes [47]. *L. amazonensis* and *L. mexicana* form large parasitophorous vacuoles, thus diluting molecules capable of restricting their growth. [48].

Infectious agents may induce secretion of cytokines by macrophages. We will focus on TNF, a quick response to infection, IL-1 β and IL-18, hallmarks of inflammasome activation, and IL-12, responsible for the differentiation of T helper lymphocytes into the Th1 subtype, leading to resistance to *Leishmania*. IL-10 and TGF- β are the main suppressive cytokines present during infection. Examples of the data available in the literature are summarized in the table. We did not cite all papers available for each cytokine due to space constraints (see Table 1).

Overall, macrophages respond to infection with *Leishmania* with low production of TNF, an essential cytokine for macrophage activation into the inflammatory phenotype that will kill *Leishmania*. TNF is involved in both pathogenesis and healing as discussed below. Activation of the inflammasome results in IL-1 β and IL-18, but other stimuli such as LPS are necessary. Macrophages are unable to produce IL-12 in response to *Leishmania* without the addition of adjuvants. In contrast, different species of *Leishmania* have also been shown to induce the production of TGF- β and IL-10 [49], which inhibit the killing of intracellular parasites, both *in vitro* and *in vivo* [50], by inhibiting NO synthesis. In *L. amazonensis*, this may be due to apoptosis mimicry by exposure of phosphatidylserine on their surface [51], known to trigger the production of TGF- β and IL-10 [51].

It is well described that *Leishmania* interferes with a number of signaling pathways in the macrophage, causing several effects that promote parasite survival [52,53]. *L. donovani* also exploits a macrophage de-ubiquitinating enzyme, a negative regulator of NF- κ B pathway, suppressing the TLR2-mediated production of IL-12 and TNF, which decreases the production of NO. This may be due to impairment of the association of TRAF6 with the TAK-TAB complex, thus inhibiting the recruitment of TRAF6 in TLR2 signaling [54].

Parmar et al. [55] reported that *L. donovani* exploits histone lysine methyltransferases (KMT) and histone lysine demethylases (KDM), which ultimately regulate gene transcription, to reprogram macrophage polarization. They have shown that inflammatory and suppressive macrophage polarization lead to the accumulation of activating methylation at the promoter regions of host defensive (*il12* and *tnf*) or host suppressive (*il10* and *arg1*) marker genes, respectively. The alterations observed during infection were accompanied with reduced level of IL-12 and TNF and increased level of IL-10 and Arg1.

L. donovani amastigotes strongly impair the response induced by Th1-derived IFN- γ , such as the expression of class II MHC and iNOS due

ARTICLE IN PRESS

M.B. Carneiro et al.

Cytokine xxx (xxxx) xxx

Table 1
Macrophage cytokine production in response to infection with *Leishmania*.

Cytokine	<i>Leishmania</i> species	Stage	Source of macrophage	Species or mouse strain	Other added stimulus	Production	Reference
TNF	<i>L. amazonensis</i>	Stationary phase promastigotes	Peritoneal thioglycolate elicited	CBA/J, C57BL/10, BALB/c, C3H/HeN	No	Lower levels than <i>L. major</i>	[17,119]
	<i>L. braziliensis</i>	Stationary phase promastigotes	Healthy human, blood-derived	Human	No	Yes	[120]
	<i>L. braziliensis</i>	Stationary phase promastigotes	Cutaneous or mucosal patients, blood derived	Human	No	Yes	[120]
	<i>L. braziliensis</i>	Stationary phase promastigotes	Subclinical patients, blood-derived	Human	No	Lower levels than healthy and other clinical forms	[120]
	<i>L. braziliensis</i>	Metacyclic promastigotes	Resident peritoneal macrophages	BALB/c	No	No	[121]
	<i>L. major</i>	Stationary phase promastigotes	Peritoneal thioglycolate elicited	C57BL/10, BALB/c, C3H/HeN	No	Yes	[17,122]
IL-1- β	<i>L. amazonensis</i>	Stationary phase promastigotes	Bone marrow-derived macrophages in L929-conditioned medium	C57BL/6	LPS	Yes	Reviewed in [14]
	<i>L. amazonensis</i>	Amastigotes	Bone marrow-derived macrophages with recombinant murine CSF	BALB/c	LPS and ATP	Activation of NLRP3 less effectively than promastigotes	Reviewed in [14]
	<i>L. braziliensis</i>	Metacyclic-enriched promastigotes	<i>In vivo</i>	Rag mice reconstituted with CD8+ T cells		Yes, increased pathology	[123]
	<i>L. donovani</i>	Parasites from infected sandflies	<i>In vivo</i>	BALB/c	Bacteria from the sandfly bite and sandfly saliva	Yes	[97]
	<i>L. major</i> (non-healing strain)	Metacyclic promastigotes	Bone marrow-derived macrophages in L929-conditioned medium	C57BL/6 mice	LPS	Yes, increased pathology	[124]
	<i>L. major</i> (healing strain)	Metacyclic promastigotes	Bone marrow-derived macrophages in L929-conditioned medium	C57BL/6 mice	LPS	No	[124]
IL-18	<i>L. amazonensis</i>	Metacyclic promastigotes	<i>In vivo</i>	C57BL/6		No, less pathology and marginally less parasites in IL-18 knockout mice	[78]
	<i>L. donovani</i>	Amastigotes	<i>In vivo</i>	IL-18 wt and knockout mice in the C57BL/6 background		Yes (message), increased pathology and parasite burden in knockout mice.	[125]
	<i>L. major</i>		<i>In vivo</i>	IL-18 knockout mice in the 123/sv background (resistant)		No, increased pathology	[126]
	<i>L. major</i>	Stationary phase promastigotes	<i>In vivo</i>	IL-18 knockout mice in the DBA/1 (resistant) and BALB/c background	No	BALB/c knockouts more resistant, DBA/1 knockouts more susceptible	[127]
	<i>L. mexicana</i>	Amastigotes	<i>In vivo</i>	IL-18 knockout mice in the BALB/c background	No	Knockout mice presented decreased pathology compared to WT	[128]
	<i>L. mexicana</i>	Stationary phase promastigotes	spleen cells <i>ex vivo</i>	C57BL/6	No	Yes	[129]
	<i>L. amazonensis</i> , <i>L. major</i>	Stationary phase promastigotes	Bone marrow derived macrophages, thioglycolate elicited macrophages, human mononuclear cells	C57BL/6 mice and healthy humans	No	No	[130-133]
	<i>L. amazonensis</i> , <i>L. infantum</i> and <i>L. major</i>	Stationary phase promastigotes	immature murine macrophages (expressing ER-HR3, low levels of the mature markers, scavenger receptor and CD11b/Mac-1 and none of the precursor markers CD31, Ly-6C or ER-MP58) derived from bone marrows	C3H/HePas, BALB/c and C57BL/6 mice	NO	Yes IL-12 P40 but not IL-12(p70)	[134]
IL-12	<i>L. major</i>	Promastigotes	Dendritic cells from <i>in vivo</i> infection	C57BL/6	No	Yes	[135]
	<i>L. amazonensis</i> and <i>L. major</i>	Amastigotes from mouse lesions	Bone marrow derived by L929 cell-conditioned medium	C3H/HeJ and BALB/c	Hyaluronic acid or LPS	Yes	[89,136]
	<i>L. braziliensis</i>	Metacyclic promastigotes	human macrophages derived <i>in vitro</i> from peripheral blood mononuclear cells	Human	No	Yes	[137]
IL-10	<i>L. donovani</i>	Stationary phase promastigotes	Human monocytes and THP-1 cells		LPS or TLR2 ligand	Yes	[138]
	<i>L. donovani</i>	Stationary phase promastigotes	J774 murine macrophage cell line		No	Yes	[55]
	<i>L. major</i>	Promastigotes			IFN- γ	Yes	[86]

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Cytokine	<i>Leishmania</i> species	Stage	Source of macrophage	Species or mouse strain	Other added stimulus	Production	Reference
		Stationary phase promastigotes	Thioglycollate elicited peritoneal macrophages and bone marrow derived by L929 cell-conditioned medium	C57BL/6 and BALB/c			
	<i>L. mexicana</i>	Stationary phase promastigotes	bone marrow-derived macrophages differentiated <i>in vitro</i> with M-CSF-containing supernatants from 3 T3 cells and thioglycollate elicited macrophages	C57BL/6	No	No, by microarray analysis of gene expression	[139]
	<i>L. amazonensis</i>	Stationary phase promastigotes	thioglycollate-elicited peritoneal macrophages	BALB/c	No	Yes	[93]
	<i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. donovani</i> and <i>L. major</i>	Stationary phase promastigotes	human monocyte-derived macrophages	Human	No	Yes	[92,140]
TGF- β	<i>L. braziliensis</i>	Stationary phase promastigotes	thioglycollate-elicited peritoneal macrophages	BALB/c	No	Yes	[91]
	<i>L. donovani</i>	Stationary phase promastigotes	Starch-elicited peritoneal macrophages	BALB/c	No	Yes	[141]
	<i>L. major</i>	Stationary phase promastigotes	Bone marrow derived by L929 cell-conditioned medium	BALB/c	No	No (mRNA)	[142]

prevention the association of the transcription factor STAT1- α with the nuclear transport adaptor importin- α 5, required to transfer STAT1- α from the cytoplasm to the nucleus. Translocation of STAT1- α to the nucleus is essential for the transcription of iNOS itself, as well as of IFN regulatory factor 1 (IRF-1) and class II transactivator (CIITA), both mediators of class II MHC and iNOS transcription [56].

It has also been reported that *L. donovani* exosomes, which are micro vesicles secreted by the parasite, attenuate the production of the pro-inflammatory TNF and intensify the production of the anti-inflammatory IL-10, both induced by the Th1-derived IFN- γ , probably by the action of gp63 and elongation 1 (EF-1 α), which activate protein-tyrosine phosphatases (PTP) impairing IFN- γ -induced signaling, including NO [57].

In addition, infection of macrophages with several species of *Leishmania* have been shown to modify the expression of several different miRNAs, whose targets are genes associated with the IFN- γ -induced response and thus induced by adaptive response, or other genes such as MHC, iNOS, and genes related with innate macrophage responses [32,58,59].

4. Macrophage activation

Cytokines present in the infection milieu determine the kind of activation macrophages undergo and thus their role during infection. It is important to understand that macrophage polarization refers to an estimate of macrophage activation at a given point in space and time. Hence, macrophages that are in one activation state could switch to another, exhibiting plasticity along their life [4]. For successful clearance and wound healing in the context of leishmaniasis, different phenotypes of macrophages need to appear at the appropriate time. In addition, the subsets of macrophages are well defined on *in vitro* settings, where a known dose of a specific stimulus is given. During *in vivo* infections macrophages are exposed and respond to different cytokines, and the parasite itself, and can express markers associated with more than one specific phenotype activation, such as double positive cells for iNOS and Arg1 [60,61]. Activation into inflammatory or wound healing phenotypes is thus dependent on Th1 or Th2 cytokines, respectively, and could determine resistance or susceptibility to *Leishmania major* [2,62], however, it does not explain resistance or susceptibility to other *Leishmania* species, nor even to all *L. major* strains. *L. major*-like strain BH49 (MHOM/BR/1971/BH49) is eliminated independently of IFN- γ due low infectivity [63]. C57BL/6 mice infected with *L. major* Sd (MHOM/SN/74/SD) do not heal lesions despite a strong Th1 response due to T

lymphocytes producing both IFN- γ and IL-10 [64]. We will also discuss the potential role of suppressive macrophages as a niche for parasite replication during the establishment of the disease and after the resolution phase.

5. Inflammatory macrophages

Macrophages acquire the inflammatory phenotype when activated by IFN- γ which, in synergism with TNF, induces iNOS expression and NO production, ultimately resulting in killing of *Leishmania* [13,65,66]. The intermediate product of this reaction, *N*^o-hydroxy-L-arginine (NOHA), is a potent Arg1 inhibitor. Arginase I and iNOS compete for their substrate, L-arginine [67,68]. NO is a lipophilic gas that migrates through cells, interacting with a great number of targets. NO reacts with superoxide to generate reactive nitrogen species (RNS) such as peroxynitrite (ONOO⁻), nitrogen dioxide (NO₂), and nitrogen trioxide (N₂O₃) which cause damage to DNA, proteins and lipids, conferring protection against *Leishmania* and others intracellular parasites [69,70].

Synergic action between IFN- γ and TNF is known since the 1990 s, but some aspects of the pathway inducing the expression of iNOS are yet to be clarified. A dual signal, provided by TNF and IFN- γ is necessary for iNOS expression [71]. Indeed, IFN- γ knockout mice do not express iNOS during *Leishmania* infection [60,72]. In the absence of IFN- γ signaling, phosphorylated STAT1 dimers are not formed and activation of interferon regulatory factor-1, essential for iNOS expression, is prevented [73]. In TNF deficient mice infected with *L. major* myeloid cells express iNOS, but do not produce NO. TNF acts as an inhibitor of histone 3 acetylation, impairing STAT6 binding to chromatin. STAT6 phosphorylation is a consequence of IL-4R α signaling, and leads to Arg1 expression [61]. Thus, TNF is a powerful agent that participates on inducing inflammatory macrophage activation while impairing wound healing phenotype [74]. Nevertheless, during the chronic stage of infection, mice deficient for TNF receptors are able to control parasite growth, although not the lesions [75–77]. In the absence of TNF, the induction of iNOS is triggered by both IFN- γ and CD40-CD40L signaling [77]. In addition, inflammasome activation, during *L. amazonensis* infection, induce NO production in an IL-1 β dependent and IL-18 independent way [14,78].

The biological effect of iNOS/Arg1 expression by macrophages cannot be well understood by assaying just the enzyme expressions. Both enzymes compete for the same substrate. Both inflammatory and wound healing macrophages are dependent on the extra-cellular L-arginine pool [28,29]. Arginase I has the advantage in the competition for the

substrate. Although iNOS has higher affinity for L-arginine (K_M 10–50 $\mu\text{mol/L}$) than Arg1 (K_M 1–5 mmol/L), arginases' V_{max} of at physiological pH ($\approx 1400 \mu\text{mol/min per mg}$) is almost 1000 times larger than iNOS' ($\approx 1.3 \mu\text{mol/min per mg}$) [30,31]. Thus, arginase I uses L-arginine faster than iNOS.

NO production is necessary in order to control parasite replication after the onset of the adaptive immunity. However, recent works have also shown that NO play an important role on controlling inflammation. NO blocks the respiratory chain and diminishes available energy leading to metabolic rewiring of monocyte-derived macrophages to the glycolytic pathway, which inhibits the production of pro-inflammatory mediators [79]. In a *Leishmania* infection model NO produced by monocyte-derived cells can contribute to termination of inflammation by reducing further recruitment of inflammatory cells to the site of infection by decreasing both mitochondrial respiration and cytokine production [80]. It is not clear yet whether NO or TNF mediating parasite killing and inflammation resolution come from inflammatory macrophages during different phases of the disease, or whether NO and TNF represent a transitional activation status or even are secreted by suppressive macrophages, which will be discussed below.

6. Wound healing macrophages

During *Leishmania* infection, resident macrophages can be activated into the wound healing phenotype by IL-4 and IL-13. Binding of IL-4 or IL-13 to the IL-4R α results in phosphorylation of STAT6, which translocate to the nucleus, activating the expression of genes that are markers for wound healing macrophages, including *arg1*, *ym1*, *relm α* and *mr* [4]. Arg1 catalyzes the hydrolysis of L-arginine into urea and L-ornithine; the latter is a precursor for L-proline via ornithine aminotransferase. Also, L-ornithine can be decarboxylated by ornithine decarboxylase into putrescine, spermidine and spermine. These polyamines are used by *Leishmania* for replication. They also depress the immune system and can further downregulate the production of NO. Thus, when Arg1 is activated early in *Leishmania* infection, the parasite may persist in the host and the presence of wound healing macrophages before the resolution phase of the disease might represent a niche for parasite replication [81,82]. However detrimental for the host for supporting parasite growth IL-4R α signaling is also important for skin wound healing as it controls collagen assembly [83]. Interestingly, it has also been described that Arg1 expression is not an absolute requirement for *Leishmania* growth. Arg1 expression by hematopoietic and endothelial cells did not influence parasite load during *L. major* infection in C57BL/6 mice and, surprisingly, is not required for tissue repair [84]. Also, despite the absence of Arg1 expression in Stat-6 deficient mice infected with *L. amazonensis*, we recently showed that these mice were not able to control parasite growth. In this case, the own *Leishmania* arginase gene expression associated with high levels of IL-10 might explain parasite persistence [60].

7. Suppressive macrophages

Regulatory macrophages are activated by immunocomplexes in the presence of a TLR ligand. These cells are characterized by the production of high levels of IL-10 [85,86] but can also express iNOS and MHC II and are able to inhibit both inflammatory and wound healing macrophage activation [87]. For the purpose of this review we will not use the term "regulatory" as both inflammatory and wound healing macrophages can also play that role to certain extent [5]. Rather, we will use the term suppressive to characterize macrophages that play a role on suppressing inflammation and might represent an intermediate phenotype of activation between inflammatory and wound healing macrophages. In the skin, resident macrophages express high levels of IL-10 mRNA, lower capacity of presenting antigen and high phagocytosis activity, which suggest that they might have an anti-inflammatory clearance role [88]. The presence or induction of suppressive macrophages phenotype

during effector phase of disease might represent a reservoir niche for *Leishmania*. Opsonized amastigotes, through activation of ERK1/2, in the presence of hyaluronic acid from the extracellular matrix, can induce high levels of IL-10 production on macrophages [89]. When activated by IL-10 macrophages become refractory to IFN- γ and TNF activation [86]. In addition, activation of macrophages by IL-10 is critical for parasite persistence after lesion resolution in resistant mice to *L. major*. Hence, treatment of *L. major*-infected C57BL/6 (healing) mice with anti-IL-10 receptor antibodies caused complete elimination of the parasite [90]. Interestingly, the host cells for these persistent parasites are iNOS $^+$ cells. We can speculate that if these cells produce high levels of IL-10 that would explain how these parasites survive in these macrophages.

TGF- β is another cytokine produced by macrophages that can mediate pathogenesis during infection with different species of *Leishmania* and might be associated with a more suppressive macrophage subset. Inflammatory macrophages when exposed to TGF- β do not get properly activated by IFN- γ [91–93]

8. Sand fly bite-associated factors influence on monocyte/macrophages activation

During *Leishmania* transmission infected sandflies inoculate several components that impact the development of the immune response, such as: salivary proteins [94], exosomes [95], promastigote secretory gel (PSG) [96] and gut microbes [97]. It has been shown that the inoculation of the vector-associated factors can influence on the recruitment and activation of inflammatory cells at the site of infection with an impact on early chemokine/cytokine production as well as on the development of the adaptive immune response [94].

Salivary gland sonicate (SGS) from *Lutzomyia longipalpis* can have a direct effect on the phenotype activation of macrophages as SGS increased prostaglandin E $_2$ (PGE $_2$) production enhancing *L. infantum* viability [98]. In addition, the use of salivary gland lysate (SGL) from *Phlebotomus papatasi* also inhibited NO production by IFN- γ activated macrophages *in vitro*, probably by inhibiting mRNA expression of the iNOS enzyme, enhancing *L. major* survival [99,100]. However, not all the biological functions modulated by IFN- γ are inhibited by saliva components, as MHC II expression is still up-regulated on macrophages and the phagocytosis of *L. major* was not altered [99].

The promastigote secretory gel (PSG) constituted by *Leishmania* proteophosphoglycans is also inoculated during the parasite transmission. PSG has been related to enhanced susceptibility to *L. mexicana* infection after co-inoculation with the parasite. A higher recruitment of monocytes/macrophages to the site of infection associated with an increased expression of wound-healing activation markers (Arg1 and Ym1) without changing iNOS expression could explain, in part, the higher susceptibility to *L. mexicana* in BALB/c mice [96,101]. *Leishmania* also secrete exosomes in the lumen of sand fly midgut that are egested during the vector bite. The co-inoculation of *L. major* and the exosomes exacerbate the disease in BALB/c mice, which produce high levels of pro-inflammatory cytokines (IFN- γ , IL-4 and IL-17a), in addition to IL-10. This could be associated with the worse outcome of the disease [95]. In addition, exosomes secreted by *L. mexicana in vitro* can inhibit NO production by macrophages [102].

Sandflies also inoculate gut microbes at the skin. When BALB/c mice were exposed to either infected or uninfected *L. longipalpis* bites the same expression level for Ym1 gene was observed at the skin. And in both cases, the expression was higher comparing to mice that only received salivary gland, or the *L. infantum* parasite. This result suggests that other components, rather than salivary proteins, PSG or parasite exosomes might influence on immune response during transmission, that can modulate monocyte/macrophage function. Although yet not explored, it is possible that gut microbes may influence both the recruitment and activation of monocytes/macrophages during parasite transmission [97].

- [11] R.P. Brazil, In vivo fusion of lysosomes with parasitophorous vacuoles of *Leishmania*-infected macrophages, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 78 (2) (1984) 87–91.
- [12] R.P. da Silva, B.F. Hall, K.A. Joiner, D.L. Sacks, CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages, *J. Immunol.* 143 (1989) 617–622.
- [13] S.J. Green, M.S. Meltzer, J.B. Hibbs, C.A. Nacy, Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism, *J. Immunol.* 144 (1) (1990) 278–283.
- [14] R.V.H. de Carvalho, D.S. Zamboni, Inflammation activation in response to intracellular protozoan parasites, *Trends Parasitol.* 36 (5) (2020) 459–472.
- [15] G. Arango Duque, A. Descoteaux, Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases, *Front. Immunol.* 5 (2014) 491.
- [16] P. Chauhan, D. Shukla, D. Chattopadhyay, B. Saha, Redundant and regulatory roles for Toll-like receptors in *Leishmania* infection, *Clin. Exp. Immunol.* 190 (2) (2017) 167–186.
- [17] M.F. Horta, B.P. Mendes, E.H. Roma, F.S.M. Noronha, J.P. Macedo, L.S. Oliveira, M.M. Duarte, L.Q. Vieira, Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis, *J. Parasitol. Res.* 2012(1, Suppl. 1) (2012) 203818-11.
- [18] T. Van Assche, M. Deschacht, R.A.I. da Luz, L. Maes, P. Cos, *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology, *Free Radical Biol. Med.* 51 (2) (2011) 337–351.
- [19] C.A. Henard, E.D. Carlsen, C. Hay, P.E. Kima, L. Soong, *Leishmania amazonensis* amastigotes highly express a trypanothione peroxidase isoform that increases parasite resistance to macrophage antimicrobial defenses and fosters parasite virulence, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (7) (2014), e3000.
- [20] B. Mitra, M.F. Laranjeira-Silva, D.C. Miguel, J. Perrone Bezerra de Menezes, N. W. Andrews, The iron-dependent mitochondrial superoxide dismutase SODA promotes *Leishmania* virulence, *J. Biol. Chem.* 292 (29) (2017) 12324–12338.
- [21] R. Lodge, A. Descoteaux, Phagocytosis of *Leishmania donovani* amastigotes is Rac1 dependent and occurs in the absence of NADPH oxidase activation, *Eur. J. Immunol.* 36 (10) (2006) 2735–2744.
- [22] T.B. McNeely, G. Rosen, M.V. Londner, S.J. Turco, Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycosylphosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite *Leishmania*, *Biochem. J.* 259 (2) (1989) 601–604.
- [23] M. Olivier, K.G. Baimbridge, N.E. Reiner, Stimulus-response coupling in monocytes infected with *Leishmania*. Attenuation of calcium transients is related to defective agonist-induced accumulation of inositol phosphates, *J. Immunol.* 148 (4) (1992) 1188–1196.
- [24] F. Watson, J. Robinson, S.W. Edwards, Protein kinase C-dependent and -independent activation of the NADPH oxidase of human neutrophils, *J. Biol. Chem.* 266 (12) (1991) 7432–7439.
- [25] R. Lodge, T.O. Diallo, A. Descoteaux, *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane, *Cell. Microbiol.* 8 (12) (2006) 1922–1931.
- [26] F.R. DeLeo, J.B. Burritt, L. Yu, A.J. Jesaitis, M.C. Dinauer, W.M. Nauseef, Processing and maturation of flavocytochrome b558 include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly, *J. Biol. Chem.* 275 (18) (2000) 13986–13993.
- [27] N.-K. Pham, J. Mouriz, P.E. Kima, *Leishmania pifanoi* amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation, *Infect. Immun.* 73 (12) (2005) 8322–8333.
- [28] M. Olivier, R.W. Brownsey, N.E. Reiner, Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase C, *PNAS* 89 (16) (1992) 7481–7485.
- [29] P. Kumar, K. Pai, H.P. Pandey, S. Sundar, NADH-oxidase, NADPH-oxidase and myeloperoxidase activity of visceral leishmaniasis patients, *J. Med. Microbiol.* 51 (10) (2002) 832–836.
- [30] R. Kumar, K. Pai, S. Sundar, Reactive oxygen intermediates, nitrite and IFN- γ in Indian visceral leishmaniasis, *Clin. Exp. Immunol.* 124 (2) (2001) 262–265.
- [31] F.M. Balestieri, A.R. Queiroz, C. Scavone, V.M. Costa, M. Barral-Netto, A. Abrahamsohn Ide, *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages, *Microbes Infect.* 4 (1) (2002) 23–29.
- [32] S.M. Muxel, M.F. Laranjeira-Silva, R.A. Zampieri, L.M. Floeter-Winter, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* induces macrophage miR-294 and miR-721 expression and modulates infection by targeting NOS2 and L-arginine metabolism, *Sci. Rep.* 7 (1) (2017) 44141–44215.
- [33] L. Proudfoot, A.V. Nikolaev, G.J. Feng, W.Q. Wei, M.A. Ferguson, J. S. Brimacombe, F.Y. Liew, Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages, *PNAS* 93 (20) (1996) 10984–10989.
- [34] L. Proudfoot, C.A. O'Donnell, F.Y. Liew, Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthase and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages, *Eur. J. Immunol.* 25 (3) (1995) 745–750.
- [35] A. Descoteaux, S.J. Turco, Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)* 1455 (2–3) (1999) 341–352.
- [36] G.J. Feng, H.S. Goodridge, M.M. Harnett, X.Q. Wei, A.V. Nikolaev, A.P. Higson, F. Y. Liew, Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: *Leishmania* phosphoglycans subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase, *J. Immunol.* 163 (12) (1999) 6403–6412.
- [37] S. Ghosh, S. Bhattacharyya, S. Das, S. Raha, N. Maulik, D.K. Das, S. Roy, S. Majumdar, Generation of ceramide in murine macrophages infected with *Leishmania donovani* alters macrophage signaling events and aids intracellular parasitic survival, *Mol. Cell. Biochem.* 223 (1–2) (2001) 47–60.
- [38] P. Cameron, A. McGachy, M. Anderson, A. Paul, G.H. Coombs, J.C. Mottram, J. Alexander, R. Plevin, Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway, *J. Immunol.* 173 (5) (2004) 3297–3304.
- [39] T.C. Calegari-Silva, A.C. Vivarini, M. Miqueline, G.R. Dos Santos, K.L. Teixeira, A. M. Saliba, S. Nunes de Carvalho, L. de Carvalho, U.G. Lopes, The human parasite *Leishmania amazonensis* downregulates iNOS expression via NF-kappaB p50/p50 homodimer: role of the PI3K/Akt pathway, *Open Biol.* 5 (9) (2015), 150118.
- [40] D.J. Gregory, M. Godbout, I. Contreras, G. Forget, M. Olivier, A novel form of NF-kappaB is induced by *Leishmania* infection: involvement in macrophage gene expression, *Eur. J. Immunol.* 38 (4) (2008) 1071–1081.
- [41] J.M. Boitz, C.A. Gilroy, T.D. Olenyik, D. Paradis, J. Perdek, K. Dearman, M. J. Davis, P.A. Yates, Y. Li, M.K. Riscoe, B. Ullman, S.C. Roberts, Arginase is essential for survival of *Leishmania donovani* oromastigotes but not intracellular amastigotes, *Infect. Immun.* 85 (1) (2017).
- [42] A. Badirzadeh, T. Taheri, Y. Taslimi, Z. Abdossamadi, M. Heidari-Kharaji, E. Gholami, B. Sedaghat, M. Niyayati, S. Rafati, Arginase activity in pathogenic and non-pathogenic species of *Leishmania* parasites, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11 (7) (2017), e0005774.
- [43] U. Gaur, S.C. Roberts, R.P. Dalvi, I. Corraliza, B. Ullman, M.E. Wilson, An effect of parasite-encoded arginase on the outcome of murine cutaneous leishmaniasis, *J. Immunol.* 179 (12) (2007) 8446–8453.
- [44] R.M. Reguera, R. Balana-Fouce, M. Showalter, S. Hickerson, S.M. Beverley, *Leishmania major* lacking arginase (ARG) are auxotrophic for polyamines but retain infectivity to susceptible BALB/c mice, *Mol. Biochem. Parasitol.* 165 (1) (2009) 48–56.
- [45] G. Colotti, A. Ilari, Polyamine metabolism in *Leishmania*: from arginine to trypanothione, *Amino Acids* 40 (2) (2011) 269–285.
- [46] A. Goldman-Pinkovich, C. Balno, R. Strasser, M. Zeituni-Molad, K. Bendelak, D. Rentsch, M. Ephros, M. Wieser, A. Jardim, P.J. Myler, D. Zilberstein, An arginine deprivation response pathway is induced in *Leishmania* during macrophage invasion, *PLoS Pathog.* 12 (4) (2016), e0105494.
- [47] S. Roy, C. Mandal, *Leishmania donovani* utilize sialic acids for binding and phagocytosis in the macrophages through selective utilization of siglecs and impair the innate immune arm, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10 (8) (2016), e0004904.
- [48] J. Wilson, C. Htynh, K.A. Kennedy, D.M. Ward, J. Kaplan, A. Aderem, N. W. Andrews, Control of parasitophorous vacuole expansion by LYST/Beige restricts the intracellular growth of *Leishmania amazonensis*, *PLoS Pathog.* 4 (10) (2008), e1000179.
- [49] S.S. Cheekatla, A. Aggarwal, S. Naik, mTOR signaling pathway regulates the IL-12/IL-10 axis in *Leishmania donovani* infection, *Med. Microbiol. Immunol.* 201 (1) (2012) 37–46.
- [50] C. Bogdan, M. Rollinghoff, The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion, *Int. J. Parasitol.* 28 (1) (1998) 121–134.
- [51] J.L.M. Wanderley, M.E.C. Moreira, A. Benjamin, A.C. Bonomo, M.A. Barcinski, Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L.) amazonensis* in mammalian hosts, *J. Immunol.* 176 (3) (2006) 1834–1839.
- [52] D.J. Gregory, M. Olivier, Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*, *Parasitology* 130 (Suppl) (2005) S27–S35.
- [53] M. Olivier, D.J. Gregory, G. Forget, Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view, *Clin. Microbiol. Rev.* 18 (2) (2005) 293–305.
- [54] S. Srivastav, S. Kar, A.G. Chande, R. Mukhopadhyaya, P.K. Das, *Leishmania donovani* exploits host deubiquitinating enzyme A20, a negative regulator of TLR signaling, to subvert host immune response, *J. Immunol.* 189 (2) (2012) 924–934.
- [55] N. Parmar, P. Chandrakar, S. Kar, *Leishmania donovani* subverts host immune response by epigenetic reprogramming of macrophage M(Lipopolysaccharides + IFN- γ)/M(IL-10) polarization, *J. Immunol.* (2020) jii900251.
- [56] C. Matte, A. Descoteaux, *Leishmania donovani* amastigotes impair gamma interferon-induced STAT1alpha nuclear translocation by blocking the interaction between STAT1alpha and importin-alpha5, *Infect. Immun.* 78 (9) (2010) 3736–3743.
- [57] J.M. Silverman, J. Clos, E. Horakova, A.Y. Wang, M. Wiesig, I. Kelly, M.A. Lynn, W.R. McMaster, L.J. Foster, M.K. Levings, N.E. Reiner, *Leishmania* exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells, *J. Immunol.* 185 (9) (2010) 5011–5022.
- [58] J. Lemaire, G. Mkannez, F.Z. Guerfali, C. Gustin, H. Attia, R.M. Sghaier, C. Sysco, K. Dellagi, D. Laouini, P. Renard, MicroRNA expression profile in human macrophages in response to *Leishmania major* infection, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (10) (2013), e2478.
- [59] N. Tiwari, V. Kumar, M.R. Gedda, A.K. Singh, V.K. Singh, S. Gannavaram, S. P. Singh, R.K. Singh, Identification and characterization of miRNAs in response to *Leishmania donovani* infection: delineation of their roles in macrophage dysfunction, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 314.
- [60] M.B. Carneiro, M.E. Lopes, L.S. Hohman, A. Romano, B.A. David, R. Kratofil, P. Kubas, M.L. Workentine, A.C. Campos, L.Q. Vieira, N.C. Peters, Th1-Th2 Cross-regulation controls early *Leishmania* infection in the skin by modulating the size of the permissive monocytic host cell reservoir, *Cell Host Microbe* (2020).
- [61] U. Schleicher, K. Paduch, A. Debus, S. Obermeyer, T. König, J.C. Kling, E. Ribechini, D. Dudziak, D. Mouggiakakos, P.J. Murray, R. Ostuni, H. Körner, C. Bogdan, TNF-mediated restriction of arginase 1 expression in myeloid cells triggers type 2 no synthase activity at the site of infection, *Cell Reports* 15 (5) (2016) 1062–1075.

- [62] D. Sacks, N. Noben-Trauth, The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice, *Nat. Rev. Immunol.* 2 (11) (2002) 845–858.
- [63] S.D.O. Silva, A.A. Wu, D.A. Evans, L.Q. Vieira, M.N. Melo, *Leishmania* sp. isolated from human cases of cutaneous leishmaniasis in Brazil characterized as *Leishmania major*-like, *Acta Trop.* 112 (3) (2009) 239–248.
- [64] C.F. Anderson, M. Oukka, V.J. Kuchroo, D. Sacks, CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis, *J. Exp. Med.* 204 (2) (2007) 285–297.
- [65] S.J. Green, R.M. Crawford, J.T. Hockmeyer, M.S. Meltzer, C.A. Nacy, *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN- γ -stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor- α , *J. Immunol.* 145 (12) (1990) 4290–4297.
- [66] F.Y. Liew, Y. Li, S. Millott, Tumor necrosis factor- α synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide, *J. Immunol.* 145 (12) (1990) 4306–4310.
- [67] J.L. Boucher, J. Custot, S. Vadon, M. Delaforge, M. Lepoivre, J.P. Tenu, A. Yap, D. Mansuy, N omega-hydroxyl-L-arginine, an intermediate in the L-arginine to nitric oxide pathway, is a strong inhibitor of liver and macrophage arginase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203 (3) (1994) 1614–1621.
- [68] J.P. Tenu, M. Lepoivre, C. Moali, M. Brollo, D. Mansuy, J.L. Boucher, Effects of the new arginase inhibitor N(omega)-hydroxy-nor-L-arginine on NO synthase activity in murine macrophages, *Nitric Oxide* 3 (6) (1999) 427–438.
- [69] D. Jourd'heuil, K.M. Miranda, S.M. Kim, M.G. Espey, Y. Vodovotz, S. Laroux, C. T. Mai, A.M. Miles, M.B. Grisham, D.A. Wink, The oxidative and nitrosative chemistry of the nitric oxide/superoxide reaction in the presence of bicarbonate, *Arch. Biochem. Biophys.* 365 (1) (1999) 92–100.
- [70] D.A. Wink, H.B. Hines, R.Y.S. Cheng, C.H. Switzer, W. Flores-Santana, M.P. Vitek, L.A. Ridnour, C.A. Colton, Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response, *J. Leukoc. Biol.* 89 (6) (2011) 873–891.
- [71] T. Salim, C.L. Sershen, E.E. May, Investigating the role of TNF- α and IFN- γ activation on the dynamics of iNOS gene expression in LPS stimulated macrophages, *PLoS ONE* 11 (6) (2016), e0153289.
- [72] M.B. Carneiro, M.E. Lopes, L.G. Vaz, L.M. Sousa, L.M. dos Santos, C.C. de Souza, A.C. Campos, D.A. Gomes, R. Goncalves, W.L. Tafuri, L.Q. Vieira, IFN- γ -dependent recruitment of CD4(+) T cells and macrophages contributes to pathogenesis during *Leishmania amazonensis* infection, *J. Interferon Cytokine Res.* 35 (12) (2015) 935–947.
- [73] Y. Ohmori, R.D. Schreiber, T.A. Hamilton, Synergy between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in transcriptional activation is mediated by cooperation between signal transducer and activator of transcription 1 and nuclear factor kappaB, *J. Biol. Chem.* 272 (23) (1997) 14899–14907.
- [74] F. Kratochvill, G. Neale, J.M. Haverkamp, L.-A. Van de Velde, A.M. Smith, D. Kawachi, J. McEvoy, M.F. Roussel, M.A. Dyer, J.E. Qualls, P.J. Murray, TNF counterbalances the emergence of M2 tumor macrophages, *Cell Reports* 12 (11) (2015) 1902–1914.
- [75] C.F. Oliveira, D. Manzoni-de-Almeida, P.S. Mello, C.C. Natale, H.C. Santiago, L.S. Miranda, F.O. Ferraz, L.M. Dos Santos, M.M. Teixeira, R.M. Arantes, L.Q. Vieira, Characterization of chronic cutaneous lesions from TNF-Receptor-1-deficient mice infected by *Leishmania major*, *Clin. Develop. Immunol.* 2012 (2012), 865708.
- [76] L.Q. Vieira, M. Goldschmidt, M. Nashleas, K. Pfeffer, T. Mak, P. Scott, Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication, *J. Immunol.* 157 (2) (1996) 827–835.
- [77] M. Nashleas, P. Scott, Activated T cells induce macrophages to produce NO and control *Leishmania major* in the absence of tumor necrosis factor receptor p55, *Infect. Immun.* 68 (3) (2000) 1428–1434.
- [78] L.M. Sousa, M.B. Carneiro, L.M. Dos Santos, C.C. Natale, M.E. Resende, D. Mosser, L.Q. Vieira, IL-18 contributes to susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection by macrophage-independent mechanisms, *Cytokine* 74 (2) (2015) 327–330.
- [79] E.M. Palmieri, M. Gonzalez-Cotto, W.A. Baseler, L.C. Davies, B. Ghesquiere, N. Maio, C.M. Rice, T.A. Rouault, T. Cassel, R.M. Higashi, A.N. Lane, T.W. Fan, D. A. Wink, D.W. McVicar, Nitric oxide orchestrates metabolic rewiring in M1 macrophages by targeting aconitase 2 and pyruvate dehydrogenase, *Nat. Commun.* 11 (1) (2020) 698.
- [80] J. Postat, R. Olekhnovitch, F. Lemaître, P. Bouso, A metabolism-based quorum sensing mechanism contributes to termination of inflammatory responses, *Immunity* 49 (4) (2018) 654–665 e5.
- [81] P. Kropf, J.M. Fuentes, E. Fährlich, L. Arpa, S. Herath, V. Weber, G. Soler, A. Celada, M. Modolell, I. Müller, Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis *in vivo*, *FASEB J.* 19 (8) (2005) 1000–1002.
- [82] V. Iniesta, J. Carcelen, I. Molano, P.M. Peixoto, E. Redondo, P. Parra, M. Mangas, I. Monroy, M.L. Campo, C.G. Nieto, I. Corraliza, Arginase 1 induction during *Leishmania major* infection mediates the development of disease, *Infect. Immun.* 73 (9) (2005) 6085–6090.
- [83] J.A. Knipper, S. Willenborg, J. Brinckmann, W. Bloch, T. Maaß, R. Wagener, T. Krieg, T. Sutherland, A. Munitz, M.E. Rothenberg, A. Niehoff, R. Richardson, M. Hammerschmidt, J.E. Allen, S.A. Eming, Interleukin-4 receptor α signaling in myeloid cells controls collagen fibril assembly in skin repair, *Immunity* 43 (4) (2015) 803–816.
- [84] K. Paduch, A. Debus, B. Rai, U. Schleicher, C. Bogdan, Resolution of cutaneous leishmaniasis and persistence of *Leishmania major* in the absence of arginase 1, *J. Immunol.* 202 (5) (2019) j11801249-1464.
- [85] B.D. Fleming, D.M. Mosser, Regulatory macrophages: setting the threshold for therapy, *Eur. J. Immunol.* 41 (9) (2011) 2498–2502.
- [86] M. Vieth, A. Will, K. Schroppel, M. Rollinghoff, A. Gessner, Interleukin-10 inhibits antimicrobial activity against *Leishmania major* in murine macrophages, *Scand. J. Immunol.* 40 (4) (1994) 403–409.
- [87] P. Chandrasekaran, S. Izadjoo, J. Stimely, S. Palaniyandi, X. Zhu, W. Tafuri, D. M. Mosser, Regulatory macrophages inhibit alternative macrophage activation and attenuate pathology associated with fibrosis, *J. Immunol.* 203 (8) (2019) 2130–2140.
- [88] S. Tamoutounour, M. Guilliams, F. Montanana Sanchis, H. Liu, D. Terhorst, C. Malosse, E. Pollet, L. Ardouin, H. Luche, C. Sanchez, M. Dalod, B. Malissen, S. Henri, Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin, *Immunity* 39 (5) (2013) 925–938.
- [89] Z. Yang, D.M. Mosser, X. Zhang, Activation of the MAPK, ERK, following *Leishmania amazonensis* infection of macrophages, *J. Immunol.* 178 (2) (2007) 1077–1085.
- [90] Y. Belkaid, K.F. Hoffmann, S. Mendez, S. Kamhawi, M.C. Udey, T.A. Wynn, 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.* 194 (10) (2001) 1497–1506.
- [91] A. Barral, M. Barral-Netto, E.C. Yong, C.E. Brownell, D.R. Twardzik, S.G. Reed, Transforming growth factor β as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (8) (1993) 3442–3446.
- [92] A. Barral, M. Teixeira, P. Reis, V. Vinhas, J. Costa, H. Lessa, A.L. Bittencourt, S. Reed, E.M. Carvalho, M. Barral-Netto, Transforming growth factor- β in human cutaneous leishmaniasis, *Am. J. Pathol.* 147 (4) (1995) 947–954.
- [93] M. Barral-Netto, A. Barral, C.E. Brownell, Y.A.W. Skeiky, L.R. Ellingsworth, D. R. Twardzik, S.G. Reed, Transforming growth factor- β in leishmanial infection: a parasite escape mechanism, *Science* 257 (1992) 545–548.
- [94] M. Abdeladhim, S. Kamhawi, J.G. Valenzuela, What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity, *Infect. Immun.* 82 (2014) 691–703.
- [95] V.D. Atayde, H. Aslan, S. Townsend, K. Hassani, S. Kamhawi, M. Olivier, Exosome secretion by the parasitic protozoan *Leishmania* within the sand fly midgut, *Cell Reports* 13 (5) (2015) 957–967.
- [96] M. Rogers, P. Kropf, B.-S. Choi, R. Dillon, M. Podinovskaia, P. Bates, I. Müller, Proteophosphoglycans regurgitated by *Leishmania*-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival, *PLoS Pathog.* 5 (8) (2009), e1000555.
- [97] R. Dey, A.B. Joshi, F. Oliveria, L. Pereira, A.B. Guimarães-Costa, T.D. Serafim, W. Castro, I.V. Coutinho-Abreu, P. Bhattacharya, S. Townsend, H. Aslan, A. Perkins, S. Karmakar, N. Ismail, M. Karentnick, D. Meneses, R. Duncan, H. L. Hakhasi, J.G. Valenzuela, S. Kamhawi, Sand flies augment severity of leishmaniasis via inflammasome-derived IL-1 β , *Cell Host Microbe* 23 (2018) 1–10.
- [98] T. Araujo-Santos, D.B. Prates, J. Franca-Costa, N.F. Luz, B.B. Andrade, J. C. Miranda, C.I. Brodskyn, A. Barral, P.T. Bozza, V.M. Borges, Prostaglandin E2/leukotriene B4 balance induced by *Lutzomyia longipalpis* saliva favors *Leishmania infantum* infection, *Parasites Vectors* 7 (2014) 601.
- [99] L.R. Hall, R.G. Titus, Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production, *J. Immunol.* 155 (7) (1995) 3501–3506.
- [100] J. Waitumbi, A. Warburg, *Phlebotomus papatasi* saliva inhibits protein phosphatase activity and nitric oxide production by murine macrophages, *Infect. Immun.* 66 (4) (1998) 1534–1537.
- [101] E. Giraud, T. Lestinaova, T. Derrick, O. Martin, R.J. Dillon, P. Volf, I. Müller, P. A. Bates, M.E. Rogers, *Leishmania* proteophosphoglycans regurgitated from infected sand flies accelerate dermal wound repair and exacerbate leishmaniasis via insulin-like growth factor 1-dependent signalling, *PLoS Pathog.* 14 (1) (2018), e1006794.
- [102] K. Hassani, E. Antoniak, A. Jardim, M. Olivier, Temperature-induced protein secretion by *Leishmania mexicana* modulates macrophage signalling and function, *PLoS ONE* 6 (5) (2011), e18724.
- [103] F. Ginhoux, M. Guilliams, Tissue-resident macrophage ontogeny and homeostasis, *Immunity* 44 (3) (2016) 439–449.
- [104] U.M. Gundra, N.M. Girgis, D. Ruckerl, S. Jenkins, L.N. Ward, Z.D. Kurtz, K. E. Wiens, M.S. Tang, U. Basu-Roy, A. Mansukhani, J.E. Allen, P. Loke, Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are phenotypically and functionally distinct, *Blood* 123 (20) (2014) e110–e122.
- [105] Y. Lavin, D. Winter, R. Blecher-Gonen, E. David, H. Keren-Shaul, M. Merad, S. Jung, I. Amit, Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment, *Cell* 159 (6) (2014) 1312–1326.
- [106] S. Heyde, L. Philipsen, P. Formaglio, Y. Fu, I. Baars, G. Hobbel, C.L. Kleinholz, E. A. Seiss, J. Stettin, P. Gintschel, A. Dudeck, P. Bouso, B. Schraven, A.J. Müller, CD11c-expressing Ly6C+CCR2+ monocytes constitute a reservoir for efficient *Leishmania* proliferation and cell-to-cell transmission, *PLoS Pathog.* 14 (10) (2018), e1007374.
- [107] F.L. Ribeiro-Gomes, E.H. Roma, M.B. Carneiro, N.A. Doria, D.L. Sacks, N. C. Peters, Site-dependent recruitment of inflammatory cells determines the effective dose of *Leishmania major*, *Infect. Immun.* 82 (7) (2014) 2713–2727.
- [108] A. Romano, M.B.H. Carneiro, N.A. Doria, E.H. Roma, F.L. Ribeiro-Gomes, E. Inbar, S.H. Lee, J. Mendez, A. Páun, D.L. Sacks, 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. 13 (6) (2017), e1006479.
- [109] C. De Trez, S. Magez, S. Akira, B. Ryffel, Y. Carlier, E. Muraille, iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic *Leishmania major* infection phase of C57BL/6 resistant mice, PLoS Pathog. 5 (6) (2009), e1000494.
- [110] D.L. Costa, D.S. Lima-Junior, M.S. Nascimento, L.A. Sacramento, R.P. Almeida, V. Carregaro, J.S. Silva, CCR2 signaling contributes to the differentiation of protective inflammatory dendritic cells in *Leishmania braziliensis* infection, J. Leukoc. Biol. 100 (2) (2016) 423–432.
- [111] N.D. Glennie, S.W. Volk, P. Scott, Skin-resident CD4+ T cells protect against *Leishmania major* by recruiting and activating inflammatory monocytes, PLoS Pathog. 13 (4) (2017), e1006349.
- [112] S.H. Lee, M. Charmoy, A. Romano, A. Paun, M.M. Chaves, F.O. Cope, D.A. Ralph, D.L. Sacks, Mannose receptor high, M2 dermal macrophages mediate nonhealing *Leishmania major* infection in a Th1 immune environment, J. Exp. Med. 215 (1) (2018) 357–375.
- [113] S.H. Lee, M.M. Chaves, O. Kamenyeva, P.H. Gazzinelli-Guimaraes, B. Kang, G. Pessenda, K. Passelli, F. Tacchini-Cottier, J. Kabat, E.A. Jacobsen, T.B. Nutman, D.L. Sacks, M2-like, dermal macrophages are maintained via IL-4/CCL24-mediated cooperative interaction with eosinophils in cutaneous leishmaniasis, Sci. Immunol. 5 (46) (2020).
- [114] B.M. Abidin, A. Hammami, S. Stager, K.M. Heinonen, Infection-adapted emergency hematopoiesis promotes visceral leishmaniasis, PLoS Pathog. 13 (8) (2017), e1006422.
- [115] A. Hammami, B.M. Abidin, T. Charpentier, A. Fabie, A.P. Duguay, K.M. Heinonen, S. Stager, HIF-1 α is a key regulator in potentiating suppressor activity and limiting the microbicidal capacity of MDSC-like cells during visceral leishmaniasis, PLoS Pathog. 13 (9) (2017), e1006616.
- [116] C. Terrazas, S. Varikuti, S. Oghumu, H.M. Steinkamp, N. Ardıc, J. Kimble, H. Nakhasi, A.R. Satoskar, Ly6C(hi) inflammatory monocytes promote susceptibility to *Leishmania donovani* infection, Sci. Rep. 7 (1) (2017) 14693.
- [117] F. Kong, O.A. Saldarrıaga, H. Spratt, E.Y. Osorio, B.L. Travi, B.A. Luxon, P. C. Melby, Transcriptional profiling in experimental visceral leishmaniasis reveals a broad splenic inflammatory environment that conditions macrophages toward a disease-promoting phenotype, PLoS Pathog. 13 (1) (2017), e1006165.
- [118] J. Schulthess, S. Pandey, M. Capitani, K.C. Rue-Albrecht, I. Arnold, F. Franchini, A. Chomka, N.E. Iloit, D.G.W. Johnston, E. Pires, J. McCullagh, S.N. Sansom, C. V. Arancibia-Carcamo, H.H. Uhlig, F. Powrie, The short chain fatty acid butyrate imprints an antimicrobial program in macrophages, Immunity 50 (2) (2019) 432–445 e7.
- [119] I.N. Gomes, A.F. Calabrich, R.S. Tavares, J. Wietzerbin, L.A. de Freitas, P.S. Veras, Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*, Microbes Infect. 5 (4) (2003) 251–260.
- [120] A. Giudice, C. Vendrame, C. Bezerra, L.P. Carvalho, T. Delavechia, E.M. Carvalho, O. Bacellar, Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection, BMC Infect. Dis. 12 (2012) 75.
- [121] F.O. Novais, R.C. Santiago, A. Bafica, R. Khouri, L. Afonso, V.M. Borges, C. Brodskyn, M. Barral-Netto, A. Barral, C.I. de Oliveira, Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection, J. Immunol. 183 (12) (2009) 8088–8098.
- [122] S.J. Green, R.M. Crawford, J.T. Hockmeyer, M.S. Meltzer, C.A. Nacy, *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN- γ -stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor- α , J. Immunol. 145 (1990) 4290–4297.
- [123] F.O. Novais, A.M. Carvalho, M.L. Clark, L.P. Carvalho, D.P. Beiting, I.E. Brodsky, E.M. Carvalho, P. Scott, CD8+ T cell cytotoxicity mediates pathology in the skin by inflammasome activation and IL-1 β production, PLoS Pathog. 13 (2) (2017), e1006196.
- [124] M. Charmoy, B.P. Hurrell, A. Romano, S.H. Lee, F. Ribeiro-Gomes, N. Riteau, K. Mayer-Barber, F. Tacchini-Cottier, D.L. Sacks, The Nlrp3 inflammasome, IL-1 β , and neutrophil recruitment are required for susceptibility to a nonhealing strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice, Eur. J. Immunol. 46 (4) (2016) 897–911.
- [125] H.W. Murray, C.W. Tsai, J. Liu, X. Ma, Responses to *Leishmania donovani* in mice deficient in interleukin-12 (IL-12), IL-12/IL-23, or IL-18, Infect. Immun. 74 (7) (2006) 4370–4374.
- [126] X.Q. Wei, B.P. Leung, W. Niedbala, D. Piedrafita, G.J. Feng, M. Sweet, L. Dobbie, A.J. Smith, F.Y. Liew, Altered immune responses and susceptibility to *Leishmania major* and *Staphylococcus aureus* infection in IL-18-deficient mice, J. Immunol. 163 (5) (1999) 2821–2828.
- [127] X.Q. Wei, W. Niedbala, D. Xu, Z.X. Luo, K.G. Pollock, J.M. Brewer, Host genetic background determines whether IL-18 deficiency results in increased susceptibility or resistance to murine *Leishmania major* infection, Immunol. Lett. 94 (1–2) (2004) 35–37.
- [128] K.J. Bryson, X.Q. Wei, J. Alexander, Interleukin-18 enhances a Th2 biased response and susceptibility to *Leishmania mexicana* in BALB/c mice, Microbes Infect. 10 (7) (2008) 834–839.
- [129] T.F. Aguilar, J.D. Laman, M. Van Meurs, L. Adorini, E. Muraille, Y. Carlier, Endogenous interleukin-12 is critical for controlling the late but not the early stage of *Leishmania mexicana* infection in C57BL/6 mice, Infect. Immun. 70 (9) (2002) 5075–5080.
- [130] G. Carrada, C. Caneda, N. Salaiza, J. Delgado, A. Ruiz, B. Sanchez, L. Gutierrez-Kobeh, M. Aguirre, I. Becker, Monocyte cytokine and costimulatory molecule expression in patients infected with *Leishmania mexicana*, Parasite Immunol. 29 (3) (2007) 117–126.
- [131] L. Carrera, R.T. Gazzinelli, R. Badolato, S. Hiény, W. Muller, R. Kuhn, D.L. Sacks, *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice, J. Exp. Med. 183 (1996) 515–526.
- [132] M.A. Oliveira, H.C. Santiago, C.R. Lisboa, I.P. Ceravollo, G. Trinchieri, R. T. Gazzinelli, L.Q. Vieira, *Leishmania* sp: comparative study with *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* in their ability to initialize IL-12 and IFN- γ synthesis, Exp. Parasitol. 95 (2) (2000) 96–105.
- [133] A. Sartori, M.A.P. Oliveira, P. Scott, G. Trinchieri, Metacylogenesis modulates the ability of *Leishmania* promastigotes to induce IL-12 production in human mononuclear cells, J. Immunol. 159 (1997) 2849–2857.
- [134] M.A. Oliveira, C.E. Tadokoro, G.M. Lima, T. Mosca, L.Q. Vieira, P.J. Leenen, I. A. Abrahamsohn, Macrophages at intermediate stage of maturation produce high levels of IL-12 p40 upon stimulation with *Leishmania*, Microbes Infect. 7 (2005) 213–223.
- [135] E. von Stebut, S. Tenzer, Cutaneous leishmaniasis: distinct functions of dendritic cells and macrophages in the interaction of the host immune system with *Leishmania major*, Int. J. Med. Microbiol. 308 (1) (2018) 206–214.
- [136] M.M. Kane, D.M. Mosser, The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis, J. Immunol. 166 (2) (2001) 1141–1147.
- [137] L.L.L. Silva, R.S. Gomes, M.V.T. Silva, L.A.B. Joosten, F. Ribeiro-Dias, IL-15 enhances the capacity of primary human macrophages to control *Leishmania braziliensis* infection by IL-32/vitamin D dependent and independent pathways, Parasitol. Int. (2020), <https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102097>.
- [138] D. Chandra, S. Naik, *Leishmania donovani* infection down-regulates TLR2-stimulated IL-12p40 and activates IL-10 in cells of macrophage/monocytic lineage by modulating MAPK pathways through a contact-dependent mechanism, Clin. Exp. Immunol. 154 (2) (2008) 224–234.
- [139] S. Zhang, C.C. Kim, S. Batra, J.H. McKerrow, P. Loke, Delineation of diverse macrophage activation programs in response to intracellular parasites and cytokines, PLoS Negl. Trop. Dis. 4 (3) (2010), e648.
- [140] N.S. Geraci, J.C. Tan, M.A. McDowell, Characterization of microRNA expression profiles in *Leishmania*-infected human phagocytes, Parasite Immunol. 37 (1) (2015) 43–51.
- [141] A. Kumar, S. Das, A. Mandal, S. Verma, K. Abhishek, A. Kumar, V. Kumar, S. Kumar, P. Das, *Leishmania* infection activates host mTOR for its survival by M2 macrophage polarization, Parasite Immunol. 40 (2018), e12586.
- [142] E.L. Racoosin, S.M. Beverley, *Leishmania major*: promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages, Exp. Parasitol. 85 (3) (1997) 283–295.