

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

LEANDRO GONZAGA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS, PRÓ-
RESOLUTIVOS E DA VIA DE SINALIZAÇÃO ERK1/2 EM MODELO MURINO
DE INFECÇÃO POR *Leishmania spp***

Belo Horizonte, MG

2018

LEANDRO GONZAGA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS, PRÓ-
RESOLUTIVOS E DA VIA DE SINALIZAÇÃO ERK1/2 EM MODELO MURINO
DE INFECÇÃO POR *Leishmania spp***

Tese, como requisito parcial, para obter o grau de doutor em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Salles Moura Fernandes – UFMG.

Co-orientadoras: Prof^a. Dr^a. Lirlândia Pires de Sousa – UFMG.

Prof^a.Dr^a. Míriam Conceição De Souza Testasicca - IFMG

Belo Horizonte, MG

2018

Aos meus pais Wilson e Hely e à minha esposa Fernanda.

Agradecimentos

À professora Ana Paula Salles Moura Fernandes, cujos ensinamentos transcenderam, por várias vezes, os limites da academia. Obrigado pela orientação, pelo apoio incondicional e por acreditar em mim ao longo desses anos. A frase do educador e escritor norte-americano William Arthur Ward demonstra bem aquilo que levarei dessa nossa maravilhosa convivência:

*“O professor medíocre conta. O bom professor explica. O professor superior demonstra. O grande professor **inspira**.”*

À professora Lirlândia Pires de Sousa, pela co-orientação. Obrigado por ter me auxiliado na condução deste projeto com valiosas sugestões e questionamentos que lastrearam as bases argumentativas deste trabalho. Agradeço-lhe também por ter me inserido em seu grupo de pesquisa, proporcionando-me grandes momentos de aprendizagem e uma amigável convivência com toda a equipe.

À professora Míriam Conceição de Souza Testassica, pela co-orientação, amizade e por me socorrer inúmeras vezes em relação a todas minhas dúvidas sobre o projeto. Obrigado por ter acreditado em mim e permitir que eu desse continuidade a este intrigante trabalho e que foi iniciado de modo exemplar por você.

Às minhas colegas Dra. Ana Paula Morais Martins Almeida, Dra. Juliana Priscila Vago da Silva e ao meu aluno de iniciação científica Tiago Queiroga Nery Ricotta por todo apoio prestado e por não terem medido esforços para me auxiliar na condução dos inúmeros experimentos contidos neste trabalho.

Aos amigos do laboratório, particularmente Juliano Toledo, Ângela Serufo, Frederico Crepaldi, Daniela Diniz, Breno Goston, Mateus Sá, Carlos, Tatiane Souto e Ana Raquel. Muito obrigado pela maravilhosa convivência, amizade, pelos ensinamentos e, principalmente, pelas incontáveis risadas responsáveis por tornar esta jornada muito mais suave. Serei eternamente grato a todos vocês.

Ao programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas e o programa de Pós Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Minas Gerias

Aos meus pais Wilson de Oliveira e Hely Gonzaga de Oliveira pelo apoio incondicional nesta etapa e por terem me proporcionado, ao longo da vida, todas as condições para a minha formação intelectual. Aos meus irmãos Hilton, Helenice e Hebe pelo carinho e incentivo e demais familiares.

À minha esposa Fernanda, pelo amor e carinho. Obrigado pelo apoio incondicional e por ter sido, por incontáveis vezes, meu “porto seguro” ao longo desta jornada.

A Deus, que me concedeu a vida e proporcionou-me o desfrute de momentos como este.

RESUMO

Neste estudo propusemos investigar de forma comparativa e cinética a resposta inflamatória, em especial a via da MAP cinase ERK 1/2, após a infecção de camundongos BALB/c por *Leishmania braziliensis* ou *L. amazonensis*, modelos de resistência e susceptibilidade, respectivamente. Nossos achados demonstraram que, no modelo de resistência, a cinética de ativação de ERK1/2 segue o curso da infecção, com pico de ativação no ápice do parasitismo tecidual, sendo acompanhado pelo aumento da ativação de NF-kB e níveis elevados de IFN- γ , IL-10 e IL-4, seguido de redução na fase de resolução. Já na infecção por *L. amazonensis*, há uma deficiência temporária na fosforilação de ERK1/2, em estádios tardios da infecção, que resulta em aumento da lesão, parasitismo, ativação de resposta imune específica e níveis elevados de NF-kB e caspase 3. Este fato levou-nos a investigar como a ativação de ERK1/2 poderia afetar a progressão da doença em animais infectados com *L. amazonensis*. Utilizando o inibidor de MEK/ERK, U0126, verificamos que inibição desta via resultou em maiores lesões e carga parasitária, em relação aos animais controle. Foi avaliado ainda o papel da anexina A1 (AnxA1), proteína que tem ação anti-inflamatória e na resolução dos processos inflamatórios, na infecção por ambas as espécies. Na ausência de AnxA1, os camundongos infectados por *L. braziliensis* foram capazes de controlar a replicação do parasita, mas apresentaram respostas inflamatórias mais intensas e capacidade retardada para diminuir o tamanho de suas lesões. Nossos achados também evidenciaram maiores níveis de AnxA1 em amostras sorológicas de pacientes com leishmaniose mucosa, a qual é caracterizada por um processo inflamatório mais intenso, comparado a forma cutânea localizada. De forma similar, a infecção por *L. amazonensis* nos animais AnxA1KO leva a infiltrado celular mais intenso, lesões de maior tamanho, mas não impacta no carga parasitária. Em conjunto os dados obtidos, por meio da abordagem cinética e comparativa, revelaram aspectos significativos na resistência e susceptibilidade à infecção por *Leishmania*, potenciais alvos para o desenvolvimento de novos fármacos e abordagens terapêuticas,

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*; *Leishmania amazonensis*; inflamação; anexina A1; ERK 1/2

ABSTRACT

In this study, we propose to investigate, in a comparative and kinetic way, the inflammatory responses, especially the MAP kinase ERK 1/2 pathway, after infection of BALB/c mice by *Leishmania braziliensis* or *L. amazonensis*, resistance and susceptibility models, respectively. Our findings demonstrated that, in the resistance model, the kinetics of ERK1/2 activation follows the course of the infection, with peak activation at the apex of tissue parasitism, being accompanied by increased NF- κ B activation and elevated IFN- γ , IL-10 and IL-4, followed by reduction in the resolution phase. In *L. amazonensis* infection, there is a temporary deficiency in ERK1/2 phosphorylation, in the late stages of infection, resulting in increased lesion, parasitism and inflammation, activation of specific immune response, NF- κ B and caspase 3. This fact led us to investigate how the activation of ERK1/2 could affect the progression of the disease in *L. amazonensis* infected animals. Using the MEK/ERK inhibitor, U0126, we verified that inhibition of this pathway resulted in bigger lesions and parasitic loads, in relation to the control animals. The role of the annexin A1 (AnxA1), a protein that has an anti-inflammatory action and importance in the resolution of inflammatory processes, was also evaluated in the infection by both species. In the absence of AnxA1, mice infected with *L. braziliensis* were able to control parasite replication but had more intense inflammatory responses and a delayed ability to decrease the size of their lesions. Our findings also showed higher levels of AnxA1 in serological samples from patients with mucosal leishmaniasis, which is characterized by a more intense inflammatory process, compared to the localized cutaneous form. Similarly, *L. amazonensis* infection of AnxA1KO animals leads to a more intense cellular infiltrate and larger and progressive lesions, but no effect on parasite loads. Taken together, the kinetic and comparative data revealed significant aspects of resistance and susceptibility to *Leishmania* infection, potential targets for the development of new drugs and therapeutic approaches.

Keywords: *Leishmania braziliensis*; *Leishmania amazonensis*; inflammation; Annexin A1, ERK ½

LISTA DE FIGURAS

1 - Prevalência de leishmaniose no mundo em 2013	17
2 - Esquema da classificação taxonômica atual de espécies de <i>Leishmania</i> ,	19
3 - Ciclo de vida de <i>Leishmania spp.</i>	21
4 - Cascata de recrutamento de neutrófilos	26
5 - Apoptose	30
6 - Regulação da infecção de <i>Leishmania spp</i> por macrófagos e células dendríticas	40
7 - Curva de desenvolvimento de lesão em camundongos inoculados com <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. braziliensis</i>	60
8 - Parasitismo em camundongos inoculados com <i>L. braziliensis</i> ou <i>L. amazonensis</i> .	61
9 - Produção de IFN- γ e IL-10 por células dos linfonodos drenantes de camundongos inoculados com <i>L. braziliensis</i> ou <i>L. amazonensis</i> .	62
10 - Estado de ativação de proteínas sinalizadoras envolvidas na inflamação e vias apoptóticas após infecção por <i>L. amazonensis</i>	67
11 - Análise dos níveis de expressão ERK1 / 2 total após 2, 5, 6 e 9 semanas pós-infecção por <i>L. amazonensis</i>	68
12 - Fotomicrografias de cortes histológicos de coxim plantar de camundongos BALB/c infectados por <i>L. amazonensis</i> , após 24 horas, 2, 5 e 9 semanas de inoculação	70
13 - Avaliação dos níveis de P- ERK1/2 e da expressão de ERK $\frac{1}{2}$ total em BMDMs de camundongos BALB/c pré-tratados com U0126 e infectados por <i>L. amazonensis</i> .	72
14 - Avaliação da infecção por <i>L. amazonensis</i> e o impacto do tratamento com U0126 na fagocitose de parasitas e níveis de citocinas em BMDMs de camundongos BALB/c	74
15 - Avaliação da infecção por <i>L. amazonensis</i> e o impacto do tratamento com Selumetinib na ingestão de parasitas e níveis de citocinas IL-10 em BMDM's de camundongos BALB/c	75
16 - Avaliação do tratamento com U0126 em estádios específicos da infecção por <i>L. amazonensis</i>	76
17- Avaliação do desenvolvimento da lesão e carga parasitária após infecção por <i>L. amazonensis</i> e tratamento com o inibidor da fosforilação de ERK $\frac{1}{2}$ (U0126)	77
18 - Avaliação dos níveis de citocinas inflamatórias IFN- γ e IL-10 em camundongos BALB/c após infecção por <i>L. amazonensis</i> e tratamento com o inibidor da fosforilação de ERK $\frac{1}{2}$ (U0126).	78

19 - Camundongos BALB/c infectados por <i>L. amazonensis</i> e tratados com o inibidor da fosforilação de ERK ½ (U0126) apresentam maiores alterações histológicas no sítio da lesão após cinco semanas da infecção	79
20 - Avaliação do tratamento com U0126 em estágios precoces da infecção por <i>L. amazonensis</i> .	81
21 - Avaliação do desenvolvimento da lesão e carga parasitária após infecção por <i>L. amazonensis</i> e tratamento com o inibidor da fosforilação de ERK ½ (U0126).	82
22 - Avaliação dos níveis de citocinas inflamatórias IFN-γ e IL-10 em camundongos BALB/c após infecção por <i>L. amazonensis</i> e tratamento com o inibidor da fosforilação de ERK ½ (U0126)	83
23 - Camundongos BALB/c infectados por <i>L. amazonensis</i> e tratados com o inibidor da fosforilação de ERK ½ (U0126) apresentam maiores alterações histológicas no sítio da lesão após cinco semanas da infecção	84
24 - Expressão de AnxA1 em patas de camundongos inoculados com <i>L. amazonensis</i> .	103
25 - Curva de desenvolvimento de lesão em camundongos inoculados com <i>L. amazonensis</i>	104
26 - Parasitismo em camundongos AnxA1KO ou Wild-type inoculados com <i>L. amazonensis</i> .	105
27 - Produção de IL-10 por células dos linfonodos drenantes de camundongos inoculados com <i>L. amazonensis</i>	106
28 - Produção de IL-4 por células dos linfonodos drenantes de camundongos inoculados com <i>L. amazonensis</i>	107
29 - Produção de IFN-γ por células dos linfonodos drenantes de camundongos inoculados com <i>L. amazonensis</i>	108
30 - Fotomicrografias de cortes histológicos de coxim plantar de camundongos BALB/c WT e AnxKO infectados por <i>L. amazonensis</i> , após 5 semanas de inoculação	109
31 - Fotomicrografia de cortes histológicos de coxim plantar de camundongos BALB/c WT e AnxA1KO infectados por <i>L. amazonensis</i> , após 6 semanas de inoculação	110
32 - Score histopatológico do coxim plantar de camundongos BALB/c infectados por <i>L. amazonensis</i> , após 5 e 6 semanas de inoculação	111
33 - Análise <i>in vitro</i> da infecção com <i>L. amazonensis</i> de BMDMs obtidos de animais BALB/c WT e AnxA1KO	113
34 - Produção de TNF-α e IL-10 por células BMDM de camundongos BALB/c WT e AnxA1KO infectados por <i>L. amazonensis</i>	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AnxA1KO	<i>Annexin A1 Knockout mice</i>
AgLa	antígeno particulado de <i>L. amazonensis</i>
AgLb	antígeno particulado de <i>L. braziliensis</i>
AnxA1	anexina A1
ATL	lipoxina induzida por aspirina
ATP	trifosfato de adenosina
ConA	concanavalina A
CR	receptor do complemento
CTCM	meio de cultura completo para células e tecidos
DC	célula dendríticas
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK1/2	<i>extracellular regulated kinase 1/2</i>
FcγR	receptor Fcγ
FnR	receptor fibronectina
FPR2	Formil peptide Receptor 2
GC	glicocorticoide
H&E	hematoxilina-eosina
ICAM	molécula de adesão intercelular
IFN-γ	interferon-γ
IL	interleucina
iNOS	sintase indutível do óxido nítrico
IκB	proteína inibidora de NF-κB
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KO	knockout
LCD	leishmaniose cutânea difusa
LCL	leishmaniose cutânea localizada
LM	leishmaniose mucosa
LO	lipoxigenase
LPG	lipofosfoglicano
LPS	lipopolissacarídeo
LT	leishmaniose tegumentar
LV	leishmaniose visceral

LX	lipoxina
LXA ₄	lipoxina A ₄
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MAPKK	cinases de MAPK
MAPKKK	cinases de MAPKK
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
min.	minutos
MR	receptor de manose
MΦ	macrófago
ND	não detectado
NF-κB	fator de transcrição nuclear-kappa B
NK	<i>natural killer</i>
NO	óxido nítrico
OPD	ortofenilenodiamina
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PG	prostaglandina
PS	fosfatidilserina
ROS	espécies reativas de oxigênio
SFB	soro fetal bovino
TGF-β	fator de crescimento transformante-β
Th1	linfócitos T auxiliares tipo 1
Th2	linfócitos T auxiliares tipo 2
TLR	receptor tipo Toll
TNF-α	fator de necrose tumoral-α
UA	unidades arbitrárias
VCAM	molécula de adesão celular vascular
WB	<i>Western blotting</i>
WT	<i>wild-type</i>

Sumário

1 INTRODUÇÃO	16
Leishmanioses	16
1.2 O Gênero <i>Leishmania</i>	18
1.3 Ciclo de vida	20
1.4 As formas clínicas da leishmanioses	21
1.4.1 Leishmaniose Visceral	22
1.4.2 Leishmaniose tegumentar	22
2 Inflamação e Leishmaniose.....	25
2.1 O processo inflamatório	25
2.2 Resolução da inflamação.....	28
2.3 Apoptose.....	29
2.4 Mediadores pró-resolutivos.....	31
2.4.1 Anexina A1	31
2.4.2 Vias de sinalização celular e elaboração da resposta inflamatória ..	33
2.5 Resposta imune à <i>Leishmania spp</i>	37
2.5.1 Imunidade inata e a Leishmaniose.....	37
2.5.2 Imunidade adaptativa e a Leishmaniose	41
3 Justificativa e relevância deste trabalho	46
3.1 Objetivo geral.....	49
3.2 Objetivos específicos	49
4 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 Animais experimentais	50
4.2 Parasitos.....	50
4.3 Infecção dos animais experimentais.....	51

4.4 Tratamento dos camundongos infectados por <i>L. amazonensis</i> com o inibidor de MAP cinase ERK1/2 - U0126	51
4.5 Obtenção de antígeno particulado de <i>Leishmania</i>	52
4.6 Estimulação de células mononucleares <i>in vitro</i> e quantificação de parasitos	52
4.7 Cultivo de células L929 para obtenção de Macrófagos derivados de Medula óssea (BMDM)	53
4.8 Obtenção de Macrófagos derivados de Medula óssea (BMDMs)	53
4.9 Infecção de BMDMs por <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. braziliensis</i>	54
4.10 Tratamento de células BMDMs com os inibidores de MAP cinase U0126 ou Selumetinib anteriormente à Infecção por <i>L. amazonensis</i>	55
4.11 ELISA para quantificação de citocinas	55
4.12 Análises histológicas	56
4.13 Análises de Western blot (WB)	56
4.14 Análises estatísticas	57
5. Resultados e discussão	58
5.1- Seção 1	59
5.1.1: A infecção de camundongos BALB/c por <i>L. braziliensis</i> tem resolução natural, enquanto animais infectados por <i>L. amazonensis</i> desenvolvem lesões progressivas	59
5.1.2 Discussão Sessão 1	63
5.2: Seção 2:	66
5.2.1 - A inibição da fosforilação da ERK1/2 em estágio específico da infecção por <i>L. amazonensis</i> tem efeitos dramáticos no desenvolvimento da lesão, na carga parasitária e na resposta inflamatória em camundongos BALB/c	66
5.2.2: Camundongos BALB/c infectados por <i>L. amazonensis</i> desenvolvem resposta inflamatória intensa contra o parasito ao longo do processo de infecção	69

5.2.3: A inibição <i>in vitro</i> da via MER/ERK utilizando o inibidor U0126 impactou na fagocitose, na carga parasitária celular e na resposta imune	71
5.2.4: Células BMDM pré-tratadas com selumetinib também apresentam menor atividade fagocítica	74
5.2.5: A inibição precoce da via MER/ERK em camundongos infectados com <i>Leishmania amazonensis</i> desencadeia aumento do tamanho da lesão e do parasitismo tecidual	75
5.2.6: Camundongos tratados com U0126 na fase aguda da infecção por <i>L. amazonensis</i> mantiveram os níveis de fosforilação de ERK1/2 reduzidos por semanas após o término do tratamento e também apresentaram aumento do tamanho da lesão e título de parasitismo.....	80
5.2.7: Discussão Seção 2.....	85
Seção 3:.....	90
5.3.1 O papel da Anexina A1 na infecção por <i>Leishmania braziliensis</i>	90
5.4 Seção 4:.....	102
O papel da Anexina A1 na resolução da resposta inflamatória durante a infecção por <i>Leishmania amazonensis</i>	102
5.4.1 Cinética da expressão local de AnxA1 ao longo da infecção por <i>L. amazonensis</i> em camundongos BALB/c.....	102
5.4.2 Camundongos BALB/c deficientes em AnxA1 e infectados com <i>L. amazonensis</i> apresentam aumento da lesão após sete semanas de infecção.....	104
5.4.3 Avaliação dos níveis das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10 em camundongos BALB/c WT e AnxA1KO infectados com <i>L. amazonensis</i>	106
5.4.4 Na ausência de AnxA1, camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> apresentam exacerbação do processo inflamatório.....	109
5.4.5 Avaliação da infecção de BMDMs de WT e AnxA1KO com <i>Leishmania amazonensis</i>	112
5.4.6 Discussão Seção 4.....	115
5.5 Discussão Geral	119

6 - Conclusões	123
7 Referências Bibliográficas	124
Anexo	144

1 INTRODUÇÃO

Leishmanioses

As leishmanioses constituem um grupo de doenças causadas por mais de vinte diferentes espécies de protozoários parasitas do gênero *Leishmania*. Esses parasitas são transmitidos ao hospedeiro mamífero pela picada de fêmeas hematófagas de flebotomíneos, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*, presentes no velho e novo mundo, respectivamente (WHO, 2016).

Com exceção da Antártida, as leishmanioses acometem indivíduos em todos os continentes onde se encontram aproximadamente 350 milhões de pessoas consideradas em risco de contrair uma das formas clínicas da infecção, principalmente em regiões de maior taxa de pobreza (Figura 1). A incidência de 2 milhões de novos casos a cada ano, tem sido relatada, sendo que destes, 500 mil correspondem a casos de leishmaniose visceral e os demais de leishmaniose tegumentar. Nas áreas endêmicas, o risco de infecção aumenta em decorrência de condições precárias de ocupação do espaço físico, o que leva a crer que a doença tenha sua prevalência fortemente influenciada pelas condições socioeconômicas das regiões afetadas (CHAWLA & MADHUBALA, 2010; ALVAR, 2012).

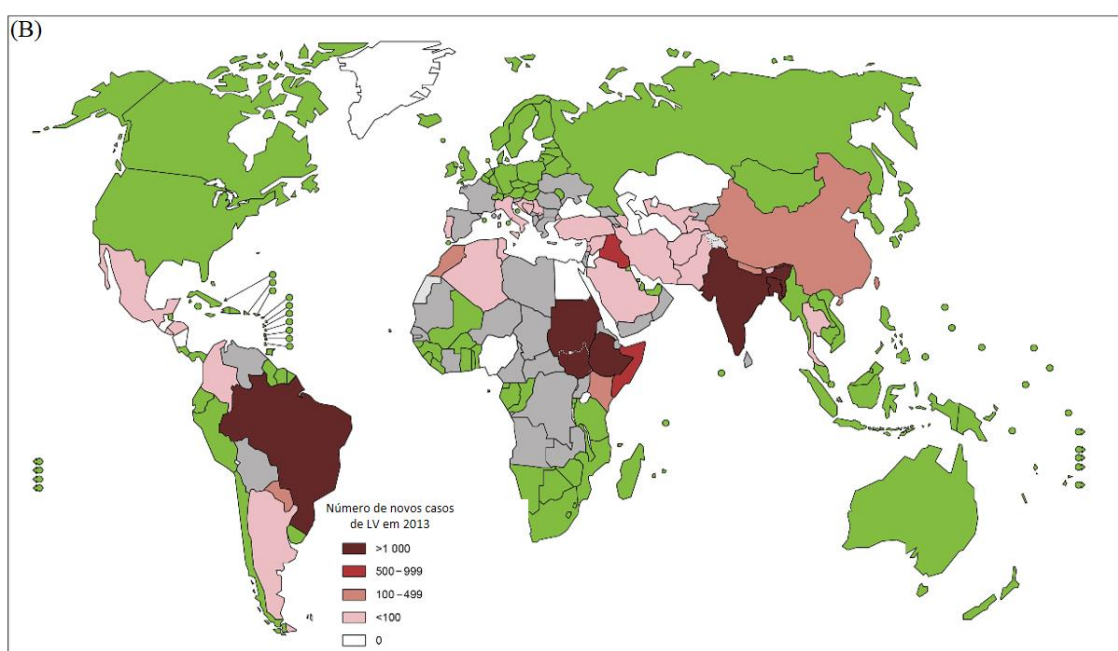
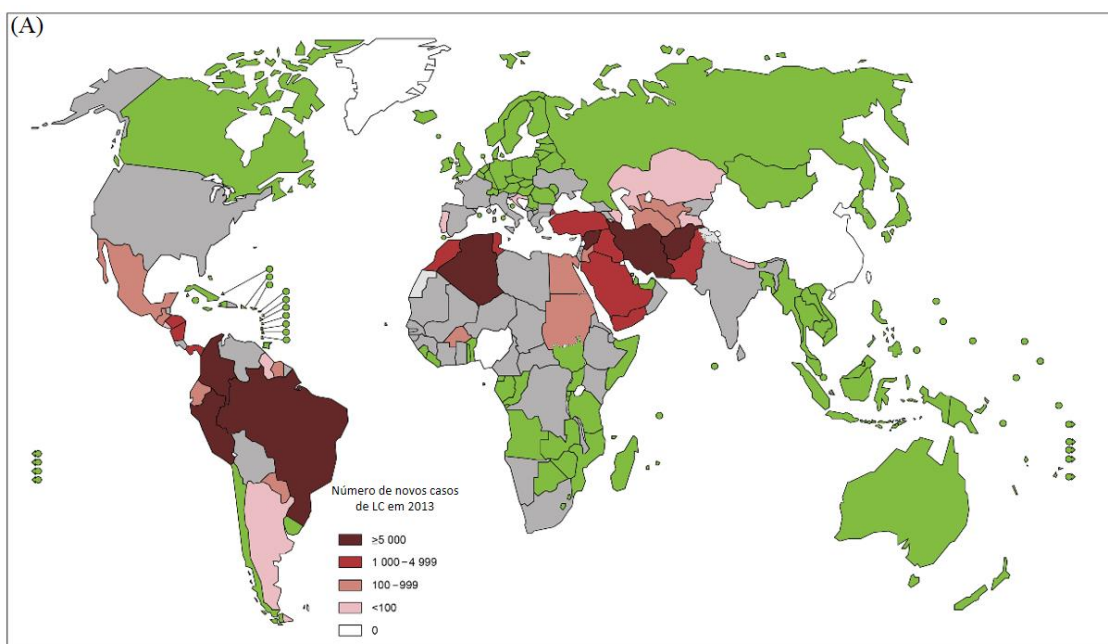


Figura 1: Prevalência de leishmaniose no mundo, em 2013. (A) leishmaniose cutânea; (B) leishmaniose visceral (adaptado WHO, 2015).

1.2 O Gênero *Leishmania*

Gênero *Leishmania* é composto por microrganismos unicelulares pertencentes ao sub-reino Protozoa, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (PACE, 2014; ROSS, 1903). Foi primeiramente descrito por Ronald Ross em 1903, após o médico inglês Sir Willian Boog Leishman identificar um microrganismo desconhecido durante a análise da punção de baço de um paciente que apresentava febre, hepatoesplenomegalia e anemia em um hospital na Índia.

De um total de 30 espécies de *Leishmania* reconhecidas, 20 são patogênicas para humanos (MURRAY *et al*, 2005; ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006). Diferenças morfológicas significativas não são observadas ao microscópio entre as diferentes espécies, sendo necessário métodos bioquímicos e moleculares para identificação e classificação das mesmas.

A classificação do gênero *Leishmania* foi inicialmente baseada em critérios clínicos e bioecoepidemiológicos, tais como relação com vetores, distribuição geográfica, tropismo celular, propriedades antigênicas e manifestações clínicas (BRAY, 1974; LAINSON, R.; SHAW *et al*, 1987). Em virtude desses critérios demonstrarem-se insuficientes, novos parâmetros, como análise por reatividade com anticorpos monoclonais, análises de eletroforese e isoenzimas, foram estabelecidos e contribuíram para a classificação atual do gênero em questão (Figura 2) (PRATT & DAVID, 1981; AKHOUNDI *et al*, 2016).

Em relação a taxonomia, O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros: *Leishmania*, (encontrado no Velho e Novo Mundo) e *Viannia* (exclusivamente encontrado no novo Mundo). Os parasitos são classificados nestes dois subgêneros de acordo com as diferenças anatômicas de seu sítio de desenvolvimento dentro do sistema digestório do vetor. Dessa forma, os parasitos que desenvolvem-se na região anterior e média do intestino do flebotomíneo foram classificados no subgênero *Leishmania*. Já os parasitos que se desenvolvem na região posterior do intestino foram classificados como *Viannia* (LAINSON, R.; SHAW *et al*, 1987)

Um conceito ainda bastante utilizado e que merece destaque é o da classificação das espécies de *Leishmania* em complexos. Baseado em critérios extrínsecos, Shawn e Lainson (1972) reuniram as espécies de *Leishmania* em três complexos: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania mexicana* e *Leishmania donovani* e, recentemente uma nova classificação baseada em seis complexos foi estabelecida (Figura 2).

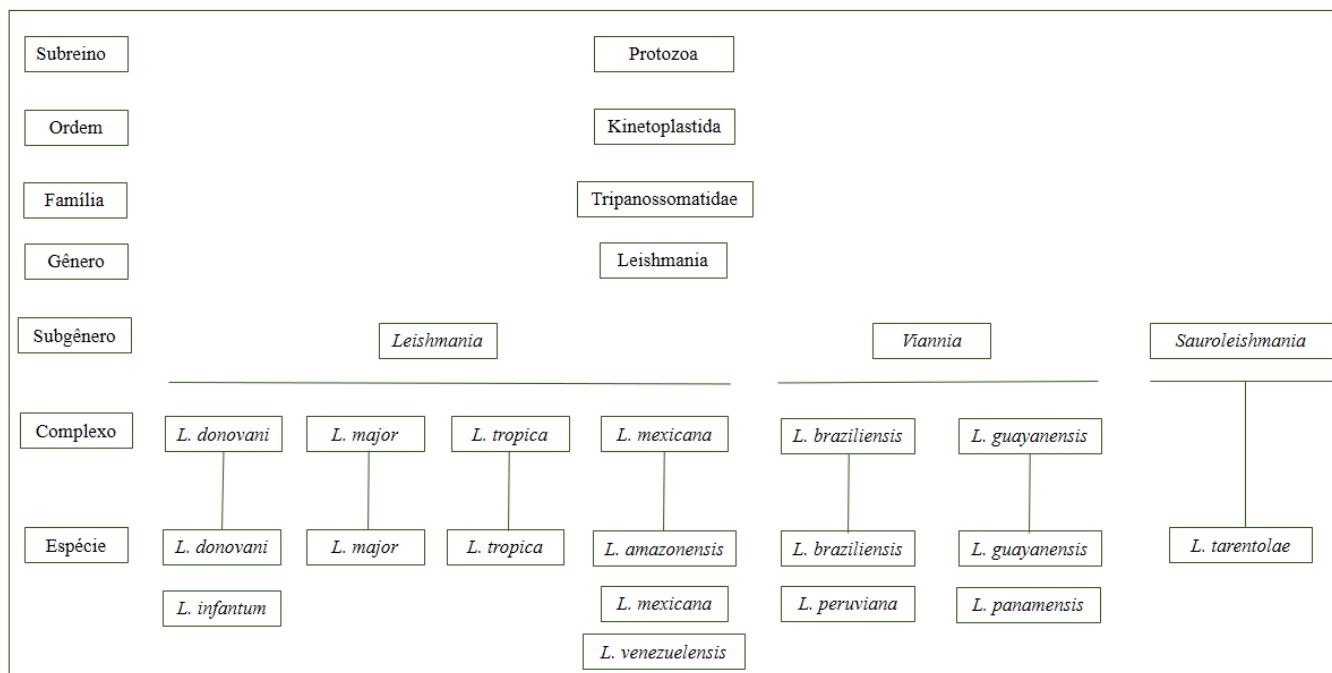


Figura 2: Esquema da classificação taxonômica atual de espécies de *Leishmania*, considerando a descrição original das espécies e classificação proposta com base em critérios extrínsecos e a partir dos resultados obtidos por métodos bioquímicos e moleculares. Adaptado do livro *Leishmanioses do continente americano*, 2014 Ed. Fiocruz.

1.3 Ciclo de vida

Os parasitos do gênero *Leishmania* são adaptados à vida em dois ambientes, com condições físico-químicas totalmente distintas, que são o intestino do inseto vetor e o fagolisossomo de fagócitos do hospedeiro mamífero. Na porção intestinal do inseto vetor, são encontradas formas flageladas dos parasitos, chamadas promastigotas procíclicas, cujo processo de diferenciação envolve diversas morfologias. Ao fim deste estágio de diferenciação, as formas promastigotas infecciosas, denominadas promastigotas metacíclicas, migram para a porção anterior do intestino e são regurgitadas por fêmeas durante o repasto sanguíneo, sendo depositadas na pele do hospedeiro vertebrado. As formas promastigotas, que ocorrem no inseto vetor, possuem de 10 a 20µm de comprimento e apresentam flagelo livre extracelular. A presença do parasita e componentes da saliva do inseto atraem fagócitos para o local da picada, o que permite que essas formas metacíclicas sejam rapidamente internalizadas por células desse hospedeiro e se diferenciem em amastigotas. Essas formas amastigotas, cujo diâmetro varia entre 2 a 4 µm, são considerados parasitos intracelulares estritos, e têm flagelo encurtado e armazenado em sua bolsa flagelar (KAYE; SCOTT, 2011). Ao se replicarem intracelularmente, as amastigotas formam um reservatório de parasitos, permitindo sua transmissão ao vetor durante o repasto sanguíneo, fechando, assim, o ciclo de vida e transmissão da *Leishmania* spp (Figura 3) (ANTOINE *et al*, 2004; DOSTÁLOVÁ e VOLF, 2012; KAYE e SCOTT, 2011; SIBLEY, 2011).

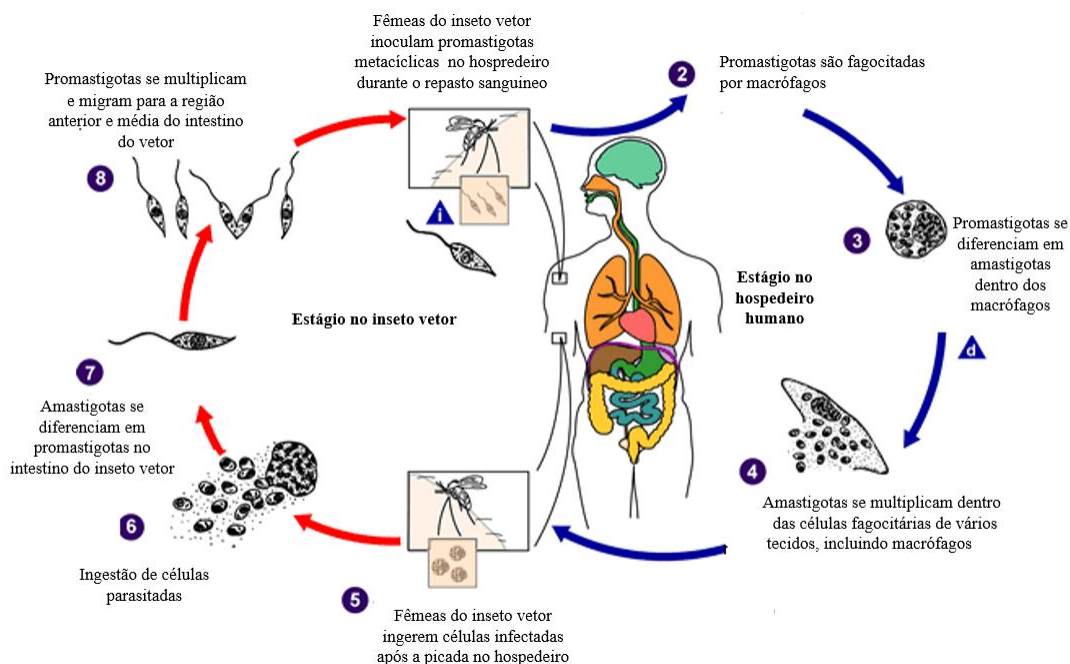


Figura 3 – Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Formas promastigotas procíclicas se diferenciam no intestino do inseto vetor em promastigotas metacíclicas e migram para as porções anteriores do tubo digestório. Durante o repasto sanguíneo, o inseto regurgita as formas promastigotas metacíclicas, juntamente com componentes salivares imunomoduladores. No hospedeiro infectado, as formas metacíclicas são fagocitadas por células locais, estabelecendo residência intracelular, e se diferenciam em amastigotas. Após multiplicação dos parasitos, as células infectadas podem se romper, liberando amastigotas que reinfectam fagócitos presentes no local. O ciclo de transmissão se completa quando fagócitos infectados são ingeridos por outros insetos durante o repasto sanguíneo e as amastigotas se diferenciam em promastigotas no intestino dos flebotomíneos (Adaptado: www.dpd.cdc.gov/dpdx)

1.4 As formas clínicas da leishmaniose

As leishmanioses se apresentam como um conjunto de síndromes que causam diferentes manifestações clínicas, dependentes da espécie do parasito e das características do sistema imune do hospedeiro (SCHRIEFER; WILSON; CARVALHO, 2008). Dentre as formas clínicas incluem a leishmaniose visceral e a leishmaniose tegumentar.

1.4.1 Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral (LV) é a forma das leishmanioses em que os parasitos se localizam, preferencialmente, em órgãos e vísceras dos sistemas hematopoiético e linfático, como fígado, baço, medula óssea e também rins e pulmões. É causada pelas espécies *L. donovani* no Velho Mundo e *L. infantum* no Novo Mundo, e constitui-se na forma de acometimento que apresenta o maior índice de letalidade, principalmente em indivíduos imunocomprometidos portadores de HIV (WHO,2010). Outro agravante é o fato de que os sintomas clínicos do indivíduo, como febre, fadiga, perda de peso e anorexia, se assemelham muito com os sintomas de outras doenças infecciosas, o que dificulta o diagnóstico precoce e aumenta as chances de um quadro fatal.

1.4.2 Leishmaniose tegumentar

Clinicamente, as leishmanioses tegumentares são divididas em leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose cutânea disseminada (LCDi) e leishmaniose mucosa (LM). As formas cutâneas apresentam lesões na pele que, dependendo das picadas infectantes do vetor, podem ser únicas ou múltiplas. As lesões produzidas são de vários tipos e podem cicatrizar espontaneamente em alguns meses. Na forma mucosa, as infecções podem comprometer o trato respiratório ou digestivo alto, atingindo o nariz, nasofaringe, cavidade oral e laringe, isoladamente ou com múltiplo acometimento mucoso. As lesões da mucosa nasal são as mais frequentes e iniciam-se por ulcerações do septo nasal, que podem evoluir para perfuração, com grande potencial destrutivo e mutilante, sendo difícil o tratamento e rara a cura espontânea. A LCL é causada pelas espécies *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica*, no Velho Mundo, e *L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, no Novo Mundo. De modo geral, essa forma clínica caracteriza-se por um lesão ulcerada de bordas elevadas que se desenvolve no local da inoculação do parasito e é autolimitada. A LCD é causada principalmente por *L. amazonensis* e caracteriza-se pelo aparecimento de inúmeras lesões não ulceradas distribuídas por várias regiões do tegumento cutâneo, repletas de parasitos. Já a LM característica da infecção por parasitas do subgênero *Viannia*, particularmente *L.*

brasiliensis, apresenta distribuição tecidual progressiva associada à intensa resposta inflamatória nas vias aerodigestivas superiores, abrangendo a mucosa nasal, oral e faríngea (ANDRADE e DUARTE, 2003; LESSA *et al*, 2007). A inflamação exacerbada nestes casos é responsável pelo baixo parasitismo no sítio da lesão, a qual surge semanas ou meses após o desaparecimento da lesão cutânea inicial, por disseminação hematogênica ou linfática do parasito a partir do foco primário da lesão (NYLEN e EIDSMO, 2012; SOONG *et al*, 2012) (Quadro1).

Como mencionado, mais de uma dezena de espécies de *Leishmania* são capazes de causar a leishmaniose tegumentar no Velho e no Novo Mundo; porém, especificamente no Brasil, os principais agentes causais da LTA são a *Leishmania (Viannia) braziliensis* e a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, as quais são responsáveis por mais de 70% dos casos diagnosticados (SILVEIRA *et al*, 1991). Em relação as manifestações clínicas da LTA desencadeadas pelo parasitismo de cada uma das duas espécies em humanos, existem algumas peculiaridades: enquanto a infecção por *L. amazonensis* normalmente se associa com lesão única e cicatrização espontânea, a *L. braziliensis* é responsável pelas formas mais graves da doença, incluindo a forma mucosa (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006).

Quadro 1 – Particularidades das leishmanioses causadas por *L. braziliensis* ou *L. amazonensis* em humanos e no modelo murino.

Parâmetro	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	Referências
Formas clínicas	 LCL LM	 LCL LCD LV	SILVEIRA et al, 2009; SOONG, 2012.
 Camundongos	Linhagens são resistentes.	BALB/c e C57BL/10: muito susceptíveis; DBA, CBA e C3H: menos susceptíveis.	PEREIRA e ALVES, 2008; SOONG, 2012.
 DCs	Não modula expressão de CD40 em resposta a LPS.	↓ expressão de CD40 em resposta a LPS.	FIGUEIREDO et al, 2012.
 Neutrófilos	Depleção de neutrófilos aumenta susceptibilidade.	Necróticos ou inflamatórios: ↓ parasitismo em MΦs; apoptóticos: ↑ parasitismo.	AFONSO et al, 2008; CARMO et al, 2010; NOVAIS et al, 2009.
 MΦs	↓ produção de TNF-α em resposta a IFN-γ+LPS.	↓ produção de citocinas Th1 e Th2 e ↑ produção de IL-10 em resposta a LPS.	SOUZA et al, 2010; LAPARA e KELLY, 2010.
 IFN-γ	Resistência inicial.	Resistência tardia.	DE SOUZA-NETO et al, 2004; PINHEIRO et al 2007.
 IL-12	Resistência.	Resistência.	HERNÁNDEZ et al, 2006.
 IL-4	- Modulação da resposta Th1. - Susceptibilidade	Susceptibilidade.	COSTA et al, 2011; FELIZARDO, 2012.
 IL-10	Controle da inflamação.	- Susceptibilidade. - Controle da inflamação.	SOUZA et al, 2010; JONES et al, 2002.

Quadro comparativo entre *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis* quanto manifestações clínicas, perfis de resistência e susceptibilidade de camundongos BALB/c, papel das principais células fagocíticas e expressão de citocinas (Adaptado SOUZA-TESTASICCA, 2013).

2 Inflamação e Leishmaniose

2.1 O processo inflamatório

Lesões tissulares de natureza química, física ou biológica desencadeiam um foco inflamatório caracterizado por rubor, calor, dor e edema cuja finalidade é, em última análise, reestabelecer o equilíbrio fisiológico e, conseqüentemente, promover a cicatrização da região lesada (ALBINI *et al*, 2005; BALKWILL *et al*, 2005). Esses sinais cardinais, como são conhecidos, são explicados da seguinte maneira: na presença de um agente nocivo, ocorre liberação de mediadores químicos que provocam aumento da permeabilidade vascular, permitindo o extravasamento de líquido do interior dos vasos para a cavidade intersticial, gerando o edema. O fluxo sanguíneo mais intenso na região lesada e conseqüente hipertrofia do calibre dos vasos provocam o calor e rubor característicos. A dor é decorrente da estimulação das terminações nervosas por substâncias como bradicinina e prostaglandinas, liberadas durante o processo inflamatório. Há, ainda, o último sinal cardinal, que é a perda de função do órgão decorrente do edema, da dor e da substituição de células funcionais por tecido de cicatrização (PUNCHARD *et al*, 2004).

Com a finalidade de promover a defesa e o remodelamento do tecido durante o processo inflamatório, ocorre a migração de leucócitos para a região lesada. Os neutrófilos constituem as primeiras células de defesa a adentrar no foco da lesão. São atraídos por citocinas inflamatórias liberadas por plaquetas ativadas e células endoteliais para promover a limpeza do local (fagocitose) e impedir a invasão e/ou proliferação de microrganismos patogênicos (DIEGELMANN & EVANS, 2004).

O processo de recrutamento dos neutrófilos envolve as etapas de captura, rolamento, adesão, rastejamento e diapedese (Figura 4). Após contato direto com estímulos inflamatórios, ocorre a liberação de mediadores inflamatórios provenientes principalmente das células residentes, o que desencadeia um aumento na expressão das moléculas de adesão E-selectina e P-selectina pelas células endoteliais. Essas

selectinas reconhecem seus ligantes expressos na superfície de neutrófilos, levando essas células a rolarem ao longo do endotélio. Este rolamento potencializa o contato dos neutrófilos com as células endoteliais que apresentam quimiocinas ligadas à sua superfície. A ligação destas quimiocinas aos receptores presentes nos neutrófilos induz mudanças conformacionais nas integrinas superficiais, aumentando sua afinidade por seus ligantes. Neutrófilos expressam as integrinas LFA1 e MAC1 que se ligam a moléculas presentes na superfície do endotélio, como molécula de adesão intercelular (ICAM)-1, ICAM-2 e molécula de adesão celular vascular (VCAM)-1. Esta ligação promove a firme adesão dos neutrófilos ao endotélio. Em seguida, essas células rastejam sobre o endotélio até localizarem um sítio propício para sua transmigração, processo que depende de integrinas e outras moléculas de adesão, como molécula de adesão plaqueta-célula endotelial (PECAM)-1 (ALESSANDRI *et al*, 2013; KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013; PHILLIPSON *et al*, 2006).

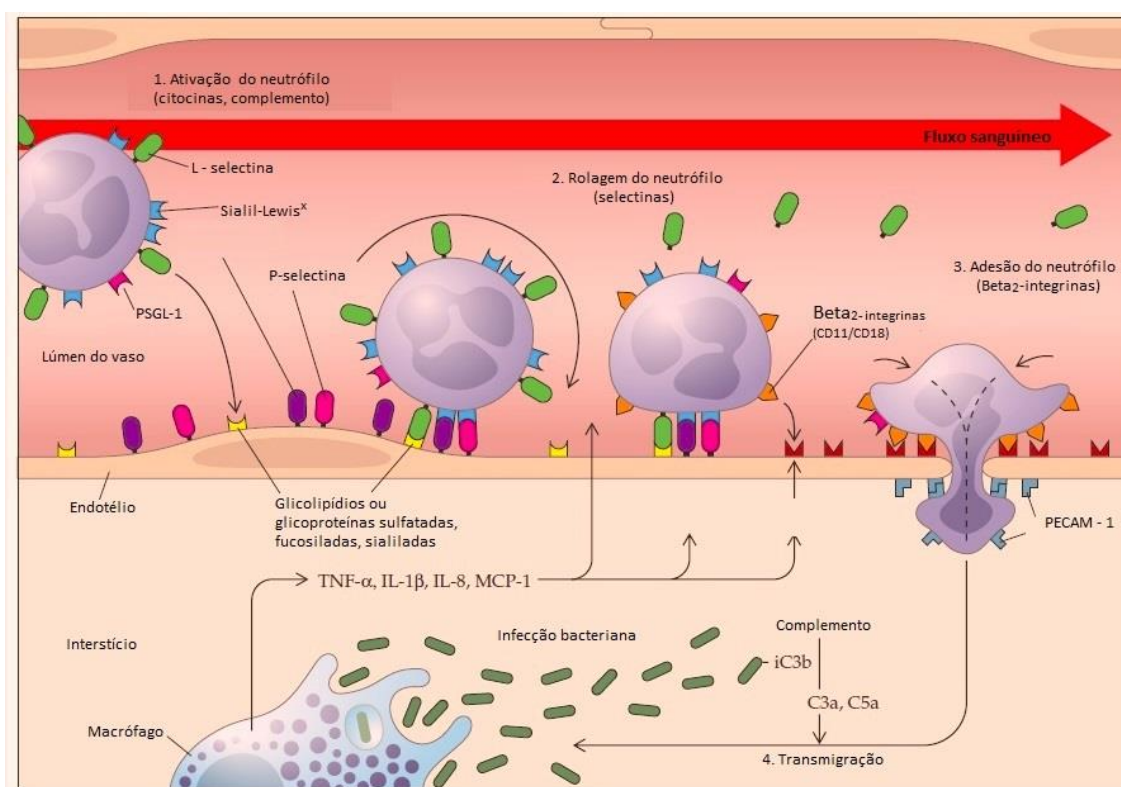


Figura 4 – Cascata de recrutamento de neutrófilos. As selectinas são as principais moléculas envolvidas no rolamento, enquanto adesão e rastejamento dependem principalmente de integrinas. Quimiocinas expostas na superfície das células endoteliais ativam os neutrófilos em rolamento, induzindo mudanças conformacionais nas integrinas e, assim, possibilitando os eventos subsequentes. Neutrófilos rastejantes atingem os sítios preferenciais para transmigração guiados por gradiente de quimiocinas (Adaptada de <http://www.medicinanet.com.br/m/conteudos/acp-medicine/5797/sepse.htm>)

Numa sequência temporal, os monócitos, também atraídos por citocinas inflamatórias, migram do espaço intravascular para a região da lesão, local onde são ativados e passam a ser denominados de macrófagos. Essas células ativadas secretam mediadores inflamatórios como óxido nítrico (NO), interleucina (IL)-6, IL-12, fator de necrose tumoral (TNF- α) e fatores de crescimento, que atuam em processos importantes, como deposição de colágeno, angiogênese e contração da ferida (TIMOTHY & DIPIETRO, 2011) (Figura 4).

Ainda no contexto da resposta imune frente a infecção por *leishmania spp*, as células dendríticas exercem papel crucial do desenvolvimento da imunidade adaptativa. São as células de Langerhans responsáveis pela captura, processamento e apresentação do antígeno para os linfócitos T (STEINMAN, 2007). Essas células também, ao serem infectadas, produzem IL-12 que por sua vez tem o papel de estimular a produção de IFN- γ pelos linfócitos TCD4⁺ e, conseqüentemente, induzir uma resposta do tipo Th1 importante para o controle do parasita (DONG, 2012).

Estabelecido o processo inflamatório com conseqüente eliminação ou estabilização do agente nocivo, o organismo pode responder de duas maneiras: reestruturar o local da injúria e promover a reconstrução do tecido lesado, no caso de eliminação do estímulo nocivo ou, caso o agente nocivo persista, dar continuidade ao processo inflamatório com a finalidade de amplificar sua resposta (KUN LING, 2014)

Atualmente é clara a ideia que a inflamação é uma resposta fisiológica protetora, isto é, que promove reparação tecidual e é autolimitada. Qualquer fator desregulador deste processo pode ser deletério ao hospedeiro como acontece nas inflamações crônicas e no câncer. Portanto, dependendo do contexto, as células inflamatórias podem ter papel benéfico e/ou prejudicial estando envolvidas na patogênese de diversas doenças incluindo as neoplasias (COUSSENS & WERB, 2002).

2.2 Resolução da inflamação

A resolução da inflamação é um processo ativo e contínuo que envolve a ativação de um programa endógeno com produção e liberação de diferentes mediadores bioquímicos e ativação de vias de sinalização que garantem a restauração rápida e bem sucedida da homeostase do tecido (SERHAN *et al.*, 2007; ALESSANDRI *et al.*, 2013; SOUSA *et al.*, 2013). Por si só, a eliminação do estímulo flogístico limita a produção de mediadores pró-inflamatórios, impedindo a ativação adicional de vias relacionadas à manutenção da resposta inflamatória (SERHAN *et al.*, 2007). No entanto, os leucócitos que migraram para o sítio da lesão com função de neutralizar o agente agressor necessitam ser eliminados, a fim de se evitar maiores danos ao tecido (ALESSANDRI *et al.*, 2013). Para isso, de modo geral, essas células iniciam um processo de apoptose e induzem sua própria fagocitose não flogística por macrófagos (processo chamado eferocitose), ao expressarem marcadores de superfície, como fosfatidilserina, por exemplo. Somado a este fato, mediadores pró-resolutivos induzem o recrutamento adicional de monócitos não flogísticos, a fim de intensificar o processo de eferocitose (MCARTHUR *et al.*, 2015). Por fim, quando o *clearance* de células apoptóticas se completa, os MΦs podem seguir dois caminhos: morrer por apoptose, ou deixar o tecido por recirculação em vasos linfáticos (BELLINGAN *et al.*, 2002; GAUTIER *et al.*, 2013).

2.3 Apoptose

A apoptose é um processo fisiológico de morte celular programada em eucariotos e que desempenha papel chave no controle do crescimento e sobrevivência celular, contribuindo dessa maneira para o desenvolvimento normal dos organismos multicelulares (MAURILLO *et al.*, 2001). O processo de apoptose é caracterizado pela condensação da cromatina, fragmentação do DNA, contração da membrana plasmática e projeção de vesículas que desencadeiam a formação dos chamados corpos apoptóticos (WICKMAN *et al.*, 2012).

O reconhecimento das células apoptóticas pelos macrófagos se dá, principalmente, por meio de moléculas de fosfatidilserina, um fosfolípido de membrana que, em células viáveis, é encontrado exclusivamente na porção interna da membrana plasmática e, durante a apoptose, é exposto em sua face externa (FADOK *et al.*, 1992). A expressão dessas moléculas sinalizadoras na superfície celular desencadeia a sua internalização por MΦ, num processo denominado eferocitose. Este processo fornece sinais anti-inflamatórios para os fagócitos, reduzindo os danos ao tecido. Caso a eferocitose não seja apropriada, as células apoptóticas podem sofrer necrose secundária, com liberação do conteúdo celular, danos aos tecidos adjacentes e favorecimento de uma resposta inflamatória local (WICKMAN *et al.*, 2012; SAVILL e FADOK, 2000; AMARANTE-MENDES, 1999).

O processo de apoptose acontece pela ativação de membros de uma família especial de proteases denominados caspases. Em mamíferos, já foram identificados 14 tipos dessas proteases, sendo que nem todas estão envolvidas na apoptose. As caspases 1, 4, 5, 11, 12 e 13, por exemplo, estão envolvidas em processos inflamatórios (LUO *et al.*, 1998; PEREIRA; AMARANTE-MENDES, 2011).

A apoptose pode ser iniciada por duas vias: a via intrínseca ou mitocondrial e a via extrínseca ou de receptor de morte (Figura 5). A apoptose ativada pela via intrínseca é iniciada por vários sinais intracelulares, tais como rompimento do citoesqueleto, ausência de fatores de crescimento, hipóxia, infecção por vírus, bactérias e ação de drogas citotóxicas, e envolve a permeabilização da membrana mitocondrial externa

(AMARANTE-MENDES; GREEN 1999; ELMORE, 2007). Esse processo é desencadeado por elevações nos níveis de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2. Esta família de proteínas citoplasmáticas é caracterizada pela presença de membros que suprimem a apoptose (Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL, A1) ou que a promovem (Bax, Bak, Bik, Bad, Bid, Bim e Puma). No citosol, o citocromo c, liberado pela mitocôndria despolarizada, forma um complexo com a APAF-1 e caspase-9, chamado apoptossomo, que promove a clivagem e consequente ativação da caspase-9, que posteriormente ativa as caspases-3/7 (LIU *et al.*, 2015). A via extrínseca da apoptose é disparada por ligantes extracelulares, que se ligam a receptores transmembranares. O sinal de morte é transmitido para o citoplasma pelo recrutamento das caspases iniciadoras da via extrínseca, que são caspase-8 e caspase-10. Em ambos os casos, segue-se a ativação das caspases efetoras, que são a caspase-3 e a caspase-7 (EARNSHAW *et al.*, 1999; RIEDL e SALVESEN, 2007 MILOT *et al.*, 2011) (Figura 5).

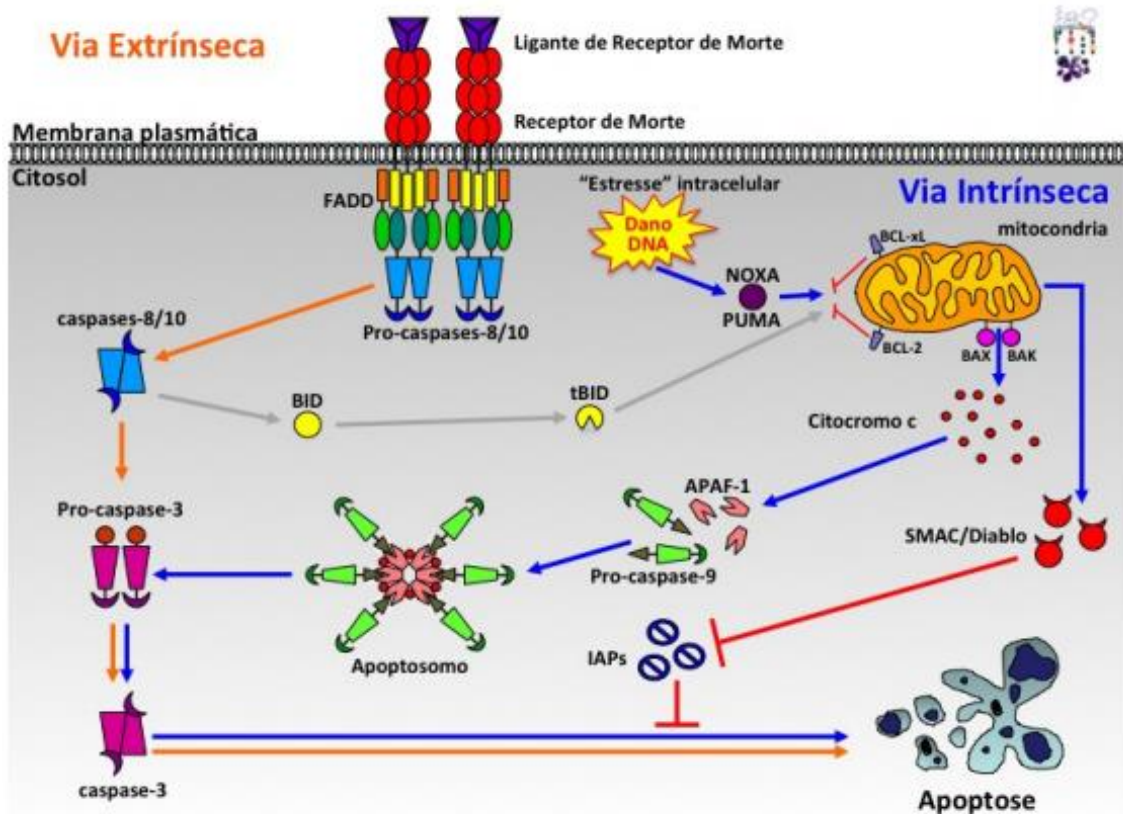


Figura 5: Apoptose: Sinalização do processo de apoptose pela via extrínseca, induzida por meio da interação entre receptores de morte e seus respectivos ligantes e pela via intrínseca, ativada por estresse intracelular. Ambas as vias resultam numa via comum de morte, na qual há ativação de caspase-

3 e 7, que resulta na apoptose. A comunicação com a mitocôndria durante a via extrínseca é realizada pela proteína BID da família BCL-2 (Adaptado MEDINA, L; 2011).

2.4 Mediadores pró-resolutivos

Cessado o estímulo flogístico, tem-se início a terceira fase do processo inflamatório, denominada de fase resolutiva. Essa etapa é coordenada por uma série de moléculas de natureza proteica, como a AnxA1, ou lipídica, como a LXA4, que visam, entre outras funções, bloquear a ação de prostaglandinas e leucotrienos, inibir o recrutamento flogístico de monócitos e induzir a ativação de processos específicos como apoptose e eferocitose. Importa salientar que, diferentemente dos mediadores anti-inflamatórios, os mediadores endógenos de resolução atuam no processo flogístico sem induzir imunossupressão (SERHAN e CHIANG, 2013). Esse fato tem despertado o interesse de pesquisadores em desenvolver novas estratégias terapêuticas utilizando fármacos com ação pró-resolutiva para serem empregados no tratamento de doenças inflamatórias crônicas como colite ulcerativa, doença de Crohn (DANESE *et al*, 2011; BAUMGART *et al*, 2012) e também doenças infecciosas (TAVARES *et al*, 2016).

2.4.1 Anexina A1

Anexina A1 (AnxA1), também conhecida como Lipocortina-1, é uma proteína de 37 KDa, Ca²⁺ dependente e que pertence à superfamília das anexinas, que é constituída por 13 proteínas relativamente abundantes e estruturalmente semelhantes, com membros encontrados tanto no reino animal, como no reino vegetal (GERKE *et al.*, 2002).

Inicialmente descrita por Flower e Blackwell (1979), AnxA1 é um polipeptídeo formado por 346 resíduos de aminoácidos arranjados em quatro sequências repetitivas, com aproximadamente 70 resíduos cada que formam o *core* da proteína. Sua estrutura é constituída por dois domínios principais: o N-terminal, responsável por suas funções

específicas, e o domínio C-terminal, que contém os sítios de ligação ao Ca^{2+} . Em relação a este íon, sabe-se que, em concentrações maiores que 1mM, a AnxA1 extracelular sofre uma mudança conformacional que leva a exposição da região N-terminal e, conseqüentemente, permite sua ligação ao receptor nas células alvo (D'ACQUISTO *et al*, 2008; GAVINS e HICKEY, 2012). O receptor para AnxA1 é denominado de *Formyl peptide receptor* (FPR)-2 murino ou FPRL1 humano, e é expresso em vários tipos celulares, incluindo neutrófilos, monócitos, macrófagos, eosinófilos, células endoteliais e epiteliais (GAVINS e HICKEY, 2012). Interessante salientar que AnxA1 e os peptídeos derivados da sua porção N-terminal competem com a lipoxina A4 e com a proteína amiloide sérica A pelo sítio ativo de FPR2.

A ação anti-inflamatória da AnxA1 decorre de sua capacidade de desencadear a inibição da enzima fosfolipase A2 e, conseqüentemente, de bloquear a síntese do ácido araquidônico, o que gera efeitos inibitórios sobre a geração de prostaglandinas, de leucotrienos e do fator de agregação plaquetária (KIM *et al.*, 2001). Associado a este fato, AnxA1 atua na regulação da migração celular, inibindo a atividade de moléculas de adesão como integrinas, selectinas e também reduzindo afinidade de neutrófilos ativados para ICAM-1 e VCAM-1. Como resultado, ocorre uma diminuição da população de células inflamatórias no sítio da lesão (SOLITO *et al*, 2001; DRECHSLER *et al*, 2015; SUGIMOTO *et al*, 2016). Trabalhos de D. PUPJALIS *et al* (2011) demonstraram que AnxA1 reduz a produção de IL-6 e TNF- α em monócitos estimulados com LPS. Ainda dentro deste contexto, este peptídeo é capaz de provocar a inibição da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e da enzima sintase do óxido nítrico (iNOS), além de estar relacionada com o aumento da liberação de IL-10 em fagócitos, com a indução da apoptose de células inflamatórias e com a remoção de células e corpos apoptóticos (Revisado por SUGIMOTO *et al*, 2016).

O peptídeo sintético Ac2-26 corresponde aos resíduos de aminoácidos 2 a 26 da proteína AnxA1 nativa e possui a extremidade amino-terminal acetilada, a fim de retardar sua degradação proteolítica (VAGO *et al*, 2012). Dados da literatura têm demonstrado que este peptídeo reduz os sinais da inflamação em modelos de edema de pata induzidos por carragenina ou fosfolipase A2, e também no modelo de injeção de IL-1 β em *air-pouch* (CIRINO *et al*, 1993). Em modelo de inflamação pulmonar

induzida por isquemia e reperfusão intestinal, o peptídeo Ac2-26 tem efeitos reguladores e protetores, uma vez que reduz a migração de leucócitos para os pulmões e induz um aumento da concentração de IL-10 no sangue (GUIDO *et al*, 2013).

Alguns trabalhos recentes têm estudado o papel da AnxA1 no contexto de doenças infecciosas. Foi demonstrado que a inoculação intravítrea de taquizoítos de *T. gondii* em camundongos C57BL/6 induziu aumento da expressão de AnxA1 em neutrófilos inflamatórios e células do epitélio pigmentado da retina, sugerindo a participação desta proteína na resposta imune frente à infecção por este protozoário (MIMURA *et al*, 2012). Posteriormente, trabalhos de Koh Hui *et al* (2014) demonstraram que camundongos BALB/c deficientes para AnxA1 são mais susceptíveis a infecção por *Micobacterium tuberculosis*, apresentando maior carga bacteriana e maior dano tecidual quando comparado aos animais selvagens. Ainda, TAVARES *et al* (2016) correlacionaram a baixa expressão/clivagem de AnxA1 com um aumento da inflamação em camundongos BALB/c infectados com *Streptococcus pneumoniae*. Além disso, animais deficientes em AnxA1 apresentaram maior letalidade durante a infecção por *S. pneumoniae*.

Na literatura, há apenas um trabalho correlacionando AnxA1 na infecção por *Leishmania* spp (da SILVA *et al*, 2015), com células obtidas de pacientes diagnosticados com leishmaniose cutânea, em que se verificou que a expressão de AnxA1 é diferentemente modulada durante o curso da infecção, tanto em MΦ, quanto em células T e que esses níveis distintos de expressão estão relacionados com a espécie do parasito em questão. Este fato sugere a relevância dessa proteína na infecção por protozoários deste gênero.

2.4.2 Vias de sinalização celular e elaboração da resposta inflamatória

As cascatas de sinalização celular são redes moleculares complexas que compreendem receptores específicos, elementos de sinalização efetores e proteínas reguladoras, que, em conjunto, detectam, amplificam e integram os mais variados

estímulos celulares (BROOM *et al*, 2009; GOODRIDGE e HARNETT, 2005). A sinalização por algumas dessas cascatas impacta diretamente na produção de mediadores inflamatórios e de sobrevivência celular. Dentre estas, destacam-se a via das *mitogen activated protein kinases* (MAPKs) e a via do fator de transcrição nuclear-kappa B (NF- κ B).

As MAPK são um grupo heterogêneo de proteínas constituído por três cinases que formam um sistema regulatório responsável por estabelecer uma via sequencial de ativação de proteínas cinases: a MAP cinase cinase cinase (MAPKKK), a MAP cinase cinase (MAPKK) e a MAP cinase. Os sinais são em geral transmitidos por meio de fosforilação sequencial de resíduos dos aminoácidos serina e treonina presentes em vários substratos (BROOM *et al*, 2009).

O primeiro componente do módulo MAPKKK pode ser ativado tanto por fosforilação quanto por interação com uma proteína de ligação chamada GTP da família Ras ou Rho. A grande maioria dos substratos das MAPK é formada por fatores de transcrição citoplasmáticos ou nucleares, os quais, após serem ativados, induzem a expressão de genes que promovem a resposta celular apropriada ao estímulo recebido (BROOM *et al*, 2009; HOMMES *et al*, 2003).

As MAPK podem ser categorizadas em cinco subfamílias: ERK 1/2, p38, JNK, ERK 5 e ERK 3/4. É sabido que a MAP cinase ERK1/2 está relacionada com uma série de processos celulares tais quais, crescimento, proliferação e manutenção da viabilidade celular. Também, dentro do contexto inflamatório, existem vários estudos correlacionando esta via com a produção citocinas, quimiocinas e ativação de linfócitos T (HOMMES *et al*, 2003; ARBABI e MAIER, 2002). Trabalhos de SAWATZKY *et al* (2006) afirmam que a via ERK1/2 é responsável pela sobrevivência dos leucócitos dentro sítio da lesão, uma vez que sua inibição favorece a apoptose destas células e, conseqüentemente, contribui para a resolução do processo inflamatório. A ativação clássica das isoformas ERK1 e ERK2 é iniciada pela interação do ligante ao receptor de tirosina kinase (FC γ -R) presente na superfície da membrana plasmática, seguida pela ativação da Proteína G Ras (SILVA *et al*, 2016). Uma vez ativada, Ras recruta e ativa uma proteína cinase denominada Raf, uma MAPKKK que é capaz de ativar MAPKK e MAPK, esta última fosforila ERK 1/2 em seus resíduos de treonina e tirosina

ativando a via (CHAMBARD *et al.*, 2006; SHAUL e SEGER, 2007; KNIGHT and IRVING, 2014).

No contexto das leishmanioses, vários trabalhos têm correlacionado a modulação desta via em populações celulares diversas. Nesse sentido, MΦs peritoneais murinos infectados por formas amastigotas de *L. donovani* apresentaram níveis elevados de ERK1/2 defosforilado associado com aumento de ceramida e diminuição de NO. Fato que tornou a célula mais vulnerável à infecção (GHOSH *et al.*, 2002). Também XIN *et al.* (2008), avaliando a resposta de células dendríticas infectadas por formas amastigotas de *L. amazonensis*, observou que o parasita no interior da célula desencadeava a redução dos níveis de fosforilação de ERK ½ e que este processo prejudicava a ativação das DC e, conseqüentemente, o desenvolvimento de uma resposta th1, favorecendo o parasitismo. Por outro lado, trabalhos de PRIVÉ e DESCOTEAUX (2000) demonstraram que MΦs de camundongos BALB/c ativados por IFN-γ e infectados por promastigotas de *L. donovani* apresentaram maior expressão de ERK1/2, porém associado a maiores concentrações de TNF-α, o que resulta num ambiente hostil para a sobrevivência do parasito. De modo semelhante, YANG *et al.* (2007) demonstrou que BMDMs obtidos de camundongos BALB/c pré estimulados com ácido hialurônico apresentavam níveis elevados de IL-10 decorrentes também da ativação da via de sinalização ERK1/2 e eram mais susceptíveis a infecção por formas amastigotas de *L. amazonensis* opsonizadas com IgG.

Em conjunto, esses dados demonstram que via da MAP cinase ERK ½ é capaz de induzir diferentes perfis de resposta, que variam em função da população celular e da espécie/forma do parasito.

O NF-κB foi descrito por SEN e BALTIMORE em 1986 como uma proteína reguladora da expressão gênica de imunoglobulinas em linfócitos B. Atualmente, sabe-se que este fator também está envolvido na transcrição de diversos genes ligados à resposta imune, à apoptose e à transformação neoplásica celular (YAMAMOTO *et al.*, 2001). Alguns genes cuja expressão é controlada pelo NF-κB estão descritos na literatura; dentre eles, os mais conhecidos são o fator de crescimento GM-CSF, as moléculas de adesão celular MAd-CAM-1, ICAM-1, VCAM; as citocinas IL-1, 2, 6, 8, TNF-α, IFN-α, proteínas anti e pró-apoptóticas, entre outros.

O NF- κ B é um heterodímero composto por duas subunidades: uma proteína de 50 kDa, chamada de p50 ou NF- κ B1, e outra proteína de 65 kDa, chamada de p65 ou RelA. Essas proteínas representam o protótipo clássico do NF- κ B. Durante as fases iniciais da inflamação, prevalecem heterodímeros p65/p50 que promovem a síntese de mediadores pró-inflamatórios e o recrutamento e sobrevivência de leucócitos. Entretanto, durante a fase de resolução do processo inflamatório, prevalecem homodímeros p50/p50, responsáveis pela supressão da síntese de mediadores pró-flogísticos e pela indução de genes pró-apoptóticos (ALESSANDRI *et al*, 2013; LAWRENCE e FONG, 2010; LAWRENCE *et al*, 2001). De modo interessante, alguns estudos na literatura reiteram a direta relação entre ERK $\frac{1}{2}$ e NF- κ B: SOMENSIA *et al* (2017) evidenciaram um mecanismo de ativação de NF- κ B diretamente dependente de ERK $\frac{1}{2}$ em ensaios *in vitro* com células tumorais humanas, já WANG *et al* (2012) atestaram que e NF- κ B apresentam uma via de sinalização em comum, sendo que ERK $\frac{1}{2}$ está *upstream* ao NF- κ B.

Em modelos de infecção por *L. major*, foram atribuídas várias funções à família NF- κ B. Nesse sentido, camundongos C57Bl/6 deficientes em RelA são extremamente susceptíveis à infecção por esta espécie, desenvolvendo lesões com necrose severa e um alto título de parasitos decorrente da baixa produção de iNOS e, conseqüentemente, NO (MISE-OMATA *et al*, 2009). Também DCs de camundongos C57BL/6 deficientes em c-Rel apresentaram produção reduzida de IL-12p40, o que se reflete em menor produção de IFN- γ por estes animais durante a infecção (REINHARD *et al*, 2011; SANJABI *et al*, 2000).

2.5 Resposta imune à *Leishmania spp*

2.5.1 Imunidade inata e a Leishmaniose

O primeiro contato da *Leishmania spp.* com o hospedeiro vertebrado ocorre no momento do repasto sanguíneo em que o inseto regurgita as formas promastigotas metacíclicas, juntamente com componentes imunomoduladores presentes na sua saliva. (RIBEIRO *et al*, 2003). A partir deste momento, desenvolve-se uma resposta contra o parasito que requer a ação coordenada de células da imunidade inata e adaptativa. As primeiras células a entrarem em contato com os parasitos serão as células residentes ou seja, macrófagos dérmicos, células de Langerhans, fibrobrócitos e queratinócitos.

Os queratinócitos, após serem ativados pelo parasito, iniciam a expressão de uma série de receptores de reconhecimento, como o MHC de classe II, por exemplo. A partir deste momento, essas células passam a atuar como agentes apresentadores de antígeno que, por sua vez, provocam a ativação de outras células da imunidade inata e adaptativa (BASHAM *et al*, 1984; KIM *et al*, 2009). Trabalhos anteriores demonstraram que a produção de IL-6 pelos queratinócitos é de extrema importância para a elaboração de uma resposta contra *Leishmania spp*, bem como o desenvolvimento de uma resposta Th1 em modelos murinos experimentais (SAKTHIANANDESWAREN *et al*, 2005). Em outro estudo, EHRCHEM *et al* (2010) demonstraram que essas células são capazes de produzir diversas citocinas, como IL-1 β , IL-12 e TNF- α , em resposta à inoculação de *L. major*

Os fibrócitos são células localizadas no sangue periférico que possuem a habilidade de migrarem rapidamente para o tecido lesado o que lhes confere um papel importante no estabelecimento de infecções por espécies de *Leishmanias spp.* Após a estimulação desencadeada pelo microrganismo, essas células expressam receptores do tipo Toll e FcR γ , essenciais para o reconhecimento e internalização do parasita. (BALMELLI *et al*, 2007; VON STEBUT, 2007; MACEDO-SILVA, 2014). De acordo com

os trabalhos de GRAB *et al* (2004), os fibrócitos possuem um importante papel no estabelecimento da infecção por *Leishmania* spp. uma vez que essas células são capazes de induzir uma resposta do tipo TH2 com elevada produção de IL-10.

Do mesmo modo, fibroblastos humanos infectados por *L. major* geram um ambiente menos hostil para o parasita quando comparado com outros fagócitos, favorecendo o seu desenvolvimento intracelular (CHRISTIAN BOGDAN, 2000).

As células de Langerhans ou células dendríticas (DCs) são componentes importantes da resposta imune inata da pele. Elas são capazes sofrer estimulação de agentes de natureza diversa, incluindo *Leishmania* spp., ao passarem por um processo de maturação e migrarem para o linfonodo regional, onde apresentam os antígenos para as células T, iniciando assim a resposta imune celular (NYLEN E EIDISMO, 2012; MOLL, FLOHÉ and ROLLINGHOFF, 1995). De modo geral as DCs podem influenciar a dicotomia existente entre *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. Enquanto para aquela espécie ocorre o direcionamento de uma resposta para o polo de hiperresponsividade com forte produção de citocinas do tipo TH1, para esta é direcionada uma resposta para o polo hiporresponsivo com forte produção de citocinas do tipo 2 e redução da infiltração de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (SILVEIRA *et al.*, 2004).

Os neutrófilos possuem papel crucial no contexto das leishmanioses. Após o repasto sanguíneo e inoculação intradérmica do parasito, essa população celular recebe estímulos da região lesada e se desloca para o sítio da infecção, onde exerce sua ação fagocítica sobre as formas promastigotas. Posteriormente atuam como células apresentadoras de antígenos para outros fagócitos como os macrófagos, por exemplo (PETERS *et al*, 2008).

Nos últimos anos, estudos focados na função dos neutrófilos na leishmaniose têm demonstrado resultados contraditórios: se por um lado essas células favorecem o controle do parasitismo tanto *in vitro* quanto *in vivo* em camundongos C57Bl/6 infectados por *L. major*, por outro são responsáveis pelo aumento da carga parasitária e exacerbação da doença em camundongos

BALB/c infectados por *L. major* (RIBEIRO GOMES, *et al*, 2004). De acordo com os trabalhos de NONAES *et al* (2009), essa aparente contradição é fruto da variação do modelo murino e dos parasitos, uma vez que a depleção de neutrófilos em

camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* leva a um aumento da carga parasitária e que a presença dessas células estimula a produção de TNF- α e NO pelos macrófagos.

Estudos utilizando os modelos de infecção por *L. major* demonstraram que os neutrófilos atuam como espécie de “cavalo de Tróia”, uma vez que, ao fagocitarem o parasito, tornam-se incapazes de eliminá-lo através de seus mecanismos microbicidas e passam a liberar quimiocinas responsáveis por atrair e induzir a sua própria fagocitose por macrófagos ativados, permitindo assim a entrada silenciosa do parasito nessas células (JOHN e HUNTER, 2008).

Os macrófagos constituem células de defesa chave nos processos de infecção por espécies de *Leishmania spp.* Após a ativação desencadeada pela presença do parasita e sua consequente internalização via interações com receptor de manose (MR), receptor de fibronectina (FnR) e receptores para Fc γ (Fc γ R), essas células disparam mecanismos efetores responsáveis pela eliminação das formas amastigotas do protozoário, (UENO e WILSON, 2012). Interessante salientar que a ligação individual a estes receptores não é suficiente para ativação dos macrófagos, o que indica que a ligação a múltiplos receptores é essencial para o desenvolvimento de uma resposta protetora (DONG e JUDE, 2012). Dentre esses mecanismos podemos destacar a produção de NO induzida pelo aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-1 e TNF- α , por exemplo (BRONTE e ZANOVELLO, 2005).

A ativação de macrófagos pode se dar por dois modelos distintos: a ativação clássica e a ativação alternativa (Figura 6). A primeira ocorre por meio da exposição a citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , produzida principalmente por linfócitos TH1 e células *Natural killer* (NK), que induz a expressão da enzima iNOS (LIEW *et al* ,1990). Por outro lado, os macrófagos podem ser ativados pela via alternativa por meio de citocinas liberadas por linfócitos TH2, como IL-4, e IL-13. Trabalhos de KROPF *et al* (2005), demonstraram que a produção de IL-4 induz a expressão de arginase e favorece a sobrevivência de *L. major* em macrófagos *in vitro*. Ao avaliar também o papel da enzima arginase em modelos de infecção por *Leishmania spp*, HAI QI *et al* (2004) observaram que em macrófagos infectados por *L. amazonensis* ocorre aumento do metabolismo da arginina, elevando os níveis de L-ornitina e ureia na chamada via das

poliaminas. Esse mecanismo também é dependente da arginase e favorece a sobrevivência do parasita no interior do vacúolo parasitóforo (Figura 6).

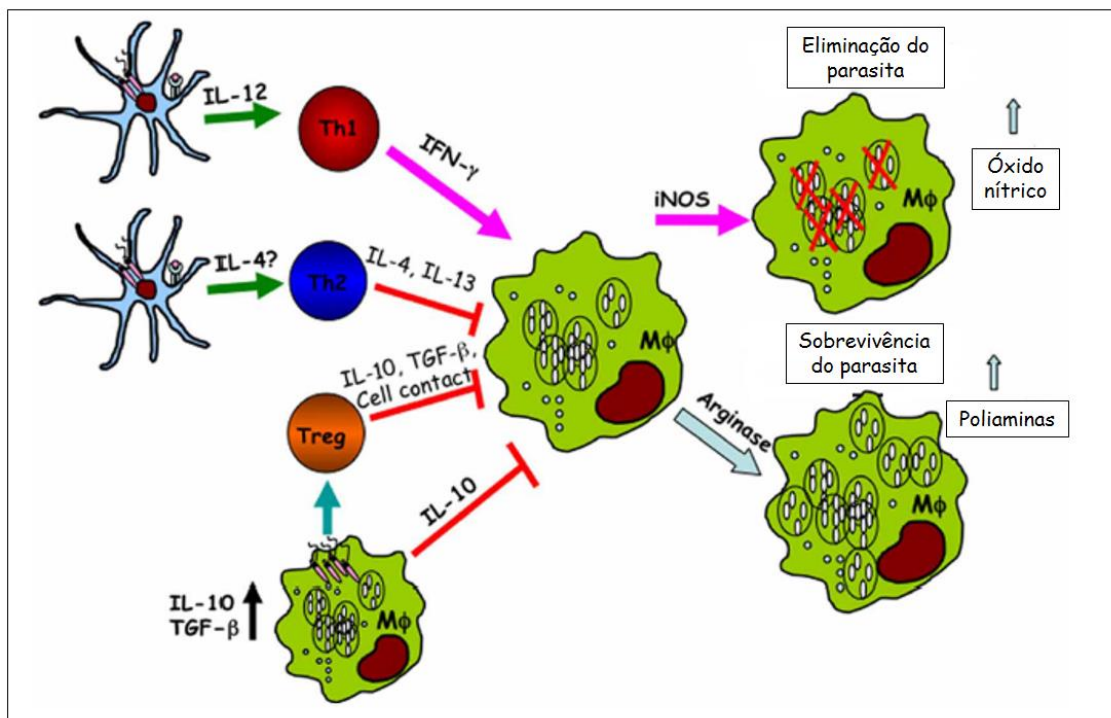


Figura 6: Regulação da infecção de *Leishmania* spp. por macrófagos e células dendríticas. Após a infecção, tanto macrófagos quanto DC fagocitam o protozoário e utilizam-se de diversas estratégias para eliminar o parasito. Citocinas como IFN- γ produzidas por células TH1 ativam os macrófagos pela via clássica e estimulam a expressão de iNOS e consequente produção de NO, importante para eliminar o parasito. Por outro lado, a produção de IL-4 por outras células, como linfócitos TH2, por exemplo, favorecem a ativação alternativa dos macrófagos, com aumento da expressão de arginase e da produção de poliaminas, o que favorece a proliferação intracelular do parasita. Adaptado DONG and JUDE, 2012

2.5.2 Imunidade adaptativa e a Leishmaniose

O equilíbrio entre a amplitude da resposta imune do hospedeiro e a capacidade de evasão do parasito associado à sua virulência constituem fatores determinantes para o desenvolvimento da doença ou sua eliminação. Nesse sentido, a diferença entre resistência e susceptibilidade era atribuído ao desenvolvimento de uma resposta caracterizada pela presença de células TCD4⁺ do tipo Th1 ou Th2, respectivamente (JIAXIANG *et al*, 2003). No entanto, trabalhos mais recentes têm demonstrado que os mecanismos de resistência ou vulnerabilidade à infecção dependem de mecanismos mais complexos relacionados tanto ao hospedeiro quanto ao parasita, bem como a coexistência de uma resposta Th1 e Th2 ou a ausência de uma resposta Th1 (BROMBACHER, 2012; ALEXANDER E BRYSON, 2005).

Já está bem estabelecido o papel das duas subpopulações celulares de linfócitos T CD4⁺ Th1 e Th2 no modelo de Leishmaniose cutânea desencadeada pela infecção com *L. major*. Neste modelo, uma forte polarização Th1, associada com grande produção de IL-12 e IFN- γ leva a resolução espontânea da infecção em camundongos C57BL/6. Em contraste, camundongos BALB/c infectados com a mesma espécie apresentam uma resposta do tipo Th2, caracterizada por altos níveis de expressão de IL-4 e IL-10, o que culmina com aumento da carga parasitária no hospedeiro (SACKS AND NOBEN- TRAUTH 2002).

De modo geral, a capacidade do organismo de controlar o crescimento parasitário e as formas clínicas mais ou menos graves está diretamente relacionada com a maneira que as células do sistema imune interagem entre si. Nesse sentido, a resposta imune adequada para o controle da carga parasitária dependeria da ativação de linfócitos T CD4⁺ capazes de produzir citocinas IL-12 e IFN- γ as quais levam a ativação de macrófagos e a um aumento da expressão de iNOS com consequente produção de NO e radicais superóxidos.

A enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) é responsável por catalisar a síntese de óxido nítrico (NO) a partir do aminoácido L- arginina (QADOUMI *et al*, 2002) e sua expressão é reduzida na presença de citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10, características de uma resposta do tipo Th-2. Esse quadro leva a uma diminuição da

produção de NO e aumento considerável da carga parasitária em macrófagos humanos infectados, gerando as formas graves da infecção, como demonstrado para *L. major* e *L. infantum* (BRANDONISIO *et al*, 2001).

Embora a dicotomia entre as repostas Th-1 e Th-2 relacionada respectivamente a processos de resistência e susceptibilidade à infecção por *L. major* esteja bem estabelecida, esse balanço entre Th-1/Th-2 é insuficiente para explicar o perfil de infecção em modelos murinos desencadeados por *L. amazonensis* (CARNEIRO *et al*, 2015). Tal assertiva decorre de trabalhos que afirmam que baixos níveis de IL-4 foram detectados em camundongos infectados por *L. amazonensis* e que o tratamento com anticorpo anti-IL-4 não foi suficiente para reverter a susceptibilidade à infecção (CORTES *et al* 2010; AFONSO and SCOT, 1993). Além disso, trabalho de HAI QI *et al* (2004) demonstraram que a estimulação de macrófagos com IFN- γ *in vitro* induziu a replicação de formas amastigotas em vez de eliminá-los. Adicionalmente, modelos de infecção *in vivo* demonstraram que IFN- γ não está relacionado com proteção do hospedeiro nos estágios iniciais da infecção por *L. amazonensis* (CARNEIRO *et al*, 2015). Assim, a elaboração de uma resposta imunológica eficaz frente a infecção por espécies de *Leishmania* spp. depende de uma harmoniosa interação entre as células envolvidas, seja no desenvolvimento de uma resposta imune inata ou adaptativa. Diante disso, as quimiocinas e as citocinas representam moléculas chave na elaboração da interação célula-célula (JI *et al*, 2003).

As quimiocinas são pequenos peptídeos responsáveis pelo recrutamento de diversas populações celulares para o local da infecção durante a organização e desenvolvimento de uma resposta imune. Possuem, portanto, um papel chave no processo inflamatório, pois são capazes de determinar qual perfil celular deverá ser predominante no sítio da lesão, de acordo com a natureza do agente flogístico. No contexto das leishmanioses, trabalhos de CHARMOY *et al* (2010) evidenciaram a presença de CCL3, CCL4, CCL5 e CCL20 produzidas por neutrófilos e responsáveis por atrair células dendríticas para o sítio da infecção em um modelo murino de infecção por *L. major*. Também RITTER and KORNER (2002), ao avaliar pacientes infectados com *L. mexicana*, demonstrou que a forma localizada apresentava maior

expressão de CCL2, CXCL9 e CXCL10, enquanto na forma difusa da doença ocorria o predomínio de CCL3 durante a resposta do tipo Th2.

As citocinas são proteínas imunomoduladoras que exercem sua função por meio de interações com receptores específicos da própria célula (automodulação) ou células vizinhas (paramodulação) (CARVALHO, PEARCE & SCOTT, 2008; LIESE, SCHLEICHER & BOGDAN, 2008). No contexto das leishmanioses, a interação entre parasito e hospedeiro desencadeia um modelo de resposta relacionado com perfis de resistência e susceptibilidade - resposta Th1 e Th2, respectivamente - em que as citocinas representam moléculas chave nesse processo.

A citocina IFN- γ é produzida por linfócitos T e células NK. Sua função no contexto das leishmanioses é limitar o crescimento do parasita em macrófagos humanos e murinos, induzindo a síntese ROS e NO nessas células (CARVALHO *et al*, 1992). Essa teoria foi reafirmada por DEKREY *et al* (1998), que verificou que a neutralização de IFN- γ em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* desencadeava um aumento das lesões e do parasitismo local. Também PINHEIRO and ROSSI-BERGMANN (2007) verificaram que IFN- γ é necessário para reduzir o parasitismo em modelo murino de infecção por *L. major* ao reduzir a expansão de populações de células Th2.

A citocina TNF- α é produzida por macrófagos e age em sinergismo com IFN- γ aumentando a ativação de iNOS e assim levando a morte mediada por óxido nítrico (CARVALHO, 2008; BOGDAN; ROLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000; LIEW *et al.*, 1990;). Porém, embora esta citocina seja relevante para o controle da infecção, ela também participa da patogênese das lesões. Essa assertiva foi discutida em trabalho de OLIVEIRA *et al* (2011) em que, em humanos infectados com *L. braziliensis*, houve uma correlação entre o tamanho da úlcera, a produção de TNF- α e o tempo de cura das lesões. Também a avaliação do soro de pacientes infectados por *L. major* demonstrou que os baixos níveis desta citocina estão relacionados com a severidade da doença. Paradoxalmente, camundongos C57BL/6 deficientes em TNF- α e infectados com *L. braziliensis* desenvolveram lesões maiores, com maior parasitismo, durante a fase aguda da infecção (ROCHA *et al*, 2007).

A citocina IL-12 bioativa, chamada IL-12p70, é formada pelas subunidades IL-12p40 e IL-12p35. A subunidade p40 é produzida exclusivamente por DCs e MΦs (ZHANG e WANG, 2008). IL-12 promove a diferenciação e a proliferação de células Th1 produtoras de IFN- γ , citocina que estimula MΦs a produzirem ROS e NO, levando à morte dos parasitos (ALEXANDER *et al*, 1999; HORTA *et al*, 2012; KIMA e SOONG, 2013). No entanto, em modelos de infecção com *Leishmania* spp. foi verificado que o parasito possui mecanismos capazes de contornar os efeitos desta citocina, uma vez que moléculas de fosfoglicano presentes em sua membrana plasmática regulam negativamente a expressão de IL-12 e, conseqüentemente, inibem a expansão de células Th1 e a produção de NO estimulada por IFN- γ (BRANDONISIO *et al*, 2001).

A citocina IL-4 é produzida principalmente por linfócitos T e tem ação moduladora do sistema imune em modelo murinho de infecção por *Leishmania*, regulando a secreção ou inibindo os efeitos protetores de citocinas da resposta do tipo 1 como IFN- γ e IL-12, sendo relacionada à morbidade neste modelo (SILVA *et al.*, 1994). Trabalhos em que foram utilizados modelos murinos infectados por *L. braziliensis* demonstraram que IL-4 atua tanto na modulação da resposta imune, regulando a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IFN- γ (CASTELLANO *et al*, 2009), quanto na ativação da enzima arginase-1 que por sua vez tem a capacidade de competir com a iNOS pelo substrato L-arginina levando à uma menor produção de NO e favorecendo a proliferação do parasita. Por outro lado, a neutralização de IL-4 em camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* promoveu a resolução das lesões em metade do tempo necessário para os animais controle (DEKREY, 1998). De forma semelhante, camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* e deficientes em IL-4 desenvolveram lesões menores e com menor parasitismo, mesmo não apresentando um aumento na produção de IFN- γ (FELIZARDO *et al*, 2012).

A citocina IL-10 exerce um papel modulador na resposta imune frente a infecções por *Leishmania* spp., regulando a ativação de mediadores pró-inflamatórios produzidos por monócitos (HURDAYAL *et al*, 2014). Lesões ativas de pacientes infectados com *L. braziliensis* apresentaram uma maior produção de IL-10 quando comparado a indivíduos controle. Acredita-se que este seja um mecanismo compensatório em resposta aos níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias nesses pacientes

(CASTELLANO *et al*, 2009). Em estudo recente, foi demonstrado que formas amastigotas de *L. braziliensis* induzem a expressão de IL-10 em ensaios com BMDMs, por meio da interação do parasito com receptores TLR-4 (CALDINO *et al*, 2016).

Em modelos murinos de infecção por *L. amazonensis*, IL-10 contribui tanto para a redução do dano tecidual, quanto para o estabelecimento da infecção. Camundongos C57BL/6 deficientes em IL-10 apresentam lesões semelhantes aos animais controle, porém com maior área de necrose (JONES *et al*, 2002).

3 Justificativa e relevância deste trabalho

A leishmaniose tegumentar é um problema grave de saúde pública no Brasil. Dentre as espécies de maior importância no país, destacam-se a *L. braziliensis* e a *L. amazonensis*. Pela sua alta prevalência ou pela gravidade das manifestações que podem desencadear nas populações humanas, além da complexa interação com o sistema imune de seus hospedeiros, estas espécies despertam atenção especial para estudos na área.

A infecção por essas espécies em modelos murinos geram perfis de resistência e susceptibilidade marcadamente diferentes. Embora muito infecciosa para humanos, *L. braziliensis* é, em geral, eficazmente controlada por camundongos. Já a *L. amazonensis* causa lesões progressivas nestes animais, além de determinar diferentes manifestações clínicas em humanos, que podem incluir a LCD e a LV.

Tanto em humanos, quanto em camundongos, a reação inflamatória é um fator importante na patogênese da LT. Lesões teciduais causados pelo excesso de mediadores inflamatórios são componentes significativos das leishmanioses. Assim, o equilíbrio entre a resposta inflamatória, necessária para o controle da multiplicação dos parasitos, e a prevenção das lesões por ela causados é fundamental. Apesar da grande importância da inflamação nas leishmanioses, seu desenvolvimento e regulação nestas doenças ainda não foram completamente investigados. Particularmente, não há estudos cinéticos *in vivo* que permitam caracterizar as vias de sinalização inflamatórias envolvidas nos processos de resistência e susceptibilidade à infecção, bem como também não se sabe o papel desempenhado por mediadores pró-resolutivos endógenos neste contexto.

Sendo assim, é de importância estratégica caracterizar a resposta inflamatória em modelos de resistência e de susceptibilidade à infecção, particularmente no que se refere às vias de sinalização envolvidas em ambos os processos. Também é fundamental a caracterização da participação de mediadores pró-resolutivos em modelos de resolução natural da leishmaniose. Além de representar um avanço significativo no conhecimento da doença, o estudo destas moléculas e vias pode

fornecer subsídios para a investigação de novas possibilidades terapêuticas para a LT.

Considerando, então, a escassez de estudos caracterizando a ativação de vias de sinalização inflamatórias e a participação de mediadores resolutivos, como AnxA1 na infecção por *Leishmania* spp., foram iniciados estudos em nosso grupo de pesquisa visando a avaliação de aspectos cinéticos e comparativos dessa resposta deflagrada por *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. Em síntese, nestes estudos, TESTASICCA (2013) observou que camundongos BALB/c se apresentaram resistentes à infecção por *L. braziliensis*, controlando o parasitismo tecidual e o processo inflamatório, na décima segunda semana pós-infecção. Houve produção precoce de IFN- γ por células do linfonodo e, histologicamente, presença de infiltrado inflamatório precoce e autolimitado. Em contraste, camundongos BALB/c, susceptíveis à *L. amazonensis*, desenvolveram lesões progressivas, com parasitismo crescente. A produção de IFN- γ foi observada apenas nove semanas pós-infecção e, histologicamente, observou-se aparente retardo na infiltração celular, seguido de inflamação exacerbada, com macrófagos intensamente parasitados e áreas de necrose. Houve ativação de ERK1/2 e NF- κ B na infecção por *L. braziliensis*, com posterior retorno aos seus níveis basais associado a diminuição das lesões. A expressão de AnxA1 apresentou perfil similar à curva de lesão, o que coincidiu com a ativação de caspase-3. Houve ainda produção de lipoxina A₄, durante todo o curso da infecção. Por outro lado, na infecção por *L. amazonensis* não foram observadas alterações significativas na ativação de ERK1/2 e NF- κ B, nas semanas iniciais. No entanto, uma forte redução da ativação de ERK1/2 ocorreu na quinta semana pós-infecção, revertida na nona semana. Nesse momento, observou-se também aumento da ativação de NF- κ B e de anxA1. A infecção de camundongos BALB/c deficientes em anxA1 com *L. braziliensis* resultou em lesões maiores, com resolução tardia, em comparação aos controles.

Face aos resultados já alcançados nessa linha de investigação, propusemos aqui, dar continuidade e a essa abordagem, complementando os dados gerados na infecção por *L. braziliensis* e avaliando os diversos parâmetros na infecção por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c, como modelo de suscetibilidade à infecção por leishmaniose. Em todas essas condições foi avaliado o desenvolvimento de lesão e o parasitismo tecidual. Foi avaliado ainda, a cinética da infecção por *L. amazonensis* em

camundongos deficientes em AnxA1, a expressão de marcadores inflamatórios e da proteína pró-resolutiva AnxA1. Por fim, os dados obtidos foram comparados com os resultados prévios obtidos por nosso grupo na infecção de camundongos deficientes de AnxA1 por *L. braziliensis*.

Espera-se, com esta abordagem, contribuir para um maior entendimento dos mecanismos e fatores que possam estar associados à resistência e suscetibilidade às espécies de *Leishmania*, bem como da ação dos marcadores resolutivos ao longo do curso da infecção por estas espécies de protozoários.

3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel da AnxA1 e da via de sinalização de MEK/ERK1/2 no desenvolvimento das lesões e no parasitismo desencadeados pela infecção por *L. braziliensis* ou *L. amazonensis* em modelo murino.

3.2 Objetivos específicos

✓ Caracterizar, comparativamente, a cinética da infecção por *L. braziliensis* ou *L. amazonensis* em camundongos BALB/c quanto ao desenvolvimento de lesão em pata, parasitismo tecidual e a produção de citocinas.

✓ Caracterizar o impacto da inibição da via MEK/ERK1/2, utilizando o inibidor U0126, durante a infecção por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c, quanto ao desenvolvimento de lesão em pata, parasitismo tecidual e a produção de citocinas.

✓ Investigar o efeito da inibição de MEK/ERK1/2 em modelo *in vitro* após infecção por *L. amazonenses* utilizando macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) obtidos de animais BALB/c.

✓ Caracterizar a cinética de infecção por *L. brasiliensis* ou *L. amazonensis* em camundongos BALB/c deficientes em AnxA1, quanto ao desenvolvimento de lesão em pata, parasitismo tecidual, produção de citocinas e ativação de vias sinalizadoras.

✓ Investigar o impacto da deficiência da AnxA1 em modelo *in vitro* quanto ao desenvolvimento da resposta inflamatória frente a infecção por *L. brasiliensis* em macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) obtidos de animais WT e AnxA1 KO.

✓ Avaliar os níveis séricos de AnxA1 em pacientes com a formas cutânea e mucosa da leishmaniose tegumentar causada por *L. braziliensis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Fêmeas de camundongos BALB/c, com idade média entre cinco e seis semanas, foram obtidos do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os animais receberam água e ração comercial *ad libitum*. Os animais *AnxA1 knockout* (*AnxA1 KO*) com *background* BALB/c, bem como seus controles *wild-type* (WT), foram gentilmente cedidos pela Dra. Patrícia Martins, Fiocruz– IOC, Rio de Janeiro, Brasil. Estes animais foram mantidos sob condições controladas no biotério do Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais. Os procedimentos adotados foram submetidos à Comissão de Ética no uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG), protocolo número 240/2016.

4.2 Parasitos

Formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (cepa IFLA/BR/67/PH8) e *Leishmania (Viannia) braziliensis* (cepa MHOM/BR/75/M2903) foram cultivadas a 25°C, em meio de Grace (Sigma Aldrich Inc, St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil); 2mM de L-glutamina (Sigma AldrichInc), 100 U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (Sigma AldrichInc), pH 6,5.

Para manutenção da infecciosidade dos parasitos, os mesmos foram periodicamente recuperados de camundongos BALB/c. Os parasitos foram submetidos a novos repiques em meio de cultura a cada três dias. Em todos os experimentos foram utilizados parasitos com menos de quinze passagens em cultura (DE SOUZA *et al*, 2010).

4.3 Infecção dos animais experimentais

Parasitas obtidos de culturas no início da fase estacionária de crescimento foram lavados duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS), através de centrifugação a $1540 \times g$, a 4°C , por 10 minutos (min.). Para inoculação, os parasitos foram ressuspensos em PBS. O volume total do inóculo foi de $40 \mu\text{L}$ /pata. Camundongos com idade aproximada de seis a sete semanas foram inoculados por via subcutânea, no coxim plantar da pata esquerda traseira, com 1×10^5 promastigotas de *L. amazonensis* ou 1×10^7 promastigotas de *L. braziliensis*. Tal diferença de inóculo foi necessária devido à baixa infectiosidade de *L. braziliensis* no modelo murino (DE SOUZA-NETO *et al*, 2004). O curso da infecção (edema de pata) foi acompanhado semanalmente, utilizando-se um micrômetro digital (Western, Etilux, São Paulo, SP, Brasil). Definiu-se como lesão a diferença de espessura entre a pata infectada e a pata controle (AFONSO e SCOTT, 1993).

4.4 Tratamento dos camundongos infectados por *L. amazonensis* com o inibidor de MAP cinase ERK1/2 - U0126

Os camundongos receberam uma administração intraperitoneal (I.P.) de U0126 (1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis [2- aminofeniltio] butadieno-sinalização celular) 3 mg / Kg / IP diariamente por sete dias consecutivos. A solução de U0126 foi preparada em solução de DMSO de acordo com o protocolo do fabricante e misturada com solução salina estéril antes do uso. Foram estabelecidos dois esquemas de tratamentos para dois grupos de animais: O Primeiro grupo recebeu o inibidor U0126 após 4 semanas de infecção. O tratamento ocorreu por sete dias consecutivos e os animais foram eutanasiados na sequência, ou seja, na quinta semana de infecção para realização das análises propostas. Já o segundo grupo recebeu o inibidor U0126 após duas semanas de infecção. O tratamento ocorreu por sete dias consecutivos e, posteriormente, os animais foram mantidos no biotério com acesso a água e ração e eutanasiados na sexta semana após a infecção para realização das análises propostas

4.5 Obtenção de antígeno particulado de *Leishmania*

Parasitas obtidos de culturas no início da fase estacionária de crescimento foram lavados duas vezes com PBS, através de centrifugação a 1540 x g, a 4°C, por 10 min. Em seguida, foram submetidos a sete ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 37°C. A eficiência de lise dos parasitos foi acompanhada por microscopia óptica (AFONSO e SCOTT, 1993). A dosagem de proteína dos extratos obtidos foi feita pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando-se um reagente comercial (Sigma Aldrich Inc.), de acordo com as orientações do fabricante.

4.6 Estimulação de células mononucleares *in vitro* e quantificação de parasitos

Em diferentes momentos pós-infecção, os animais foram submetidos à eutanásia. A pata infectada e o linfonodo poplíteo drenante foram coletados. Após processamento dos linfonodos em homogeneizador de vidro, coletou-se a suspensão celular ajustou-se sua concentração para 5×10^6 células/mL, em meio de cultura completo para células e tecidos (CTCM), composto por DMEM suplementado com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 25 mM de HEPES (Sigma Aldrich Inc.), pH 7,2. As células foram distribuídas em placas de 48 poços e estimuladas com 50 µg/mL de antígeno particulado homólogo de *Leishmania* ou 10µg/mL de concanavalina A (ConA) como controle positivo. O próprio meio de cultura CTCM foi utilizado como controle negativo (COELHO *et al*, 2003). O sobrenadante foi coletado após 48 horas de incubação a 37°C, 5% de CO₂, e armazenado a -20°C, para posterior dosagem de citocinas (CARVALHO *et al*, 2012a). Para quantificação de parasitos, utilizou-se a técnica da diluição limitante. As patas foram processadas em homogeneizador de vidro, em meio de Grace, pH 6,5. Para retirada de *debris* grosseiros, centrifugou-se a suspensão obtida a 50 x g, a 4°C, por 1min. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 1540 x g, a 4°C, por 10min. O *pellet* obtido foi ressuspendido em meio de Grace suplementado com 10% de SFB, 2mM de L-glutamina, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina. Essa suspensão de parasitos foi submetida à diluição seriada, na proporção de 1:10, em

placa de cultura de 96 poços. Após incubação a 25°C durante 15 dias, os poços foram avaliados com relação à presença de parasitos. Os resultados foram expressos como logaritmo negativo do título de parasitos, que corresponde à última diluição na qual observaram-se parasitos viáveis (DE SOUZA *et al*, 2010). Alternativamente, o parasitismo tecidual foi avaliado por PCR em tempo real (VITALE *et al.*, 2004), de acordo com protocolos já padronizados em no laboratório de Biologia Molecular (ACT/FAFAR).

4.7 Cultivo de células L929 para obtenção de Macrófagos derivados de Medula óssea (BMDM)

Fibroblastos murinos da linhagem L929, produtores de fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), foram gentilmente cedidas pelo Dr. Luís Carlos Crocco Afonso, da Universidade Federal de Ouro Preto, e foram cultivadas em meio de cultura completo para células e tecidos CTCM (Dulbecco's Modified Eagle's medium – DMEM, suplementado com 10% de SFB inativado, L-glutamina 2mM, penicilina G 100U/mL, 50µM de mercaptoetanol (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suíça) e HEPES 25mM, pH 7,2). Em concentração inicial de 2×10^5 células/mL). As células foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂, com trocas de meio de cultivo a cada 48 horas, até as células se tornarem confluentes. Após sete dias de cultura, o sobrenadante foi coletado, centrifugado (1540 g, 4°C, 10 minutos) e esterilizado por filtração. Como o fator de diferenciação está presente no sobrenadante e objetivando novas coletas para manutenção e estoque, foi adicionado meio fresco às culturas até a obtenção de uma quantidade suficiente para todos os ensaios. O sobrenadante foi estocado a -80°C, até o momento do uso.

4.8 Obtenção de Macrófagos derivados de Medula óssea (BMDMs)

Os BMDMs (*Bone marrow derived macrophages*) foram obtidos segundo protocolo descrito por BOLTZ-NITULESCU *et al* (1987). Camundongos BALB/c foram eutanasiados por deslocamento cervical. Em seguida, foram dissecados

asépticamente os fêmures e as tíbias. Os ossos foram mergulhados por dois minutos em álcool 70°GL e lavados com PBS contendo 5% de SFB inativado. Em seguida, as epífises foram cortadas e as diáfises ósseas lavadas com PBS, suplementado de 5% de SFB, para retirada da medula óssea. As células foram ressuspensas em meio de diferenciação (DMEM suplementado com 20% de sobrenadante de cultura de L929, 10% de SFB, 1% de L-glutamina e 100 U/mL de penicilina G), distribuídas em garrafas de cultura e incubadas a 37°C, 5% de CO₂. Quarenta e oito horas após a retirada da medula óssea, foi adicionado mais 20 ml de DMEM com 20% de meio de diferenciação (LCCM) às garrafas de cultura. No 7º dia de cultura, o sobrenadante foi aspirado e descartado. Em cada placa, adicionou-se 2 mL de tripsina para desagregação das células da parede do recipiente, seguido de incubação a 37°C, 5% de CO₂, por 3 minutos. Ao fim do período de incubação, foi adicionado 10 ml de DMEM +10% SFB para neutralizar a ação da tripsina. A suspensão celular foi transferida para tubos estéreis de fundo cônico, lavadas com PBS e tiveram sua concentração ajustada para 1×10^6 células/mL, em meio CTCM. Ao fim do processo de diferenciação, obteve-se, em média, 60 - 77% de BMDMs, em relação ao número inicial de células isoladas da medula óssea dos animais.

4.9 Infecção de BMDMs por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*

Para infecção foram utilizadas 5×10^5 formas promastigotas *L. braziliensis* ou *L. amazonensis*, provenientes de cultura axênica em fase estacionária, submetidas a centrifugação de 50xg por 10 minutos para separar os parasitos mortos. Em uma *chamber slide* (Lab-Tek®) foram adicionados 1×10^5 BMDMs e, após duas horas de fixação, a placa foi lavada com PBS1X e adicionou-se os 5×10^5 parasitos por poço. O tempo de infecção foi de três horas e após esse período, os poços foram novamente lavados com PBS. Finalmente, após os tempos de 6, 24 e 48 horas de infecção as amostras foram coradas com Panótico rápido (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil), conforme instruções do fabricante. A análise de infecciosidade foi feita por contagem, utilizando um microscópio ótico Olympus BX50 (Olympus, Center Valley, PA, USA). Determinou-se o número de células infectadas e não infectadas de acordo com a presença de parasitos nos vacúolos parasitóforos dos BMDMs. A análise estatística foi realizada através do teste pareado de t-student.

4.10 Tratamento de células BMDMs com os inibidores de MAP cinase U0126 ou Selumetinib anteriormente à Infecção por *L. amazonensis*

Alternativamente, macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) de camundongos BALB /c foram submetidos ao pré-tratamento durante duas horas com inibidor de cinase U0126 na dosagem de 15 μ M / well (Cell Signaling Technology, Beverly MA). Paralelamente, outro grupo foi pré-tratado com SELUMETINIB 15 μ M/ well (Selleck Chemical's – USA- cat: AZD6244) Em seguida, promastigotas de fase estacionária de *L. amazonensis* foram adicionadas à culturas a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 5: 1. Após 3 h de infecção, as células foram lavadas com PBS para remover parasitas extracelulares e incubadas com meio fresco a 37 ° C em 5% de CO₂. A infecção dos macrófagos foi avaliada nos tempos de 0, 3, 24 e 48 horas após a infecção, utilizando o kit de coloração de Giemsa (Laborclin, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Determinou-se o número de células infectadas e não infectadas e o número de parasitas presentes nas células infectadas. Um mínimo de 200 macrófagos por lâmina foram examinados.

4.11 ELISA para quantificação de citocinas

A quantificação de citocinas em sobrenadante de cultura foi feita por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Foram utilizados kits da linha BD OptEIA (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) para dosagem das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-4, de acordo com orientações do fabricante. Placas de 96 poços foram sensibilizadas com os anticorpos de captura *overnight*, a 4°C. Em seguida, foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 e secas em papel toalha. Foram adicionados, então, o padrão e as amostras, e seguiu-se a incubação à temperatura ambiente, por duas horas. As placas foram lavadas e os poços receberam o reagente de detecção, contendo o anticorpo de detecção e o reagente enzimático. Após incubação por uma hora à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas, para adição do substrato enzimático H₂O₂ e do reagente de cor, orto-fenilenediamina (OPD – Sigma Aldrich Inc.). Após trinta minutos de incubação à temperatura ambiente,

ao abrigo da luz, a reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 3mol/L. Procedeu-se a leitura espectrofotométrica a 492 nm, utilizando o leitor Emax Molecular Devices e o *software* SoftMax Pro 5.2 (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA).

4.12 Análises histológicas

Após o procedimento de eutanásia, as patas infectadas foram coletadas e fixadas em formol tamponado 10%, por um período mínimo de 48h. Fragmentos desses tecidos foram processados rotineiramente por meio do processador automático de tecidos Lupetec[®] Modelo PT05 (Lupe Indústria Tecnológica de Equipamentos para Laboratório LTDA, São Carlos, SP). Após o processamento, os fragmentos de coxim plantar foram incluídos em parafina à 60°C, submetidos à microtomia com cortes de 4 µm e corados com hematoxilina-eosina (H&E). Os cortes corados assim obtidos foram fixados entre lâmina e lamínula para que fossem analisados. As imagens foram digitalizadas com o auxílio do microscópio óptico de captura Leica[®] DM500 por meio do *software* *Leica Application Suite* versão 2.4.1 (Leica, Wetzlar, Germany). As análises histopatológicas foram feitas por um patologista no modelo “simples cego”.

4.13 Análises de Western blot (WB)

As patas infectadas foram coletadas e os coxins plantares foram isolados. Os fragmentos de tecido ou BMDMs infectados, adicionou-se solução de lise, composta por 1% NP-40, 100mM de Tris/HCl pH 8,0, 10% glicerol, 0,2mM EDTA, 1 mM NaVO₃, 1mM DTT, 1 mM PMSF, 200mM NaCl, 25mM NaF, leupeptina e aprotinina. Os tecidos foram, então, homogeneizados em ultraturrax Power Gen 1000 (Fisher Scientific/IKA, Zuideinde, Netherlands). Após incubação em gelo por 15 minutos, o lisado foi centrifugado (12000 rpm, 15 min., 4°C) e o sobrenadante aliquoteado e armazenado a -20°C até o momento do uso. A dosagem de proteínas totais das amostras foi feita pelo método de Bradford, utilizando-se kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Para cada

amostra, 50 µg de proteína serão desnaturados pela adição de tampão contendo 10% SDS, 10% β-mercaptoetanol, 40% glicerol, 0,05% azul de bromofenol, 0,250M Tris/HCl pH 6,8, e incubação a 100°C, por 5 min. Os extratos proteicos foram fracionados em gel de poliacrilamida/SDS a 10-15%, e transferidos para membranas de nitrocelulose (Hybond™ ECL™, GE Healthcare, Buckinghamshire, NA, UK). As membranas foram bloqueadas com PBS contendo Tween 0,1 % (PBS-T) e 5% de leite em pó desnatado por uma hora, lavadas com PBS-T e incubadas *overnight* em presença do anticorpo primário de interesse, a 4°C. Serão utilizados os anticorpos anti-anexina A1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), anti-β-actina (Sigma Aldrich Inc), anti-iNOS (Santa Cruz Biotechnology Inc, Dallas, TX, USA) anti-caspase-3 clivada, anti-formas fosforiladas das proteínas ERK1/2, NF-κB p65 e p44/42 (MAPK) ERK1/2 #9102 (os quatro últimos da Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Em seguida, as membranas foram novamente lavadas com PBS-T e incubadas com o anticorpo secundário apropriado conjugado à peroxidase, por uma hora, à temperatura ambiente. Por fim, as membranas foram incubadas em solução reveladora ECL-Plus (GE Healthcare), expostas contra filme de raio X (Hyperfilm ECL, GE Healthcare) e reveladas utilizando-se revelador e fixador Kodak, de acordo com as instruções do fabricante (VAGO *et al*, 2012). A análise densitométrica das bandas obtidas foi feita com o *software* ImageJ 1.46r (National Institutes of Health, USA). Após normalização pela expressão da proteína constitutiva β-actina, os dados foram expressos em unidades arbitrárias (UA)

4.14 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Foram analisados por ANOVA seguida do pós-teste de Newman-Keuls, ou pelo teste *t* de Student, de acordo com as características de cada experimento, utilizando-se o *software* GraphPad Prism versão 5.0.3 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se $P < 0.05$. Os resultados são apresentados como média ± SD.

5. Resultados e discussão

Com o objetivo de proporcionar uma melhor compreensão deste trabalho e tornar sua apresentação mais didática, os resultados e discussão foram divididos em 4 seções:

- ✓ Na primeira seção, parâmetros básicos da infecção de camundongos BALB/c por *L. braziliensis* e *L. amazonensis* foram caracterizados como modelos de resistência e suscetibilidade, respectivamente.
- ✓ A segunda seção aborda o papel da via de sinalização MAPK ERK 1/2 e sua inibição por U0126, ao longo do curso da infecção por *L. amazonensis*.
- ✓ Na terceira seção avaliamos o papel da AnxA1 e seu envolvimento no curso da resposta inflamatória, na infecção de camundongos BALB/c por *L. braziliensis* (artigo publicado no periódico "*The Journal of Immunology*", 2017).
- ✓ A quarta seção aborda o papel da AnxA1 no decorrer da resposta inflamatória em camundongos BALB/c, infectados por *L. amazonensis*, dado que o parasitismo por esta espécie constitui-se em um modelo que apresenta curso da infecção e resposta imunológica completamente diferentes da primeira (modelo de resistência), justificando esta segunda abordagem.

5.1- Seção 1

5.1.1: A infecção de camundongos BALB/c por *L. braziliensis* tem resolução natural, enquanto animais infectados por *L. amazonensis* desenvolvem lesões progressivas

A infecção por *L. braziliensis* em BALB/c é caracterizada por um modelo de cura e resolução de lesões, enquanto a infecção por *L. amazonensis* está associada ao desenvolvimento de lesões progressivas e à incapacidade de resolver a infecção (TESTASSICA, 2013; SOONG *et al*, 2012). Inicialmente, afim de validar esses perfis distintos e estabelecer uma base para os parâmetros comparativos subsequentes, foi conduzida a caracterização dos dois modelos de infecção.

Camundongos BALB/c fêmeas foram inoculados com 1×10^7 promastigotas de *L. braziliensis* ou 1×10^5 promastigotas de *L. amazonensis* e o desenvolvimento das lesões foi monitorado semanalmente. Como observado na Figura 7, o desenvolvimento da lesão nos camundongos BALB/c foi marcadamente diferente para as duas espécies de Leishmania estudadas. Camundongos inoculados com *L. braziliensis* desenvolveram lesões discretas nas primeiras semanas após a infecção, cuja espessura máxima foi atingida em duas semanas e foi significativamente maior que a desenvolvida pelos camundongos inoculados com *L. amazonensis*. A partir da quarta semana pós-infecção, observou-se redução gradativa no tamanho da lesão causada por *L. braziliensis*, culminando na ausência de edema detectável, a partir da sexta semana pós-infecção. Em contraste, os animais inoculados com *L. amazonensis* apresentaram um atraso no desenvolvimento da lesão, que só se tornou visível após a quarta semana pós-infecção. Posteriormente, o tamanho da lesão aumentou progressivamente e tornou-se estatisticamente diferente dos animais inoculados com *L. braziliensis*, a partir da quinta semana. Por razões éticas, na nona semana após a infecção, os animais foram eutanasiados (Figura 7).

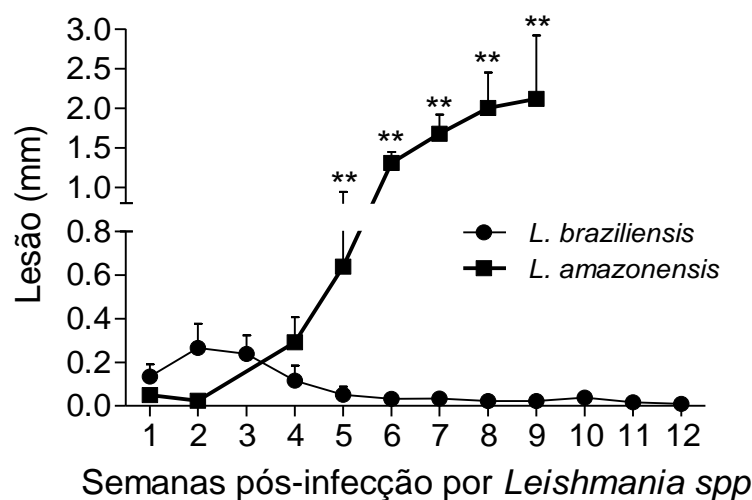


Figura 7 – Curva de desenvolvimento de lesão em camundongos inoculados com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*. Fêmeas de camundongos BALB/c foram inoculadas na pata esquerda traseira com 1×10^5 promastigotas de *L. amazonensis* ou 1×10^7 promastigotas de *L. braziliensis*. Semanalmente, foi acompanhado o desenvolvimento da lesão, a partir da diferença de espessura entre a pata inoculada e a pata controle. São apresentados a média e o desvio-padrão de ao menos quatro animais por grupo. As comparações entre as espécies, para cada tempo avaliado, foram feitas por teste *t* de Student; (*) indica diferenças ($p < 0,05$) entre os grupos nos tempos avaliados.

Além da medida da lesão, o parasitismo também foi avaliado. Essa análise foi realizada em diferentes momentos pós-infecção os quais foram definidos em função das curvas de desenvolvimento da lesão: duas semanas de infecção, momento do ápice da lesão na infecção por *L. braziliensis*; cinco semanas de infecção, quando se observa a redução da lesão de *L. braziliensis* e a progressão da lesão por *L. amazonensis*; e ao final do experimento, ou seja, nona semana para *L. amazonensis* e décima segunda semana para *L. braziliensis* (Figura 7).

Nos animais inoculados com *L. braziliensis* (Figura 8), observou-se maior número de parasitas na segunda semana após a infecção, coincidente com o tamanho máximo da lesão. No quinto período pós-infecção, o parasitismo tecidual diminuiu, refletindo a redução do tamanho do edema. Doze semanas pós-infecção, nenhum parasito foi detectado nas patas dos animais, evidenciando o controle efetivo da infecção pelos camundongos e a resolução das lesões.

Em contraste, nos animais inoculados com *L. amazonensis*, o parasitismo tecidual aumentou progressivamente. Na segunda semana pós-infecção, em que ainda não

havia lesão visível nos animais, o parasitismo tecidual foi equivalente ao observado no ápice da infecção por *L. braziliensis*. Na quinta e nova semanas pós-infecção, as cargas de parasitas foram significativamente mais elevadas, em comparação aos níveis da segunda semana, fato que demonstra que os animais infectados por *L. amazonensis* não conseguiram controlar a infecção (Figura 8)

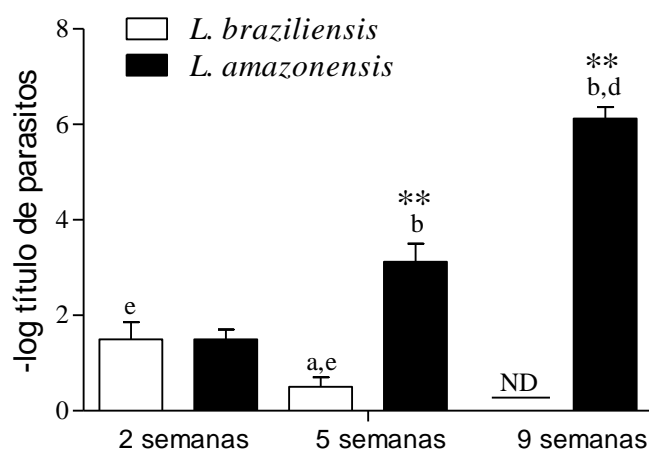


Figura 8 – Parasitismo em camundongos inoculados com *L. braziliensis* ou *L. amazonensis*. Fêmeas de camundongos BALB/c foram inoculadas na pata esquerda traseira com 1×10^5 promastigotas de *L. amazonensis* e 1×10^7 promastigotas de *L. braziliensis*. Em diferentes tempos pós-infecção, os animais foram submetidos à eutanásia. Suas patas foram coletadas e processadas para determinação do parasitismo tecidual, pela técnica da diluição limitante. São apresentados a média e o desvio-padrão de quatro animais por grupo. Os dados foram analisados por teste *t* de Student.

Para caracterizar melhor os modelos de resistência (infecção por *L. braziliensis*) e suscetibilidade (infecção por *L. amazonensis*), a produção de citocinas foi avaliada por células isoladas dos linfonodos drenantes em resposta ao antígeno específico após a reestimulação *in vitro* (Figuras 9). Produção aumentada de IFN- γ , em resposta ao AgLb foi observada por células isoladas de animais infectados por 2 semanas por *L. braziliensis*. Essa produção foi maior que a das células de animais infectados por 24h. Curiosamente, a produção desta citocina em resposta ao AgLb foi menor naqueles animais infectados por 12 semanas (Figura 9A). Portanto, esses dados mostram a importância da produção precoce de IFN- γ para o controle da infecção por *L. braziliensis* e também a transitoriedade dessa resposta, uma vez eliminada a infecção. Em contraste com a cinética de produção de IFN- γ no modelo de resistência, células de animais infectados por *L. amazonensis* por 24 horas ou 2 semanas

produziram baixos níveis de IFN- γ em resposta ao AgLa, após reestimulação *in vitro*. No entanto, células de animais submetidos a eutanásia, após 9 semanas de infecção produziram altos níveis desta citocina, em resposta ao AgLa (Figura 9C). Em relação à IL-10, maior produção foi observada por células de animais infectados por 2 semanas por *L. braziliensis* (Figuras 9B). No modelo de suscetibilidade, os níveis de IL-10 mantiveram-se basais nas primeiras cinco semanas de infecção e aumentaram na nona semana de infecção, após o estabelecimento do parasitismo (Figura 9D).

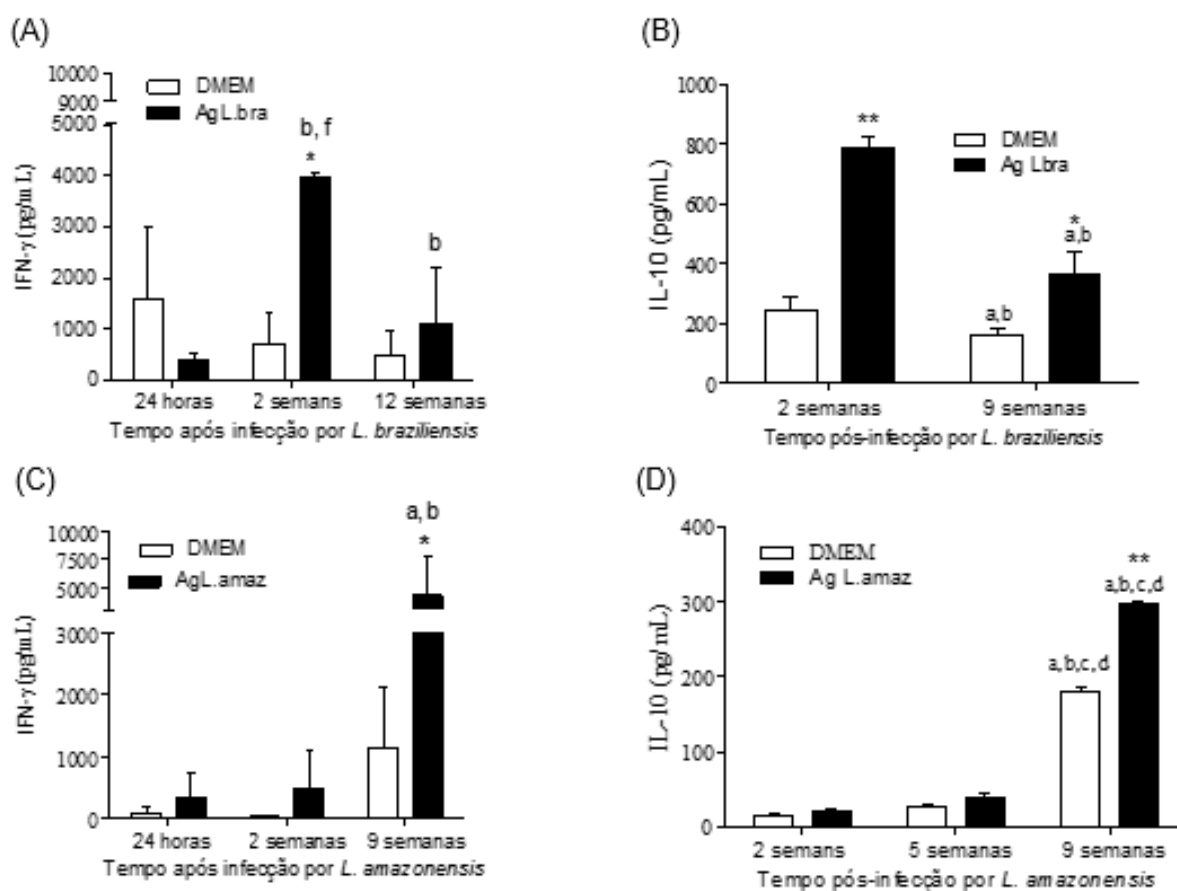


Figura 9: Produção de IFN- γ e IL-10 por células dos linfonodos drenantes de camundongos inoculados com *L. braziliensis* ou *L. amazonensis*. Fêmeas de camundongos BALB/c foram inoculadas na pata esquerda traseira com 1×10^7 promastigotas de *L. braziliensis* ou 1×10^5 promastigotas de *L. amazonensis*. Em diferentes tempos pós-infecção, animais foram submetidos à eutanásia e os linfonodos drenantes das patas inoculadas foram coletados e processados. As células obtidas foram estimuladas *in vitro* com antígeno particulado de *L. braziliensis* ou *L. amazonensis* por 48 horas, a 37 °C e 5% CO₂. Por ELISA, foram quantificadas as citocinas IFN- γ (Figuras A e C): 24 horas, 2 e 9 semanas; e IL-10 (Figuras B e D): 2, 5 e 9 semanas. São apresentados a média e o desvio-padrão de dois experimentos semelhantes. Os dados foram analisados por ANOVA, com pós-teste de Newman-Keuls.

5.1.2 Discussão Sessão 1

As infecções por espécies diversas de *Leishmania* podem resultar em um amplo espectro de manifestações clínicas cujo resultado é determinado pela complexa rede de interações estabelecidas entre o parasita e o hospedeiro (LEITE *et al*, 2012). Dentro deste contexto e objetivando melhor compreender os mecanismos responsáveis pela pluralidade de sinais e sintomas decorrentes do parasitismo por essas espécies, nosso grupo de pesquisa realizou estudos que avaliaram perfis de infecção, desenvolvimento de lesão, resposta imune e inflamatória proveniente da infecção por *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis* em modelo murino, espécies estas responsáveis por desencadear perfis de resistência e susceptibilidade, respectivamente.

Confirmando os resultados apresentados por TESTASSICA *et al* (2013) que também comparou a cinética de infecção entre estas duas espécies, neste presente trabalho demonstramos que no modelo de resolução, representado pela infecção de *L. braziliensis*, o ápice da lesão e do parasitismo ocorrem na segunda semana de infecção e, posteriormente, decaem até completa eliminação do parasita na sexta semana. Por outro lado, no modelo susceptibilidade representado pela infecção por *L. amazonensis*, foi observado que nos estágios precoces da infecção este protozoário manipula o sistema imune do hospedeiro no sentido de manter a resposta imunológica abaixo dos limiares de patogenicidade e favorecer o curso “silencioso” da infecção até a quinta semana, uma vez que após este período, é observado aumento contínuo da lesão e da carga parasitária. Esses dados vão ao encontro dos trabalhos de SOONG (2012) e MAOILI (2004) os quais já haviam relatado perfis de semelhantes de infecção por estas duas espécies utilizando como modelos murinos de estudo camundongos BALB/c e C57BL/6, respectivamente.

Em relação à resposta imunológica, nossos dados demonstraram perfis heterogêneos para produção de citocinas chave na modulação do curso infeccioso. Enquanto no modelo de resistência foi observado aumento dos níveis de IFN- γ na segunda semana de infecção, concomitante com o ápice do parasitismo e lesão, no modelo de susceptibilidade, níveis aumentados desta citocina foram observados apenas nas fases tardias do parasitismo, quando o organismo já não é mais capaz de controlar a

carga parasitária. No contexto das leishmanioses, o papel do IFN- γ é relacionado com o controle do parasita uma vez que esta citocina possui a capacidade de atuar sobre populações celulares importantes como os macrófagos ativando-as e, conseqüentemente, induzindo a síntese de NO responsável pela atividade leishmanicida da célula (CARVALHO *et al*, 2012). De modo semelhante, FAGUNDES *et al*, (2011) avaliando perfil de resposta celular em camundongos C57BL/6 infectados pelo vírus da dengue, verificou que níveis elevados de IFN- γ associados com IL-12 e IL-18 são responsáveis por mediar mecanismos de resistência no hospedeiro. Também, PINHEIRO e ROSSI-BERGMANN (2007) relatou que camundongos C57BL/6 deficientes para esta citocina e infectados por *L. amazonensis* apresentavam lesões e parasitismo maiores que os animais WT.

Por outro lado, dentro do contexto da infecção por *L. amazonensis*, existem estudos que relataram papel controverso desta citocina, ao longo do processo de infecção. CARNEIRO *et al* (2015) observou que, em momentos precoces da infecção, a presença de IFN- γ no sítio da lesão induz a migração de macrófagos e linfócitos TCD4⁺ para a região favorecendo a infecção destas células e, conseqüentemente, o parasitismo. Também QI *et al* (2004) avaliando o processo de infecção *IN VITRO* de macrófagos murinos pré-estimulados com esta citocina, observou aumento da carga parasitária no interior células e correlacionou, entre outros fatores, com o aumento da produção de arginase e maior capacidade fagocítica da mesma.

Em relação a IL-10, nossos resultados demonstraram que no ápice do parasitismo, ou seja, na segunda semana de infecção por *L. braziliensis* e na oitava semana de infecção por *L. amazonensis* os níveis desta citocina apresentavam-se elevados, provavelmente estimulados pelo parasita na tentativa de gerar um ambiente menos hostil e capaz de favorecer o sucesso da infecção. Colaborando com os nossos achados, trabalhos de KANNE e MOSSER (2017) já haviam relatado que formas amastigotas de *Leishmania* spp atuam via receptor FC- γ dos macrófagos na indução da expressão de IL-10, o que faz com que estas células se tornem menos responsivas ao IFN- γ , fato que dificulta sua respectiva ativação e conseqüente produção de NO. Também JIAXIANG *et al* (2003), avaliando o modelo de infecção de camundongos C57BL/6 por *L. amazonensis* verificou que este parasita induz resposta imune do tipo

Th2 com aumento dos níveis de IL-10 e redução de citocinas Th1, fato que também favorece o estabelecimento da infecção.

Face aos dados apresentados, foi possível validar os dois padrões distintos entre o perfil de lesão, parasitismo e a resposta imune deflagrados pela infecção por *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, no mesmo hospedeiro. Essas diferenças nos levaram a supor possíveis mecanismos regulatórios das vias de sinalização celular sobre estes padrões desencadeados ao longo do processo de infecção.

A ativação de vias de sinalização associadas à resposta imune inata e inflamação ocorre em estágios precoces dos processos infecciosos e determinam eventos posteriores associados à resposta do hospedeiro e à infecção, incluindo a resposta imune adaptativa (SOMENSI *et al* , 2017; XIN *et al*, 2008; YANG *et al* 2007). Consistente com essa hipótese, resultados anteriores obtidos por nosso grupo demonstraram que no modelo de infecção por *L. braziliensis* ocorre um aumento da ativação de ERK 1/2 na segunda semana de infecção, o qual coincide com o ápice do parasitismo tecidual. Posteriormente, os níveis de fosforilação desta proteína decaem progressivamente até atingir os níveis basais na quinta semana, período em que o quadro infeccioso foi debelado (OLIVEIRA *et al*. 2017). De forma contrária, no modelo de resistência, não há aumento da fosforilação de ERK1/2 induzida por *L. amazonensis* nos momentos iniciais da infecção, sendo estes comparados aos níveis basais. De forma interessante, com o avançar da infecção há um completo desaparecimento dos níveis de ERK1/2 fosforilados que é recuperado somente nos estágios de aumento de lesão tecidual (Figura 10). Este fato nos estimulou a investigar o papel da via de sinalização MAP cinase ERK 1/2, ao longo do curso da infecção por *L. amazonensis* (seção 2), considerando que, ao contrário de *L. braziliensis*, na infecção por esta espécie há um retardo na produção de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias, o que coincide com aumento no edema da pata infectada e no parasitismo tecidual.

5.2: Seção 2:

Papel da via de sinalização celular ERK 1/2 no contexto da infecção por *Leishmania amazonensis*

5.2.1 - A inibição da fosforilação da ERK1/2 em estágio específico da infecção por *L. amazonensis* tem efeitos dramáticos no desenvolvimento da lesão, na carga parasitária e na resposta inflamatória em camundongos BALB/c

Entre as vias de sinalização que afetam a resposta inflamatória em condições infecciosas (SAWATZKY *et al*, 2006), MAPK ERK1/2 tem sido associada à infecção por *Leishmania* (OLIVEIRA *et al*, 2017; YANG *et al*, 2007), embora vários aspectos associados ao seu papel no curso da infecção ainda não foram completamente investigados. Com o objetivo de melhor compreender o papel da ativação e/ou inibição desta via de sinalização, ao longo do processo de infecção por *L. amazonensis* em modelo BALB/c, inicialmente foram avaliados os níveis de ERK 1/2 fosforilados e total, em diferentes momentos ao longo de 9 semanas de infecção.

Como pode ser observado na figura 10 (A e B), os níveis de fosforilação de ERK 1/2 se mantiveram equivalentes aos níveis basais ao longo das primeiras semanas de infecção. Entretanto, foi observado uma brusca redução do perfil de ativação desta proteína na quinta semana de infecção, período este que coincide com o aumento da lesão e da carga parasitária (Figuras 7 e 8, respectivamente). Já na nona semana de infecção é possível observar um aumento dos níveis de fosforilação de ERK 1/2. De modo complementar, também foram avaliados a ativação da via NF- κ B (subunidade p-65) e os níveis de caspase 3 ao longo do processo de infecção. Nossos resultados demonstraram níveis elevados de ambos marcadores somente em momentos tardios do processo infeccioso, mais precisamente 9 semanas após inoculação do parasita (Figura 10 A e densitometrias 10C e 10D).

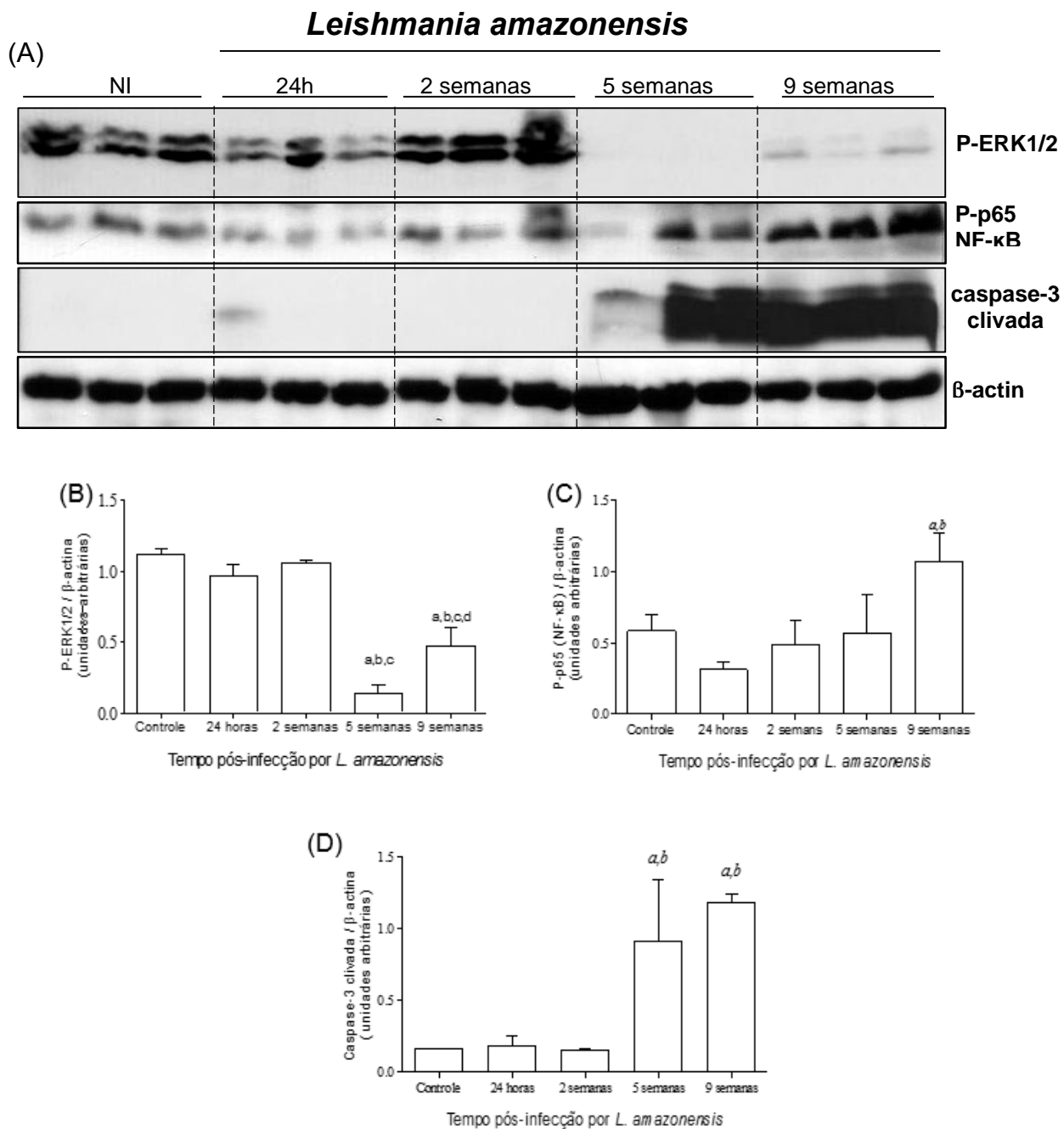


Figura 10: Estado de ativação de proteínas sinalizadoras envolvidas na inflamação e vias apoptóticas após infecção por *L. amazonensis*. Os animais foram infectados na pata traseira esquerda com 1×10^5 promastigotas de *L. amazonensis*. Após 24 horas, 2, 5 e 9 semanas de infecção os tecidos de suas patas foram coletados e as amostras processadas e avaliadas por *Western blotting*. (A) Análise de *Western blotting* de p-ERK 1/2, P-p65 / RelA (NF-κB), caspase-3 clivada e normalização por β-actina após 24 horas, 2, 5 e 9 semanas de infecção. A análise densitométrica das bandas p-ERK1 / 2 (B), p-p65 (NF-κB) (C) e caspase-3 (D) normalizadas para β-actina são mostradas. Os dados são representativos de dois experimentos, com resultados semelhantes. Todos os dados são apresentados como média \pm sd de três camundongos por grupo em cada ponto de tempo. Diferenças estatisticamente significantes foram assumidas quando P foi $< 0,05$ em relação ao controle (a), 24 horas pós-infecção (b), 2 semanas após a infecção (c), 5 semanas após a infecção (d) e 9 semanas após a infecção (e) (dados gerados por TESTASSICA *et al*, 2013).

Com o intuito de avaliar se a infecção por esta espécie afetaria também os níveis totais da proteína foram avaliados os níveis totais de ERK1/2. Nossos resultados demonstraram que, ao longo das primeiras cinco semanas de infecção, os níveis de ERK1/2 total não diferiram do controle (Figuras 11), sendo observado aumento significativo apenas na nona semana.

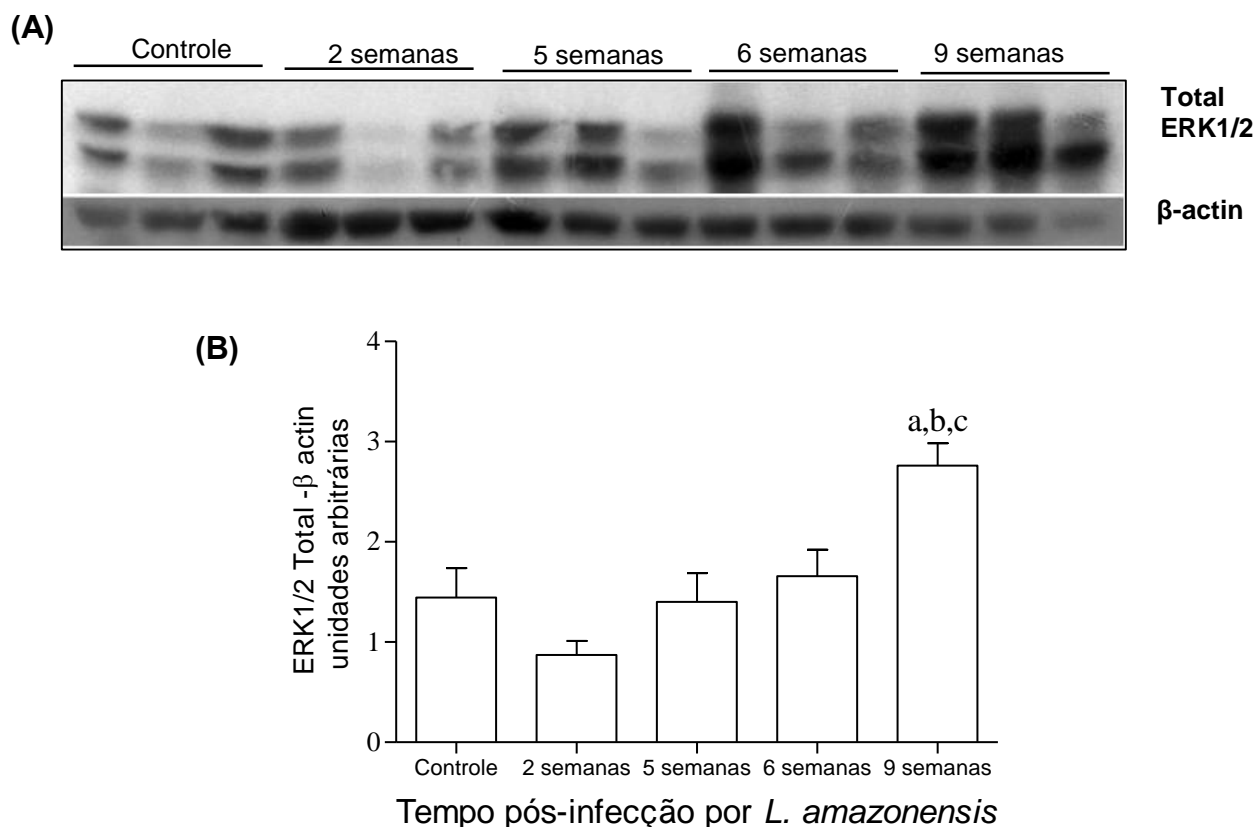


Figura 11: Análise dos níveis de expressão ERK1 / 2 total após 2, 5, 6 e 9 semanas pós-infecção por *L. amazonensis*. Os animais foram infectados na pata traseira esquerda com 1×10^5 promastigotas de *L. amazonensis*. Após 24 horas, 2, 5, 6 e 9 semanas de infecção os tecidos de suas patas foram coletados e as amostras processadas e avaliadas por *Western blotting*. (A) Análise de *Western blotting* para ERK1/2 total e normalização por β -actina após 24 horas, 2, 5, 6 e 9 semanas de infecção (B). Os dados são representativos de dois experimentos, com resultados semelhantes. Todos os dados são apresentados como média + SD de três camundongos por grupo em cada ponto de tempo. Diferenças estatisticamente significativas foram assumidas quando P foi < 0,05 em relação ao controle (a), 24 horas pós-infecção (b), 2 semanas após a infecção (c).

5.2.2: Camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* desenvolvem resposta inflamatória intensa contra o parasito ao longo do processo de infecção

Para uma melhor caracterização da lesão desencadeada pela infecção por *L. amazonensis* nos camundongos BALB/c, foi realizada uma análise histopatológica pós-infecção do coxim plantar da pata infectada nos animais após 24 horas, 2, 5 e 9 semanas de infecção (Figura 12). Nossos resultados demonstraram que até a segunda semana de infecção não foram observadas alterações histopatológicas na pele analisada. A epiderme apresentava-se íntegra em todas as camadas, bem como a derme, com seus respectivos anexos cutâneos, ou seja, glândulas sebáceas, folículos pilosos, glândulas sudoríparas e ductos, de aspecto e distribuição convencional (Figuras12: A, B, C, D). Entretanto, na quinta semana de infecção, foi observada a presença de infiltrado inflamatório de perfil crônico, distribuído em toda a camada reticular da derme de forma difusa, caracterizado pela predominância de MΦs e eosinófilos. Acúmulos focais de células inflamatórias foram observados ao redor de folículos pilosos, caracterizando uma foliculite. Foram observados ainda inúmeros MΦs com citoplasma amplo, de aspecto vacuolizado, contendo formas amastigotas (Figuras12:E, F). Já ao longo da nona semana foi possível observar uma exacerbação desses fenômenos inflamatórios, caracterizada por intenso infiltrado celular na derme, que se estendia à hipoderme e até a camada muscular. O número de MΦs vacuolizados aumentou de forma considerável. Observou-se ainda necrose focal em alguns animais, com proliferação angiogênica. Entre as células do infiltrado inflamatório, foram observados linfócitos e plasmócitos, que representavam uma pequena população (Figuras12:G, H).

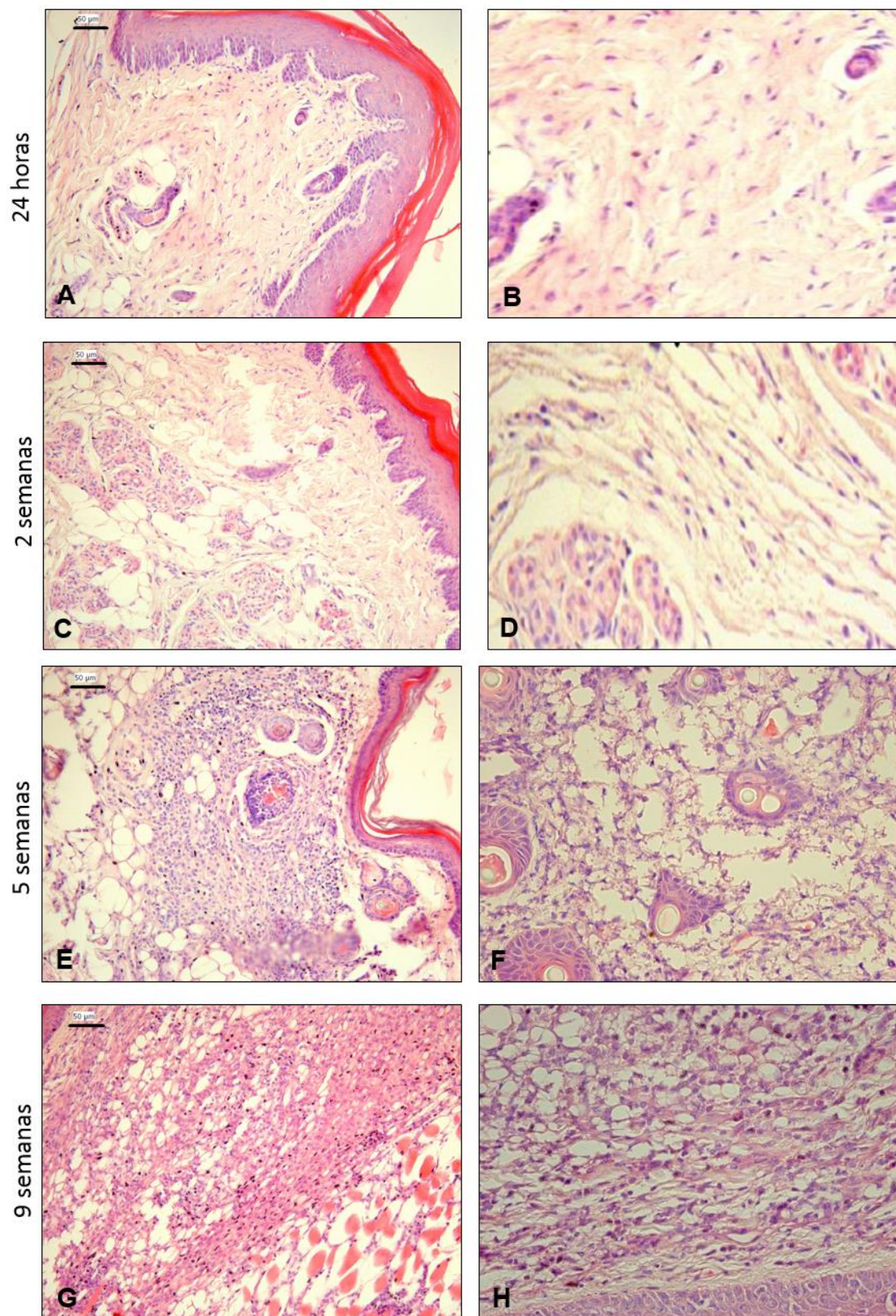


Figura 12: Fotomicrografias de cortes histológicos de coxim plantar de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis*, após 24 horas, 2, 5 e 9 semanas de inoculação. Camundongos BALB/c foram inoculados com 1×10^5 promastigotas de *L. amazonensis*. Em diferentes tempos pós infecção, os animais foram submetidos à eutanásia e os tecidos de suas patas foram processados para histologia (4 µm, H&E). (A,C,E,G) representam 24 horas, 2, 5 e 9 semanas, respectivamente, após

inoculação com aumento de 20X. (B,D,F,H) representam 24 horas, 2, 5 e 9 semanas, respectivamente, após inoculação com aumento de 40X.

Considerando em conjunto os marcadores avaliados cineticamente ao longo da infecção por *L. amazonensis*, verifica-se um perfil muito peculiar, em que há um retardo na expressão/ativação destes marcadores nas primeiras semanas de infecção. Neste contexto, por volta da 5ª semana de infecção, destaca-se a defosforilação de ERK 1/2 abaixo dos níveis basais como um evento supostamente crucial, uma vez que níveis de todos os outros marcadores são alterados após esse sinal, incluindo caspase 3, NF-κB (subunidade p-65), citocinas e, mais importante, parâmetros associados à infecção, como edema no local da infecção, infiltrado inflamatório e parasitismo tecidual.

5.2.3: A inibição *in vitro* da via MER/ERK utilizando o inibidor U0126 impactou na fagocitose, na carga parasitária celular e na resposta imune

Para testar a hipótese de que a inibição da fosforilação de ERK 1/2 em estágio específico da infecção por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c é um evento crítico que determina o curso progressivo da infecção, delineamos diferentes experimentos em que BMDMs de camundongos BALB/c pré-tratados com U0126 foram infectados em seguida com *L. amazonensis*.

Como observado na figura 13, a infecção *in vitro* de BMDMs com *L. amazonensis* induz aumento dos níveis de P-ERK 1/2 ao longo das primeiras horas de infecção, sem afetar os níveis de ERK 1/2 total (Figuras 13A- 13D). O tratamento com U0126 em BMDMs infectados inibiu completamente a fosforilação de ERK1/2, como mostrado nas Figuras 13A-C, sem afetar os níveis de ERK1/2 total.

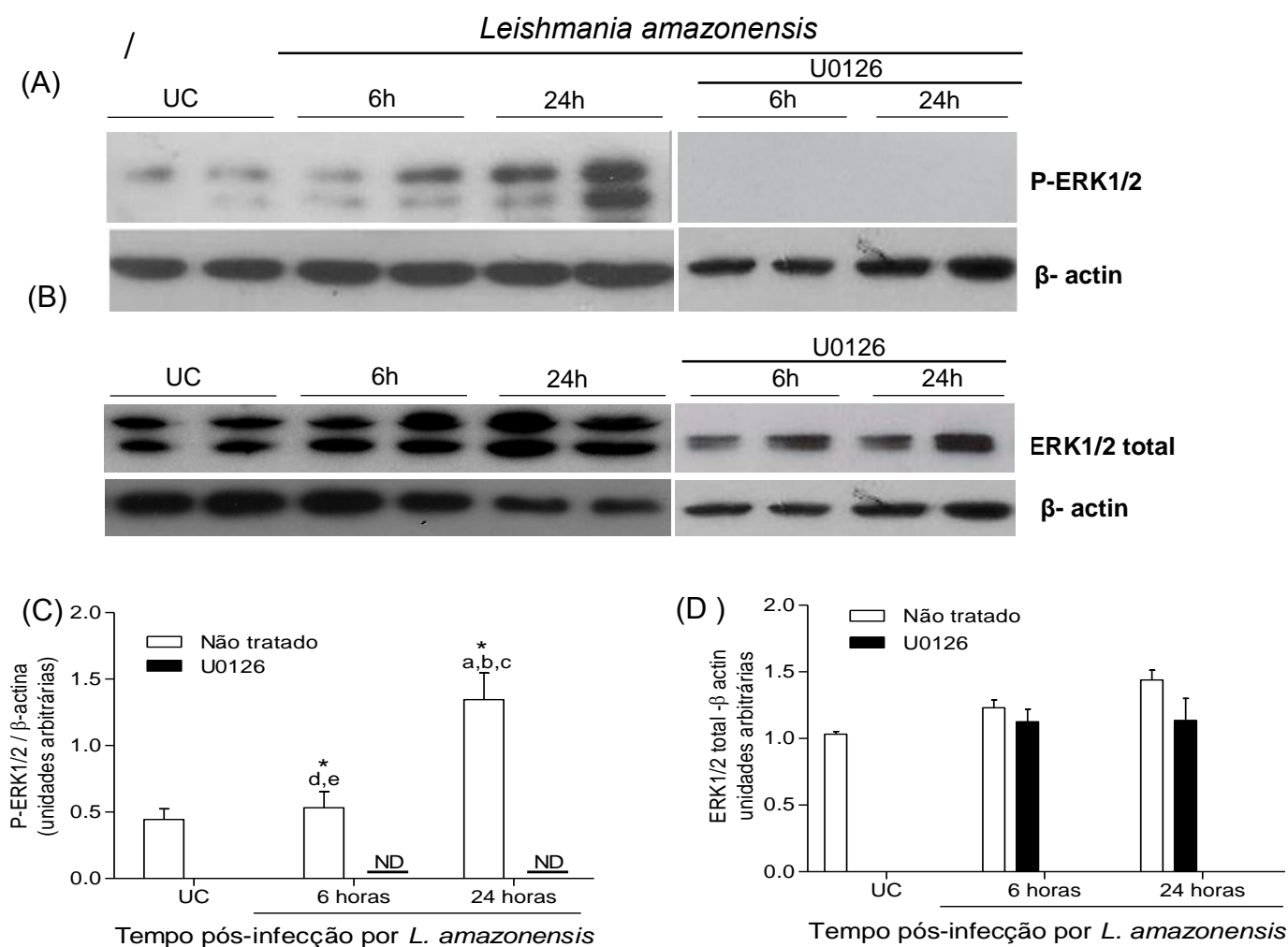


Figura 13: Avaliação dos níveis fosforilados e total de ERK1/2 em BMDMs de camundongos BALB/c pré-tratados com U0126 e infectados por *L. amazonensis*. BMDMs foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis*, na proporção parasita/ célula de 5: 1. Perfis observados para níveis de expressão de fosforilação de ERK1/ 2 (A) e ERK1/2 total (B) em células não tratadas ou células pré-tratadas com U0126 por duas horas antes da infecção por *L. amazonensis*. Análises densitométricas para a fosforilação de ERK 1/2 (C) e expressão de ERK 1/2 total (D) após normalização com β -actina. Diferenças estatisticamente significantes foram assumidas quando $p < 0,05$. UC = controle não infectado; ND = Não detectável.

De modo complementar, também foi avaliado o impacto do tratamento com U0126 no número de células infectadas por *L. amazonensis* e também na quantidade de amastigotas/células. Como observado na Figura 14, o tratamento com U0126 impactou no número de células parasitadas, logo após a infecção (0 horas - 6 horas após o contato célula/parasito), sendo possível observar menor quantidade de macrófagos com a *Leishmania* internalizada, assim como menor quantidade de

parasitos por célula (Figuras 14A e 14B). Esses achados indicam que a inibição da ativação de ERK1/2 por fosforilação afeta a competência da fagocitose de MΦ e a replicação de formas amastigotas de *L. amazonensis*.

Em seguida, avaliamos os efeitos do tratamento com U0126 nos níveis de TNF- α e IL-10. Enquanto os níveis de TNF- α foram baixos e aumentaram moderadamente após 6 e 24 horas, imediatamente após a infecção por *L. amazonensis* no grupo tratado, os níveis de IL-10 mostraram-se aumentados tanto pelo tratamento quanto pela infecção, uma vez que níveis significativamente aumentados foram detectados em ambos os grupos. Maior expressão desta citocina nos tempos de 6 e 24 horas foram observadas na células que receberam U0126. Posteriormente, uma diminuição significativa foi observada em 48 horas em comparação com células não tratadas (Figuras 14C e 14D).

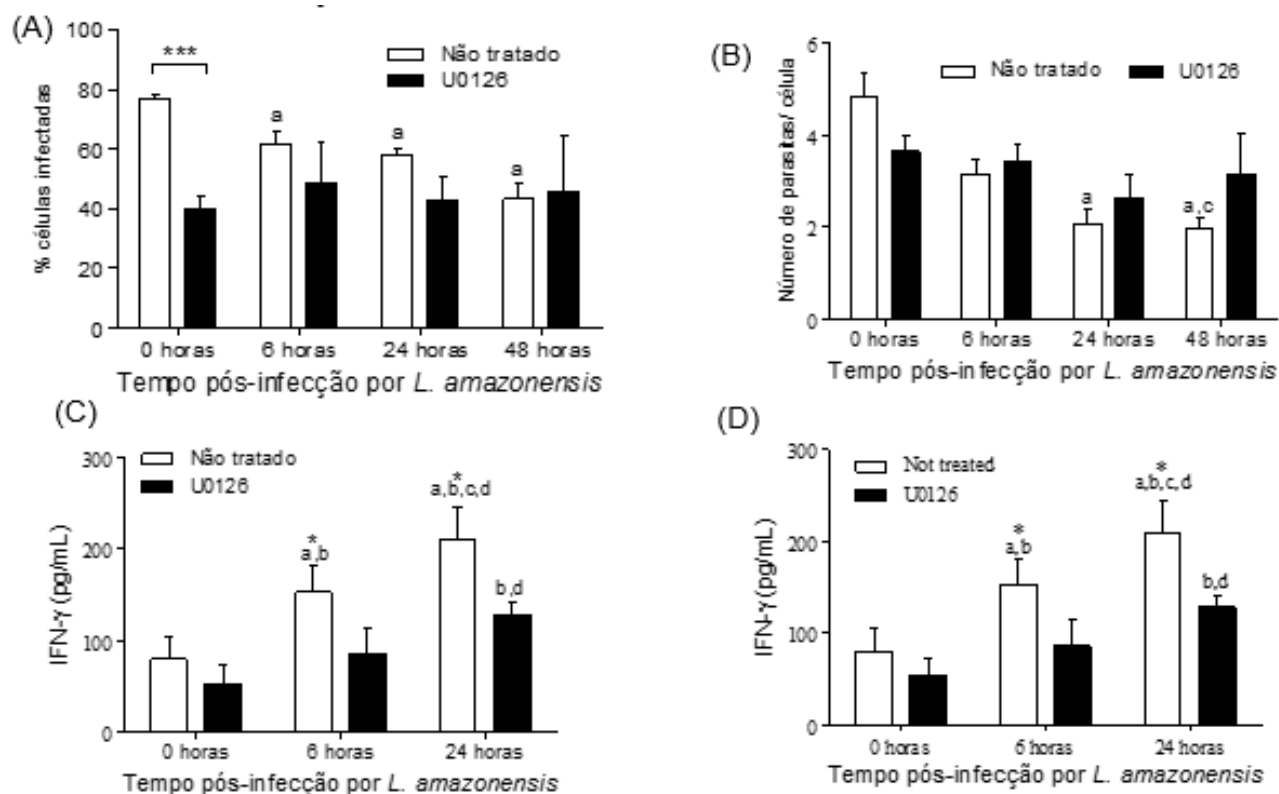


Figura 14: Avaliação da infecção por *L. amazonensis* e o impacto do tratamento com U0126 na fagocitose de parasitas e níveis de citocinas em BMDMs de camundongos BALB/c. BMDMs foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis*, na proporção parasita/célula de 5:1. Nos tempos 0, 6, 24 e 48 horas após a infecção, as células foram avaliadas quanto à porcentagem de células infectadas (A) e ao número de parasitas por células infectadas (B). Nos mesmos momentos, o sobrenadante foi utilizado para avaliar os níveis de TNF- α (C) e IL-10 (D). Os dados são representativos de dois experimentos com resultados semelhantes. Diferenças estatisticamente significativas foram assumidas quando $p < 0,05$. UC = controle não infectado; ND = Não detectável.

5.2.4: Células BMDM pré-tratadas com selumetinib também apresentam menor atividade fagocítica

No intuito de validar os dados obtidos com U0126, utilizamos um inibidor altamente seletivo da via MEK/ERK chamado selumetinib (Carmo *et al.*, 2014). De modo semelhante ao tratamento com U0126, o tratamento *in vitro* de BMDMs com selumetinib reduziu o número de parasitas por células parasitadas logo após a infecção (0 horas - 6 horas do contato célula/parasito), bem como uma menor responsividade das células infectadas, uma vez que o número de parasitas por célula permaneceu constante durante as primeiras horas de infecção, diferentemente do que ocorreu nas células não tratadas (Figura 15), corroborando os dados observados no tratamento com U0126.

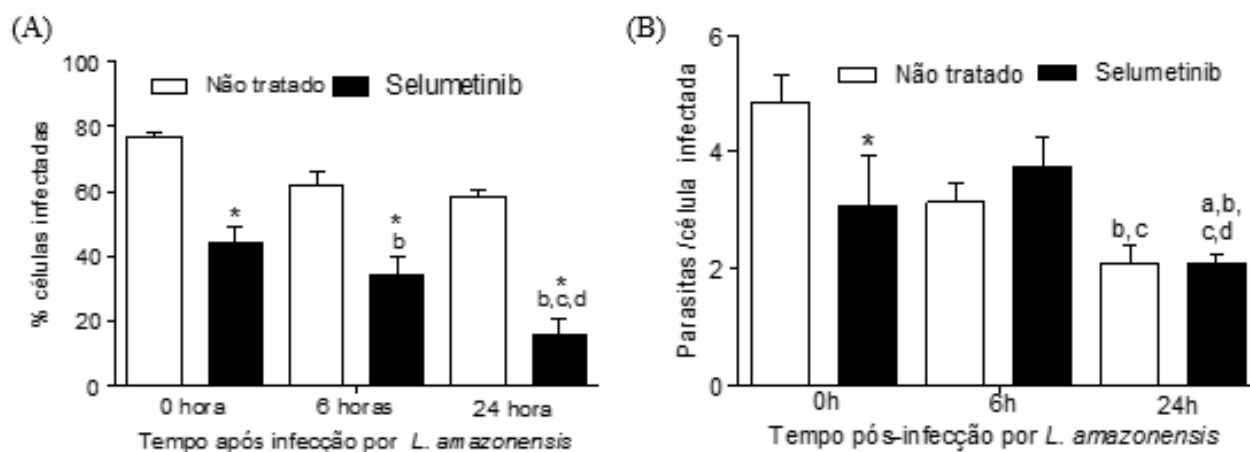


Figura 15: Avaliação da infecção por *L. amazonensis* e o impacto do tratamento com Selumetinib na ingestão de parasitas em BMDMs de camundongos BALB/c. BMDMs foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis*, na proporção parasita/célula de 5: 1. Às 0, 6 e 24 horas após a infecção, as células foram avaliadas quanto à porcentagem de células infectadas (A) e ao número de parasitas por células infectadas (B). Diferenças estatisticamente significantes foram assumidas quando $p < 0,05$. NT = células infectadas e não tratadas.

5.2.5: A inibição precoce da via MER/ERK em camundongos infectados com *Leishmania amazonensis* desencadeia aumento do tamanho da lesão e do parasitismo tecidual

Após a avaliação *in vitro*, testamos se o tratamento farmacológico com U0126 antes da 5ª semana de infecção em camundongos BALB/c infectados anteciparia o início do desenvolvimento da lesão e aumentaria a carga parasitária e a resposta inflamatória. Inicialmente, camundongos foram infectados e receberam tratamento por sete dias consecutivos ao longo da quarta semana de infecção. No início da quinta semana após a infecção, os animais foram eutanasiados para realização das análises propostas (Figura 16).

Como controle, foi observado que o tratamento com U0126 inibiu a fosforilação de ERK 1/2 (Figuras 16B e 16D). Além disso, observou-se que o processo de infecção por *L. amazonensis* não afetou os níveis total de ERK 1/2 nos animais não tratados (Figuras 16C e 16E).

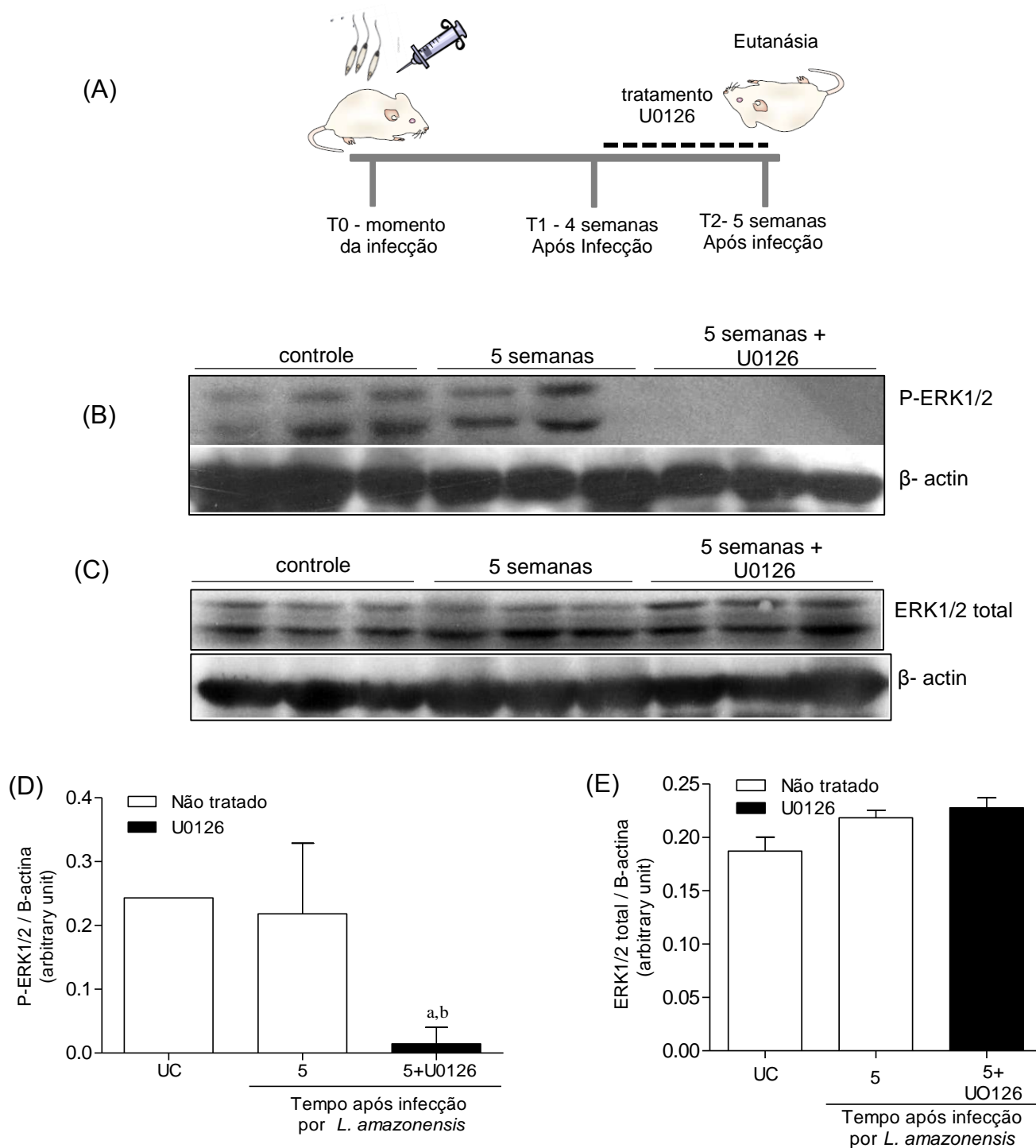


Figura 16: Avaliação do tratamento com U0126 em estágio específico da infecção por *L. amazonensis*. Fêmeas de camundongos BALB/c foram inoculadas na pata traseira esquerda com 1×10^5 promastigotas de *L. amazonensis* e após quatro semanas de infecção os animais receberam U0126 (3mg / kg) pela via intraperitoneal por sete dias consecutivos e foram eutanasiados (A); Análise de *Western blotting* de P-ERK1/2 5 semanas pós-infecção nos grupos não tratado e tratado (5 + U0126) (B); Análise por *Western blotting* de ERK1/2 total 5 semanas após infecção no grupo tratado e tratado (5 + U0126) (C). Análises densitométricas para fosforilação de ERK 1/2 após normalização com β -actina para P-ERK1 / 2 (D) e ERK total 1/2 (E);

Os animais também foram monitorados quanto ao desenvolvimento da lesão e carga parasitária e, como esperado, o tratamento antecipou o aumento no tamanho da lesão em comparação aos controles (Figura 17A), além de impactar o parasitismo tecidual, que foi significativamente maior nos animais tratados, quando avaliados na quinta semana pós-infecção (Figura 17B), confirmando a hipótese inicialmente proposta.

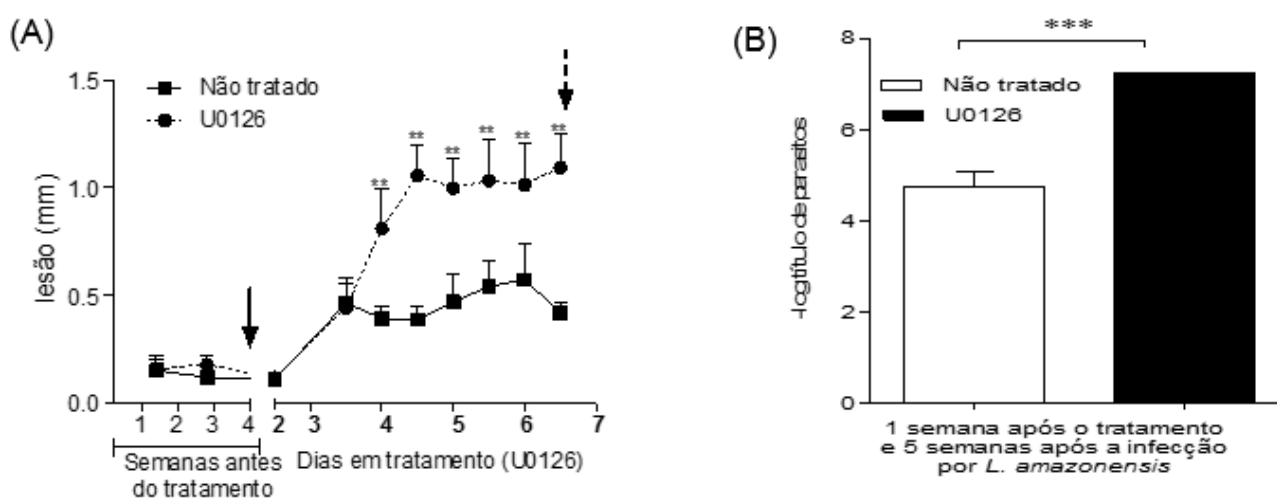


Figura 17: Avaliação do desenvolvimento da lesão e carga parasitária após infecção por *L. amazonensis* e efeito do tratamento com o inibidor da ativação de ERK 1/2 (U0126). Fêmeas de camundongos BALB / c foram inoculadas na pata traseira esquerda com 1×10^5 promastigotas de *L. amazonensis* e após quatro semanas de infecção os animais receberam U0126 (3mg / kg), pela via intraperitoneal, por sete dias consecutivos e foram eutanasiados. O desenvolvimento do tamanho da lesão foi monitorado semanalmente, com base na diferença de espessura entre a pata de inoculada e a pata controle com um paquímetro digital. Seta preta indica início de tratamento e seta pontilhada indica fim de tratamento (A); Carga parasitária entre os grupos tratados e não tratado após cinco semanas de infecção (B); As comparações entre os grupos, para cada tempo avaliado, foram feitas por teste *t* de Student; (*) indica diferenças ($p < 0,05$) entre os grupos nos tempos avaliados.

O impacto do tratamento com U0126 nos níveis de IFN- γ e IL-10 foi avaliado em células de linfonodos de camundongos infectados, já que, na infecção por *L. amazonensis* e de acordo com a hipótese em avaliação, estas citocinas tem seus níveis aumentados após a defosforilação de ERK1/2. Como esperado, os níveis de IFN- γ foram maiores nas células de camundongos infectados tratados com U0126 e estimulados com o extrato antigênico de promastigotas de *L. amazonensis* (Figura 18A). Da mesma forma, a produção de IL-10 a partir de células de camundongos tratados e estimuladas com antígenos parasitários foi significativamente maior,

quando comparada aos níveis produzidos por células não estimuladas ou por células estimuladas de camundongos não tratados (Figura 18B).

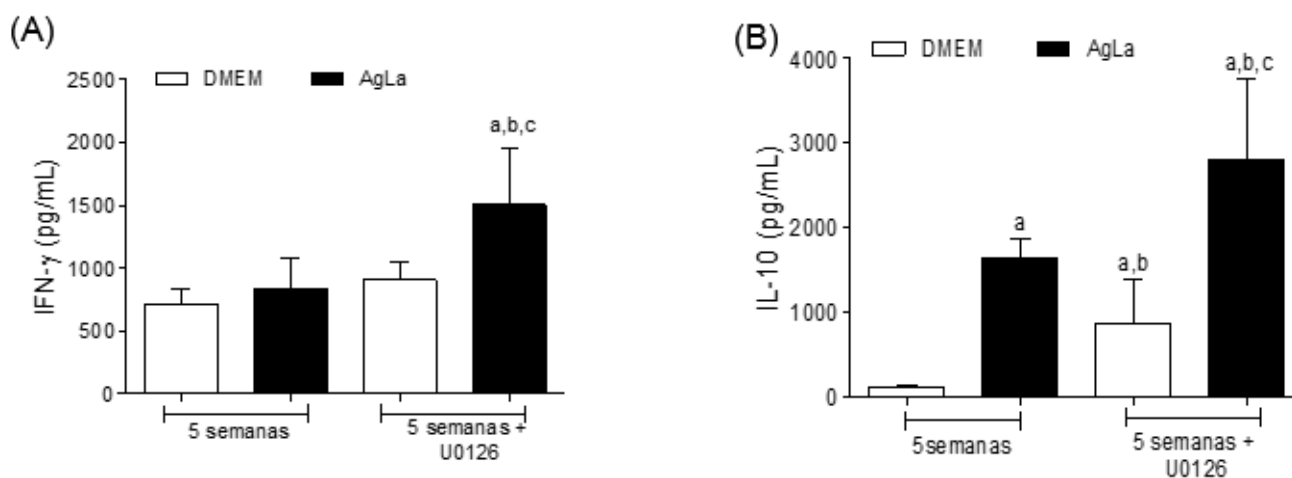


Figura 18: Avaliação dos níveis das citocinas IFN- γ e IL-10 em linfonodos de camundongos BALB/c após infecção por *L. amazonensis* e tratamento U0126. Fêmeas de camundongos BALB/c foram inoculadas na pata traseira esquerda com 1×10^5 promastigotas de *L. amazonensis* e após quatro semanas de infecção os animais receberam U0126 (3mg / kg) pela via intraperitoneal por sete dias consecutivos e foram eutanasiados no final da 5ª semana. Após este processo, os linfonodos drenantes das patas inoculadas foram coletados e processados. As células obtidas foram estimuladas *in vitro* com antígeno particulado de *L. amazonensis* por 48 horas, a 37°C e 5% CO₂. Por ELISA, foram quantificadas as citocinas IFN- γ (A) e IL- 10 (B).

Na quinta semana, análises histopatológicas foram realizadas em secções de tecido cutâneo da pata de camundongos tratados e não tratados ao longo da quarta semana de infecção, com o objetivo de melhor avaliar o impacto do tratamento com o U0126 na formação do infiltrado inflamatório (Figura 19). Os resultados demonstraram presença de maior infiltrado inflamatório no grupo tratado, que se estendeu da hipoderme até a camada muscular, que é composto majoritariamente por macrófagos vacuolizados. Também foi possível observar a presença de necrose focal, em alguns animais além de proliferação angiogênica. Entre as células do infiltrado inflamatório, foram observados também e, em menor quantidade, linfócitos e plasmócitos. Esses aspectos do infiltrado inflamatório foram traduzidos em escores que foram significativamente maiores nos camundongos que receberam o U0126 (Figura 19C). Em geral essas alterações só aparecem em camundongos não tratados em momentos tardios do curso da infecção o que foi associado ao evento de defosforilação temporária de ERK1/2 (Figura 10). Em conjunto, esses achados indicam que a antecipação da inibição da fosforilação de ERK1/2, nos camundongos tratados,

também antecipa as alterações inflamatórias, que ocorrem durante o curso da infecção por *L. amazonensis*, associadas à exacerbação da infecção.

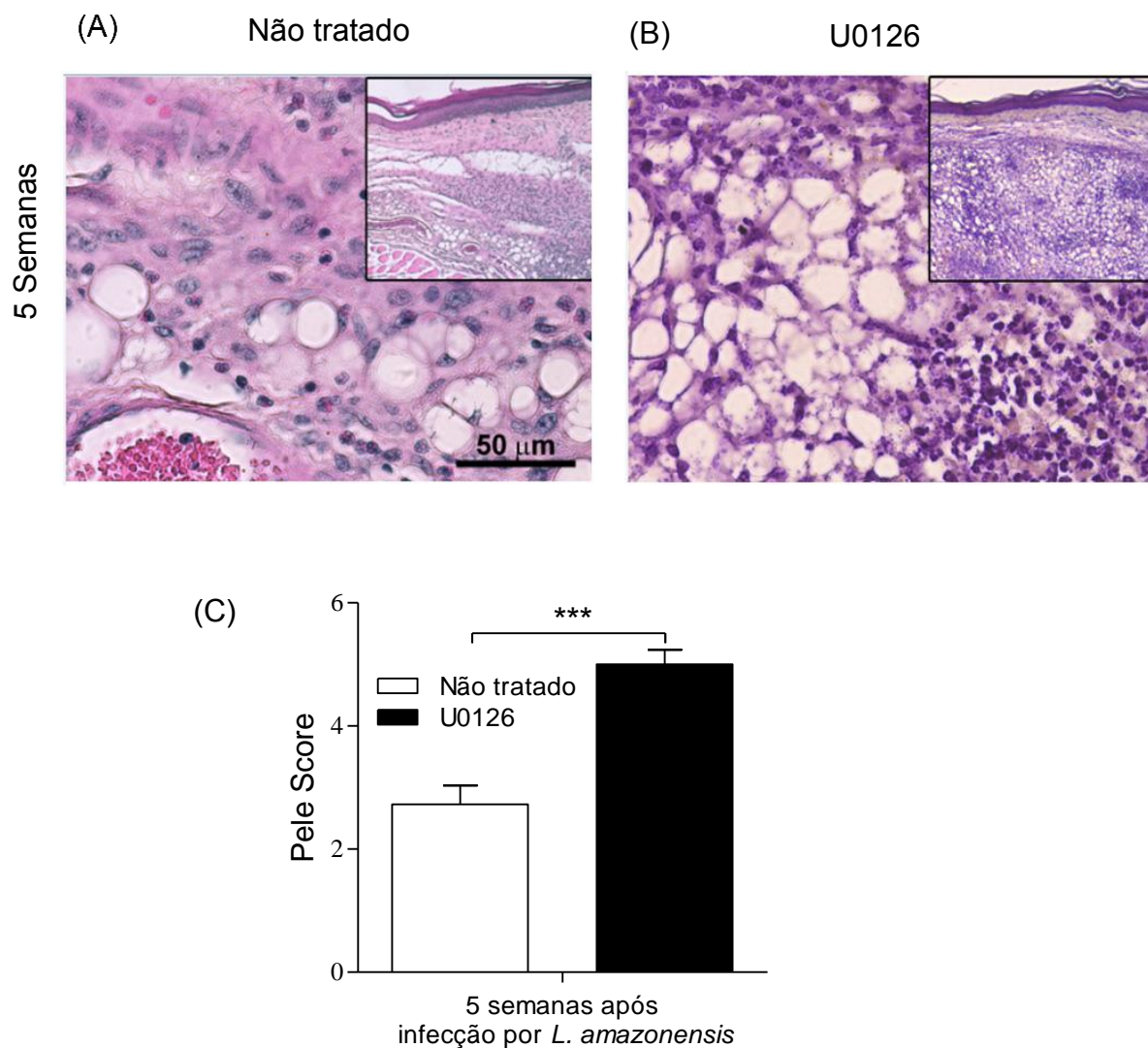


Figura 19- Camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* e tratados com o inibidor de MEK/ERK-U0126 apresentam maiores alterações histológicas no sítio da lesão após cinco semanas da infecção. Fêmeas de camundongos BALB/c foram inoculados com 1×10^5 promastigotas de *L. amazonensis* e ao longo da quarta semana de infecção, os animais receberam U0126 (3mg / kg) pela via intraperitoneal, por sete dias consecutivos e, em seguida, foram submetidos à eutanásia e os tecidos de suas patas foram processados para histologia (4 µm, H&E). Em (A) cortes histológicos de animais não tratados e em (B) cortes histológicos de animais que receberam U0126. (C) representa Score histopatológico do coxim plantar de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis*, após 5 semanas de inoculação.

5.2.6: Camundongos tratados com U0126 na fase aguda da infecção por *L. amazonensis* mantiveram os níveis de fosforilação de ERK1/2 reduzidos por semanas após o término do tratamento e também apresentaram aumento do tamanho da lesão e título de parasitismo

Para confirmar os efeitos da inibição *in vivo* da fosforilação de ERK1/2 na progressão da infecção por *L. amazonensis*, em um segundo experimento, os camundongos foram tratados U0126 por uma semana, em um momento ainda mais precoce da infecção, entre a 2^a e 3^a semanas, sendo mantidos sem tratamento a partir de então até a sexta semana da infecção, instante em que foram eutanasiados para avaliação dos mesmos parâmetros anteriormente determinados (Figura 20).

Nossos resultados demonstraram que o tratamento com U0126 ao longo da segunda semana de infecção, promoveu redução dos níveis de fosforilação de ERK1/2 na sexta semana de infecção, em comparação com o grupo não tratado (Figuras 20B e 20D). Em relação ao ERK1/2 total, o processo de infecção bem como o tratamento com U0126, não exerceu modulação na nos níveis da proteína (Figuras 20C e 20E).

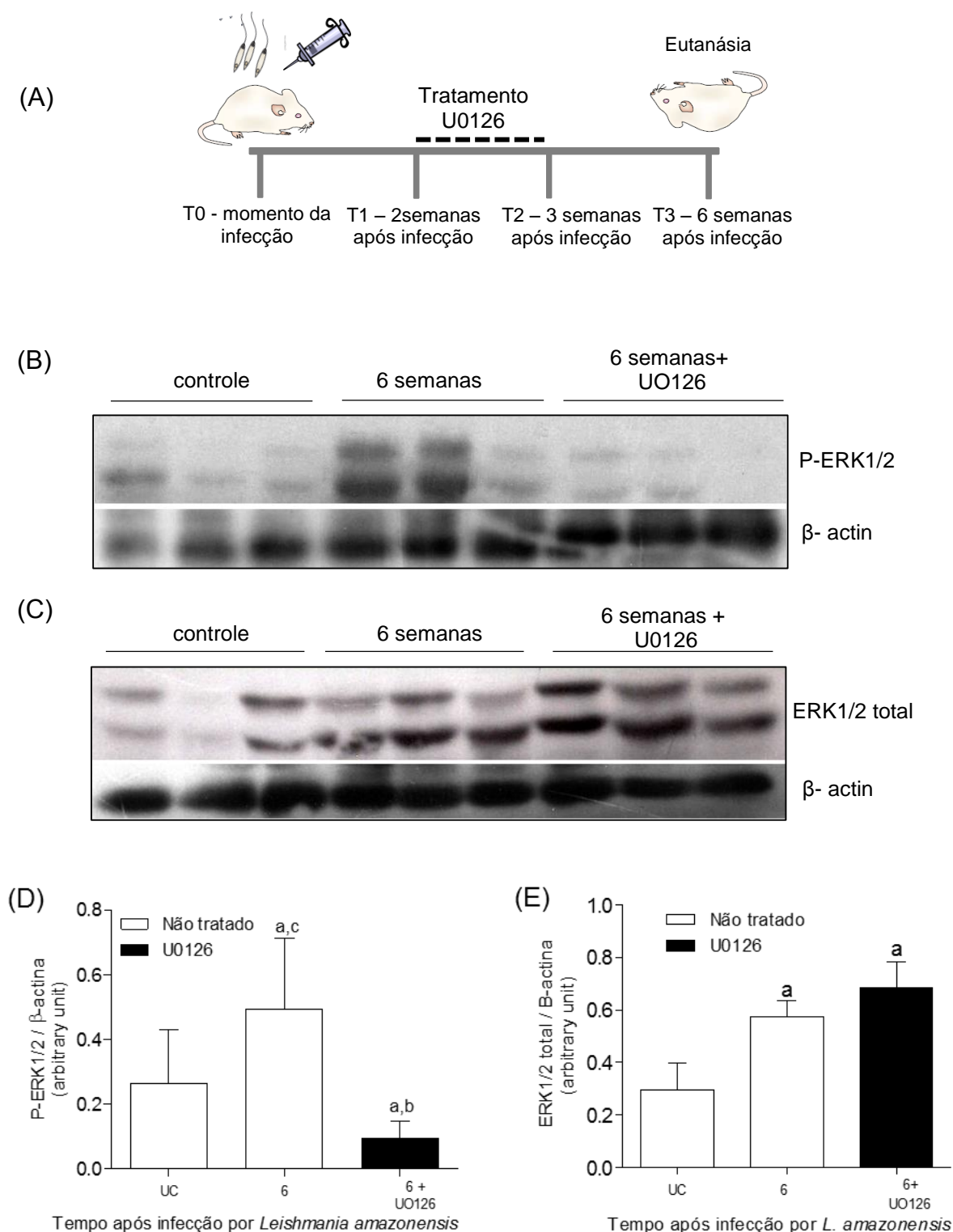


Figura 20: Avaliação do tratamento com U0126 em estágios precoces da infecção por *L. amazonensis*. Fêmeas de camundongos BALB/c foram inoculadas na pata traseira esquerda com 1×10^5 promastigotas de *L. amazonensis* e, após duas semanas de infecção, os animais receberam U0126 (3mg / kg) pela via intraperitoneal por sete dias consecutivos, sendo então mantidos com livre acesso à água e ração até a sexta semana da infecção, instante em que foram eutanasiados (A); Análise de *Western blotting* de P-ERK1/2 6 semanas pós-infecção no grupo não tratado e tratado (6 + U0126) (B); Análise por *Western blotting* de ERK1 / 2 total 6 semanas após infecção no grupo tratado e tratado (6 + U0126) (C). Análises densitométricas para fosforilação de ERK 1/2 após normalização com β -actina para (D) e ERK total ½ (E).

Apesar das diferenças nos dois protocolos de tratamento, efeitos similares aos descritos para o tratamento na 4ª semana foram observados. Nesse sentido, aumentos significativos no tamanho da lesão (Figura 21A), carga parasitária (Figura 21B), níveis aumentados de IFN- γ (Figura 22A) e um maior escore de lesões inflamatórias da pele (Figuras 23) foram detectados nos animais tratados em relação ao grupo controle. Coletivamente, estes dados revelam de maneira contundente que a inibição da via MEK/ERK em estádios específicos da infecção por *L. amazonensis* representa um evento crítico que modula respostas inflamatórias inatas e adaptativas em camundongos BALB/c levando à perda de controle do processo infeccioso.

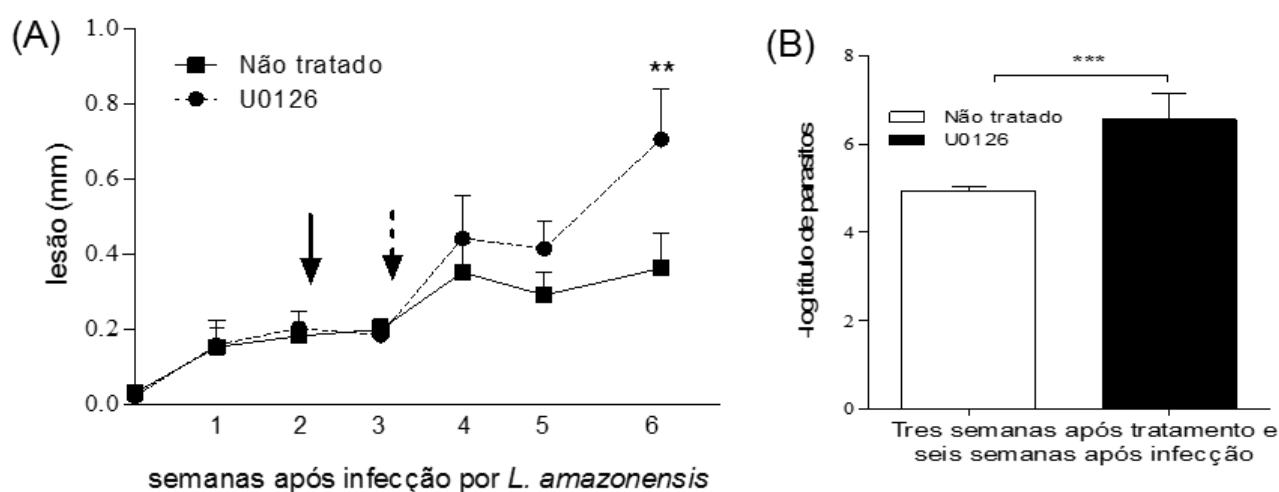


Figura 21: Avaliação do desenvolvimento da lesão e carga parasitária após infecção por *L. amazonensis* e tratamento com U0126.

Fêmeas de camundongos BALB/c foram inoculadas na pata traseira esquerda com 1×10^5 promastigotas de *L. amazonensis* e após duas semanas de infecção os animais receberam U0126 (3mg / kg), pela via intraperitoneal, por sete dias consecutivos, sendo então mantidos com livre acesso a água e ração até a sexta semana da infecção, instante em que foram eutanasiados. O desenvolvimento do tamanho da lesão foi monitorado semanalmente, pela diferença de espessura entre a pata de inoculada e a pata controle, medidas com um paquímetro digital. A seta preta indica início de tratamento e seta pontilhada indica fim de tratamento (A); Carga parasitária entre os grupos tratado e não tratado após seis semanas de infecção (B);

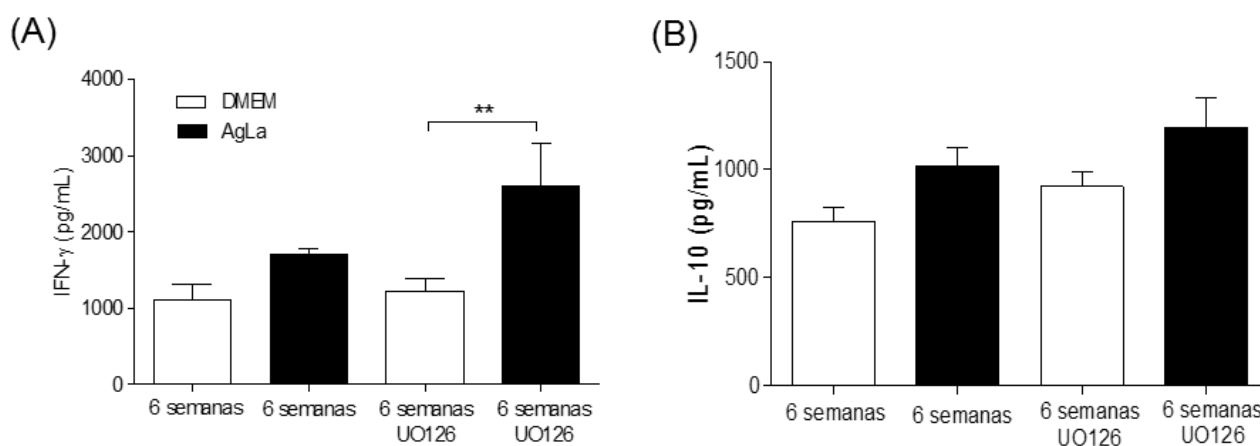


Figura 22: Avaliação dos níveis das citocinas IFN- γ e IL-10 em camundongos BALB/c após infecção por *L. amazonensis* e tratamento U0126. Fêmeas de camundongos BALB/c foram inoculadas na pata traseira esquerda com 1×10^5 promastigotas de *L. amazonensis* e após quatro semanas de infecção os animais receberam U0126 (3mg / kg) pela via intraperitoneal por sete dias consecutivos sendo então mantidos com livre acesso a água e ração até a sexta semana da infecção, instante em que foram eutanasiados. Após este processo os linfonodos drenantes das patas inoculadas foram coletados e processados. As células obtidas foram estimuladas *in vitro* com antígeno particulado de *L. amazonensis* por 48 horas, a 37 °C e 5% CO₂. Por ELISA, foram quantificadas as citocinas IFN- γ (A) e IL- 10 (B).

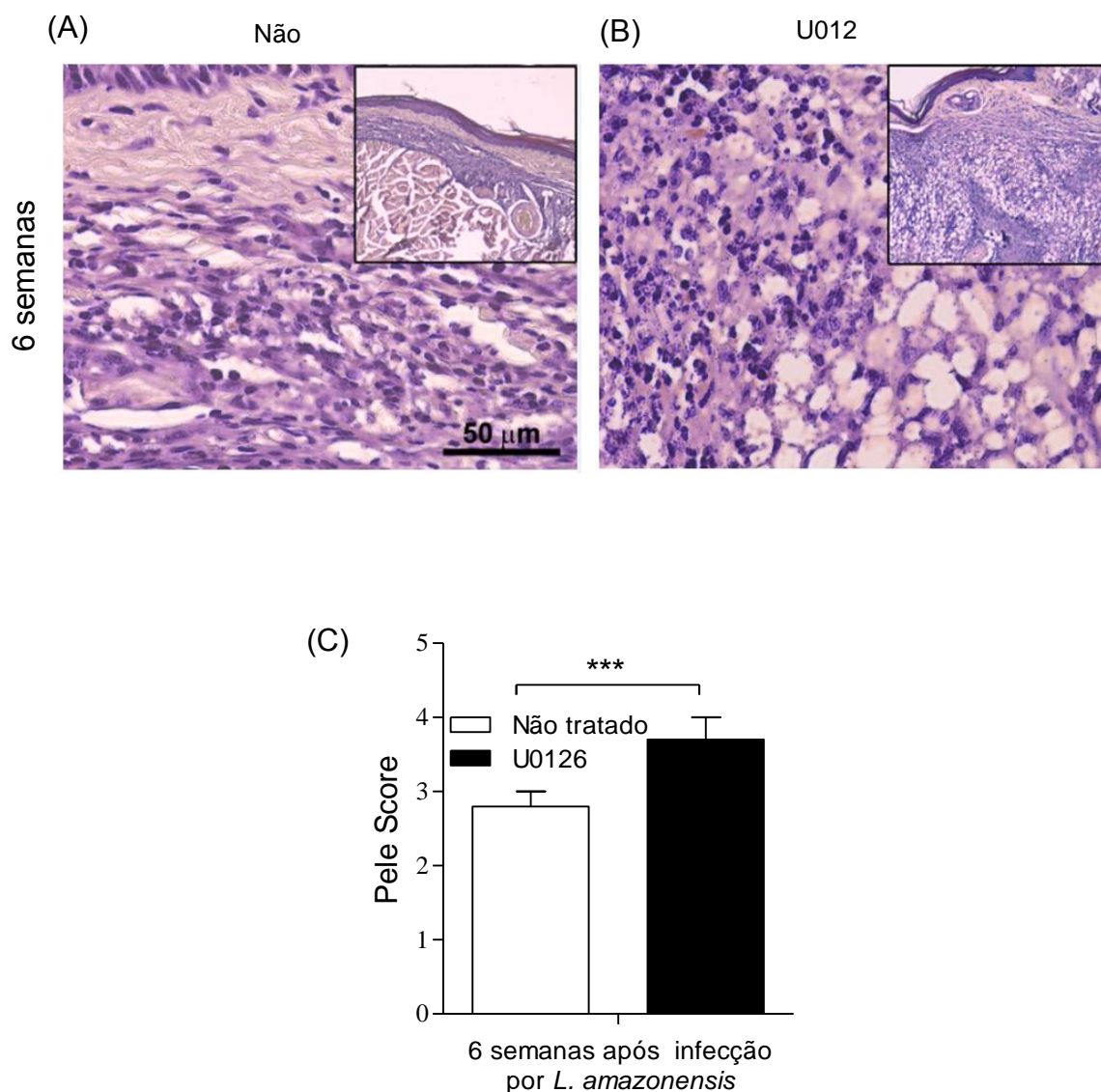


Figura 23: Camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* e tratados com U0126 apresentam maiores alterações histológicas no sítio da lesão após cinco semanas da infecção. Fêmeas de camundongos BALB/c foram inoculados com 1×10^5 promastigotas de *L. amazonensis* e ao longo da segunda semana de infecção, os animais receberam U0126 (3mg / kg) pela via intraperitoneal por sete dias consecutivos sendo então mantidos com livre acesso a água e ração até a sexta semana da infecção, instante em que foram eutanasiados e os tecidos de suas patas foram processados para análise histológica (4 µm, H&E). Em (A) cortes histológicos de animais não tratados e em (B) cortes histológicos de animais que receberam U0126. (C) representa score histopatológico do coxim plantar de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis*, após 6 semanas de inoculação.

5.2.7: Discussão Seção 2

Dados da literatura já haviam relatado que espécies patogênicas de leishmania são capazes de modular a resposta inflamatória no sentido de favorecer o parasitismo (ALEXANDER e BROMBACHER, 2012; ALEXANDER e BRYSON, 2005), apontando a ativação ou inibição de vias de sinalização celular como um ponto chave na regulação de respostas efetoras (OLIVEIRA *et al*, 2017; BROOM *et al*, 2009; GOODRIDGE e HARNETT, 2005). Embora estudos prévios tenham investigado o papel da via de sinalização ERK 1/2 na infecção *in vitro* e *in vivo* por *Leishmania* spp, salientamos que o presente trabalho abordou com ineditismo a modulação da ativação desta via em momentos distintos do curso da infecção por *L. amazonensis*. Coerentemente, demonstramos pela primeira vez a importância da manutenção dos níveis basais de P-ERK1/2, uma vez que os mesmos permanecem similares aos apresentados pelos animais do grupo controle até a 4^a - 5^a semanas de infecção seguido de um completo “shut down”, bem como a relevância de sua reativação em estágios tardios para o sucesso do parasitismo. Uma vez que, após esse breve evento de defosforilação de ERK1/2 ocorre uma mudança drástica em todos os marcadores avaliados, propusemos que esse mecanismo seria capaz alterar a resposta imune inata do hospedeiro e desencadear a ativação da inflamação e resposta imune específica, culminando com exacerbação da infecção.

O uso do inibidor farmacológico U0126 no tratamento de camundongos infectados por *L. amazonensis* antes da ocorrência do evento de defosforilação de P-ERK1/2 permitiu confirmar essa hipótese, uma vez que o bloqueio da ativação de ERK 1/2 desencadeou aumento da lesão e da carga parasitária nos dois esquemas de tratamento propostos, ou seja, iniciados na segunda ou na quarta semana de infecção. Salientamos que, embora o tratamento ou a infecção tenham impactado nos níveis de fosforilação de ERK1/2, não foram observadas alterações dos níveis proteicos de ERK1/2 total. A escolha do uso do U0126 foi baseado em trabalhos anteriores que já haviam relatado que o tratamento de camundongos BALB/c nas fases tardias da infecção por *L. amazonensis* com este inibidor de MEK/ ERK1/2 desencadeava redução da lesão e da carga parasitária (YANG and MOSSER, 2007), e que a inibição

por U0126 da via MEK/ERK/NF-kB impactava no influxo de células inflamatórias em um mecanismo dependente de plasmina (CARMO 2017).

De modo semelhante, nossos dados *in vitro* também apoiam os achados *in vivo*, uma vez que tanto no tratamento com U0126 quanto com Selumetinib (outro inibidor mais específico da via MEK/ERK) foi possível observar uma redução da atividade fagocítica da célula, bem como redução da atividade leishmanicida nos BMDMs. Sabe-se que a interação do parasita com a célula hospedeira e consequente fagocitose ocorre via receptores de complemento CR1, CR3 e também receptores FC γ , sendo este último estimulado pela ativação de ERK1/2, o que poderia explicar a menor capacidade fagocítica nos BMDMs tratados e avaliados em nosso estudo (GERALDO *et al*, 2016; LIU and UZONNA, 2012; GARCIA and ROSALLES, 2002). Já a manutenção da carga parasitária *in vitro* no grupo tratado pode ser correlacionada com o expressivo aumento dos níveis de IL-10 ao longo do experimento. Vários estudos têm relatado a capacidade da *Leishmania* de induzir a expressão desta citocina anti-inflamatória na tentativa de reduzir a produção de NO e, conseqüentemente, inibir a atividade leishmanicida da célula hospedeira (CALDINO *et al*, 2016; GOMES *et al*, 2014; KANNE and MOSSER, 2001).

A inibição de ERK1/2 é também um ponto chave na produção de mediadores inflamatórios como IFN- γ , IL-12 e NO (OLIVEIRA *et al*, 2017; BROOM *et al*, 2009; BLANCHETT *et al*, 2008; GOODRIDGE;e HARNETT, 2005), bem como no estabelecimento da infecção por *Leishmania spp*. A ausência de modulação de P-ERK1/2 nos momentos iniciais da infecção por *L. amazonensis* pode refletir a habilidade destes parasitos em infectar silenciosamente o hospedeiro mamífero. Neste caso, não haveria indução da produção de IL-12 e, conseqüentemente, não ativação de células T capazes de produzir IFN- γ e ativar mecanismos microbicidas como NO por parte dos macrófagos, garantindo a multiplicação “silenciosa” dos parasitos. De fato, a produção de citocinas como IFN- γ foi evidenciada somente após o evento de defosforilação de ERK1/2 ou após tratamento com U0126.

Conforme demonstrado histologicamente, não houve alterações inflamatórias nos momentos iniciais pós-infecção, simultaneamente à presença de níveis basais de

ERK1/2, sugerindo que a infecção não afeta a ativação de ERK1/2 nestes estágios precoces. Esse processo, somado à ausência de modulação de NF-κB e caspase 3, pode ser decisivo para a ausência de células inflamatórias no sítio de infecção. No entanto, a redução pronunciada nos níveis de P-ERK1/2 na quinta semana pós-infecção seria um gatilho para que esse processo se revertesse; foi quando puderam ser observados lesão macroscópica, infiltrado inflamatório e aumento de NF-κB e caspase. Esse gatilho poderia ser disparado no momento em que a carga parasitária atinge um determinado limite, levando à defosforilação de ERK. Entre os possíveis mecanismos podemos ressaltar a capacidade de formas amastigotas de *L. amazonensis* de induzir aumento dos níveis de fosfatases. Não se pode descartar ainda a participação de fosfatases do hospedeiro nesse processo.

Corroborando nossa hipótese, FERNANDES *et al* (2013) avaliou modelos de infecção de macrófagos por amastigotas de *L. amazonensis* e observou que o parasita secreta diferentes perfis de fosfatases ácidas e básicas, que favorecem a sua sobrevivência no interior do vacúolo parasitóforo. Adicionalmente, XIN *et al* (2008), ao avaliar a infecção de células dendríticas por esta espécie, verificou que o parasita reduz os níveis de fosforilação desta MAP cinase, o que culmina no decréscimo dos níveis de IL-12 e, conseqüentemente, prejudica o desenvolvimento de uma resposta Th1. Este mesmo mecanismo de inibição destas vias de sinalização celular impedindo o desenvolvimento de uma resposta imune foi observado também em modelos de infecção por *L. infantum* e *L. chagasi* (AGALLOU *et al*, 2014; PRIVÉ e DESCONTEOUX, 2000; NANDAN e REINER, 1999). Ainda dentro deste contexto, mecanismo similar foi demonstrado após a infecção por *Yersinia enterocolitica* em cepas virulentas contendo o plasmídeo que codifica para fosfatases e que, após determinado período, passam a defosforilar ERK1/2, com conseqüente redução dos níveis de TNF- α , se constituindo portanto em mecanismo de virulência para essa bactéria (RUCKDESCHERL *et al*, 1998)

Ainda no contexto das leishmanioses, foi relatado que o LPG da superfície de *L. donovani* tem a propriedade de quelar o cálcio da célula hospedeira e prejudicar a ativação de proteínas Ca⁺⁺ dependentes como a Proteína cinase C, importante na

ativação de vias de sinalização celular (OLIVIER, 2005). É sabido também que espécies como *L. donovani* e *L. major* são capazes de ativar um regulador negativo importante das vias de sinalização, denominado *PTP SHP1*, uma classe de fosfatase presente em células hematopoiéticas e epiteliais, cuja atividade é correlacionada com a defosforilação de várias cinases importantes para inibir a proliferação do parasita no interior das células hospedeiras (BLANCHETTE *et al*, 1999; NANDAM *et al*, 1999).

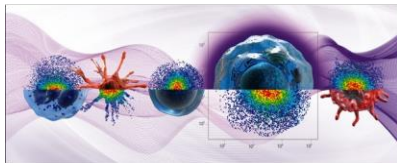
Como mencionado acima, a redução brusca na ativação do ERK1/2 ao longo da quinta semana de infecção parece ser um mecanismo chave para o aumento do parasitismo. Nos momentos que antecedem este estágio, podemos verificar que a ativação desta via segue em níveis basais, ou seja, semelhantes ao grupo controle e favorecendo o curso silencioso da infecção, embora haja aumento da carga parasitária. No entanto, é plausível que, após esse estágio, seja necessário o rompimento do equilíbrio entre resposta imune e parasitismo desencadeado pelo aumento da relação Th1/Th2. Embora pareça contraditório, a geração de um ambiente mais inflamado neste momento representa um influxo maior de células inflamatórias (principalmente macrófagos) no sítio flogístico, o que sem dúvida favorece o curso da infecção. Trabalhos anteriores já haviam relatado que a imunomodulação representada pelo balanço da produção de IL-10 e IL-12 é desencadeada por diversos patógenos (KAJI *et al*, 2010; QIAN *et al*, 2006). BOUHAMDAN *et al*. (2015) demonstraram que a deficiência genética de MEK1 ou inibição da via da MEK, por meio do tratamento de células dendríticas com U0126, muda o equilíbrio para a produção aumentada de IL-12 e correlaciona este aumento com a ativação de p38 e JNK. Esses autores demonstraram ainda que, na ausência da cinase MEK1, houve aumento na fosforilação dos fatores de transcrição STAT3 e STAT4, responsáveis pela elevação dos níveis de IL-12. Este fato nos permite inferir que a leishmania utiliza-se de estratégias, ativando e/ou inibindo outras vias de sinalização celular como p38 e JNK, concomitantes com a inibição do ERK1/2. Assim, seria oportuno investigar futuramente a produção da IL-12 de forma cinética na infecção por *L. amazonensis*, já que a sua produção parecer ser crítica nos mecanismos “downstream” à defosforilação de ERK1/2.

De modo interessante, nossos achados também evidenciaram, nos estágios mais tardios da infecção por *L. amazonensis* (ou seja, após a nona semana de infecção), níveis elevados de ERK1/2 fosforilada, bem como aumento da expressão de NF- κ B, caspase-3, IFN- γ e IL-10. Esses achados vão ao encontro de uma série de trabalhos que relatam a importância da ativação na via de sinalização ERK1/2 na resposta imune e na perpetuação do processo de infecção por *Leishmania* (SILVA e BAHIA, 2016; CONTRERAS *et al*, 2014; YANG and MOSSER, 2007). A relativa contradição entre nossos achados e aqueles relatados por YANG e MOSSER (2007) poderiam ser explicados pela diferença no período da infecção por *L. amazonensis* em que os animais foram tratados com U0126, ou seja, antes e após o evento de defosforilação de ERK1/2. Experimentos adicionais seriam, portanto, interessantes para investigar se o tratamento com U0126, após o evento de defosforilação de ERK1/2, teria impacto no controle da resposta inflamatória e do parasitismo, em nosso modelo de infecção por *L. amazonensis*

De modo aparentemente paradoxal, o ambiente inflamatório gerado pela breve defosforilação de ERK1/2 conduz a uma subsequente reativação desta proteína, o que está associado ao desencadeamento da ativação de vias de sinalização subsequentes como o NF- κ B, assim como descrito por SOMENSIA (2017). Isso culmina com o desenvolvimento de uma resposta mista, representada por altos níveis de IFN- γ concomitantemente com altos níveis de IL-10, e que neste momento já não consegue debelar o quadro infeccioso estabelecido.

Seção 3:

5.3.1 O papel da Anexina A1 na infecção por *Leishmania braziliensis*



Millions of dots: violet makes your plot more interesting
New eBioscience™ Super Bright antibody conjugates

Learn more

invitrogen
by Thermo Fisher Scientific

 **The Journal of
Immunology**

Annexin A1 Is Involved in the Resolution of Inflammatory Responses during *Leishmania braziliensis* Infection

This information is current as
of March 14, 2017.

Leandro G. Oliveira, Míriam C. Souza-Testasica, Juliana P. Vago, Amanda Braga Figueiredo, Adriana M. C. Canavaci, Luiza Oliveira Perucci, Tatiana P. Teixeira Ferreira, Eduardo A. F. Coelho, Denise Utsch Gonçalves, Manoel Otávio C. Rocha, Patrícia M. R. e Silva, Cláudia N. Ferreira, Celso Queiroz-Junior, Lirlândia P. Sousa and Ana Paula Fernandes

J Immunol published online 13 March 2017

<http://www.jimmunol.org/content/early/2017/03/11/jimmunol.1602028>

Downloaded from <http://www.jimmunol.org/> by guest on March 14, 2017

-
- Subscriptions** Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at:
<http://jimmunol.org/subscriptions>
- Permissions** Submit copyright permission requests at:
<http://www.aai.org/ji/copyright.html>
- Email Alerts** Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at:
<http://jimmunol.org/cgi/alerts/etoc>

The Journal of Immunology is published twice each month by
The American Association of Immunologists, Inc.,
9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814-3994.
Copyright © 2017 by The American Association of
Immunologists, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.



Annexin A1 Is Involved in the Resolution of Inflammatory Responses during *Leishmania braziliensis* Infection

Leandro G. Oliveira,^{*1} M'riam C. Souza-Testasica,^{*1} Juliana P. Vago,^{*1} Amanda Braga Figueiredo,[‡] Adriana M. C. Canavaci,^{*} Luiza Oliveira Perucci,^{*} Tatiana P. Teixeira Ferreira,^x Eduardo A. F. Coelho,[‡] Denise Utsch Gonçalves,[‡] Manoel Otávio C. Rocha,[‡] Patrícia M. R. e Silva,^x Cláudia N. Ferreira,^{||} Celso Queiroz-Junior,[†] Lirlândia P. Sousa,^{*†} and Ana Paula Fernandes^{*}

Leishmaniasis are diseases caused by several *Leishmania* species. *Leishmania (Viannia) braziliensis* can cause localized cutaneous leishmaniasis (LCL), which heals spontaneously, or mucosal leishmaniasis (ML), characterized by chronic and intense inflammation and scanty parasitism. Annexin A1 (AnxA1) is a protein involved in modulation and resolution of inflammation through multiple mechanisms. In the present study, the role of AnxA1 was investigated in *L. braziliensis*-infected BALB/c mice. AnxA1 levels increased at the peak of tissue lesion and parasitism in infected mice. AnxA1 increased also after *L. braziliensis* infection of BALB/c (wild-type [WT]) bone marrow derived macrophages. Despite a lower parasite intake, parasite burden in bone marrow-derived macrophages from AnxA1^{2/2} mice was similar to WT and associated with an early increase of TNF- α and, later, of IL-10. AnxA1^{2/2} mice controlled tissue parasitism similarly to WT animals, but they developed significantly larger lesions at later stages of infection, with a more pronounced inflammatory infiltrate and increased specific production of IFN- γ , IL-4, and IL-10. AnxA1^{2/2} mice also presented higher phosphorylation levels of ERK-1/2 and p65/RelA (NF- κ B) and inducible NO synthase expression, suggesting that AnxA1 may be involved in modulation of inflammation in this model of experimental leishmaniasis. Finally, assessment of AnxA1 levels in sera from patients with LCL or ML revealed that ML patients had higher levels of serum AnxA1 than did LCL patients or control subjects. Collectively, these data indicate that AnxA1 is actively expressed during *L. braziliensis* infection. In the absence of AnxA1, mice are fully able to control parasite replication, but they present more intense inflammatory responses and delayed ability to resolve their lesion size. *The Journal of Immunology*, 2017, 198: 000–000.

Protozoa of the genus *Leishmania* are intracellular parasites of a phagocytic mononuclear system, which are transmitted to mammalian hosts by the bite of a sand fly vector (1). Approximately a third of the 1.2 million new cases of tegumentary leishmaniasis reported worldwide occur in the Americas, and Brazil is 1 of the 10 countries with the highest incidence rates (2). Therapeutic alternatives for treatment of tegumentary leishmaniasis are scant, toxic, and per se not effective (3).

Leishmania (Viannia) braziliensis is the most prevalent species in Latin American countries and may cause localized cutaneous leishmaniasis (LCL) or mucosal leishmaniasis (ML). In LCL, skin ulcerative lesions develop at the site of a sand fly bite, which may heal spontaneously or persist for years. ML is a chronic condition

that leads to destruction of mucosal tissues, extending from the nose and mouth to the pharynx and larynx (4). In both clinical conditions, increased production of proinflammatory cytokines, including IFN- γ and TNF- α , is essential for parasite control (4, 5). However, in ML, they are also responsible for tissue damage observed at late stages of disease due to exacerbated activation of type 1-specific T lymphocytes (3, 6). Therefore, ambiguously, scant parasites and intense inflammatory responses coexist and may persist for long periods in ML lesions (7–9), leading to unresolved inflammation, failure in parasite clearance, exacerbated host tissue damage, and abnormal repair.

Resolution of inflammation is an active process that requires production of anti-inflammatory and proresolving molecules, a

*Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil;

†Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901 Brazil;

‡Laboratório de Imunoparasitologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais 35400-000, Brazil;

§Laboratório de Inflamação, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro 21040-360, Brazil;

¶Programa de Pós-Graduação em Ciências Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil; and ||Setor de Patologia Clínica, Colégio Técnico, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901 Brazil

¹L.G.O. and M.C.S.-T. contributed equally to this work.

ORCID: 0000-0001-8188-3738 (J.P.V.).

Received for publication November 30, 2016. Accepted for publication February 13, 2017.

This work was supported by funds from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, the Conselho Nacional de Pesquisas, the Comissão de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, and from the National Institute for Science and Technology on Vaccines.

A.P.F., L.P.S., L.G.O., and M.C.S.-T. designed research, analyzed data, and wrote the paper; L.G.O., M.C.S.-T., A.B.F., and A.M.C.C. performed experiments and analyzed data; J.P.V. performed Western blot analysis; L.G.O., M.C.S.-T., and C.N.F. performed human AnxA1 ELISA; M.C.S.-T., C.Q.-J., and L.G.O. performed histopathological analysis; E.A.F.C., D.U.G., M.O.C.R., and L.O.P. provided human serum samples; D.U.G. and M.O.C.R. diagnosed patients; and T.P.T.F. and P.M.R.E.S. provided knockout mice and revised the manuscript critically.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Ana Paula Fernandes, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627 Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil. E-mail address: apfernandes.ufmg@gmail.com

Abbreviations used in this article: AgLb, *Leishmania braziliensis* Ag; AnxA1, annexin A1; AU, arbitrary unit; BMM Φ , bone marrow-derived M Φ ; iNOS, inducible NO synthase; LCL, localized cutaneous leishmaniasis; M Φ , macrophage; ML, mucosal leishmaniasis; WT, wild-type.

Copyright © 2017 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/17/\$30.00

switch in the proteic and lipid mediators class from pro- to anti-inflammatory, apoptosis of granulocytes with subsequent removal by macrophages (M ϕ s), and change of M ϕ phenotype to a more restorative one (10–12). Proresolving mediators are specialized molecules, which activate resolution pathways to return the tissue to homeostasis. Functionally, they can act to limit additional leukocyte recruitment, induce neutrophil apoptosis and M ϕ reprogramming, enhance efferocytosis by M ϕ s, promote the return of nonapoptotic cells to the lymphatics, and to start tissue repair mechanisms, helping to resolve infectious disease. These mediators are diverse in nature and include specialized lipid mediators (lipoxins, resolvins, protectins, and maresins), proteins and peptides (annexin A1 [AnxA1], galectins), gaseous mediators (hydrogen sulphide), and purine (adenosine) (13, 14).

AnxA1 is a 37-kDa calcium-dependent phospholipid-binding protein, regulated by glucocorticoids, which binds to and activates the formyl peptide receptor 2/lipoxin A₄ receptor FPR2/ALXR (15) and has significant roles in modulation of the inflammatory response (16–21). AnxA1 regulates the inflammatory response through modulation of the generation of proinflammatory mediators, including those derived from activation of phospholipase 2, cyclooxygenase-2, and inducible NO synthase (iNOS), as well as of the anti-inflammatory cytokine IL-10. Recent evidence suggests that AnxA1 may control leukocyte apoptosis and favor their removal by M ϕ phagocytosis (22–25). Additionally, T cell–expressed AnxA1 has significant effects in T cell–driven inflammatory responses, including T cell–intrinsic intracellular signaling, proliferation, and Th1/Th17 cytokine release (26). In intestinal mucosal wounds, endogenous AnxA1 is also released by extracellular vesicles derived from epithelial cells, activating repair circuits (27).

Although the role of AnxA1 in various inflammatory conditions has been fairly investigated, its involvement in infection processes has been poorly addressed, especially in parasite infection (28–30). We have, accordingly, hypothesized that AnxA1 may be important for the control of inflammatory response in *L. braziliensis* infection. Therefore, this study sought to compare the kinetics of inflammatory and proresolving responses during the course of *L. braziliensis* infection in wild-type (WT) BALB/c and AnxA1-deficient mice. The BALB/c mouse is resistant to *L. braziliensis* infection (9), controlling both the inflammatory response and parasite replication, thus being a suitable model to investigate resolution of inflammation in *Leishmania* infection.

Materials and Methods

Mice

Female AnxA1 knockout (AnxA1^{2/2}) mice on a BALB/c background, generated as previously described (31), and WT BALB/c mice were obtained from the Oswaldo Cruz Foundation (Rio de Janeiro, Brazil) breeding unit. Animals were given water and food ad libitum. The procedures involving animals were in accordance with the National Council on Animal Experiments and Control (Ministry of Science and Technology, Brazil) guidelines. All described procedures had prior approval from the Animal Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais, Brazil (National Council on Animal Experiments and Control/Federal University of Minas Gerais protocol nos. 15/2011 and 221/2007).

Parasites

L. (Viannia) braziliensis (MHOM/BR/75/M2903 strain) was cultured in Grace's insect medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) supplemented with 10% heat-inactivated FCS (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brazil), 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich), 100 U/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich) (pH 6.5) at 25–26 °C. Parasites were periodically recovered from infected animals and subcultured every 3 d at 1–3 × 10⁵ parasites/ml. All experiments were conducted with parasites with fewer than 15 passages in culture (32).

Infection

Mice were inoculated in the left hind footpad with 1–3 × 10⁷ early stationary phase promastigotes of *L. braziliensis*, and lesion development was followed weekly with a digital micrometer (Western, Etílux, São Paulo, SP, Brazil). The results were expressed as the difference between measures of infected and noninfected footpad (33).

In vitro L. braziliensis infection in bone marrow–derived M ϕ s

Bone marrow–derived M ϕ s (BMM ϕ s) from BALB/c WT or AnxA1^{2/2} mice were obtained as previously described (34). BMM ϕ s were plated at 5–3 × 10⁶ cells/ml onto round coverslips in DMEM (Sigma-Aldrich) containing 10% FCS, 1 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin G potassium, 25 mM HEPES (Sigma-Aldrich), and 50 mM 2-ME (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) in 24-well plates. Cells were incubated for 90 min at 37 °C in 5% CO₂. Nonadherent cells were removed by washing with PBS. *L. braziliensis* promastigotes were added to the culture at a 5:1 parasite/cell ratio. After 3 h, cells were washed with PBS to remove noninternalized parasites. Coverslips were collected to evaluate infectivity after 3, 24, and 48 h of incubation. Culture supernatants were also collected for cytokine measurements and maintained at 280 °C until use. Coverslips were stained by May–Grünwald–Giemsa using a kit (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil), according to the manufacturer's instructions. The analysis was performed using an Olympus BX50 optical microscope (Olympus, Center Valley, PA). The number of infected and uninfected cells and the number of parasites present in infected cells were determined. A minimum of 200 M ϕ s per coverslip were examined.

Ag preparation

Promastigotes from early stationary phase cultures were washed twice in PBS. The pellets obtained were submitted to seven cycles of freezing in liquid nitrogen followed by thawing at 37 °C. The preparations were observed under a microscope for the presence of intact parasites (33). Protein content was determined by Bradford method (35) and adjusted to 1 mg/ml. The Ag suspension was stored at 280 °C in aliquots.

Lysate preparation and Western blot analysis

Infected paws were collected and footpads were isolated. Tissue fragments were added to a lysis solution consisting of 1% Nonidet P-40, 100 mM Tris/HCl (pH 8), 10% glycerol, 5 mM EDTA, 1 mM NaVO₃, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 200 mM NaCl, 25 mM NaF, leupeptin, and aprotinin. The tissues were then homogenized in an Ultra-Turrax Power Gen 1000 (Fisher Scientific/IKA, Zuideinde, the Netherlands) and incubated on ice for 15 min. Finally, the lysates were centrifuged (12,000 rpm, 15 min at 4 °C) and the supernatant aliquots were stored at 220 °C until use. The same lysis solution was used to prepare lysates from *L. braziliensis*–infected BMM ϕ s. The Bradford assay reagent (Bio-Rad Laboratories) was used to quantify proteins. Western blot analysis was as described (25). Extracts (50 mg) were separated by electrophoresis on a denaturing 10–15% polyacrylamide-SDS gel and electrotransferred to nitrocellulose membranes. Then, membranes were blocked for 1 h at room temperature with PBS containing 5% (w/v) nonfat dry milk and 0.1% Tween 20, washed three times with PBS containing 0.1% Tween 20, and then incubated with specific primary Abs at a dilution of 1:1000 overnight: anti-AnxA1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), anti-*b*-actin (Sigma-Aldrich), anti-iNOS (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), cleaved anti-caspase-3, anti-p-ERK1/2, and anti-p-NF- κ Bp65/RelA (the last three from Cell Signaling Technology, Danvers, MA). After washing, membranes were incubated with appropriated HRP-conjugated secondary Ab (1:3000). Immunoreactive bands were visualized by using an ECL detection system, as described by the manufacturer. Densitometry analyses were performed using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Data were expressed in arbitrary units (AU) after normalization to the values of *b*-actin in the same sample.

In vitro stimulation of mononuclear cells and quantification of parasites

At different periods of time postinfection, animals were euthanized. The infected paw and the draining popliteal lymph nodes were collected. Lymph nodes were processed in a glass homogenizer. The obtained cell suspension had its concentration adjusted to 5–3 × 10⁶ cells/ml in complete tissue culture medium and was stimulated with *L. braziliensis* Ag (AgLb; 50 mg/ml). Complete tissue culture medium was used as a negative control (36). The supernatant was collected after 48 h of incubation at 37 °C, 5% CO₂, and stored at 220 °C for cytokine assays (37). To quantify parasites, we used a limiting dilution technique (32). Briefly, the infected paws were processed

on a glass homogenizer in Grace's medium (pH 6.5). For debris removal, the obtained suspension was centrifuged at 50 \times g at 4°C for 1 min. The supernatant was collected and centrifuged at 1540 \times g at 4°C for 10 min. The pellet obtained was resuspended in Grace's medium supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 ml/ml streptomycin. The parasite suspension was subjected to serial dilution 1:10 in 96-well culture plates. After incubation at 25°C for 15 d, the wells were evaluated for the presence of parasites. Results were expressed as the negative logarithm titer of parasites, which corresponds to the last dilution at which viable parasites were observed (32).

ELISA for cytokines and AnxA1 quantification

Quantification of cytokines in culture supernatants was performed by ELISA. BD OptEIA (BD Biosciences, San Diego, CA) kits were used for measurement of TNF- α , IFN- γ , IL-4, and IL-10, according to the manufacturer's guidelines. Levels of AnxA1 in serum of patients were determined using an ELISA kit for AnxA1 (USCN Life Sciences, Houston, TX), according to the manufacturer's instructions.

Histological analysis

The skin samples of the plantar surface of mouse paws were collected and fixed in 10% neutral buffered formalin (pH 7.2). These samples were processed for routine histology, sectioned at 5 mm, and stained with H&E. The inflammatory reaction was evaluated using a semiquantitative procedure assessing the presence of leukocytes in the dermis and hypodermis. The inflammatory infiltrate score system was adapted from Alves et al. (38), as follows: 0, absent, no inflammatory infiltrate (histologically healthy dermis); 1, slight, diffuse inflammatory infiltrate, especially in the upper dermis (1–9 cells per field/fields); 2, moderate, diffuse or focal inflammatory infiltrate, including areas in the deep dermis or hypodermis (10–30 cells per field/20 fields); and 3, intense, severe diffuse or focal inflammatory infiltrate around the vessels, glands, hair follicles in deep dermis and/or hypodermis (\geq 30 cells per field/20 fields). Histopathological analysis was performed using a single-blinded model.

Human sera

This study was conducted according to the Declaration of Helsinki principles. The Ethics Committee from the Federal University of Minas Gerais (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; protocol no. CAAE-323431 14.9.0000.5149) approved the study. All control subjects and patients received an individual copy of the study policy, which was reviewed by an independent person, and all participants provided their consent form in Portuguese, before the collection of their blood sample. Sera samples of control subjects ($n = 10$; including 5 males and 5 females, with ages ranging from 9 to 35 y, to pair with LCL patients; and $n = 12$, 10 males and 2 females, with ages ranging from 25 to 76 y, to pair with ML patients) and patients with a confirmed diagnosis of LCL ($n = 10$; including 5 males and 5 females, with ages ranging from 9 to 33 y) or ML ($n = 12$; including 10 males and 2 females, with ages ranging from 29 to 74 y), from an endemic area of leishmaniasis (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil), were used. The diagnosis was confirmed by clinical evaluation of lesions, which were compatible with either LCL or ML, as well as by direct demonstration of parasites in Giemsa-stained smears of biopsies of skin (LCL) or mucosal fragments (ML) of the patients. Additionally, analyses from two biopsy samples collected from each patient were submitted to a conventional PCR technique, and they presented positive results for *L. braziliensis* DNA. None of the patients had been previously treated with antileishmanial drugs before the sample collection. All patients in this study were integrated into the clinical assistance Program of the Clinical Hospital from the Federal University of Minas Gerais, and they received continuous medical assistance. All samples were collected by venipuncture of medial vein in tubes without anticoagulant, and were kept at 37°C by 15 min, when they were centrifuged at 4000 \times g for 15 min. Sera were separated and kept at 280°C until use.

Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm SD or as mean \pm SEM, as indicated in each figure legend. Data were analyzed by ANOVA followed by Newman–Keuls posttest or a Student *t* test, according to the characteristics of each experiment, using GraphPad Prism software, version 5.0.3 (GraphPad Software, La Jolla, CA). A *p* value \leq 0.05 was considered significant.

Results

AnxA1 is modulated during the course of *L. braziliensis* infection in BALB/c mice and in vitro in BMMFs

Because the expression of AnxA1 in a *Leishmania* infectious model has not been previously investigated, we first evaluated the

kinetics of AnxA1 expression during the course of *L. braziliensis* infection in BALB/c mice. As shown in Fig. 1A, *L. braziliensis* infection in WT BALB/c mice followed a pattern of resistance to infection, as edema at the infection site increased in size, reaching a maximum average value on the second week postinfection, and decreased gradually afterward. Tissue parasitism correlated with lesion size, as high numbers of parasites were detected on the second week postinfection, but decreased progressively from the second week on (Fig. 1B). Parasites were no longer detected at 8 wk postinfection.

Following the infection course, AnxA1 expression in WT animals increased as early as 1 d after *L. braziliensis* infection, remained high for 2 wk, when higher lesion size and parasitism peaks were observed, but decreased, alongside the decrease in lesion size and tissue parasitism, reaching significantly lower levels at 12 wk postinfection (Fig. 1C; corresponding densitometry analysis in Fig. 1D). These findings indicate that AnxA1 expression is induced during *L. braziliensis* infection in BALB/c mice, and it may be important for control of the inflammatory process in this model of resistance to infection, because their levels were up- and downregulated in parallel with lesion size and parasitism. *L. braziliensis* infection also induced phosphorylation of ERK1/2 and p65/RelA, as compared with the noninfected group (data not shown).

Because M ϕ s are the primary target of intracellular *Leishmania* infection and AnxA1 is known to modulate dendritic cell and M ϕ functions, including phagocytic competence (39, 40), we investigated

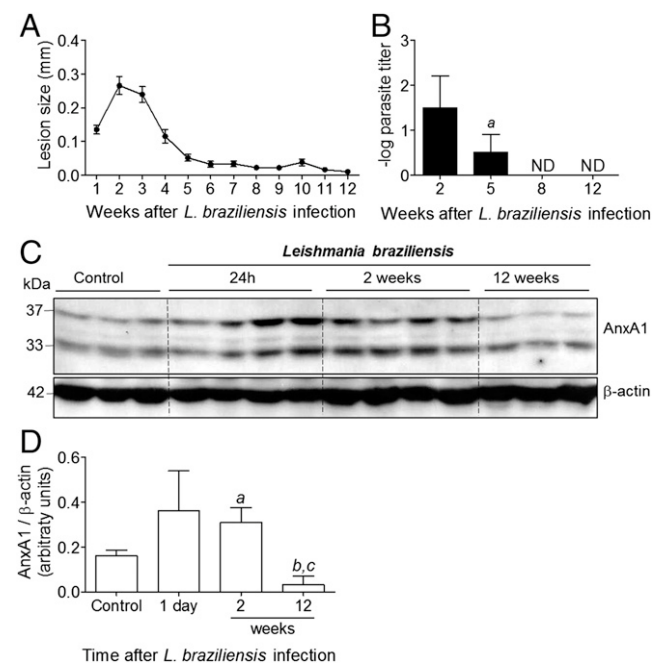


FIGURE 1. AnxA1 expression during the course of *L. braziliensis* infection in BALB/c mice. BALB/c mice were infected in the left hind footpad with 1×10^7 promastigotes of *L. braziliensis*. (A) Lesion sizes were monitored weekly with a digital caliper. Data are presented as mean \pm SEM. (B) Parasite loads were evaluated at different times after infection. Statistically significant differences were assumed when *p* \leq 0.05 in relation to (a) 2 wk postinfection. Data are presented as mean \pm SD of at least four mice in each time point (C) Western blotting analysis of AnxA1. For loading control, membranes were reprobed with β -actin. (D) Densitometric analysis of AnxA1 bands normalized to β -actin. Data are presented as mean \pm SD of at least three mice in each time point. Data are representative of two experiments with similar results. Statistically significant differences were assumed when *p* \leq 0.05 in relation to (a) control noninfected animals, (b) 1 d postinfection, and (c) 2 wk postinfection. ND, not detected.

the kinetics of AnxA1 expression in BMM \mathcal{F} s from WT mice and the phagocytic capacity of M \mathcal{F} s derived from AnxA1^{2/2} mice. As previously demonstrated in our in vivo assays in BALB/c mice, AnxA1 expression was also modulated in WT mice BMM \mathcal{F} s, increasing significantly after 24 h of infection (Fig. 2A, 2B). Although the proportion of infected BMM \mathcal{F} s was similar between WT and AnxA1^{2/2} mice (Fig. 2C), AnxA1^{2/2} BMM \mathcal{F} s displayed lower numbers of parasites per infected cell shortly after infection (3 h), suggesting an impaired ability of phagocytosis in AnxA1^{2/2} mice. However, as seen in Fig. 2D, after 24 h of infection, similar numbers of parasites per infected cell were observed in both groups, indicating that M \mathcal{F} activity in response to infection was not affected. At the 48 h time point, the numbers of parasites are smaller in WT cells, whereas they remain constant in AnxA1^{2/2} cells, as compared with 3 h postinfection. Interestingly, *L. braziliensis*-infected BMM \mathcal{F} s derived from AnxA1^{2/2} mice produced more TNF- α after 3 and 24 h of infection, and IL-10, after 24 and 48 h,

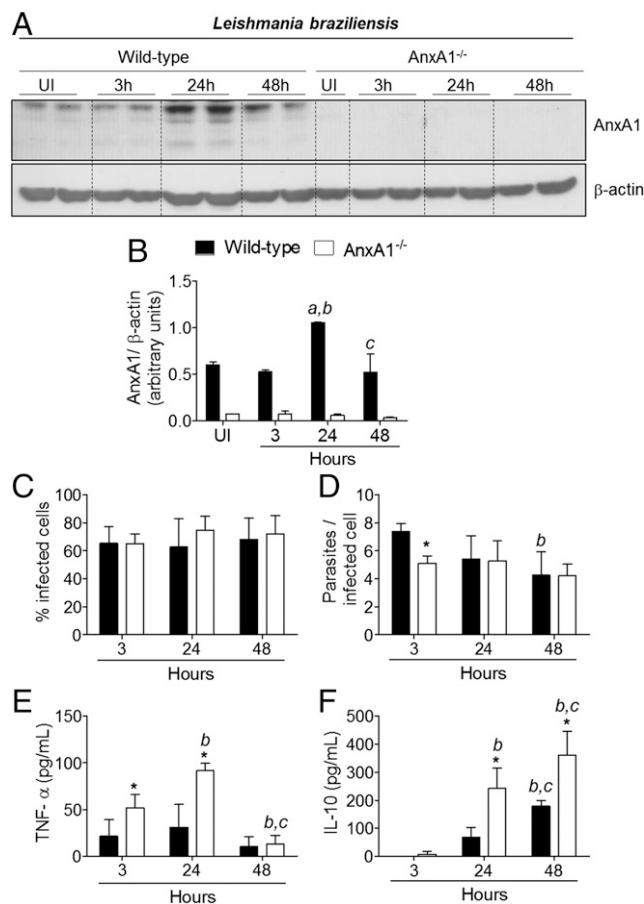


FIGURE 2. AnxA1 expression in BALB/c BMM \mathcal{F} s. BMM \mathcal{F} s from WT BALB/c or AnxA1^{2/2} mice were infected with *L. braziliensis* promastigotes, at a 5:1 parasite/cell ratio. (A and B) AnxA1 deficiency and absence of unspecific reaction with parasites proteins were confirmed by Western blotting in uninfected cells (UI) and in cells infected during 3, 24, and 48 h. For loading control, membranes were reprobed with β -actin. Blots are representative of three experiments using pooled cells from at least two animals in each experiment. At 3, 24, and 48 h postinfection, cells were evaluated to (C) percentage of infected cells and (D) number of parasites per infected cells. At the same time points, supernatant was assessed to TNF- α (E) and IL-10 (F) concentrations. Data are presented as mean \pm SD. Data are representative of two experiments with similar results, with at least four mice per group in each time point. Statistically significant differences were assumed when $p < .05$ in relation to (a) uninfected cells, (b) 3 h postinfection, and (c) 24 h postinfection. * $p < .05$ between WT and AnxA1^{2/2} mice.

as compared with BMM \mathcal{F} s derived from WT mice (Fig. 2E, 2F). Collectively, these findings suggest that AnxA1 deficiency impacts M \mathcal{F} competence for *L. braziliensis* phagocytosis, but it does not impair the fight against parasites, at least in part due to greater TNF- α production.

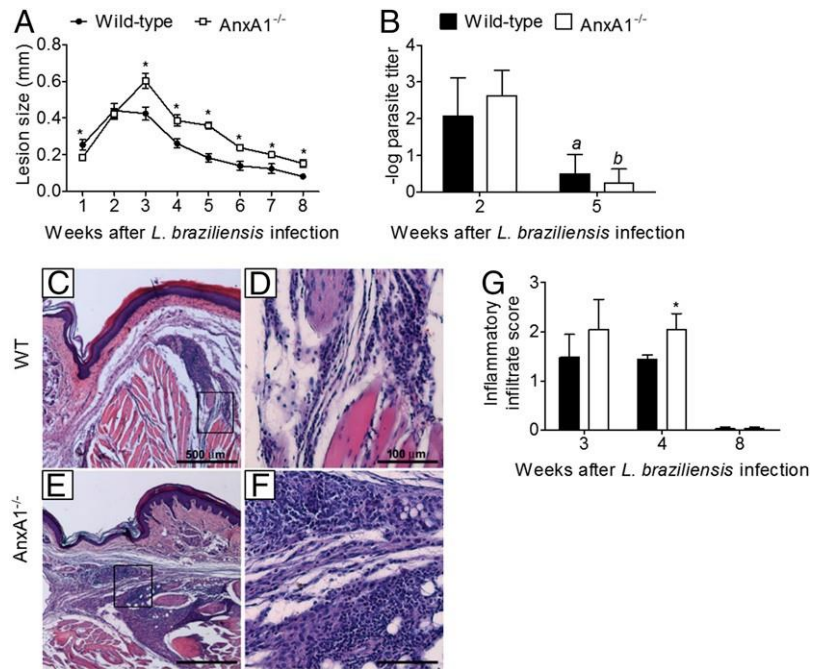
AnxA1^{2/2} mice effectively control parasite multiplication but display increased lesion size and inflammatory infiltrates during L. braziliensis infection as compared with WT mice

Given that AnxA1 levels were modulated in vivo and in vitro during the course of *L. braziliensis* infection in BALB/c mice, we compared the edema and the tissue parasitism in WT BALB/c and AnxA1^{2/2} mice. As seen in the Fig. 3A, the pattern of lesion size development in AnxA1^{2/2} mice was similar to that observed in WT animals. However, AnxA1^{2/2} mice display further and significantly increased lesion size at the third week postinfection, as compared with WT mice, suggesting a delay in the resolution of inflammatory responses. We also investigated the ability of AnxA1^{2/2} to control parasite replication at the infection site. Comparable numbers of parasites were detected in AnxA1^{2/2} and WT mice either at 2 or 5 wk postinfection (Fig. 3B), indicating that the lack of AnxA1 did not affect the control of tissue parasitism in *L. braziliensis* infection.

The histopathological analysis of skin biopsies of footpads of *L. braziliensis*-infected mice revealed significant inflammatory alterations, especially in the deep dermis and hypodermis (Fig. 3C, 3E). Significant epidermal changes, including acanthosis, dyskeratosis, papillomatosis, exocytosis, or hyperkeratosis, have not been detected either in WT or in AnxA1^{2/2} infected samples. In contrast, *L. braziliensis* infection for 4 wk triggered evident inflammatory cell infiltration into deep dermis and/or hypodermis. Whereas WT mice presented slight to moderate leukocyte infiltration (Fig. 3C, 3D), AnxA1^{2/2} mice had moderate to severe leukocyte infiltration (Fig. 3E, 3F). A mixed population of mononuclear (M \mathcal{F} s, plasma cells, and lymphocytes) and polymorphonuclear (neutrophils and eosinophils) leukocytes characterized the cellular exudates of the WT and AnxA1^{2/2} mice. The distribution of the inflammatory infiltrate varied from focal to diffuse exudates, with the diffuse pattern more frequent, along the deep dermis, hypodermis, and associated muscle tissue (Fig. 3C, 3F). Quantification of the histopathological findings is presented in Fig. 3G. Other histological events potentially associated with *L. braziliensis* skin infection, such as the presence of Langham's giant cells or foreign body giant cells, typical granulomatous chronic inflammatory reaction, or necrotic areas, have not been observed. At 8 wk postinfection, inflammatory responses decreased in both groups of mice. Nevertheless, no significant differences in the inflammatory cell infiltration were detected in WT and AnxA1^{2/2} mice, suggesting that, regardless of the lack of AnxA1, inflammatory reactions tended to resolve in all animals.

Following the evidence that AnxA1^{2/2} mice efficiently controlled parasite multiplication, but displayed delayed resolution of inflammatory response, the levels of some key cytokines that are essential for activation of M \mathcal{F} leishmanicidal mechanisms and control of *L. braziliensis* infection were investigated (Fig. 4). IFN- γ (Fig. 4A), IL-4 (Fig. 4B), and IL-10 (Fig. 4C) levels produced by lymph node cells were significantly increased in AnxA1^{2/2} mice at 2 wk postinfection in response to AgLb, as compared with WT animals. After 6 wk of infection, IFN- γ production in WT mice returned to basal levels, although it remained higher in AnxA1^{2/2} mice. At this time point, the levels of IL-4 and IL-10 were not different between the two genotypes. These findings may also indicate that the increased IFN- γ levels were associated with more intense edema and inflammatory responses in AnxA1^{2/2} mice. Alternatively, the concomitant increase in IL-4 and IL-10 levels in

FIGURE 3. Kinetic evaluation of lesion size, parasitism, and histopathological changes during *L. braziliensis* infection in WT and AnxA1^{2/2} mice. WT BALB/c or AnxA1^{2/2} mice were infected in the left hind footpad with 1.3×10^7 promastigotes of *L. braziliensis*. (A) Lesion sizes were monitored weekly with a digital caliper. Data are presented as mean \pm SEM. **p* < 0.05 between WT and AnxA1^{2/2} mice. (B) Parasite loads were evaluated at different times after infection. Data are presented as mean \pm SD. Data are representative of two experiments with similar results, with at least four mice per group in each time point. Statistically significant differences were assumed when *p* < 0.05 in relation to (a) 2 wk postinfection (WT group) and (b) 2 wk postinfection (AnxA1^{2/2} group). Histopathological analyses (H&E) were performed 4 wk postinfection for WT (C and D) and AnxA1^{2/2} (E and F) mice. Original magnification, 340 (C and E), 3200 (D and F). (G) Quantification of inflammatory infiltrate in mice footpad at 3, 4, and 8 wk postinfection. Data are presented as mean \pm SD. Data are representative of two experiments, with similar results, with at least four mice per group in each time point. **p* < 0.05 between WT and AnxA1^{2/2} mice.



those mice may well compensate for the lack of AnxA1-mediated mechanisms, controlling inflammation and its resolution, and consequently the edema in the infected footpad.

Proinflammatory signaling pathways are upregulated in AnxA1^{2/2} mice

Given the delayed resolution of the inflammatory responses in AnxA1^{2/2} mice, activation of the signaling pathways related to production of inflammatory mediators, which included the MAPK ERK1/2 and NF- κ Bp65, and the cleavage of caspase-3, as an apoptosis marker, was also investigated. Absence of AnxA1 expression in AnxA1^{2/2} mice was also confirmed in this analysis (Fig. 5A, 5B). As shown in Fig. 5, comparable levels of p-ERK1/2 and p-p65 were detected in WT and AnxA1^{2/2} mice at 2 wk after *L. braziliensis* infection. However, significantly higher activation of these proteins was observed in AnxA1^{2/2} mice at 8 wk, as compared with WT mice, suggesting that the delayed resolution of inflammatory response observed in knockout mice after the second week of infection was associated with more intense and persistent activation of p-ERK1/2 and NF- κ B (Fig. 5A, 5C, 5D). Cleaved caspase-3 levels were not altered in AnxA1^{2/2} mice, as compared with WT mice (Fig. 5A, 5E), suggesting that apoptotic mechanisms are activated in *L. braziliensis* infection, regardless of the lack of AnxA1 expression in the knockout mice.

Considering that AnxA1 reduces the expression of iNOS in strains of murine *M. f.* (41), as well as the importance of NO for the control of infection by *L. braziliensis* (42), we compared the iNOS expression in tissues of AnxA1^{2/2} and WT infected mice (Fig. 6). Accordingly, AnxA1^{2/2} animals showed an increased expression of iNOS, both at the second (0.71 \pm 0.07 versus 0.42 \pm 0.06 AU for WT animals) and eighth week postinfection (0.63 \pm 0.11 versus 0.031 \pm 0.05 AU for WT animals). Therefore, our data suggest that the lack of AnxA1 during *L. braziliensis* infection of BALB/c mice results in increased edema and activation of the inflammatory response, including increased IFN- γ levels and iNOS production, leading to efficient control of parasite replication (Fig. 3B).

AnxA1 systemic levels are increased in serum from patients presenting ML

The results described in the present study, in *L. braziliensis*-infected mice, strongly suggest that AnxA1 may be relevant

for control and resolution of inflammation during human *L. braziliensis* infection. Therefore, we have compared AnxA1 levels in sera of patients with LCL and ML caused by *L. braziliensis*, as well as in control healthy subjects, paired by sex and age. The

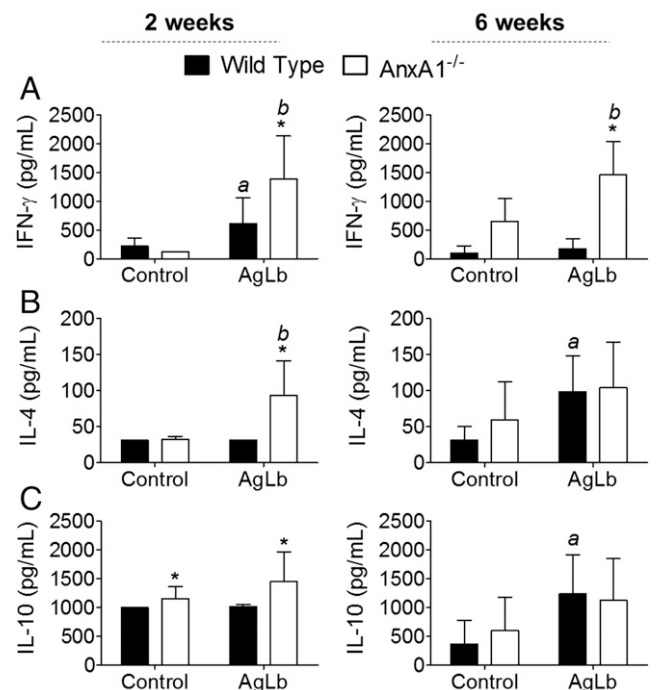
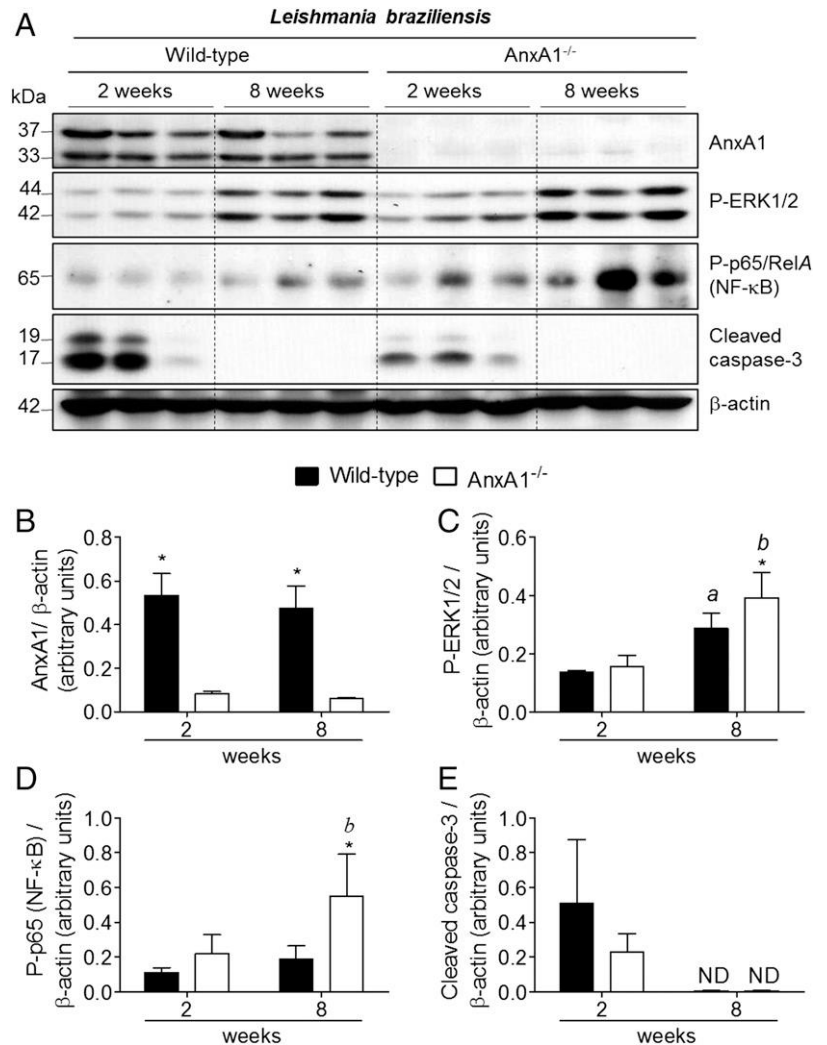


FIGURE 4. Cytokine levels in lymph nodes from WT and AnxA1^{2/2} mice 2 and 6 wk after *L. braziliensis* infection. WT BALB/c or AnxA1^{2/2} mice were infected in the left hind footpad with 1.3×10^7 promastigotes of *L. braziliensis*. At 2 (left panels) or 6 (right panels) wk postinfection, lymph node cells were stimulated in vitro with AgLb. After 48 h, supernatants were evaluated for (A) IFN- γ , (B) IL-4, and (C) IL-10 levels by ELISA. All data are presented as mean \pm SD. Data are representative of two experiments, with similar results, with at least four mice per group. Statistically significant differences were assumed when *p* < 0.05 in relation to (a) WT control group and (b) AnxA1^{2/2} group. **p* < 0.05 between WT and AnxA1^{2/2} mice.

FIGURE 5. Activation status of signaling proteins involved in inflammation and apoptotic pathways after *L. braziliensis* infection in WT and AnxA1^{2/2} mice. WT BALB/c or AnxA1^{2/2} mice were infected in the left hind footpad with 1.3 × 10⁷ promastigotes of *L. braziliensis*. At 2 and 8 wk postinfection, skin samples from infected footpads were processed and evaluated by Western blotting for signaling proteins from inflammatory and apoptotic pathways. (A) Western blotting analysis of p-ERK1/2, p-p65/RelA (NF-κB), and cleaved caspase-3 at 2 and 8 wk postinfection. AnxA1 deficiency was also confirmed by Western blotting. For loading control, membranes were reprobed with β-actin. Densitometric analysis of AnxA1 (B), p-ERK1/2 (C), p-p65 (NF-κB) (D), and cleaved caspase-3 (E) bands normalized to β-actin is shown. Data are representative of two experiments, with similar results. All data are presented as mean ± SD of three mice per group in each time point. Statistically significant differences were assumed when *p* < 0.05 in relation to (a) 2 wk postinfection (WT group) and (b) 2 wk postinfection (AnxA1^{2/2} group). **p* < 0.05 between WT and AnxA1^{2/2} mice.



characteristics of patients and control subjects are described in Table I. As seen in Fig. 7, the levels of AnxA1 were similar in sera of LCL patients and control subjects. In contrast, significantly increased AnxA1 levels were detected in sera of ML patients, as compared with both LCL patients and control subjects. Therefore, systemic levels of AnxA1 are increased in ML patients, which are known to display chronic exacerbated inflammatory responses.

Discussion

AnxA1 expression has been extensively investigated in models of sterile inflammation, leading to the recognition of its role as a key modulator of both of the innate and adaptive immune systems (15, 43). However, in the context of intracellular parasite infection only few studies (28, 44, 45) have been reported, including the demonstration that AnxA1 expression is locally increased in LCL lesions caused by *L. braziliensis* infection (29). Given that *L. braziliensis* infection may lead patients to develop an exacerbated inflammatory response, with intense tissue damage in chronic disease stages (3, 4, 6), the understanding of the mechanisms involved in the modulation of inflammatory responses, including AnxA1 expression, in leishmaniasis may provide new insights for the development of effective therapies.

BALB/c mice are extremely susceptible to various *Leishmania* species but are resistant to *L. braziliensis* infection (9). Therefore, this model of naturally resolving infection is suitable to evaluate whether AnxA1 expression is modulated during the course of *Leishmania* infection. Indeed, AnxA1 was actively expressed in

vitro, in BMMφs, and in vivo, in BALB/c mice, during *L. braziliensis* infection. Moreover, in these animals, AnxA1 expression was upregulated during the time of increased footpad edema and parasite multiplication, and it was later downregulated accordingly to control of inflammatory responses and elimination of parasites. Thus, our kinetics experiments suggested an active role of AnxA1 on modulation of the inflammatory responses during *L. braziliensis* infection in BALB/c mice. In contrast, in a self-resolving model of LPS-induced pleurisy, the accumulation of the intact form of AnxA1 (37 kDa) was lost concomitantly to intense neutrophilic infiltration and it was regained at the time points of resolution (25, 46). In agreement, in this model of neutrophilic inflammation, the use of protease inhibitors impaired AnxA1 cleavage and promoted resolution of inflammation (47).

There is significant evidence of reduced phagocytic capacity of Mφs derived from AnxA1^{2/2} animals, although Mφs from AnxA1-deficient mice phagocyte opsonized particles similarly to control Mφs (39, 40, 48). Also, AnxA1 is also known to inhibit other Mφ functions, including cytokine expression and the production of TNF-α (49). In agreement, our data support the suggestion that BMMφs from AnxA1^{2/2} are less competent to phagocyte *L. braziliensis* promastigotes. However, after 24 h of infection, AnxA1^{2/2} BMMφs showed comparable numbers of parasites per infected cells to WT BMMφs, suggesting that

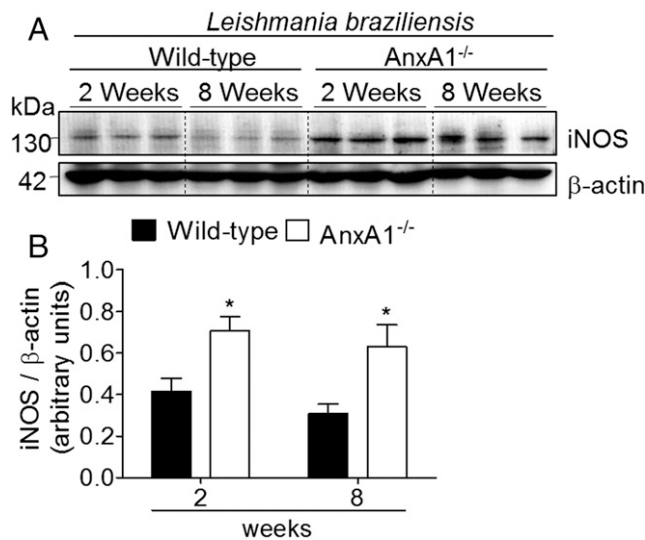


FIGURE 6. iNOS expression after *L. braziliensis* infection in WT and AnxA1^{2/2} mice. WT BALB/c or AnxA1^{2/2} mice were infected in the left hind footpad with 1.3×10^7 promastigotes of *L. braziliensis*. At 2 and 8 wk postinfection, skin samples from infected footpads were processed and evaluated by Western blotting for iNOS expression. (A) Western blotting analysis of iNOS at 2 and 8 wk postinfection. For loading control, membranes were reprobated with β -actin. (B) Densitometric analysis of iNOS bands normalized to β -actin. Data are representative of two experiments, with similar results. Data are presented as mean \pm SD of three mice per group in each time point. * $p < 0.05$ between WT and AnxA1^{2/2} mice.

AnxA1 deficiency did not affect the BMM ϕ s responses to parasite infection. Interestingly, AnxA1^{2/2} BMM ϕ s expressed increased levels of TNF- α , after 3 and 24 h, and IL-10 after 24 and 48 h, after *L. braziliensis* infection, indicating that cells were more activated for cytokine production. Therefore, the exacerbated production of TNF- α and IL-10 may ultimately balance the proinflammatory and anti-inflammatory responses, compensating for the lack of AnxA1 expression.

In vivo, the control of *L. braziliensis* replication in AnxA1^{2/2} mice was as effective as in WT mice, and it occurred at the same time points, supporting the hypothesis that AnxA1^{2/2} mice can efficiently control parasite multiplication. These findings differ from those reported for *M. tuberculosis* infection in AnxA1^{2/2} mice, which showed that AnxA1-deficient animals were more susceptible to infection, displaying increased pulmonary bacterial burden and exacerbated and disorganized granulomatous inflammation (30, 39). These pathological manifestations correlated with an impaired ability of AnxA1^{2/2} dendritic cells to activate naive T cells, leading, consequently to low IFN- γ production. In our study, lack of AnxA1 protracted the resolution of inflammatory responses, but it did not impact the course of disease or activation of specific T cell responses. Assessment of cytokine production by popliteal draining lymph node cells revealed increased and sustained parasite-specific IFN- γ levels. Thus, deficiency of AnxA1 in the model of *L. braziliensis* BALB/c mice infection did not

compromise the activation of IFN- γ -producing cells and other specific cellular immune responses, resulting, in turn, in an effective capacity to eliminate parasites.

AnxA1 was demonstrated to modulate Ag-specific CD4⁺ T cell proliferation and cytokine production (26). AnxA1 also induces IL-10 production (41, 50, 51). IL-4 and IL-10, in addition to the proresolving mediators, are important in the regulation of IFN- γ production by inhibiting exacerbated Th1 responses and controlling inflammatory responses (52). Although IFN- γ has an outstanding importance in *Leishmania* spp. infection, exacerbated type 1 cellular responses are associated with the pathogenesis of leishmaniasis (53), which could be due to defects in the activation of proresolving pathways, including those induced by AnxA1. However, increased levels of IL-10 were also observed in *L. braziliensis*-infected AnxA1^{2/2} mice. In this case, other stimuli to IL-10 production may be acting, including lipoxin A₄, which may compensate for the lack of AnxA1 in this model (21). Similar compensatory mechanisms have been demonstrated in a genetic-deficient background of the glucocorticoid-induced protein GILZ (46).

The increased IL-4 and IL-10 levels observed after *L. braziliensis* infection may have therefore contributed to recovery and maintenance of tissue homeostasis. Importantly, they did not impair parasite control. However, the increased levels of anti-inflammatory cytokines may have resulted in a delayed ability of AnxA1-deficient animals to resolve inflammation. One possible explanation for the delayed resolution of inflammatory responses in AnxA1 during *L. braziliensis* infection may be the exacerbated activation of signaling pathways related to production of proinflammatory mediators in late periods of infection, such as the MAPK ERK1/2 and NF- κ B pathways. In agreement, the increased expression of ERK1/2 observed at 8 wk postinfection in AnxA1^{2/2} mice may be related to an extended survival of inflammatory cells at the site of infection, similarly as observed in a model of Chagas' disease in which the activation of ERK1/2 correlated with inflammatory cell survival (54). Recently, a delay in neutrophil apoptosis in mice infected by *L. major* was demonstrated, an effect mediated by the activation of ERK1/2 (55). Alternatively, the ERK1/2 activation at this late period of infection may have affected the increased production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 as a feedback, compensatory mechanism for regulation of tissue inflammation (56).

The activation of NF- κ B has a major impact in *Leishmania* spp. infection due to its participation in the production of IL-12, and thus the development of Th1 responses (57, 58). Moreover, manipulation of the NF- κ B pathway is strategically used by *Leishmania* spp. to subvert the host immune response in susceptible mice models (59–65). Therefore, the increased levels of p65 NF- κ B correlated with the delay in the edema resolution and inflammatory responses during the late stages of *L. braziliensis* infection in AnxA1^{2/2} mice. Finally, caspase-3 activation was not affected by the lack of AnxA1. The high caspase-3 cleavage (and consequent activation) in the second week postinfection may be related to increased apoptosis of inflammatory cells in the microenvironment of the lesion in both mice (25).

Table I. Characteristics of LCL and ML patients and control subjects

Groups	LCL			ML		
	Control	Patient	<i>p</i> Value	Control	Patient	<i>p</i> Value
Number of individuals	10	10	NS	12	12	NS
Average age, y (range)	22.6 (9–35)	21.7 (9–33)	NS	42.8 (25–76)	45.4 (29–74)	NS
Male, <i>n</i> (%)	5 (50.0)	5 (50.0)	NS	10 (83.3)	10 (83.3)	NS

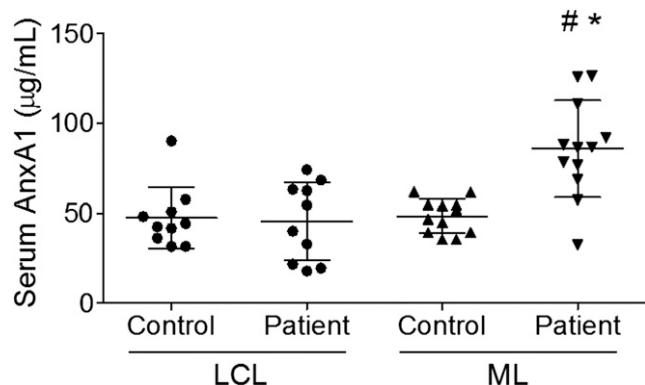


FIGURE 7. Serum levels of AnxA1 in LCL and ML patients and control subjects. AnxA1 levels were measured in serum samples from patients with LCL or ML, as well as in paired control subjects. All data are presented as mean \pm SD of at least 10 patients per group. # p < 0.05 in relation to the LCL patients group, * p < 0.05 between ML control subjects and ML patients.

Exogenous administration of AnxA1 protein reduced the iNOS message and therefore the NO production in M ϕ s stimulated with LPS (41). Treatment with dexamethasone also reduced the expression of iNOS in response to LPS, through an AnxA1-dependent mechanism (66). In the same vein, LPS-stimulated M ϕ s from AnxA1^{2/2} produced higher levels of iNOS as compared with WT M ϕ s (40). In agreement, AnxA1^{2/2} mice displayed higher iNOS expression following *L. braziliensis* infection. This finding suggests that AnxA1 may modulate the levels of iNOS and consequent NO production during *L. braziliensis* infection. As *L. braziliensis* is highly susceptible to NO (42), the major microbicidal mechanism during infection, parasite control was effectively achieved in the absence of AnxA1, regardless of the higher levels of IL-10 and IL-4.

Finally, serum AnxA1 levels were significantly increased in ML patients, but not in patients presenting with LCL. A recent study has shown increased local expression of AnxA1 in lesions of Brazilian patients with LCL caused by *L. braziliensis* (29). These contrasting findings may be related to the stage of infection in the different groups of patients. Whereas LCL lesions develop on average 3 mo after infection and are more promptly diagnosed, ML is a systemic disease that develops years after a primary LCL lesion, as a late complication and chronic inflammatory condition due to *L. braziliensis* infection. Although further studies are required, it is reasonable to presume that the expression of AnxA1 has been detected only locally in LCL lesions (29) owing to moderate inflammatory responses, which may eventually spontaneously heal. Alternatively, in a systemic infection characterized by a chronic and more severe inflammation, AnxA1 may become detectable in sera of ML patients.

Persistence of parasites concomitantly to an intense inflammatory response is still a puzzling question in human ML. More intriguingly, in ML patients, high IFN- γ /IL-10 secretion profiles in response to *Leishmania* Ags are present (67). Interestingly, in patients infected with *Plasmodium vivax*, AnxA1 expression was increased in regulatory T cells and decreased in CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Additionally, it has been suggested that AnxA1 may contribute to IL-10 production in plasma of patients with vivax malaria (45). Considering the increase in AnxA1 serum levels in ML patients, our findings suggest that upregulation of AnxA1, similarly to other anti-inflammatory markers (68), is not effective to counterbalance the higher levels of proinflammatory mediators present in ML patients, including higher levels of TNF- α . However, a deficiency in the engagement of AnxA1 to its receptor or

disturbances in downstream pathways may be determinant for maintenance of the chronic inflammatory condition. Curiously, increased expression of AnxA1 was shown in biopsies of patients under anti-TNF therapy for ulcerative colitis and in mice lacking TNFR1, indicating that blocking of TNF signaling may enhance AnxA1 bioactivity (69). In agreement, a deficit in the expression of IL-10R has been reported in ML patients (68), accounting for unbalanced type 1 and 2 immune responses in ML (68).

The presence of AnxA1, at the onset of inflammation, is important to temper inflammation by inhibiting several proinflammatory mediators that are produced, such as PGs, cytokines, chemokines, and adhesion molecules, decreasing leukocyte infiltration into tissue. In agreement, it has been shown that the absence of AnxA1 is associated with development of more severe inflammation in different models of inflammatory diseases (31, 70–73), suggesting that when this counterregulatory pathway is defective, the inflammation is overshoot. Particularly in our experimental settings, lesions are bigger in *Leishmania*-infected AnxA1^{2/2}, with more intense inflammatory cell infiltrate, cytokine production by lymph nodes cells, and expression of inflammatory-associated pathways, as compared with WT mice. From a translational perspective, the higher levels of AnxA1 in patients with ML, as compared with those presenting with LCL, indicate that the upstream branch of the AnxA1 pathway is functional and upregulated to control/attenuate the exacerbated inflammatory response in a more severe and chronic inflammatory milieu as compared that present in LCL patients. In the context of other chronic inflammatory human diseases, a similar pattern, that is, increased AnxA1 levels, has been found in pre-eclamptic women (74), Alzheimer disease (75), and ulcerative colitis (76).

In conclusion, our data indicate that AnxA1 is actively expressed and may be required to control tissue inflammation in *L. braziliensis* infection. Therefore, further investigations on the role of AnxA1 and its downstream pathway may eventually provide insights to new therapeutic strategies to better manage tegumentary leishmaniasis patients.

Acknowledgments

We thank Dr. Luis Carlos Crocco Afonso and Dr. Ricardo Gazzinelli for helpful discussions.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Von Stebut, E. 2015. Leishmaniasis. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 13: 191–200.
- Alvar, J., I. D. Vélez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, and M. den Boer, WHO Leishmaniasis Control Team. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7: e35671.
- Schriefer, A., M. E. Wilson, and E. M. Carvalho. 2008. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21: 483–488.
- de Oliveira, C. I., and C. I. Brodskyn. 2012. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. *Front. Immunol.* 3: 145.
- da Silva Santos, C., and C. I. Brodskyn. 2014. The role of CD4 and CD8 T cells in human cutaneous leishmaniasis. *Front. Public Health* 2: 165.
- Silveira, F. T., R. Lainson, C. M. De Castro Gomes, M. D. Laurenti, and C. E. Corbett. 2009. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 31: 423–431.
- Carvalho, L. P., S. Passos, A. Schriefer, and E. M. Carvalho. 2012. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front. Immunol.* 3: 301.
- Nylén, S., and L. Eidsmo. 2012. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 34: 551–561.
- Soong, L., C. A. Henard, and P. C. Melby. 2012. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. *Semin. Immunopathol.* 34: 735–751.
- Norling, L. V., and C. N. Serhan. 2010. Profiling in resolving inflammatory exudates identifies novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators and signals for termination. *J. Intern. Med.* 268: 15–24.

11. Serhan, C. N., S. D. Brain, C. D. Buckley, D. W. Gilroy, C. Haslett, L. A. O'Neill, M. Perretti, A. G. Rossi, and J. L. Wallace. 2007. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J.* 21: 325–332.
12. Sousa, L. P., A. L. Alessandri, V. Pinho, and M. M. Teixeira. 2013. Pharmacological strategies to resolve acute inflammation. *Curr. Opin. Pharmacol.* 13: 625–631.
13. Basil, M. C., and B. D. Levy. 2016. Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 16: 51–67.
14. Headland, S. E., and L. V. Norling. 2015. The resolution of inflammation: principles and challenges. *Semin. Immunol.* 27: 149–160.
15. Perretti, M., and F. D'Acquisto. 2009. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 9: 62–70.
16. Trentin, P. G., T. P. Ferreira, A. C. Arantes, B. T. Ciambarella, R. S. Cordeiro, R. J. Flower, M. Perretti, M. A. Martins, and P. M. Silva. 2015. Annexin A1 mimetic peptide controls the inflammatory and fibrotic effects of silica particles in mice. *Br. J. Pharmacol.* 172: 3058–3071.
17. Babbitt, B. A., M. G. Laukoetter, P. Nava, S. Koch, W. Y. Lee, C. T. Capaldo, E. Peatman, E. A. Severson, R. J. Flower, M. Perretti, et al. 2008. Annexin A1 regulates intestinal mucosal injury, inflammation, and repair. *J. Immunol.* 181: 5035–5044.
18. Bandeira-Melo, C., A. G. Bonavita, B. L. Diaz, P. M. E. Silva, V. F. Carvalho, P. J. Jose, R. J. Flower, M. Perretti, and M. A. Martins. 2005. A novel effect for annexin 1-derived peptide Ac2-26: reduction of allergic inflammation in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313: 1416–1422.
19. Damazo, A. S., S. Yona, F. D'Acquisto, R. J. Flower, S. M. Oliani, and M. Perretti. 2005. Critical protective role for annexin 1 gene expression in the endotoxemic murine microcirculation. *Am. J. Pathol.* 166: 1607–1617.
20. Getting, S. J., L. Gibbs, A. J. Clark, R. J. Flower, and M. Perretti. 1999. POMC gene-derived peptides activate melanocortin type 3 receptor on murine macrophages, suppress cytokine release, and inhibit neutrophil migration in acute experimental inflammation. *J. Immunol.* 162: 7446–7453.
21. Souza, D. G., C. T. Fagundes, F. A. Amaral, D. Cisalpino, L. P. Sousa, A. T. Vieira, V. Pinho, J. R. Nicoli, L. Q. Vieira, I. M. Fierro, and M. M. Teixeira. 2007. The required role of endogenously produced lipoxin A₄ and annexin-1 for the production of IL-10 and inflammatory hyporesponsiveness in mice. *J. Immunol.* 179: 8533–8543.
22. Solito, E., A. Kamal, F. Russo-Marie, J. C. Buckingham, S. Marullo, and M. Perretti. 2003. A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils. *FASEB J.* 17: 1544–1546.
23. Maderna, P., and C. Godson. 2005. Taking insult from injury: lipoxins and lipoxin receptor agonists and phagocytosis of apoptotic cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 73: 179–187.
24. Scannell, M., M. B. Flanagan, A. deStefani, K. J. Wynne, G. Cagney, C. Godson, and P. Maderna. 2007. Annexin-1 and peptide derivatives are released by apoptotic cells and stimulate phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages. *J. Immunol.* 178: 4595–4605.
25. Vago, J. P., C. R. Nogueira, L. P. Tavares, F. M. Soriani, F. Lopes, R. C. Russo, V. Pinho, M. M. Teixeira, and L. P. Sousa. 2012. Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* 92: 249–258.
26. Yang, Y. H., W. Song, J. A. Deane, W. Kao, J. D. Ooi, D. Ngo, A. R. Kitching, E. F. Morand, and M. J. Hickey. 2013. Deficiency of annexin A1 in CD4⁺ T cells exacerbates T cell-dependent inflammation. *J. Immunol.* 190: 997–1007.
27. Leoni, G., and A. Nusrat. 2016. Annexin A1: shifting the balance towards resolution and repair. *Biol. Chem.* 397: 971–979.
28. Mimura, K. K., R. C. Tedesco, K. S. Calabrese, C. D. Gil, and S. M. Oliani. 2012. The involvement of anti-inflammatory protein, annexin A1, in ocular toxoplasmosis. *Mol. Vis.* 18: 1583–1593.
29. Silva, H. A., G. S. Lima, M. C. Boité, R. Porrozzini, M. Hueb, and A. S. Damazo. 2015. Expression of annexin A1 in *Leishmania*-infected skin and its correlation with histopathological features. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 48: 560–567.
30. Vanessa, K. H., M. G. Julia, L. Wenwei, A. L. Michelle, Z. R. Zarina, L. H. Lina, and A. Sylvie. 2015. Absence of annexin A1 impairs host adaptive immunity against *Mycobacterium tuberculosis* in vivo. *Immunobiology* 220: 614–623.
31. Hannon, R., J. D. Croxtall, S. J. Getting, F. Roviezzo, S. Yona, M. J. Paul-Clark, F. N. Gavins, M. Perretti, J. F. Morris, J. C. Buckingham, and R. J. Flower. 2003. Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1^{2/2} mouse. *FASEB J.* 17: 253–255.
32. de Souza, M. C., E. A. de Assis, R. S. Gomes, A. Marques da Silva Ede, M. N. Melo, J. L. Fietto, and L. C. Afonso. 2010. The influence of ectonucleotidases on *Leishmania amazonensis* infection and immune response in C57B/6 mice. *Acta Trop.* 115: 262–269.
33. Afonso, L. C., and P. Scott. 1993. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect. Immun.* 61: 2952–2959.
34. Zhang, X., R. Goncalves, and D. M. Mosser. 2008. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr. Protoc. Immunol.* Chapter 14: Unit 14.1.
35. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
36. Coelho, E. A., C. A. Tavares, F. A. Carvalho, K. F. Chaves, K. N. Teixeira, R. C. Rodrigues, H. Charest, G. Matlashewski, R. T. Gazzinelli, and A. P. Fernandes. 2003. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect. Immun.* 71: 3988–3994.
37. Carvalho, A. K., F. T. Silveira, L. F. Passero, C. M. Gomes, C. E. Corbett, and M. D. Laurenti. 2012. *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* promote differential expression of dendritic cells and cellular immune response in murine model. *Parasite Immunol.* 34: 395–403.
38. Alves, C. F., C. F. Alves, M. M. Figueiredo, C. C. Souza, G. L. Machado-Coelho, M. N. Melo, W. L. Tafuri, P. Raso, R. P. Soares, and W. L. Tafuri. 2013. American tegumentary leishmaniasis: effectiveness of an immunohistochemical protocol for the detection of *Leishmania* in skin. *PLoS One* 8: e63343.
39. Tzelepis, F., M. Verway, J. Daoud, J. Gillard, K. Hassani-Ardakani, J. Dunn, J. Downey, M. E. Gentile, J. Jaworska, A. M. Sanchez, et al. 2015. Annexin1 regulates DC efferocytosis and cross-presentation during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Clin. Invest.* 125: 752–768.
40. Yona, S., J. C. Buckingham, M. Perretti, and R. J. Flower. 2004. Stimulus-specific defect in the phagocytic pathways of annexin 1 null macrophages. *Br. J. Pharmacol.* 142: 890–898.
41. Ferlazzo, V., P. D'Agostino, S. Milano, R. Caruso, S. Feo, E. Cillari, and L. Parente. 2003. Anti-inflammatory effects of annexin-1: stimulation of IL-10 release and inhibition of nitric oxide synthesis. *Int. Immunopharmacol.* 3: 1363–1369.
42. Rocha, F. J., U. Schleicher, J. Mattner, G. Alber, and C. Bogdan. 2007. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. *Infect. Immun.* 75: 3823–3832.
43. Alessandri, A. L., L. P. Sousa, C. D. Lucas, A. G. Rossi, V. Pinho, and M. M. Teixeira. 2013. Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacol. Ther.* 139: 189–212.
44. Zhou, D. H., Z. G. Yuan, F. R. Zhao, H. L. Li, Y. Zhou, R. Q. Lin, F. C. Zou, H. Q. Song, M. J. Xu, and X. Q. Zhu. 2011. Modulation of mouse macrophage proteome induced by *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vivo. *Parasitol. Res.* 109: 1637–1646.
45. Borges, Q. I., C. J. Fontes, and A. S. Damazo. 2013. Analysis of lymphocytes in patients with *Plasmodium vivax* malaria and its relation to the annexin-A1 and IL-10. *Malar. J.* 12: 455.
46. Vago, J. P., L. P. Tavares, C. C. Garcia, K. M. Lima, L. O. Perucci, E. L. Vieira, C. R. Nogueira, F. M. Soriani, J. O. Martins, P. M. Silva, et al. 2015. The role and effects of glucocorticoid-induced leucine zipper in the context of inflammation resolution. *J. Immunol.* 194: 4940–4950.
47. Vago, J. P., L. P. Tavares, M. A. Sugimoto, G. L. Lima, I. Galvão, T. R. de Caux, K. M. Lima, A. L. Ribeiro, F. S. Carneiro, F. F. Nunes, et al. 2016. Proresolving actions of synthetic and natural protease inhibitors are mediated by annexin A1. *J. Immunol.* 196: 1922–1932.
48. Yona, S., S. E. Heinsbroek, L. Peiser, S. Gordon, M. Perretti, and R. J. Flower. 2006. Impaired phagocytic mechanism in annexin 1 null macrophages. *Br. J. Pharmacol.* 148: 469–477.
49. Yang, Y. H., D. Aeberli, A. Dacumos, J. R. Xue, and E. F. Morand. 2009. Annexin-1 regulates macrophage IL-6 and TNF via glucocorticoid-induced leucine zipper. *J. Immunol.* 183: 1435–1445.
50. Weyd, H., L. Abeler-Dörner, B. Linke, A. Mahr, V. Jahndel, S. Pfrang, M. Schnölzer, C. S. Falk, and P. H. Krammer. 2013. Annexin A1 on the surface of early apoptotic cells suppresses CD8⁺ T cell immunity. *PLoS One* 8: e62449.
51. Parente, L., and E. Solito. 2004. Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. *Inflamm. Res.* 53: 125–132.
52. Lazarski, C. A., J. Ford, S. D. Katzman, A. F. Rosenberg, and D. J. Fowell. 2013. IL-4 attenuates Th1-associated chemokine expression and Th1 trafficking to inflamed tissues and limits pathogen clearance. *PLoS One* 8: e71949.
53. Kima, P. E., and L. Soong. 2013. Interferon gamma in leishmaniasis. *Front. Immunol.* 4: 156.
54. Adesse, D., M. P. Lisanti, D. C. Spray, F. S. Machado, N. Meirelles Mde, H. B. Tanowitz, and L. R. Garzoni. 2010. *Trypanosoma cruzi* infection results in the reduced expression of caveolin-3 in the heart. *Cell Cycle* 9: 1639–1646.
55. Sarkar, A., E. Aga, U. Bussmeyer, A. Bhattacharyya, S. Möller, L. Hellberg, M. Behnen, W. Solbach, and T. Laskay. 2013. Infection of neutrophil granulocytes with *Leishmania major* activates ERK 1/2 and modulates multiple apoptotic pathways to inhibit apoptosis. *Med. Microbiol. Immunol.* 202: 25–35.
56. Mathur, R. K., A. Awasthi, P. Wadhone, B. Ramanamurthy, and B. Saha. 2004. Reciprocal CD40 signals through p38MAPK and ERK-1/2 induce counteracting immune responses. *Nat. Med.* 10: 540–544.
57. Murphy, T. L., M. G. Cleveland, P. Kulesza, J. Magram, and K. M. Murphy. 1995. Regulation of interleukin 12 p40 expression through an NF-kappa B half-site. *Mol. Cell. Biol.* 15: 5258–5267.
58. Reinhard, K., M. Huber, M. Lohoff, and A. Visekruna. 2012. The role of NF-kB activation during protection against *Leishmania* infection. *Int. J. Med. Microbiol.* 302: 230–235.
59. Abu-Dayyeh, I., K. Hassani, E. R. Westra, J. C. Mottram, and M. Olivieri. 2010. Comparative study of the ability of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes to alter macrophage signaling and functions. *Infect. Immun.* 78: 2438–2445.
60. Neves, B. M., R. Silvestre, M. Resende, A. Ouassii, J. Cunha, J. Tavares, I. Loureiro, N. Santarém, A. M. Silva, M. C. Lopes, et al. 2010. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and impairment of nuclear factor-kB: molecular mechanisms behind the arrested maturation/activation state of *Leishmania infantum*-infected dendritic cells. *Am. J. Pathol.* 177: 2898–2911.
61. Calegari-Silva, T. C., R. M. Pereira, L. D. De-Melo, E. M. Saraiva, D. C. Soares, M. Bellio, and U. G. Lopes. 2009. NF-kB-mediated repression of iNOS expression in *Leishmania amazonensis* macrophage infection. *Immunol. Lett.* 127: 19–26.
62. Argueta-Donohué, J., N. Carrillo, L. Valdés-Reyes, A. Zentella, M. Aguirre-García, I. Becker, and L. Gutiérrez-Kobeh. 2008. *Leishmania mexicana*: participation of

- NF- κ B in the differential production of IL-12 in dendritic cells and monocytes induced by lipophosphoglycan (LPG). *Exp. Parasitol.* 120: 1–9.
63. Cameron, P., A. McGachy, M. Anderson, A. Paul, G. H. Coombs, J. C. Mottram, J. Alexander, and R. Plevin. 2004. Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF- κ B signaling pathway. *J. Immunol.* 173: 3297–3304.
 64. Guizani-Tabbane, L., K. Ben-Aissa, M. Belghith, A. Sassi, and K. Dellagi. 2004. *Leishmania major* amastigotes induce p50/c-Rel NF- κ B transcription factor in human macrophages: involvement in cytokine synthesis. *Infect. Immun.* 72: 2582–2589.
 65. Singh, V. K., S. Balaraman, P. Tewary, and R. Madhubala. 2004. *Leishmania donovani* activates nuclear transcription factor- κ B in macrophages through reactive oxygen intermediates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322: 1086–1095.
 66. Bryant, C. E., M. Perretti, and R. J. Flower. 1998. Suppression by dexamethasone of inducible nitric oxide synthase protein expression in vivo: a possible role for lipocortin 1. *Biochem. Pharmacol.* 55: 279–285.
 67. Gomes-Silva, A., R. de Cássia Bittar, R. Dos Santos Nogueira, V. S. Amato, M. da Silva Mattos, M. P. Oliveira-Neto, S. G. Coutinho, and A. M. Da-Cruz. 2007. Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin. Exp. Immunol.* 149: 440–444.
 68. Faria, D. R., K. J. Gollob, J. Barbosa, Jr., A. Schriefer, P. R. Machado, H. Lessa, L. P. Carvalho, M. A. Romano-Silva, A. R. de Jesus, E. M. Carvalho, and W. O. Dutra. 2005. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect. Immun.* 73: 7853–7859.
 69. Sena, A. A., L. P. Pedrotti, B. E. Barrios, H. Cejas, D. Balderramo, A. Diller, and S. G. Correa. 2015. Lack of TNFR1 signaling enhances annexin A1 biological activity in intestinal inflammation. *Biochem. Pharmacol.* 98: 422–431.
 70. Galvão, L., J. P. Vago, L. C. Barroso, L. P. Tavares, C. M. Queiroz-Junior, V. V. Costa, F. S. Carneiro, T. P. Ferreira, P. M. Silva, F. A. Amaral, et al. 2016. Annexin A1 promotes timely resolution of inflammation in murine gout. *Eur. J. Immunol.* DOI: 10.1002/eji.201646551.
 71. Gavins, F. N., E. L. Hughes, N. A. Buss, P. M. Holloway, S. J. Getting, and J. C. Buckingham. 2012. Leukocyte recruitment in the brain in sepsis: involvement of the annexin 1-FPR2/ALX anti-inflammatory system. *FASEB J.* 26: 4977–4989.
 72. Gimenes, A. D., T. R. Andrade, C. B. Mello, L. Ramos, C. D. Gil, and S. M. Oliani. 2015. Beneficial effect of annexin A1 in a model of experimental allergic conjunctivitis. *Exp. Eye Res.* 134: 24–32.
 73. Leoni, G., P. A. Neumann, N. Kamaly, M. Quiros, H. Nishio, H. R. Jones, R. Sumagin, R. S. Hilgarth, A. Alam, G. Fredman, et al. 2015. Annexin A1-containing extracellular vesicles and polymeric nanoparticles promote epithelial wound repair. *J. Clin. Invest.* 125: 1215–1227.
 74. Perucci, L. O., F. S. Carneiro, C. N. Ferreira, M. A. Sugimoto, F. M. Soriani, G. G. Martins, K. M. Lima, F. L. Guimarães, A. L. Teixeira, L. M. Dusse, et al. 2015. Annexin A1 is increased in the plasma of preeclamptic women. *PLoS One* 10: e0138475.
 75. Ries, M., R. Loiola, U. N. Shah, S. M. Gentleman, E. Solito, and M. Sastre. 2016. The anti-inflammatory Annexin A1 induces the clearance and degradation of the amyloid- β peptide. *J. Neuroinflammation* 13: 234.
 76. Vong, L., J. G. Ferraz, N. Dufton, R. Panaccione, P. L. Beck, P. M. Sherman, M. Perretti, and J. L. Wallace. 2012. Up-regulation of annexin-A1 and lipoxin A₄ in individuals with ulcerative colitis may promote mucosal homeostasis. *PLoS One* 7: e39244.

5.4 Seção 4:

O papel da Anexina A1 na resolução da resposta inflamatória durante a infecção por *Leishmania amazonensis*

5.4.1 Cinética da expressão local de AnxA1 ao longo da infecção por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c

Como AnxA1 faz parte de um conjunto de marcadores associados à resolução da resposta inflamatória e retorno à homeostase, mantendo relação intrínseca com a fagocitose e as modulações de IFN- γ e IL-10 dentre outros processos, decidimos investigar a participação da AnxA1 na resposta à infecção por *L. amazonensis* após os resultados obtidos no modelo de resistência à infecção por *L. braziliensis*. Nesse modelo, como demonstrado pelos dados apresentados nas seções anteriores, ocorre uma supressão inicial da resposta inflamatória nas primeiras semanas de infecção, seguida de sua exacerbação após a defosforilação temporária de ERK1/2, aspecto considerado crítico para a susceptibilidade deste modelo à infecção. Para tal, camundongos BALB/c foram inoculados com *L. amazonensis* e tecidos obtidos dos sítios de inoculação foram avaliados em diferentes momentos por WB (Figura 24)

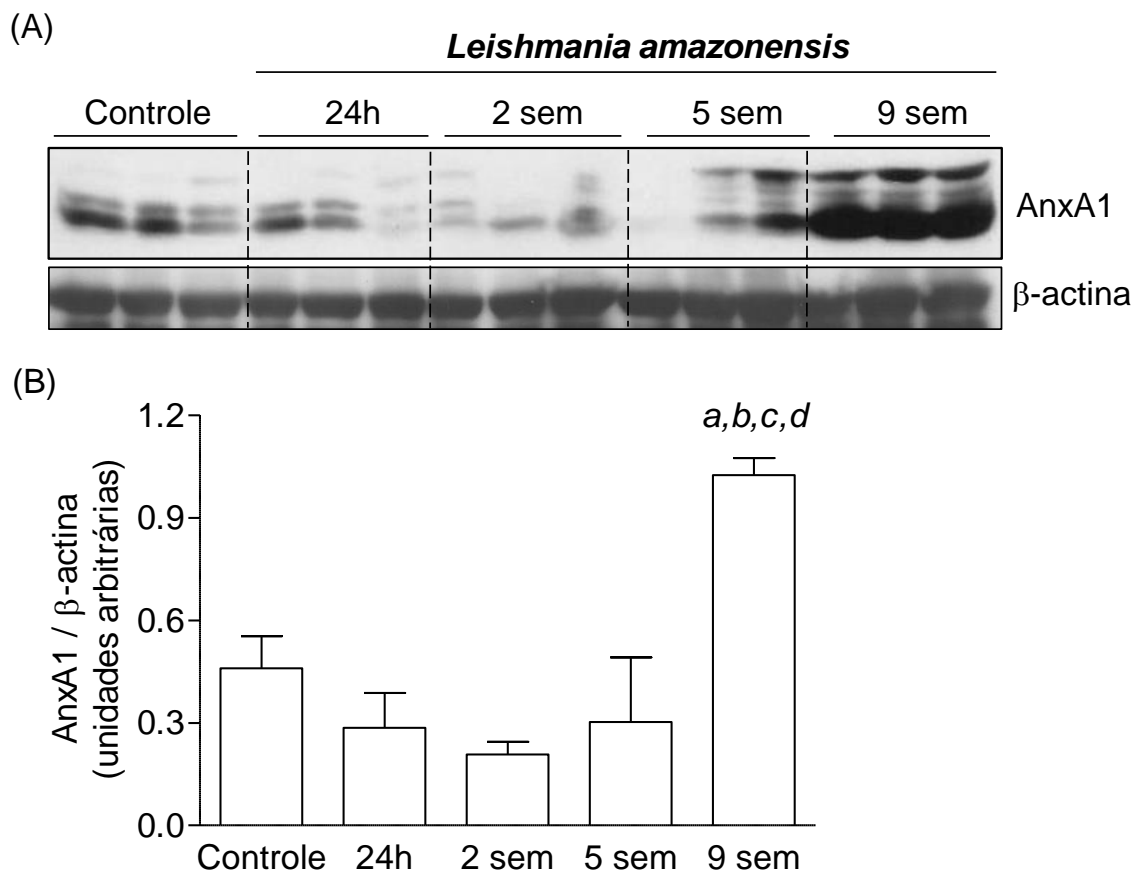


Figura 24: Expressão de AnxA1 em patas de camundongos inoculados com *L. amazonensis*. Fêmeas de camundongos BALB/c foram inoculadas com 1×10^5 promastigotas de *L. amazonensis* na pata esquerda traseira. Como controles, animais foram inoculados com PBS. Em diferentes momentos pós-infecção, animais foram submetidos à eutanásia e tecidos de suas patas foram coletados, sendo seus extratos proteicos analisados por *Western blotting*. **(A)** Perfis observados para AnxA1 e β-actina. **(B)** Análise densitométrica para AnxA, após normalização por β-actina. Dados representativos de dois experimentos com resultados semelhantes. Os dados foram analisados por ANOVA, com pós-teste de Newman-Keuls; (a) indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao controle; (b) indica diferença ($p < 0,05$) em relação a 24h; (c) indica diferença ($p < 0,05$) em relação a 2 sem; (d) indica diferença ($p < 0,05$) em relação a 5 sem.

Os resultados obtidos evidenciaram que a expressão de AnxA1 não se alterou após 24 horas, 2 semanas ou 5 semanas de inoculação em relação ao controle. Na nona semana pós-infecção, observou-se um aumento na expressão local de AnxA1, correspondente às alterações de edema na pata infectada, maior parasitismo tecidual e intensa inflamação tecidual. Assim, observamos que há modulação da expressão de AnxA1 na infecção por *L. amazonensis*, mas de forma distinta daquela observada no modelo de infecção por *L. braziliensis*. Os níveis de AnxA1 aumentam e diminuem concomitante à lesão, configurando resultados que se distribuem em uma curva em forma de sino. De modo interessante, observou-se grande proporção de AnxA1 clivada, ou seja, da forma

inativa da proteína após infecção com *L. amazonensis*, o que pode ser devido ao aumento dos níveis locais e subsequente clivagem por proteases (Vago *et al.*, 2015)

5.4.2 Camundongos BALB/c deficientes em AnxA1 e infectados com *L. amazonensis* apresentam aumento da lesão após sete semanas de infecção.

Com o objetivo de verificar se a deficiência de AnxA1 exerce algum efeito sobre a cinética da infecção com *L. amazonensis*, camundongos AnxA1KO e WT foram infectados com 1×10^5 promastigotas no coxim plantar esquerdo traseiro e o tamanho da lesão foi avaliado semanalmente. (Figura 25)

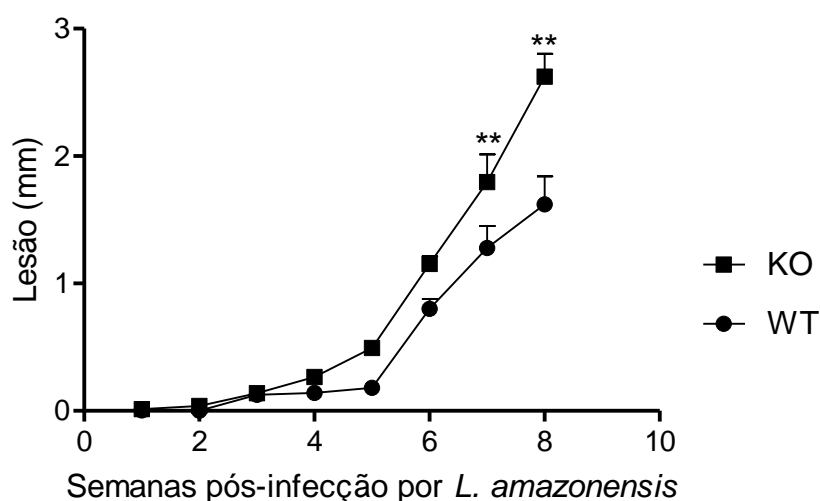


Figura 25: Curva de desenvolvimento de lesão em camundongos inoculados com *L. amazonensis*. Fêmeas de camundongos BALB/c foram inoculadas na pata esquerda traseira com 1×10^5 promastigotas de *L. amazonensis*. Semanalmente, foi acompanhado o desenvolvimento da lesão, a partir da diferença de espessura entre a pata inoculada e a pata controle. São apresentados a média e o desvio-padrão de ao menos quatro animais por grupo. As comparações entre as espécies, para cada tempo avaliado, foram feitas por teste *t* de Student; (*) indica diferenças ($p < 0,05$) entre os grupos nos tempos avaliados.

Os resultados apresentados na figura 12 indicam que os animais AnxA1KO apresentaram lesões maiores que os animais WT após sete semanas de infecção. Na oitava semana de infecção, essa diferença se ampliou, sendo detectados animais KO com lesões em processo de ulceração.

Diante disso, a fim de verificar se o aumento da lesão entre os grupos WT e AnxA1 KO em um mesmo intervalo de tempo corresponderia ao aumento do número de parasitos nas lesões, foi realizada a avaliação do parasitismo tecidual para ambos os grupos de animais na quarta e quinta semanas de infecção, quando os mesmos apresentavam lesões equivalentes, e também na oitava semana de infecção, quando os animais AnxA1KO apresentavam lesões maiores que os camundongos WT (Figura 25).

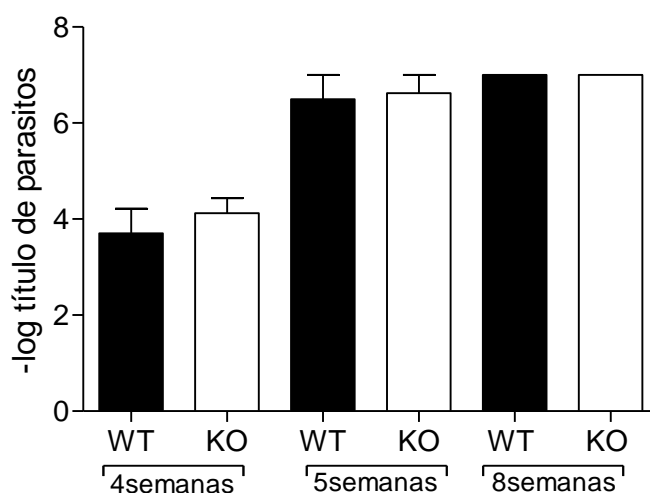


Figura 26: Parasitismo em camundongos AnxA1KO ou *Wild-type* inoculados com *L. amazonensis*. Fêmeas de camundongos BALB/c AnxA1KO ou WT foram inoculadas na pata esquerda traseira com 1×10^5 promastigotas de *L. amazonensis*. Em diferentes tempos pós-infecção, os animais foram submetidos à eutanásia. Suas patas foram coletadas e processadas, pela técnica da diluição limitante, para determinação do parasitismo tecidual. São apresentados a média e o desvio-padrão de quatro animais por grupo. Os dados foram analisados por teste *t* de Student.

Esses resultados demonstraram que a ausência de AnxA1 não interfere na carga parasitária dentro de um mesmo período de infecção, embora animais AnxA1KO apresentem lesões maiores a partir da sétima semana. Portanto, a diferença de tamanho de lesão observada se deve, possivelmente, ao impacto da deficiência da AnxA1, o que influencia o infiltrado inflamatório local.

5.4.3 Avaliação dos níveis das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10 em camundongos BALB/c WT e AnxA1KO infectados com *L. amazonensis*

Foi avaliada também a produção das citocinas IFN- γ , IL-10 e IL-4 por células isoladas dos linfonodos drenantes dos sítios de inoculação dos parasitas em camundongos WT e AnxKO, em resposta ao antígeno específico (Figuras 27, 28, 29)

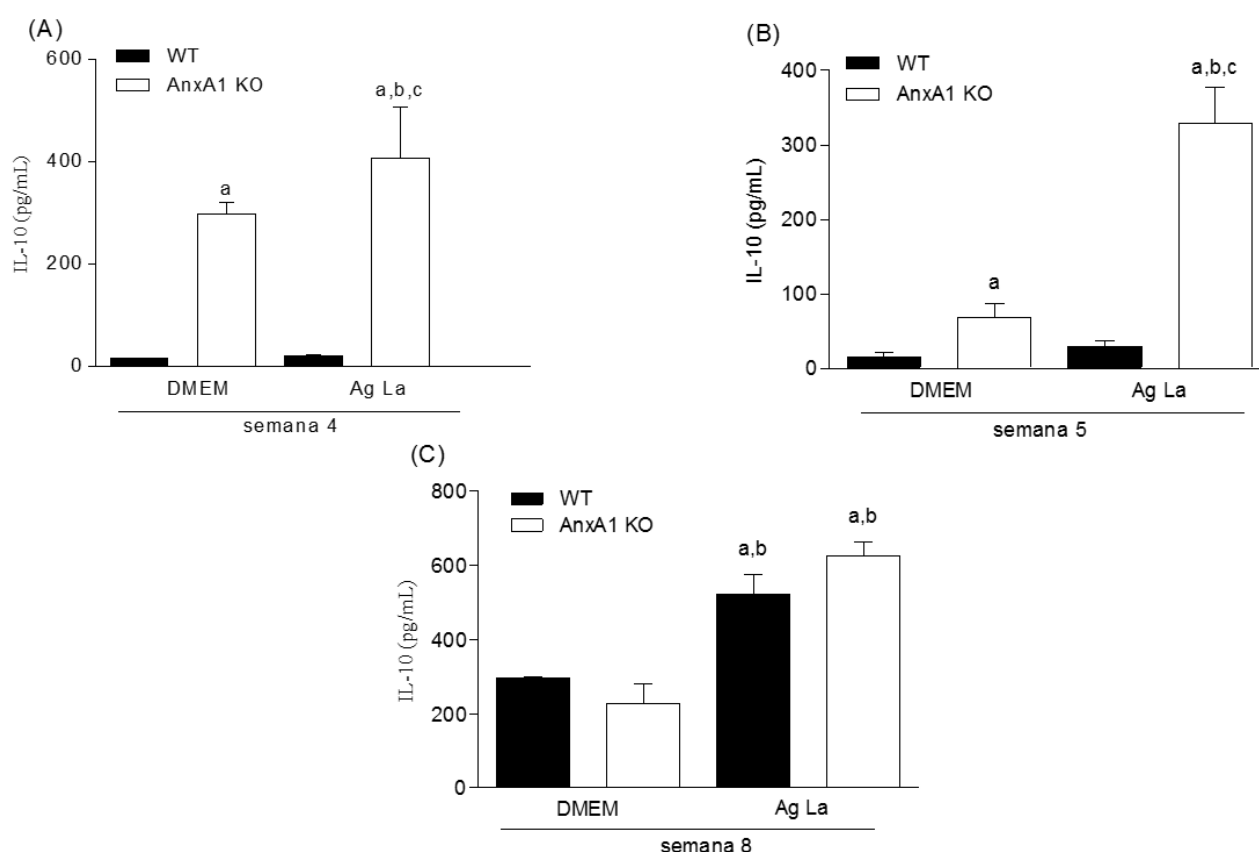


Figura 27: Produção de IL-10 por células dos linfonodos drenantes de camundongos inoculados com *L. amazonensis*. Fêmeas de camundongos BALB/c foram inoculadas na pata esquerda traseira com 1×10^5 promastigotas de *L. amazonensis*. Em diferentes tempos pós-infecção, animais foram submetidos à eutanásia e os linfonodos drenantes das patas inoculadas foram coletados e processados. As células obtidas foram estimuladas *in vitro* com antígeno particulado de *L. amazonensis* por 48 horas, a 37 °C e 5% CO₂. Por ELISA, foram quantificadas as citocinas IL-10 (A, B, C: quatro, cinco e oito semanas, respectivamente). São apresentados a média e o desvio-padrão de dois experimentos semelhantes. Os dados foram analisados por ANOVA, com pós-teste de Newman-Keuls. (*) indica diferença ($p < 0,05$) de animais KO em relação aos animais WT. (a) indica diferença ($p < 0,05$) em relação a células de camundongos WT controle; (b) indica diferença ($p < 0,05$) em relação a células de camundongos ANXKO controle; (c) indica diferença ($p < 0,05$) em relação a células de camundongos WT estimuladas com antígeno particulado; (d) indica diferença ($p < 0,05$) em relação às células de camundongos AnxKO estimuladas com antígeno particulado.

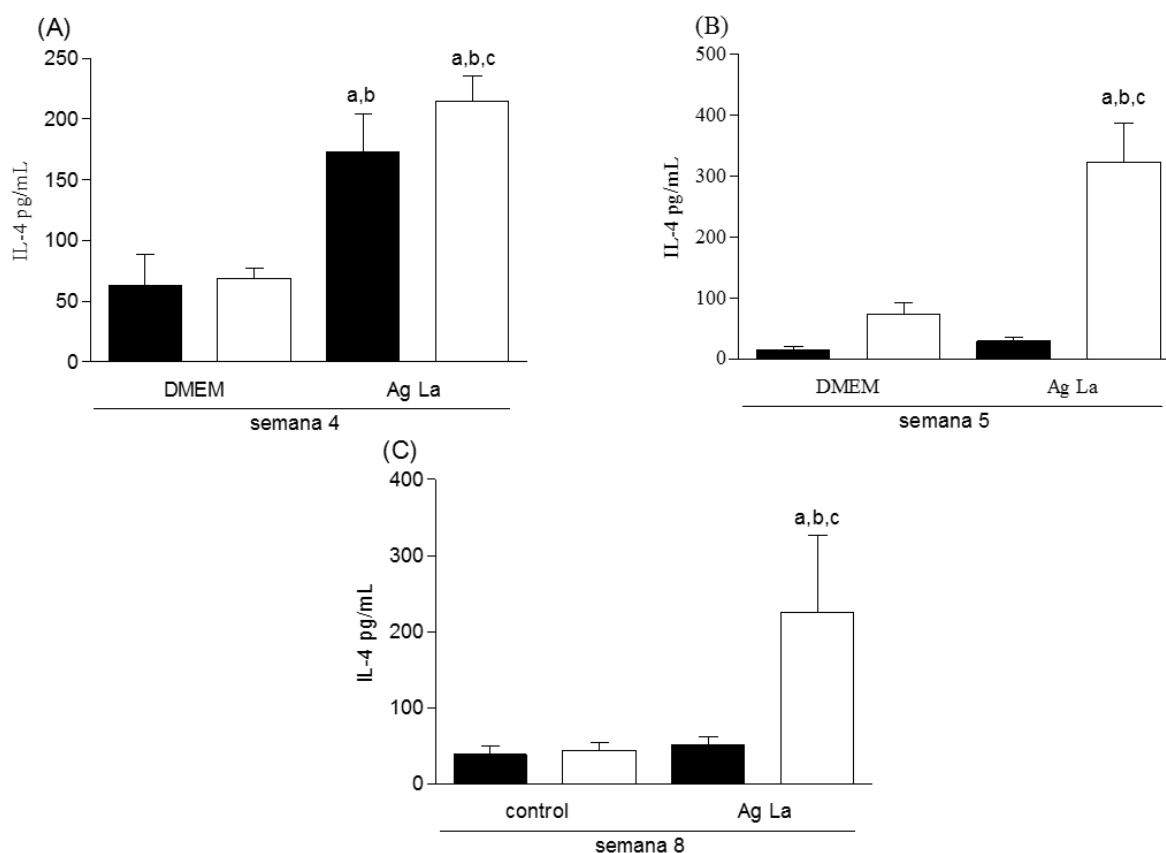


Figura 28: Produção de IL-4 por células dos linfonodos drenantes de camundongos inoculados com *L. amazonensis*. Fêmeas de camundongos BALB/c foram inoculadas na pata esquerda traseira com 1×10^5 promastigotas de *L. amazonensis*. Em diferentes tempos pós-infecção, animais foram submetidos à eutanásia e os linfonodos drenantes das patas inoculadas foram coletados e processados. As células obtidas foram estimuladas *in vitro* com antígeno particulado de *L. amazonensis* por 48 horas, a 37 °C e 5% CO₂. Por ELISA, foram quantificadas as citocinas IL-4 (A, B, C: quatro, cinco e oito semanas, respectivamente). São apresentados a média e o desvio-padrão de dois experimentos semelhantes. Os dados foram analisados por ANOVA, com pós-teste de Newman-Keuls. (*) indica diferença ($p < 0,05$) de animais KO em relação aos animais WT. (a) indica diferença ($p < 0,05$) em relação a células de camundongos WT controle; (b) indica diferença ($p < 0,05$) em relação a células de camundongos ANXKO controle; (c) indica diferença ($p < 0,05$) em relação a células de camundongos WT estimuladas com antígeno particulado; (d) indica diferença ($p < 0,05$) em relação às células de camundongos ANXKO estimuladas com antígeno particulado.

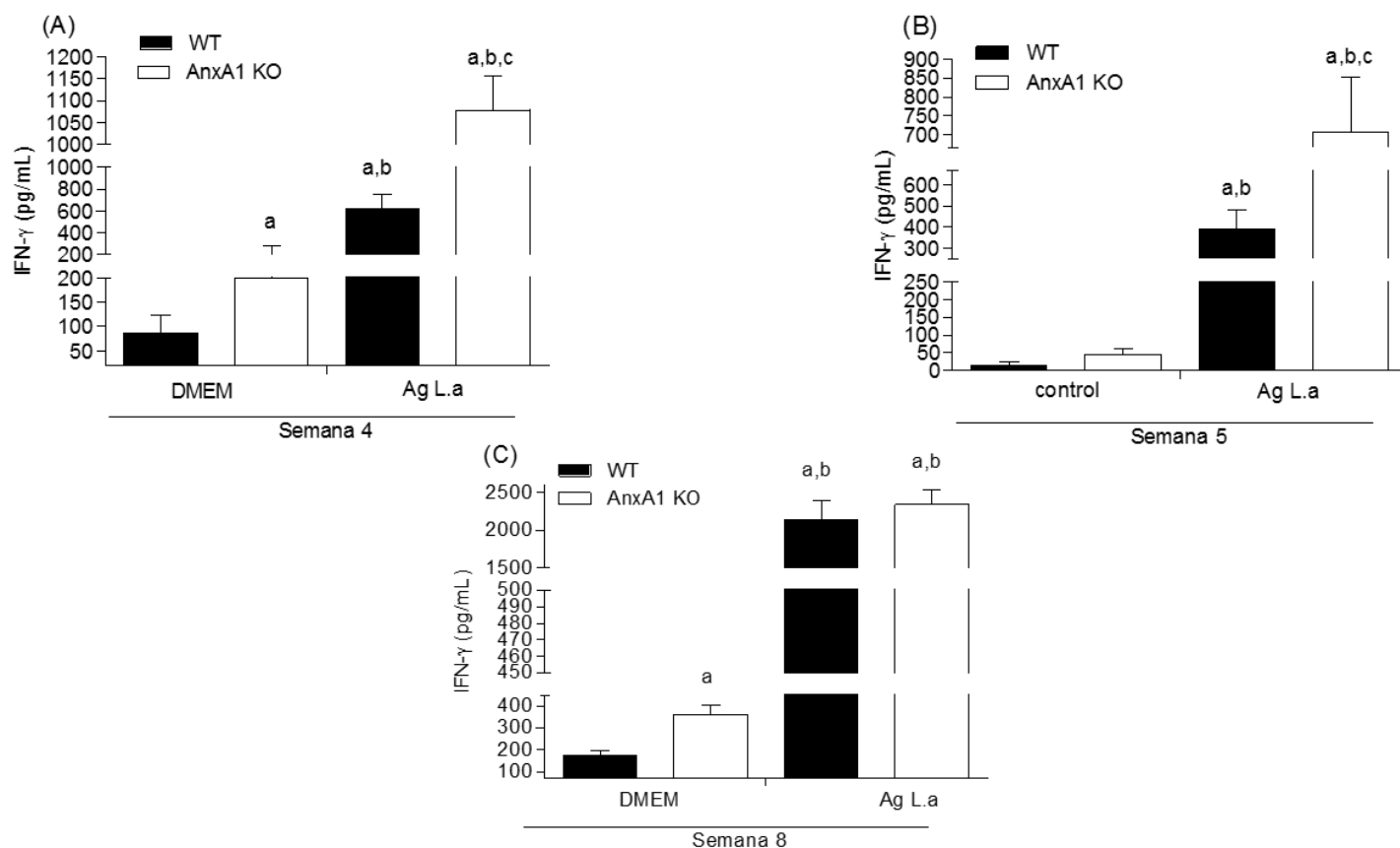


Figura 29: Produção de IFN- γ por células dos linfonodos drenantes de camundongos inoculados com *L. amazonensis*. Fêmeas de camundongos BALB/c foram inoculadas na pata esquerda traseira com 1×10^5 promastigotas de *L. amazonensis*. Em diferentes tempos pós-infecção, animais foram submetidos à eutanásia e os linfonodos drenantes das patas inoculadas foram coletados e processados. As células obtidas foram estimuladas *in vitro* com antígeno particulado de *L. amazonensis* por 48 horas, a 37 °C e 5% CO₂. Por ELISA, foram quantificadas as citocinas IFN- γ (A, B, C: quatro, cinco e oito semanas, respectivamente). São apresentados a média e o desvio-padrão de dois experimentos semelhantes. Os dados foram analisados por ANOVA, com pós-teste de Newman-Keuls. (*) indica diferença ($p < 0,05$) de animais KO em relação aos animais WT. (a) indica diferença ($p < 0,05$) em relação a células de camundongos WT controle; (b) indica diferença ($p < 0,05$) em relação a células de camundongos ANXKO controle; (c) indica diferença ($p < 0,05$) em relação a células de camundongos WT estimuladas com antígeno particulado; (d) indica diferença ($p < 0,05$) em relação às células de camundongos AnxKO estimuladas com antígeno particulado.

Nossos resultados demonstraram maior expressão dos níveis de IL-10 (Figuras 27A, 27B, 27C) nos animais AnxA1 KO na ausência de estímulo específico e em resposta ao AgLb durante a quarta e quinta semanas por *L. amazonensis*. Já na oitava semana de infecção, os níveis desta citocina apresentaram-se semelhantes entre os grupos. Com relação à produção de IL-4 (Figuras 28D,

28E, 28F), foi observado aumento em ambos os grupos após 4 semanas de infecção, sendo que os seus níveis diminuíram nas semanas seguintes nos animais WT, mas se mantiveram altos no animais AnxA1 KO, em resposta ao antígeno específico. Em relação aos níveis de IFN- γ , foram observados aumentos na 4^a e 8^a semanas após infecção nos animais AnxA1 KO mediante estímulo específico, sendo que esse efeito não foi observado em animais WT (Figuras 29G, 29H, 29I).

5.4.4 Na ausência de AnxA1, camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* apresentam exacerbação do processo inflamatório

Para uma melhor caracterização da lesão desencadeada pela infecção por *L. amazonensis* nos camundongos BALB/c, foi realizada uma análise histopatológica pós-infecção do coxim plantar da pata infectada nos grupos WT e AnxA1 KO após cinco e seis semanas de infecção. Os resultados obtidos são apresentados nas (Figuras 30, 31, 32). Nossos resultados revelaram que os animais AnxA1KO apresentaram processo inflamatório mais intenso, representado por maior influxo de leucócitos no sítio de lesão e com predomínio de macrófagos vacuolizados.

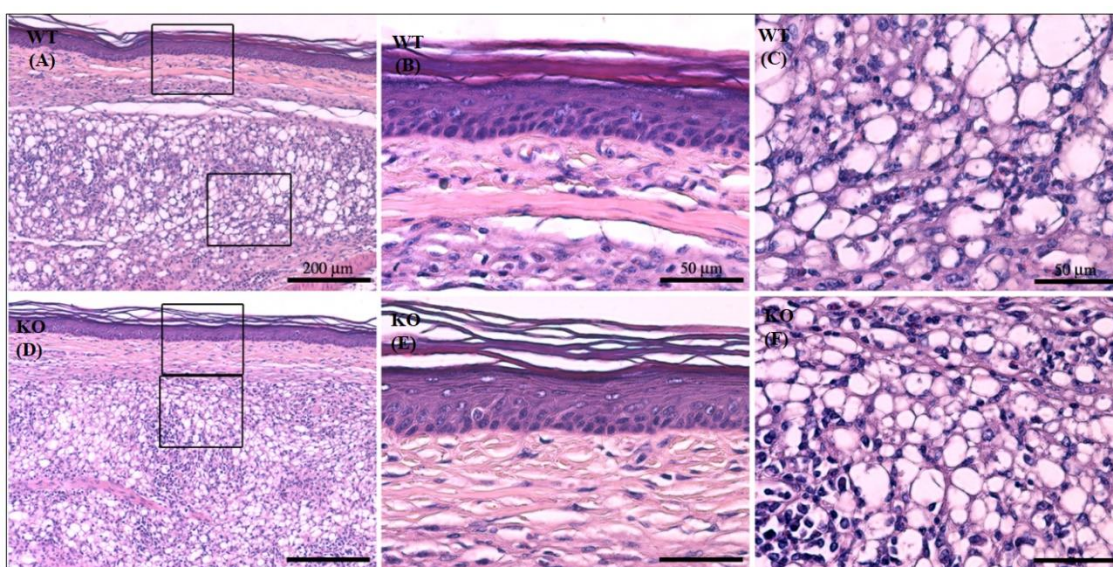


Figura 30: Fotomicrografias de cortes histológicos de coxim plantar de camundongos BALB/c WT e AnxA1KO após 5 semanas de inoculação por *L. amazonensis*. Camundongos

BALB/c foram inoculados com 1×10^5 promastigotas de *L. amazonensis*. Após 5 semanas, os animais foram submetidos à eutanásia e os tecidos de suas patas foram processados para histologia (4 μ m, H&E). (A, B, C) representam imagens de animais WT e (D, E, F) representam imagens de animais AnxA1 KO. A e D aumento de 10X; B e E aumento de 40X e C e F: zoom em área de tecido de camundongo inoculado por *L. amazonensis*, onde se pode observar clareiras macrofágicas com macrófagos repletos de parasitos.

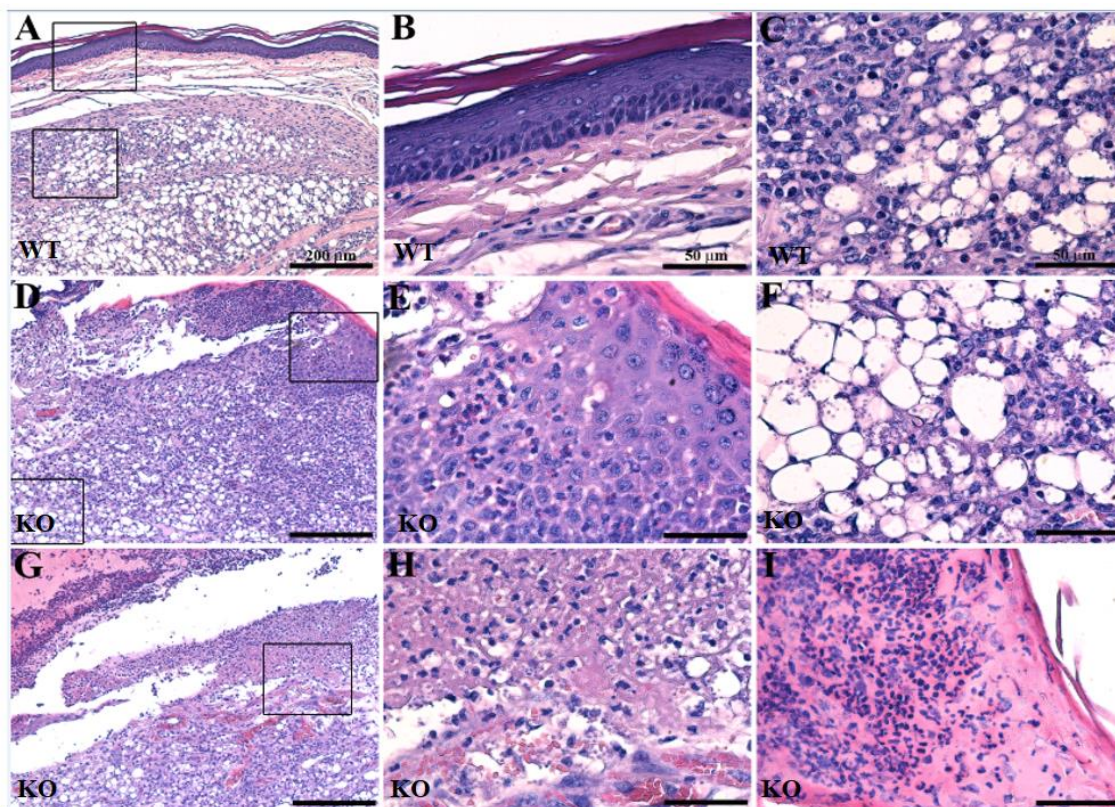


Figura 31: Fotomicrografia de cortes histológicos de coxim plantar de camundongos BALB/c WT e AnxA1KO após 6 semanas de inoculação por *L. amazonensis*. Camundongos BALB/c foram inoculados com 1×10^5 promastigotas de *L. amazonensis*. Após 6 semanas, os animais foram submetidos à eutanásia e tecidos de suas patas processados rotineiramente para histologia (4 μ m, H&E). (A, B, C) representam imagens de animais WT e (D, E, F, G, H, I) representam imagens de animais AnxA1KO. A, D, G: aumento de 10X; E, F, H, I: aumento de 40X e C e F: zoom em área de tecido de camundongo inoculado por *L. amazonensis* onde se pode observar parasitos no interior de vacúolos. (B): Epitélio sem maiores alterações; (C): Intenso infiltrado inflamatório na derme, marcado pela presença de macrófagos com vacúolos contendo o parasita (clareiras macrofágicas); (D): Área intensa com alteração da epiderme e infiltrado na derme; (E): Epiderme com exocitose (células inflamatórias) e acantose (espessamento); (F): Intenso infiltrado da derme com clareiras macrofágicas evidentes. Note a presença de parasitas no interior delas; (G): Área de ulceração; (H): Área de necrose com hemorragia; (I): Massa de queratina (hiperceratose) com exocitose.

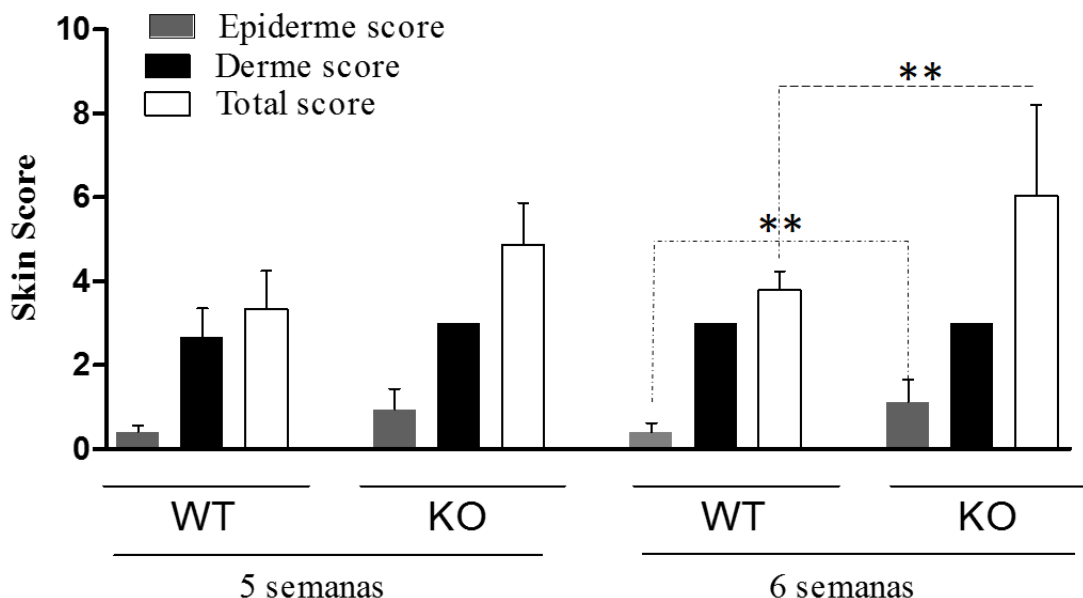


Figura 32: Score histopatológico do coxim plantar de camundongos BALB/c, após 5 e 6 semanas de inoculação com *L. amazonensis*

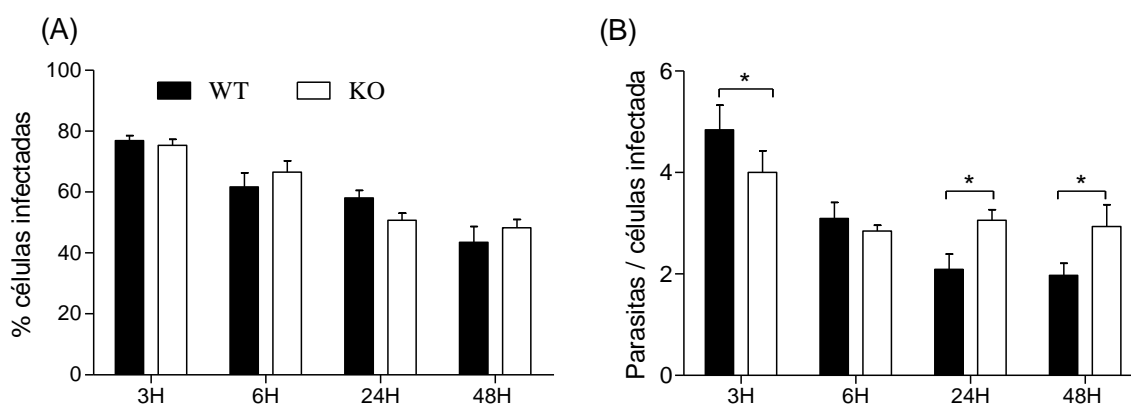
De modo geral, a análise histopatológica de biópsias de pele de camundongos WT e AnxA1KO infectadas por *L. amazonensis* revelou alterações inflamatórias significativas em ambos os grupos. Porém, essas alterações foram mais pronunciadas nos animais AnxA1 KO após seis semanas de infecção. Enquanto os animais WT apresentaram ligeira exocitose, os AnxA1KO tiveram graus variados de exocitose, papilomatose e hiperqueratose. Destaca-se a presença de ulceração em lesões nos coxins plantares de 40% nos animais KO. Em ambos os grupos, as análises histológicas demonstraram grave infiltrado de leucócitos, composto por uma população mista de células mononucleares (linfócitos e principalmente macrófagos) e polimorfonucleares (especialmente neutrófilos). O exudato celular foi caracterizado pela presença de numerosos macrófagos com grandes áreas de vacúolos. Estes macrófagos encontravam-se intensamente parasitados, abrigando um número significativo de amastigotas de *L. amazonensis*. A distribuição do infiltrado inflamatório foi difusa ao longo da derme, hipoderme e tecido muscular associado.

Após 5 semanas, a infecção por *L. amazonensis* desencadeou um evidente infiltrado de células inflamatórias na derme e/ou hipoderme profunda, mas não houve mudanças significativas na região epidérmica. Este fenótipo foi semelhante entre camundongos WT e AnxA1KO (Figura 30). Em contraste, após

6 semanas de infecção (Figura 31), alterações evidentes na epiderme foram detectadas, principalmente nos animais AnxA1 KO, nos quais foi possível observar evidente hiperqueratose com exocitose na epiderme, a qual apresentou áreas de ulceração, erosão e necrose. Em maior aumento (Figura 31-F), pode-se observar um intenso infiltrado inflamatório, constituído basicamente por macrófagos repletos de parasitos, caracterizando as chamadas clareiras macrofágicas.

5.4.5 Avaliação da infecção de BMDMs de WT e AnxA1KO com *Leishmania amazonensis*

Com o objetivo de avaliar o papel da AnxA1 na fagocitose de formas promastigotas de *L. amazonensis*, foi realizado um ensaio *in vitro* que avaliou de forma comparativa BMDMs de camundongos WT e AnxA1 KO quanto à porcentagem de células infectadas e ao número de parasitos por célula após 3, 6, 24 e 48 horas de infecção (Figuras 33). Os resultados evidenciaram que não houve diferença na porcentagem de BMDMs infectados quando se comparam animais WT e AnxA1KO ao longo dos tempos analisados (Figura 32-A). Entretanto, o número de parasitos por célula foi maior em BMDMs provenientes de animais WT ao longo das 3 primeiras horas de infecção e menor nas etapas finais do experimento, ou seja, após 24 e 48 horas de infecção (Figura 33-B).



(C)

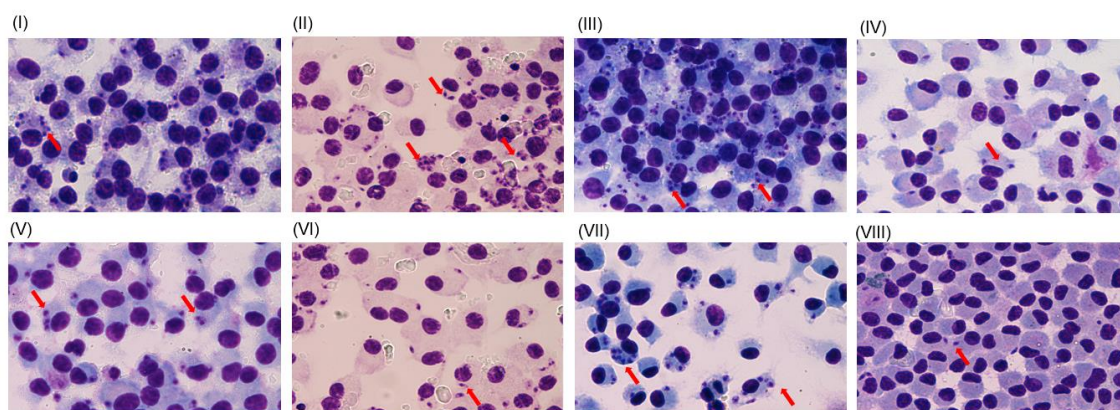


Figura 33: Análise *in vitro* da infecção com *L. amazonensis* de BMDMs obtidos de animais BALB/c WT e AnxA1KO. 1×10^5 BMDMs obtidas de camundongos WT e AnxA1KO foram fixadas em chamber slide (Lab-Tek®) e infectadas com promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 1:5. Após 3, 6, 24 e 48 horas de estimulação fez-se a avaliação da infecção: porcentagem de células infectadas (A) quantidade de parasito por célula (B) e fotomicrografias representativas da infecção (C). Em (C) BMDMs obtidos de camundongos BALB/c WT (I, II, III, IV); BMDMs obtidos de camundongos BALB/c AnxKO (V, VI, VII, VIII). Os tempos de análise pós infecção são: 3 horas (I e V), 6 horas (II e VI), 24 horas (III e VII) e 48 horas (IV e VIII). As setas vermelhas indicam as formas amastigotas no interior dos macrófagos. Aumento de 40x.

Com o intuito de melhor elucidar o que desencadeou a presença de maior número de parasitos em BMDMs AnxA1KO, foi analisada a produção de citocinas TNF- α e IL-10, uma vez que a expressão dessas citocinas são relacionadas em modelos de infecção *in vivo* por *Leishmania spp* com mecanismos de resistência e suscetibilidade, respectivamente. Nossos resultados demonstraram que não houve diferença entre os níveis de TNF- α (Figura 34-A) nas culturas de BMDMs provenientes de animais WT e AnxA1KO e que os níveis dessas citocinas se mantiveram basais ao longo dos tempos analisados. No entanto, a dosagem de IL-10 apresentou níveis maiores nos BMDMs de animais AnxA1KO nos tempos de 24 e 48 horas pós-estimulação (Figuras 34-B), o que pode estar associado à inibição dos mecanismos leishmanicidas e maior proliferação dos parasitos.

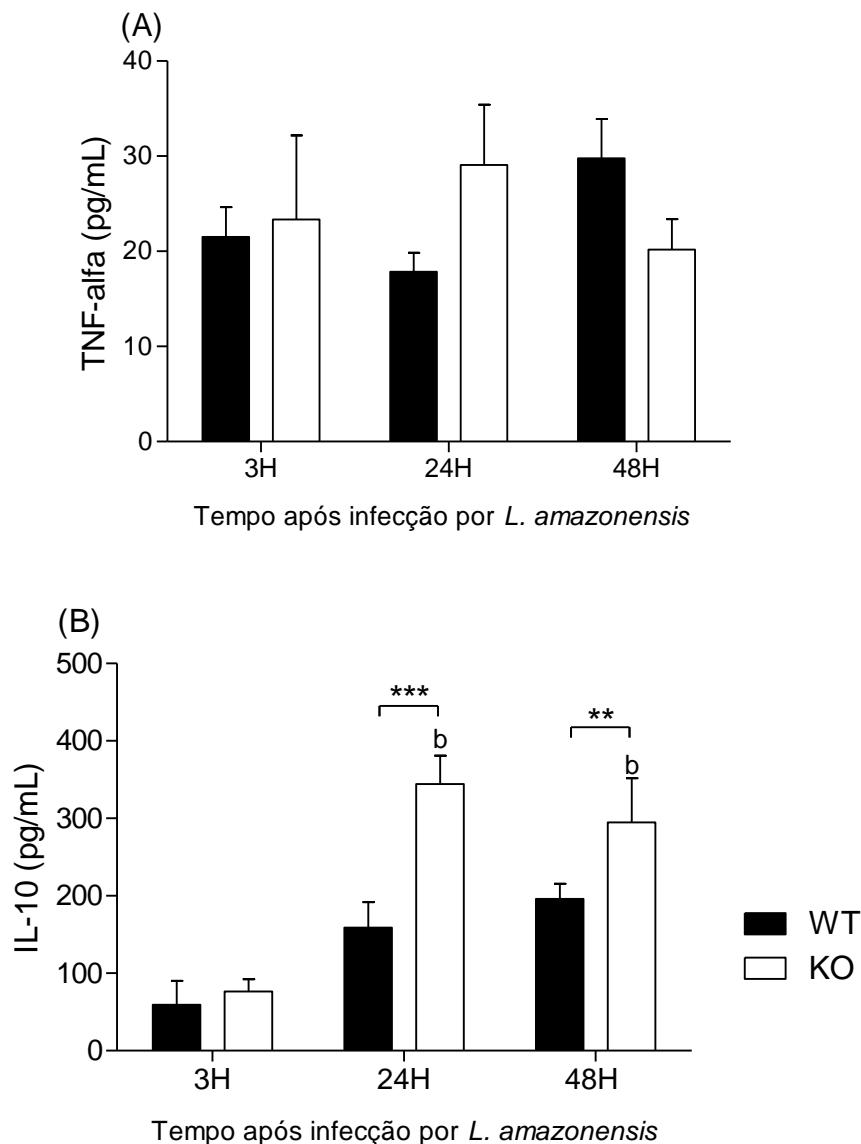


FIGURA 34: Produção de TNF- α e IL-10 por BMDMs de camundongos BALB/c WT e Anx1KO infectados por *L. amazonensis*. 1×10^5 BMDMs obtidas de camundongos WT e Anx1KO foram fixados em chamber slide (Lab-Tek®) e infectados com promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 1:5. Após 3, 24 e 48 horas de estimulação a 37 °C e 5% CO₂, fez-se a avaliação da produção de citocinas pelo método de ELISA: (A) níveis de TNF- α e (B) níveis de IL-10. Foram apresentados média e o desvio-padrão de dois experimentos semelhantes. Os dados foram analisados por ANOVA, com pós-teste de Newman-Keuls. (*) indica diferença ($p < 0,05$) de animais KO em relação aos animais WT. (b) indica diferença ($p < 0,05$) em relação a células de camundongos ANXKO após 3h de infecção.

5.4.6 Discussão Seção 4

É sabido que a relação entre as múltiplas espécies de *Leishmania* com hospedeiros de diferentes espécies culmina em quadros da doença com manifestações clínicas marcadamente diferentes (SCHRIEFER; WILSON; CARVALHO, 2008). Assim, os mediadores dos processos infeccioso e inflamatório podem se apresentar de forma distinta durante a infecção por diferentes espécies em um mesmo hospedeiro. Baseado nessa assertiva e a fim de se complementar os nossos estudos que avaliaram o papel da AnxA1 no contexto da infecção por *L. brasiliensis* (seção 3), foi avaliado neste trabalho a cinética da inflamação decorrente da infecção por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c *wild type* (WT) e deficientes em AnxA1 (AnxA1 KO). A cuja suscetibilidade a esta espécie de protozoário é sabidamente conhecida para estes últimos (CARNEIRO *et al*, 2015).

Corroborando dados da literatura, como revisto por SOONG *et al* (2012), a infecção do coxim plantar traseiro de camundongos BALB/c por *L. amazonensis* levou ao desenvolvimento de lesões progressivas e que apresentaram ulcerações após a oitava semana de infecção. Perfil similar foi observado em camundongos C57BL/6 parasitados por essa cepa, cuja infecção também resultou em lesões nas quais o tamanho aumentou de forma gradual (MAIOLI *et al*, 2004).

De modo particular, nossos resultados demonstraram que os animais AnxA1KO apresentaram maior edema a partir da sétima semana de infecção quando comparados aos animais WT. Esse fato vai ao encontro dos dados da literatura, que afirmam que AnxA1 possui a propriedade de modular a resposta inflamatória reduzindo o infiltrado celular e, conseqüentemente, o edema (SOLITO *et al*, 2000; DRECHSLER *et al*, 2015; SUGIMOTO *et al*, 2016). Nossas análises histológicas confirmaram essa propriedade modulatória da AnxA1, uma vez que, dentre os leucócitos presentes no tecido lesado de ambos os grupos foi observado um predomínio absoluto de macrófagos (com menor quantidade de neutrófilos), populações bem menores desses dois tipos celulares foram observadas no sítio inflamatório dos animais WT. Ainda em relação a estas duas

populações de leucócitos em particular e como já demonstrado neste trabalho, camundongos BALB/c deficientes em *AnxA1* e infectados por *L. braziliensis* apresentaram maior edema e lesão na epiderme. Nestas áreas, é possível visualizar histologicamente um infiltrado inflamatório celular composto por uma população mista, majoritariamente constituída também por macrófagos e neutrófilos. Em consonância com os nossos dados, trabalhos da literatura já relataram que, de modo geral, após a infecção do hospedeiro pelo protozoário, os neutrófilos migram para o sítio da lesão, fagocitam o parasito e atuam como células apresentadoras de antígenos. Concomitantemente, os neutrófilos também expressam citocinas como o IFN- γ , que agem sobre os macrófagos e induzem a expressão de NO responsável pela eliminação do parasito (PETERS *et al*, 2008; SALAZAR *et al*, 2017).

Cabe ressaltar que, por se tratar de doença infecciosa, um efeito imunoregulador excessivo decorrente da ação dos mediadores pró-resolutivos poderia interromper precocemente a resposta inflamatória e tornar o hospedeiro ainda mais susceptível ao agravamento da infecção (FULLERTON *et al*, 2013). Por outro lado, uma resposta reguladora exagerada poderia, neste contexto, favorecer a proliferação do parasito e ser prejudicial ao hospedeiro. Entretanto, a participação *in vivo* de *AnxA1* na limitação da inflamação causada pela infecção por *L. amazonensis* é notável. Embora uma melhor caracterização do modelo ainda se faça necessária, a administração de *AnxA1*, em associação a fármacos leishmanicidas, pode se apresentar como uma opção promissora a ser testada para o tratamento da leishmaniose, o que ainda será avaliado nesse trabalho.

A habilidade de *L. amazonensis* em suprimir a resposta imune dos camundongos hospedeiros nos momentos iniciais da infecção foi observada também através da avaliação da produção de citocinas. Células de camundongos infectados por *L. amazonensis* produziram IL-10 e IL-4 de maneira contínua ao longo do desenvolvimento da lesão. No entanto, os níveis destas citocinas foram bem maiores nos animais *AnxA1* KO, principalmente na quarta e quinta semana de infecção, o que supõe-se ser uma resposta aos prováveis níveis de citocinas pró-

inflamatórias como IFN- γ que se encontram ainda mais elevados nesse modelo de infecção (TESTASICCA *et al*, 2013).

De modo geral, é sabido que IL-4 contribui para a infecção por *L. amazonensis*, uma vez que animais infectados por esta espécie e deficientes para essa citocina apresentaram aumento da expressão de IFN- γ , o que resultou em lesões menores e com menor parasitismo em relação aos animais controles (GUIMARAES *et al*, 2006). Trabalhos em que foram utilizados modelos murinos infectados por *L. braziliensis* demonstraram que IL-4 atua tanto na modulação da resposta imune, controlando a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IFN- γ (CASTELANO *et al*, 2012), quanto na ativação da enzima arginase-1, que por sua vez tem a capacidade de competir com a iNOs pelo substrato L-arginina, levando a uma menor produção de NO e favorecendo a proliferação do parasita. De forma similar, a neutralização de IL-4 em camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* promoveu a resolução das lesões em metade do tempo necessário para os animais controle (DEKREY, 1998).

Em relação a IL-10, JONES *et al*. (2002) evidenciaram que esta citocina contribui tanto para a redução do dano tecidual quanto para o estabelecimento da infecção. Por outro lado, camundongos C57BL/6 deficientes em IL-10 apresentam lesões semelhantes aos animais controle, porém com maior área de necrose.

Assim como realizado com a espécie *L. braziliensis*, neste trabalho foi avaliado o perfil de infecção de BMDMs com *L. amazonensis*. Nossos resultados evidenciaram uma maior capacidade fagocítica de BMDMs provenientes de animais WT em relação àqueles dos animais Anxa1KO. Estudos anteriores realizados por YONA *et al*. (2004) mostraram reduzida capacidade fagocítica de BMDMs de Anxa1KO frente a captação de partículas de zimozano não opsonizado, sendo essa diferença atribuída à baixa expressão de moléculas CD11b na superfície celular. Ainda dentro deste contexto, é importante salientar que promastigotas metacíclicas de *Leishmania* são capazes de promover sua

própria opsonização por fatores do complemento, e que amastigotas são opsonizadas por anticorpos produzidos pelo hospedeiro, o que provavelmente viabilizou sua fagocitose por MΦs deficientes em AnxA1 (UENO e WILSON, 2012).

A avaliação da infecção também mostrou que, após 24 e 48 horas de infecção, havia maior número de amastigotas nas células deficientes em AnxA1, o que pode ser explicado pelo aumento da expressão concomitante de IL-10, que propiciou um ambiente menos hostil, favorecendo a manutenção do parasita intracelular. De modo geral, é notável a participação de IL-10 no contexto da infecção por *L. amazonensis*. Trabalhos anteriores evidenciaram que esta citocina é importante no controle da expressão dos níveis de TNF- α e IL-12 e que atua também inibindo a ativação de macrófagos, ao reduzir os níveis de IFN- γ e, conseqüentemente, favorecer o desenvolvimento de formas amastigotas do parasito no interior desses leucócitos (NAHID *et al* ,2016; JIAXIANG *et al*, 2003). De modo semelhante, SOUSA *et al* (2014), avaliando o papel dos neutrófilos nos estágios iniciais da infecção por *L. amazonensis*, verificou que a inibição de IL-10 impactava negativamente no parasitismo em camundongos BALB/c, ainda que esses animais fossem depletados de neutrófilos e, portanto, apresentassem uma imunidade celular prejudicada.

Cabe ressaltar que, para um melhor entendimento do real papel da AnxA1 na modulação do processo inflamatório no contexto de infecção por *L. amazonensis*, novos experimentos *in vivo* e *in vitro* deverão ser realizados, entre eles o tratamento de camundongos BALB/c infectados com o peptídeo sintético denominado Ac2-26, que contém a mesma sequência de aminoácidos da região N-terminal da AnxA1, caracterizada como promotora da sua ação anti-inflamatória (Perret *et al.*, 2002; VAGO *et al.*, 2012).

Finalmente, embora os dados da avaliação da AnxA1 em *L. amazonensis* tenham apontado para um impacto na resposta inflamatória, sem alteração do parasitismo tecidual, ressalta-se que a modulação da expressão de AnxA1, assim como os outros aspectos investigados, só ocorrem em momentos tardios da infecção por *L. amazonensis*, indicando que os mesmos são secundários à

defosforilação de ERK1/2, como demonstrado na seção 2. Coletivamente, os dados obtidos nesse estudo corroboram a hipótese de que o controle da ativação da MAP cinase ERK seja um evento crítico que antecede e se sobrepõe ao efeito desencadeado pela AnxA1, ao longo da infecção por *L. amazonensis*, com consequente impacto na mudança de padrão das respostas inflamatória e imune.

5.5 Discussão Geral

Ao longo deste trabalho, abordamos o curso do parasitismo por duas espécies de *Leishmania* em camundongos BALB/c. No modelo de resistência, representado pela infecção por *L. braziliensis*, o pico da lesão e também do parasitismo ocorriam na segunda semana de infecção, seguida da redução até completa eliminação do parasita na quinta semana. No modelo de susceptibilidade, representado por *L. amazonensis*, o processo de infecção ocorria de maneira silenciosa até a quinta semana, quando havia aumento contínuo da carga parasitária e da lesão decorrente do aumento da resposta inflamatória que, mesmo intensa, não era mais capaz de controlar o parasitismo. Diante destes fatos, consideramos que essa estratégia de análise comparativa e cinética revelou aspectos importantes no curso da infecção, como o papel da AnxA1 e da ativação de ERK1/2, que foram abordados mais profundamente neste trabalho,

Nossos dados também demonstraram que a modulação da via de sinalização celular ERK1/2 é um ponto chave no curso da infecção pelas duas espécies. Sua ativação concomitante com o ápice da lesão no modelo de resistência está vinculada à ativação de outras vias (como o NF- κ B) responsáveis por gerar um ambiente mais inflamado, com predomínio de resposta Th1, níveis elevados de IL-12 e IFN- γ , capazes de sustentar a ativação de células leucocitárias e seus mecanismos leishmanicidas. Na sequência, na redução do estímulo flogístico, representada pela queda do título de parasitas, ocorre aumento dos níveis de anxA1 e caspase-3, responsáveis por diminuir o número de células inflamatórias

no sítio da lesão e restabelecer a homeostase tecidual já na ausência do patógeno.

Por outro lado, observamos que, no modelo de susceptibilidade, há uma alteração na sequência temporal em que esses eventos ocorrem. Baseado em dados da literatura, é possível supor que esta heterogeneidade em relação ao desenvolvimento de uma resposta imunológica e ao curso da lesão, quando comparado ao modelo de infecção por *L. braziliensis*, é desencadeada pela modulação da fosforilação de ERK1/2 e por níveis elevados de fosfatases ácidas e básicas produzidas e secretadas pela *L. amazonensis*. Sabidamente, essas enzimas possuem a capacidade de retirar grupos fosfatos de resíduos importantes nas proteínas alvo, desativando-as. Dentre estes alvos encontram-se as constituintes da via das MAP cinases como ERK1/2, p38 e JNK. Neste contexto, e baseado no curso da infecção por *L. amazonensis*, é plausível que essa espécie se utilize deste mecanismo, na tentativa de manter baixos níveis de ERK1/2 fosforilado, similares àqueles do grupo controle ao longo das primeiras semanas de infecção, conforme nossos dados demonstraram. Somado a este fato, também foi possível observar níveis baixos de ativação da via NF- κ B, bem como das citocinas inflamatórias IFN- γ e IL-10 neste mesmo período, fato que vai ao encontro de diversos trabalhos da literatura, que salientam o papel da via NF- κ B na ativação de linfócitos e células dendríticas. Utilizando-se deste recurso, o parasita promove o curso silencioso da infecção mantendo a atividade da resposta imunológica do hospedeiro abaixo dos limiares de patogenicidade.

Entretanto, a quinta semana de infecção parece ser um ponto crítico para o sucesso e o estabelecimento do parasitismo. Neste período, um dado que nos chamou atenção foi o “*shutdown*” dos níveis de ERK1/2 fosforilado. Diante desta observação, realizamos uma série de ensaios com o inibidor de MEK/ERK U0126, no intuito de obter resultados que confirmassem nossa hipótese. Para nossa surpresa, a inibição da ativação de ERK1/2 por U0126 em momentos precoces da infecção desencadeou aumento da lesão e da carga parasitária no hospedeiro, indicando a importância deste mecanismo no contexto da infecção.

A redução observada dos níveis de P-ERK1/2 em relação aos níveis basais na quinta semana foi interpretada como uma estratégia do parasito com o objetivo de estimular a atividade do sistema imunológico do hospedeiro, aumentando o processo inflamatório no sítio da lesão e, conseqüentemente, favorecendo o curso da infecção. Embora a princípio esta estratégia seja contraditória, ela acarreta aumento do influxo de leucócitos ativados (principalmente macrófagos) para o local, facilitando a fagocitose do patógeno. Essa nossa teoria é respaldada em nossos dados histológicos que demonstraram aumento acentuado de neutrófilos e, principalmente, macrófagos no sítio flogístico, bem como aumento dos níveis de IFN- γ e IL-10 após a quinta semana.

A redução dos níveis de ERK1/2 pode levar à ativação compensatória de outras vias de sinalização, conforme discutido na seção 2. Dentre estas vias, podemos destacar a ativação de p38 e JNK, com conseqüente aumento dos fatores de transcrição como STAT3 e STAT4, responsáveis pela elevação dos níveis de IL-12 e aumento da relação Th1/Th2 (BOUHAMDAN, 2015). Este eventos culminam com o ápice do processo inflamatório observado na nona semana, em que foi possível observar a elevação dos níveis de P-ERK1/2, o que poderia estar associado à ativação de NF- κ B e ao aumento das citocinas inflamatórias e da população de leucócitos no sítio flogístico, principalmente macrófagos repletos de amastigotas. Embora neste estágio o organismo hospedeiro promova uma intensa resposta inflamatória caracterizada pela presença de lesões ulcerativas, ela já não consegue mais debelar o processo infeccioso.

Em relação à participação da proteína AnxA1 no modelo de resistência, é importante ressaltar o seu papel chave no desenvolvimento de mecanismos resolutivos ao reduzir o número de células inflamatórias no sítio da lesão, seja por diminuição do influxo celular ou pela indução de processos apoptóticos desses leucócitos, contribuindo decisivamente para o restabelecimento da homeostase tecidual (SUGIMOTTO *et al.*, 2016). Por outro lado, no modelo de susceptibilidade, sua ação parece ser secundária aos eventos decorrentes da modulação das vias de sinalização induzidos pela presença do patógeno que, como mencionado anteriormente, estimula a manutenção de um ambiente inflamatório com o intuito de favorecer o parasitismo. De modo complementar,

nossos dados demonstraram que, na ausência de AnxA1, os animais infectados por *L. amazonensis* apresentaram maiores níveis de IL-10, o que poderia acarretar numa menor ativação de macrófagos e favorecimento da infecção.

Por fim, salientamos o ineditismo deste trabalho no estudo *in vivo* do papel da AnxA1 e da modulação da ativação da via MEK/ERK ao longo do processo de infecção por duas espécies de *Leishmania* que apresentam perfil de infecção e resposta imune completamente distintos. Reforçamos também a necessidade de realizar novos ensaios comparativos que avaliem, por exemplo, o perfil de fosfatases expressas por estas espécies no curso do parasitismo como mecanismo de virulência, bem como a realização de testes complementares com o uso farmacológico do peptídeo Ac2-26 na infecção por *L. amazonensis*, e a avaliação do uso do U0126 no modelo de infecção por *L. braziliensis*. Esperamos que esse conjunto de dados possa contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos na manipulação dos processos resolutivos e das vias de sinalização, aspectos interessantes não só sob o ponto de vista biológico da interação entre parasito e hospedeiro, mas também pelo potencial que encerra para o desenvolvimento de fármacos e estratégias terapêuticas.

6 - Conclusões

- I. A AnxA1 é produzida durante a infecção por *Leishmania*, sendo um componente importante da resolução do processo inflamatório na infecção por *L. braziliensis* em camundongos BALB/c, mas não tem impacto no controle do parasitismo tecidual, independente da espécie do parasito. Na infecção por *L. amazonensis*, sua produção é um efeito secundário da modulação da ativação de ERK1/2 e da exacerbação da resposta inflamatória. No entanto, como a resposta inflamatória não cessa, devido à contínua multiplicação dos parasitos, há progressão das lesões teciduais nos camundongos infectados.

- II. A modulação da ativação de MAPK ERK1/2 tem impacto na ativação da resposta inflamatória, ao longo da infecção por *Leishmania*, em especial na susceptibilidade à infecção por *L. amazonensis*. Enquanto a ativação se mantém em níveis basais nos estágios iniciais da infecção, a defosforilação dessa MAP cinase, por um breve espaço de tempo, em momentos tardios é determinante para a ativação de respostas inflamatórias específicas, e progressão das lesões e do parasitismo tecidual.

7 Referências Bibliográficas

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

AGALLOU, M., DOTSLKA, E., FRYDAS, S., KARAGOUN, E., **Toll-like receptor 4 promotes control of leishmania infantum infection through inducement of leishmanicidal activity in host macrophages: role mitogen-activated knases.** *Journal or biological regulators & homeostatic agents*. Vol. 28, p. 41- 52, 2014.

ALEXANDER, J., SATOSKAR, A. R., RUSSELL, D. G. **Leishmania species: models of intracellular parasitism.** *J Cell Sci*, v. 112 Pt 18, p. 2993-3002, 1999

AKHOUNDI M, KUHL S K, CANNET A, VOTÝPKA J, MARTY P, DELAUNAY P, *et al.* **A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies.** *PLoS Negl Trop Dis*. v10(3): e0004349, 2016.

ALBINI, A., TOSETTI, F., BENELLI, R., NOONAN, D.M. **Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention.** *Cancer Research*, V 65(23), p.10637-10641, 2005.

ALESSANDRI AL, SOUSA LP, LUCAS CD, ROSSI AG, PINHO V, TEIXEIRA MM **Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development.** *Pharmacology & therapeutics* 139(2): 189-212, 2013

ALESSANDRI, A. L., SOUSA, L. P., LUCAS, C. D., ROSSI, A. G., PINHO, V., TEIXEIRA, M. M. **Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development.** *Pharmacol Ther*, 2013.

ALEXANDER, J., BRYSON, K. **T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm.** *Immunol Lett*, v. 99, n. 1, p. 17-23, 2005.

ALVAR, J., VELEZ, I. D., BERN, C., HERRERO, M., DESJEUX, P., CANO, J., JANNIN, J., DEN, B. M. **Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence.** *PLoS ONE*, v. 7, n. 5, p. e35671-2012.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. **Leishmaniasis and poverty**. Trends Parasitol, v. 22, n. 12, p. 552-7, Dec 2006.

AMARANTE-MENDES, G.P.; GREEN, D.R. **The regulation of apoptotic cell death**. Braz. J. Med. Biol. Res, v. 32, n.9, p. 1053-1061, 1999.

ANTOINE, J. C., PRINA, E., COURRET, N., LANG, T. **Leishmania spp.: on the interactions they establish with antigen-presenting cells of their mammalian hosts**. Adv Parasitol, v. 58, p. 1-68, 2004.

ARBABI, S., MAIER, R. V. **Mitogen-activated protein kinases**. Crit Care Med, v. 30, n. 1 Supp, p. S74-S79, 2002.

BALKWILL, F., CHARLES, K.A., MANTOVANI, A. **Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease**. Cancer Cell, v. 7,p. 211–217, 2005.

BALMELLI C, ALVES MP, STEINER E, ZINGG D, PEDUTO N, RUGGLI N, GERBER H, MCCULLOUGH K, SUMMERFIELD A. **Responsiveness of fibrocytes to Toll-like receptor danger signals**. Immunobiology, v 212: 693-699, 2007

BASHAM TY, NICKOLOFF BJ, MERIGAN TC & MORHENN VB. **Recombinant gamma interferon induces HLA-DR expression on cultured human keratinocytes**. J Invest Dermatol, 83: 88–90, 1984

BAUMGART DC, SANDBORN WJ. **Crohn's disease**. Lancet. V 380(9853):1590–605, 2012.

BELLINGAN, G. J., XU, P., COOKSLEY, H., CAULDWELL, H., SHOCK, A., BOTTOMS, S., HASLETT, C., MUTSAERS, S. E., LAURENT, G. J. **Adhesion molecule-dependent mechanisms regulate the rate of macrophage clearance during the resolution of peritoneal inflammation**. J Exp Med, v. 196, n. 11, p. 1515-1521, 2002.

BLANCHETTE, J., N. RACETTE, R. FAURE, K. A. SIMINOVITCH, AND M. OLIVIER. **Leishmania-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation**. Eur. J. Immunol.v. 29, p. 3737–3744, 1999.

BLANCHETTE, JULIE, ABU- DAYYEH, ISSA., HASSANI, KASRA., WHITCOMBE, LORIE., OLIVIER MARTIN. **Regulation of macrophage nitric**

oxide production by the protein tyrosine phosphatase Src homology 2 domain phosphotyrosine phosphatase 1 (SHP-1). *Immunology*, v. 127, p. 123–133, 2008.

BOGDAN,C; ROLLINGHOFF. M.; DIEFENBACH.A. **The role of nitric oxide in innate immunity.** *Immunol. Rev.* v.173. p17-26, 2000

BOUHAMDAN ,M., BAUERFELD, C., TALREJA, J., BEURET, L. , CHARRON, J., SAMAVATI,L. **MEK1 Dependent and Independent ERK Activation Regulates IL-10 and IL-12 Production in Bone Marrow Derived Macrophages.** *Cell Signal*, v. 27(10), p. 2068–2076, 2015.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANDONISIO, O., SPINELLI, R., PEPE, M. **Dendritic cells in Leishmania infection.** *Microbes Infect*, v. 6, n. 15, p. 1402-1409, 2004.

BRAY RS **Leishmania.***Annu Rev Microbiol* v.28 p.189-217,1974.

BRONTE,V.,and ZANOVELLO,P. **Regulation of immune responses by L-arginine metabolism.** *Nat. Rev.Immunol.* v 5, 641–654, 2005.

BROOM, O. J., WIDJAYA, B., TROELSEN, J., OLSEN, J., NIELSEN, O. H. **Mitogen activated protein kinases: a role in inflammatory bowel disease?** *Clin Exp Immunol*, v. 158, n. 3, p. 272-280, 2009.

CARMO, E.V.S. **Avaliação da capacidade leishmanicida de neutrófilos sobre a *Leishmania (Leishmania) amazonensi in vitro* e em um modelo de resistência in vivo.** Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, 2010.

CARNEIRO, H. B, M *et al.* **IFN-g-Dependent Recruitment of CD4+ T Cells and Macrophages Contributes to Pathogenesis During Leishmania amazonensis Infection.** *Journal of interferon & cytokine research.* V 35, nº 12, 2015

CARVALHO, A. K., SILVEIRA, F. T., PASSERO, L. F., GOMES, C. M., CORBETT, C. E., LAURENTI, M. D. **Leishmania (V.) braziliensis and L. (L.) amazonensis promote differential expression of dendritic cells and cellular immune response in murine model.** *Parasite Immunol*, v. 34, n. 8-9, p. 395-403, 2012.

CARVALHO, L. P.; PEARCE, E. J. & SCOTT, P. **Functional dichotomy of dendritic cells following interaction with *Leishmania braziliensis*: infected cells produce high levels of TNF-alpha, whereas bystander dendritic cells are activated to promote T cell responses.** *The Journal of Immunology*, v31:646-651. 2008

CASTELLANO, L. R., FILHO, D. C., ARGIRO, L., DESSEIN, H., PRATA, A., DESSEIN, A., RODRIGUES, V. **Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production.** *Hum Immunol*, v. 70, n. 6, p. 383-390, 2009.

CHAWLA, B; MADHUBALA, R. **Drug targets in leishmania.** *Journal of Parasitic Diseases*, v.34 pg 1-1, 2010

CHAMBARD, J.C., LEFLOCH, R., POUYSSÉGUR, J., and LENORMAND, P. **ERK Implication in cell cycle regulation.** *Biochim. Biophys. Acta*. p.1299 – 1310, 2006.

CHARMOY M, BRUNNER-AGTEN S, AEBISCHER D, AUDERSET F, LAUNOIS P, MILON G, *et al.* **Neutrophil-Derived CCL3 Is Essential for the Rapid Recruitment of Dendritic Cells to the Site of *Leishmania major* Inoculation in Resistant Mice.** *PLoS Pathog*. V 6(2), 2010

CHRISTIAN BOGDAN. C; NORBERT DONHAUSER *et al*; **Fibroblasts as Host Cells in Latent Leishmaniasis.** *J. Exp. Med*, v 191, N°12, 2000

CIRINO, G., CICALA, C., SORRENTINO, L., CILIBERTO, G., ARPAIA, G., PERRETTI, M., FLOWER, R. J. **Anti-inflammatory actions of an N-terminal peptide from human lipocortin 1.** *Br J Pharmacol*, v. 108, n. 3, p. 573-574, 1993.

CONTRERAS, IRAZÚ *et al.* **Impact of *Leishmania mexicana* Infection on Dendritic Cell Signaling and Functions.** *PLoS Negl Trop Dis* v. 8, 2014.

COSTA, D. L., CARREGARO, V., LIMA-JUNIOR, D. S., SILVA, N. M., MILANEZI, C. M., CARDOSO, C. R., GIUDICE, A., DE JESUS, A. R., CARVALHO, E. M., ALMEIDA, R. P., SILVA, J. S. **BALB/c mice infected with antimony treatment refractory isolate of *Leishmania braziliensis* present severe lesions due to IL-4 production.** *PLoS Negl Trop Dis*, v. 5, n. 3, p. e965-2011.

COUSSENS LM, WERB Z. **Inflammation and cancer.** *Nature* v.420, p.860–7, 2002.

D'ACQUISTO, F., PERRETTI, M., FLOWER, R. J. **Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems.** *Br J Pharmacol*, v. 155, n. 2, p. 152-169, 2008.

DA SILVA, I. A., JR. et al. **In vitro metacyclogenesis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* clinical field isolates, as evaluated by morphology, complement resistance, and infectivity to human macrophages.** *Biomed Res Int*, v. 2015, p. 393049, 2015.

DANESE S, FIOCCHI C. **Ulcerative colitis.** *N Engl J Med*. V 365(18):1713–25, 2011

DE OLIVEIRA CARDOSO, F., DE SOUZA, C. S., MENDES, V. G., ABREU-SILVA, A. L., GONCALVES DA COSTA, S. C., CALABRESE, K. S. **Immunopathological studies of *Leishmania amazonensis* infection in resistant and in susceptible mice.** *J Infect Dis*, v. 201, n. 12, p. 1933-1940, 2010.

DE SOUZA, M. C., DE ASSIS, E. A., GOMES, R. S., MARQUES DA SILVA, E. A., MELO, M. N., FIETTO, J. L., AFONSO, L. C. **The influence of ecto-nucleotidases on *Leishmania amazonensis* infection and immune response in C57B/6 mice.** *Acta Trop*, v. 115, n. 3, p. 262-269, 2010.

DE SOUZA-NETO, S. M., CARNEIRO, C. M., VIEIRA, L. Q., AFONSO, L. C. ***Leishmania braziliensis*: partial control of experimental infection by interleukin-12 p40 deficient mice.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 3, p. 289-294, 2004.

DIEGELMANN, R.F., EVANS, M.C. **Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing.** *Frontiers in Bioscience*, V.9,p. 283–289, 2004.

DEKREY, G. K., LIMA, H. C., TITUS, R. G. **Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*.** *Infect Immun*, v. 66, n. 2, p. 827-829, 1998.

DONG LIU AND JUDE; E.UZONNA **The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response.** *cellular and infection microbiology*. V2, 2012.

DOSTÁLOVÁ, A., VOLF, P. ***Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview.** *Parasit Vectors*, v. 5, p. 276-2012.

DRECHSLER M, DE JONG R, ROSSAINT J, VIOLA JR, LEONI G, WANG JM, *et al.* **Annexin A1 counteracts chemokine-induced arterial myeloid cell recruitment.** *Circulation research.* V 116(5): 827-835, 2015.

EARNSHAW, W. C., MARTINS, L. M., KAUFMANN, S. H. **Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis.** *Annu Rev Biochem*, v. 68, p. 383-424, 1999.

EHRCHEN JM, ROEBROCK K, FOELL D, *et al.* **Keratinocytes determine Th1 immunity during early experimental leishmaniasis.** *PLoS Pathog*, v 6: e1000871, 2010

ELMORE, S. **Apoptosis: a review of programmed cell death.** *Toxicol Pathol*, v. 35, 495- 4516, 2007

FADOK VA, VOELKER DR, CAMPBELL PA, COHEN JJ, BRATTON DL, HENSON: **Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages.** *Journal of immunology* 148(7): 2207-2216, 1992.

FADOK, V.A.; BRATTON, D.L.;KONOWAL, A. *et al.* **Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF.** *J Clin Invest*, v.101, n.4, p.890-898, 1998.

FAGUNDES CT1, COSTA VV, CISALPINO D, AMARAL FA, SOUZA PR, SOUZA RS, RYFFEL B, VIEIRA LQ, SILVA TA, ATRASHEUSKAYA A, IGNATYEV G, SOUSA LP, SOUZA DG, TEIXEIRA MM. **IFN gamma production depends on IL-12 and IL-18 combined action and mediates host resistance to dengue virus infection in a nitric oxide-dependent manner.** *PLoS Negl Trop Dis*, v. 12, 2011.

FELIZARDO, T. C., GASPAR-ELSAS, M. I., LIMA, G. M., ABRAHAMSOHN, I. A. **Lack of signaling by IL-4 or by IL-4/IL-13 has more attenuating effects on Leishmania amazonensis dorsal skin--than on footpad-infected mice.** *Exp Parasitol*, v. 130, n. 1, p. 48-57, 2012.

FERNANDES, ANNE. C.S., SOARES, DEIVID. C., SARAIVA, ELVIRA. M., FERNANDES, JOSE. R. MEYER., PADRÓN, THAÍS. SOUTO. **Different secreted phosphatase activities in Leishmania amazonensis** *Federation of European Microbiological Societies*, p. 117-128, 2013.

FIGUEIREDO, A. B., SERAFIM, T. D., MARQUES-DA-SILVA, E. A., MEYER-FERNANDES, J. R., AFONSO, L. C. **Leishmania amazonensis impairs DC function by inhibiting CD40 expression via A2B adenosine receptor activation.** *Eur J Immunol*, v. 42, n. 5, p. 1203-1215, 2012

FLOWER RJ, BLACKWELL GJ. **Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A2 inhibitor which prevents prostaglandin generation.** *Nature* 278(5703): 456- 459, 1979.

FULLERTON, J. N., O'BRIEN, A. J., GILROY, D. W. **Pathways mediating resolution of inflammation: when enough is too much.** *J Pathol*, v. 231, n. 1, p. 8-20, 2013.

GARCÍA-GARCÍA, E., ROSALES, C. **Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis.** *J Leukoc Biol*, v. 72(6), p.1092-1108, 2002.

GAUTIER, E. L., IVANOV, S., LESNIK, P., RANDOLPH, G. J. **Local apoptosis mediates clearance of macrophages from resolving inflammation in mice.** *Blood*, 2013.

GAVINS, F. N., HICKEY, M. J. **Annexin A1 and the regulation of innate and adaptive immunity.** *Front Immunol*, v. 3, p. 354-2012.

GERALDO, M, M. *et al.* **In vivo and in vitro phagocytosis of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes by B-1 cells.** *Parasite Immunology*, v. 38, p. 365–376, 2016.

GERKE V, MOSS SE. **Annexins: from structure to function.** *Physiological reviews*. V 82(2): 331-371, 2002

GHOSH, SANJUKTA., BHATTACHARYYA, SANDIP., *et al.* ***Leishmania donovani* Suppresses Activated Protein 1 and NF- β . Activation in Host Macrophages via Ceramide Generation: Involvement of Extracellular Signal-Regulated Kinase.** *Infection and immunity*,v. 70, p.6828-6838, 2002.

GOMES, C. M. ***Leishmania braziliensis* amastigotes stimulate production of IL-1b, IL-6, IL-10 and TGF- β by peripheral blood mononuclear cells from nonendemic area healthy residents.** *Parasite Immunology*, v. 36, p. 225–231, 2014

GOODRIDGE, H. S., HARNETT, M. M. **Introduction to immune cell signalling.** *Parasitology*, v. 130 Suppl, p. S3-S9, 2005.

GUIDO, B. C., ZANATELLI, M., TAVARES-DE-LIMA, W., OLIANI, S. M., DAMAZO, A. S. **Annexin-A1 peptide down-regulates the leukocyte**

recruitment and up-regulates interleukin-10 release into lung after intestinal ischemia-reperfusion in mice. *J Inflamm (Lond)*, v. 10, n. 1, p. 10-2013.

GUIMARÃES, E. T., SANTOS, L. A., RIBEIRO DOS, S. R., TEIXEIRA, M. M., DOS SANTOS, W. L., SOARES, M. B. **Role of interleukin-4 and prostaglandin E2 in Leishmania amazonensis infection of BALB/c mice.** *Microbes Infect*, v. 8, n. 5, p. 1219-1226, 2006.

QI HAI, JIAXIANG JI, NANCHAYA WANASEN, AND LYNN SOONG. **Enhanced Replication of Leishmania amazonensis Amastigotes in Gamma Interferon-Stimulated Murine Macrophages: Implications for the Pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis.** *INFECTION AND IMMUNITY*, v 72, p 988-995, 2004

HERNÁNDEZ, M. X., BARCANTE, T. A., VILELA, L., TAFURI, W. L., AFONSO, L. C., VIEIRA, L. Q. **Vaccine-induced protection against Leishmania amazonensis is obtained in the absence of IL-12/23p40.** *Immunol Lett*, v. 105, n. 1, p. 38-47, 2006.

HOMMES, D. W., PEPPELENBOSCH, M. P., VAN DEVENTER, S. J. **Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets.** *Gut*, v. 52, n. 1, p. 144-151, 2003.

HORTA, M. F., MENDES, B. P., ROMA, E. H., NORONHA, F. S., 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, p. 203818-2012.

R. HURDAYAL AND F. BROMBACHER, "The role of IL-4 and IL-13 in cutaneous Leishmaniasis," *Immunology Letters*, 2014.

ISOBE, Y., KATO, T., ARITA, M. **Emerging roles of eosinophils and eosinophil-derived lipid mediators in the resolution of inflammation.** *Front Immunol*, v. 3, p. 270-2012.

JAMES ALEXANDER AND FRANK BROMBACHER. **T helper 1/ T helper 2 cells and resistance /susceptibility to Leishmania infection:is this paradigm still relevant?** *Frontiers in immunology* , V.3, 2012.

JI, J., SUN, J., SOONG, L. **Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with Leishmania amazonensis.** *Infect Immun*, v. 71, n. 8, p. 4278-4288, 2003.

JIAXIANG, JI *et al.* **Impaired Expression of Inflammatory Cytokines and Chemokines at early Stages of Infection with *Leishmania amazonensis*** *INFECTION AND IMMUNITY*, Vol. 71; p. 4278–4288, 2003.

JOHN, B; HUNTER, C.A. **Immunology. Neutrophil soldiers or trojan horse?** *Science*, v321. 917-918, 2008.

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.

D. PUPJALIS, J. GOETSCH, D. J. KOTTAS, V. GERKE, AND U. RESCHER, **“Annexin A1 released from apoptotic cells acts through formyl peptide receptors to dampen inflammatory monocyte activation via JAK/STAT/SOCS signalling,”** *EMBO Molecular Medicine*, vol. 3, no. 2, pp. 102–114, 2011.

KAJI, R., KİYOSHIMA-SHIBATA, J., NAGAOKA, M., NANNO, M., SHIDA, K. **Bacterial teichoic acids reverse predominant IL-12 production induced by certain lactobacillus strains into predominant IL-10 production via TLR2-dependent ERK activation in macrophages.** *J Immunol*, V. 184(7), P. :3505-13, 2010.

KANE, MARGARET. MENTINK., MOSSER. DAVID. M. **The Role of IL-10 in Promoting Disease Progression in Leishmaniasis.** *The Journal of Immunology*. V. 166, P. 1141-1147, 2017

KAYE, P.; SCOTT, P. **Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface.** *Nat Rev Microbiol*, v. 9, n. 8, p. 604-15, Aug 2011.

KIM BS, MIYAGAWA F, CHO YH, BENNETT CL, CLAUSEN BE & KATZ SI. **Keratinocytes function as accessory cells for presentation of endogenous antigen expressed in the epidermis.** *J Invest Dermatol*, v 129: 2805–2817, 2009

KIM S, KO J, KIM JH, CHOI EC, NA DS. **Differential effects of annexins I, II, III, and V on cytosolic phospholipase A2 activity: specific interaction model.** *FEBS letters*. V 489(2-3): 243-248, 2001.

KIMA, P. E., SOONG, L. **Interferon gamma in leishmaniasis.** *Front Immunol*, v. 4, p. 156-2013.

KNIGHT,T.,and IRVING,J.A.E. **Ras/Raf/MEK/ ERK Pathway activation in Childhood acute lymphoblastic leucemia and its therapeutic targeting.** *Front. Oncol.* V.4, 2014.

KOH HUI QI VANESSA , MARTÍNEZ GÓMEZ JULIA, LIN WENWEI *et al.* **Absence of Annexin A1 impairs host adaptive immunity against *Mycobacterium tuberculosis in vivo.*** *Immunobiology*, 2014.

KOLACZKOWSKA, E., KUBES, P. **Neutrophil recruitment and function in health and inflammation.** *Nat Rev Immunol*, v. 13, n. 3, p. 159-175, 2013.

KROPF, P., FREUDENBERG, N., KALIS, C., MODOLELL, M., HERATH, S., GALANOS, C., FREUDENBERG, M., MULLER, I. **Infection of C57BL/10ScCr and C57BL/10ScNCr mice with *Leishmania major* reveals a role for Toll-like receptor 4 in the control of parasite replication.** *J Leukoc Biol*, v. 76, n. 1, p. 48-57, 2004b

KUN LING MA, YANG ZHANG, JING LIU *et al.* **Establishment of an Inflamed Animal Model of Diabetic Nephropathy.** *Int J Biol Sci.* v 10(2):149-159, 2014.

LAINSON, R.; SHAW. **Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 82, n. 3, p. 421-4, Jul-Sep 1987.

LAPARA, N. J., KELLY, B. L. **Suppression of LPS-induced inflammatory responses in macrophages infected with *Leishmania.*** *J Inflamm (Lond)*, v. 7, n. 1, p. 8-2010.

LAWRENCE, T., FONG, C. **The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for NF-kappaB.** *Int J Biochem Cell Biol*, v. 42, n. 4, p. 519-523, 2010.

LAWRENCE, T., GILROY, D. W., COLVILLE-NASH, P. R., WILLOUGHBY, D. A. **Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation.** *Nat Med*, v. 7, n. 12, p. 1291-1297, 2001.

LEITE, P. M., GOMES, R. S., FIGUEIREDO, A. B., SERAFIM, T. D., TAFURI, W. L., DE SOUZA, C. C., MOURA, S. A., FIETTO, J. L., MELO, M. N., RIBEIRO-DIAS, F., OLIVEIRA, M. A., RABELLO, A., AFONSO, L. C. **Ecto-nucleotidase activities of promastigotes from *Leishmania (Viannia) braziliensis* relates to parasite**

infectivity and disease clinical outcome. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 6, n. 10, p. e1850-2012.

LESSA, M, M, *et al.* **Mucosal leishmaniasis : epidemiological and clinical aspect.** *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v. 73, pg 843-847, 2007

LIESE, J.; SCHLEICHER, U. & BOGDAN, C. **The innate immune response against Leishmania parasites.** *Immunology*, v 213: 377-387, 2008.

LIEW, F. Y., LI, Y., MILLOTT, S. **Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine.** *Immunology*, v. 71, n. 4, p. 556-559, 1990.

LIU, D., UZONNA, J.E. **The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response.** *Front. Cell. Infect. Microbiol.* V.2, 2012.

LIU, L.; LING, X.; TANG, H. *et al.* **Poly(ADP-ribosyl)ation enhances H-RAS protein stability and causes abnormal cell cycle progression in human TK6 lymphoblastoid cells treated with hydroquinone.** *Chem Biol Interact*, v. 238, n.1-8, 2015.

LUO X, BUDIHardjo I, ZOU H *et al.* **Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors.** *Cell*; v. 94, n.481–490, 1998.

MACEDO-SILVA RM; SANTOS CDE L; DINIZ VA; CARVALHO JJ; GUERRA C; CÔRTE-REAL S. **Peripheral blood fibrocytes: new information to explain the dynamics of Leishmania infection.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Feb;109(1):61-9., 2014

MAIOLI, T. U., TAKANE, E., ARANTES, R. M., FIETTO, J. L., AFONSO, L. C. **Immune response induced by New World Leishmania species in C57BL/6 mice.** *Parasitol Res*, v. 94, n. 3, p. 207-212, 2004.

MARTINY, A., MEYER-FERNANDES, J. R., DE SOUZA, W., AND VANNIER-SANTOS, M. A. **Altered tyrosine phosphorylation of ERK1 MAP kinase and other macrophage molecules caused by Leishmania amastigotes.** *Mol. Biochem. Parasitol.* v.102, p.1–12. 1999

MATHUR, R. K., A. AWASTHI, P. WADHONE, B. RAMANAMURTHY, AND B. SAHA. **Reciprocal CD40 signals through p38MAPK and ERK-1/2 induce counteracting immune responses.** *Nat. Med.* 10: 540-544, 2004.

MAURILLO, L.; POETA, G.D.; VENDITTI, A.; BUCCISANO, F.; BATTAGLIA, A.;SANTINELLI, S. *et al.* **Quantitative analysis of Fas and bcl-2 expression in hematopoietic precursors.** *Haematologica*, v. 86, n.3, p. 237-243, 2001.

MCARTHUR S, GOBBETTI T, KUSTERS DH, REUTELINGSPERGER CP, FLOWER RJ, PERRETTI M. **Definition of a Novel Pathway Centered on Lysophosphatidic Acid To Recruit Monocytes during the Resolution Phase of Tissue Inflammation.** *Journal of immunology* 195(3): 1139-1151, 2015

MEDINA, L.P. **Modulação da morte mediada por FAS em células Tipo I e Tipo II.**São Paulo. USP. 2011.

MILOT E, FILEP JG . **Regulation of neutrophil survival/apoptosis by Mcl-1.**The Scientific World Journal 11: 1948-1962, 2011.

MIMURA, K. K., TEDESCO, R. C., CALABRESE, K. S., GIL, C. D., OLIANI, S. M. **The involvement of anti-inflammatory protein, Annexin A1, in ocular toxoplasmosis.** *Mol Vis*, v. 18, p. 1583-1593, 2012.

MISE-OMATA, S., KURODA, E., SUGIURA, T., YAMASHITA, U., OBATA, Y., DOI, T. S. **The NF-kappaB RelA subunit confers resistance to Leishmania major by inducing nitric oxide synthase 2 and Fas expression but not Th1 differentiation.** *J Immunol*, v. 182, n. 8, p. 4910-4916, 2009.

Muhannad Shweasha *et al*, **Leishmania mexicana promastigotes inhibit macrophage IL-12 production via TLR-4 dependent COX-2, iNOS and arginase-1 expression,** *Molecular Immunology*, v. 48, p. 1800– 1808, 2011.

MURAILLE, E., GOUNON, P., CAZARETH, J., HOEBEKE, J., LIPPUNER, C., DAVALOS-MISLITZ, A., AEBISCHER, T., MULLER, S., GLAICHENHAUS, N., MOUGNEAU, E. **Direct visualization of peptide/MHC complexes at the surface and in the intracellular compartments of cells infected in vivo by Leishmania major.** *PLoS Pathog*, v. 6, n. 10, p. e1001154, 2010.

MURRAY, H. W. *et al.* **Advances in leishmaniasis.** *Lancet*, v. 366, n. 9496, p. 1561-77, Oct 29-Nov 4 2005.

NAHID MASPI, AMIR ABDOLI & FATHEMEH GHAFARIFAR; **Pro-and anti inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review**, Pathogens and Global Health, 2016.

NANDAN, DEVKI., LO, RAYMOND,. REINER, NEIL E. **Activation of phosphotyrosine phosphatase activity attenuates mitogen-activated protein kinase signaling and inhibits c-fos and nitric oxide synthase expression in macrophages infected with *Leishmania donovani***. Infection and Immunity, v.67, p. 4055–4063, 1999.

NYLEN, S., EIDSMO, L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. Parasite Immunol, v. 34, n. 12, p. 551-561, 2012. NYLEN, S., EIDSMO, L. **Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis**. Parasite Immunol, v. 34, n. 12, p. 551-561, 2012.

OLIVEIRA, F., BAFICA, A., ROSATO, A. B., FAVALI, C. B., COSTA, J. M., CAFE, V., BARRAL-NETTO, M., BARRAL, A. **Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis**. Am J Trop Med Hyg, v. 85, n. 1, p. 70-73, 2011.

OLIVEIRA, G.L., TESTASSICA, M.C.S *et al.* **Annexin A1 Is Involved in the Resolution of Inflammatory Responses during *Leishmania braziliensis* Infection**. J Immunol, v.198, p. 3227-3236, 2017.

OLIVIER, M., GREGORY, D.J., AND FORGET GENEVIÈVE, **Subversion Mechanisms by Which *Leishmania* Parasites Can Escape the Host Immune Response: a Signaling Point of View**. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS. V. 18, p. 293–305, 2005.

PACE, D. **Leishmaniasis**. J Infect, v. 69 Suppl 1, p. S10-8, Nov 2014.

PEREIRA, B. A., ALVES, C. R. **Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis***. Vet Parasitol, v. 158, n. 4, p. 239-255, 2008.

PEREIRA W.O. AND AMARANTE-MENDES G.P. **Apoptosis: a programme of cell death or cell disposal?** Scand. J. Immunol. v.73, p. 401–407, 2011

PERRETTI, M., CHIANG, N., LA, M., FIERRO, I. M., MARULLO, S., GETTING, S. J., SOLITO, E., SERHAN, C. N. **Endogenous lipid- and peptide-derived anti-inflammatory pathways generated with glucocorticoid and aspirin treatment activate the lipoxin A4 receptor**. Nat Med, v. 8, n. 11, p. 1296-1302, 2002.

PETERS, N. C., EGEN, J. G., SECUNDINO, N., DEBRABANT, A., KIMBLIN, N., KAMHAWI, S., LAWYER, P., FAY, M. P., GERMAIN, R. N., SACKS, D. **In vivo**

imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, v. 321, n. 5891, p. 970-974, 2008.

PHILLIPSON, M., HEIT, B., COLARUSSO, P., LIU, L., BALLANTYNE, C. M., KUBES, P. **Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade.** *J Exp Med*, v. 203, n. 12, p. 2569-2575, 2006.

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.

PRATT, D. M.; DAVID, J. R. **Monoclonal antibodies that distinguish between new world species of *Leishmania*.** *Nature*, v. 291, n. 5816, p. 581-3, Jun 18 1981.

PRIVÉ, CHARLES AND ALBERT DESCOTEAUX. ***Leishmania donovani* promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages**

PUNCHARD, N.A., WHELAN, C.J., ADCOCK, J. **The Journal of Inflammation. Journal of inflammation**, V.1(1), p. 1-4, 2004.

QADOUMI M, BECKER I, DONHAUSER N, ROLLINGHOFF M, BOGDAN C. **Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis.** *Infect Immun*, v.70, p.4638–4642, 2002

QIAN, C., JIANG, X., NA, H., YU, Y., *et al*, **.TLR agonists promote ERK-mediated preferential IL-10 production of regulatory dendritic cells (diffDCs), leading to NK-cell activation.** *Blood*, v. 108(7), p. :2307-15, 2006.

REINHARD, K., HUBER, M., WOSTL, C., HELLHUND, A., TOBOLDT, A., ABASS, E., CASPER, B., JOERIS, T., HERR, C., BALS, R., STEINHOFF, U., LOHOFF, M., VISEKRUNA, A. **c-Rel promotes type 1 and type 17 immune responses during *Leishmania major* infection.** *Eur J Immunol*, v. 41, n. 5, p. 1388-1398, 2011.

RIBEIRO, J.M.; FRANCISCHETTI, I. M. **Role of arthropod saliva in blood feeding: sialone and post sialone perspectives.** *Annual review of entomology*, v48, 73-88, 2003.

RIEDL, S. J., SALVESEN, G. S. **The apoptosome: signalling platform of cell death.** *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 8, n. 5, p. 405-413, 2007.

RITTER, U., and H. KORNER. **Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis.** *Parasite Immunol.* v24:295–301, 2002

ROCHA, F. J., SCHLEICHER, U., MATTNER, J., ALBER, G., BOGDAN, C. **Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice.** *Infect Immun*, v. 75, n. 8, p. 3823-3832, 2007.

RUCKDESCHEL, K., MACHOLD, J., ROGGENKAMP, A., SCHUBERT, S., PIERRE, J., ZUMBILHL, R., LIAUTARD, J. P., HEESEMANN, J., ROUOT, B. ***Yersinia enterocolitica* promotes deactivation of macrophage mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase-1:2, p38 and c-Jun NH2-terminal kinase.** *J Biol Chem* v. 272, p.15920–7, 1998.

SACKS, D., NOBEN-TRAUTH, N. **The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice.** *Nat Rev Immunol*, v. 2, n. 11, p. 845-858, 2002.

SAKTHIANANDESWAREN A, ELSO CM, SIMPSON K, *et al.* **The wound repair response controls outcome to cutaneous leishmaniasis.** *Proc Natl Acad*, v 102: 15551–15556, 2005

SALAZAR, .M.T; DE LUNA, L.A.V; GIORGIO, SELMA. **Long-term cell culture isolated from lesions of mice infected with *Leishmania amazonensis*: a new approach to study mononuclear phagocyte subpopulations during the infection.** *Pathogens and diseases*,vol. 75,issue 8, 2017.

SANJABI, S., HOFFMANN, A., LIOU, H. C., BALTIMORE, D., SMALE, S. T. **Selective requirement for c-Rel during IL-12 P40 gene induction in macrophages.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 97, n. 23, p. 12705-12710, 2000.

SARKAR, A., E. AGA, U. BUSSMEYER, A. BHATTACHARYYA, S. MOLLER, L. HELLBERG, M. BEHNEN, W. SOLBACH, AND T. LASKAY; **Infection of neutrophil granulocytes with *Leishmania major* activates ERK 1/2 and modulates multiple apoptotic pathways to inhibit apoptosis.** *Med. Microbiol. Immunol.* 202: 25-35, 2013.

SAVILL J, FADOK V; **Corpse clearance defines the meaning of cell death.** *Nature* 407 (6805):784-788, 2000.

SAWATZKY, D. A., WILLOUGHBY, D. A., COLVILLE-NASH, P. R., ROSSI, A. G. **The involvement of the apoptosis-modulating proteins ERK 1/2, Bcl-xL and Bax in the resolution of acute inflammation in vivo.** *Am J Pathol*, v. 168, n. 1, p. 33-41, 2006.

SCHRIEFER, A.; WILSON, M. E.; CARVALHO, E. M. **Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis.** *Curr Opin Infect Dis*, v. 21, n. 5, p. 483-8, Oct 2008.

SEN, R; BALTIMORE, D. **Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism.** *Cell*, 26; v.47, n 6, p 921-8.

SERHAN CN, BRAIN SD, BUCKLEY CD, GILROY DW, HASLETT C, O'NEILL LA, ET AL. **Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21(2): 325-332.;2007

SERHAN, C. N., BRAIN, S. D., BUCKLEY, C. D., GILROY, D. W., HASLETT, C., O'NEILL, L. A., PERRETTI, M., ROSSI, A. G., WALLACE, J. L. **Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms.** *FASEB J*, v. 21, n. 2, p. 325-332, 2007.

SERHAN, C. N., CHIANG, N. **Resolution phase lipid mediators of inflammation: agonists of resolution.** *Curr Opin Pharmacol*, 2013.

SERHAN, C. N., SAVILL, J. **Resolution of inflammation: the beginning programs the end.** *Nat Immunol*, v. 6, n. 12, p. 1191-1197, 2005.

SHAUL, Y. D., and SEGER, R. **The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions.** *Biochim. Biophys. Acta*. p. 1213–1226, 2007.

SHAW, J. J; LAINSON, R. **Leishmaniasis in Brazil. Observations on seasonal variations of Lutzomyia flaviscutellata in different types of forest and relationship to enzootic rodent leishmaniasis. (Leishmania maxicana amazonensis).** *Transactions of Royal society of tropical medicine and hygiene*, v 65(5), pg 709, 1972

SIBLEY, L. D. **Invasion and intracellular survival by protozoan parasites.** *Immunol Rev*, v. 240, n. 1, p. 72-91, 2011.

SILVA, E. M., BERTHO, A. L., MENDONÇA, S. C. **Effect of in vivo depletion of CD4+ T cells on experimental infection of susceptible BALB/c mice with *Leishmania amazonensis*.** *Acta Trop*, v. 56, n. 1, p. 111-120, 1994.

SILVA, L. H, LIMA. S. G *et al*, **Expression of annexin A1 in *Leishmania*-infected skin and its correlation with histopathological features.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48(5):560-567, 2015.

SILVA, S, MERCEDES., DINIZ, F, FLÁVIA., BAHIA DIANA. **The Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway:Role in Immune Evasion by Trypanosomatids.** *Frontier's in microbiology*, v. 07, 2016.

SILVEIRA, F. T., LAINSON, R., DE CASTRO GOMES, C. M., LAURENTI, M. D., CORBETT, C. E. **Immunopathogenic competences of *Leishmania* (V.) *braziliensis* and L. (L.) *amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis.** *Parasite Immunol*, v. 31, n. 8, p. 423-431, 2009

SOLITO, E., DE, C. C., CANAIDER, S., GOULDING, N. J., PERRETTI, M. **Transfection of annexin 1 in monocytic cells produces a high degree of spontaneous and stimulated apoptosis associated with caspase-3 activation.** *Br J Pharmacol*, v. 133, n. 2, p. 217-228, 2001.

SOMENSIA, N., BRUM, P, O.**Extracellular HSP70 Activates ERK1/2, NF-κB and Pro-Inflammatory Gene Transcription Through Binding with RAGE in A549 Human Lung Cancer Cells.** *Cell Physiol Biochem*. V.42, p.2507-2522, 2017

SOONG, L., HENARD, C. A., MELBY, P. C. **Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis.** *Semin Immunopathol*, v. 34, n. 6, p. 735-751, 2012.

SOUSA LP, ALESSANDRI AL, PINHO V, TEIXEIRA MM. **Pharmacological strategies to resolve acute inflammation.** *Current opinion in pharmacology* 13(4): 625-631, 2013

SOUSA, L. M. A. *et al*, **Neutrophils have a protective role during early stages of *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice.** *Parasite Immunology*, v. 36, 13–31, 2014.

STEINMAN L. **A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage.** Nat. Med. v.13(2) p.139–145. 2007.

SUGIMOTO MA, VAGO JP, TEIXEIRA MM, and SOUSA LP . **Annexin A1 and the Resolution of Inflammation: Modulation of Neutrophil Recruitment, Apoptosis, and Clearance.** Journal of Immunology Research, vol. 2016(13), 2016.

TAVARES LP, GARCIA, C. C, VAGO, J. P *et al*, **Inhibition of Phosphodiesterase-4 during Pneumococcal Pneumonia Reduces Inflammation and Lung Injury in Mice.** Am J Respir Cell Mol Biol, v. 55.24-34, 2016.

TESTASSICA, Míriam Conceição de Souza. **AVALIAÇÃO DE MARCADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS E DE ANEXINA A1 EM CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS POR Leishmania braziliensis OU Leishmania amazonensis.** 2013, 151f.Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. Número de chamada: **TF 616.9364 T342a 2013 (FAFAR)**

TIMOTHY. J. K., DIPIETRO, A.L. **Inflammation and wound healing: the role of the macrophage.** Expert Rev. Mol. Med. Vol. 13, e23, July, 2011.

TZELEPIS, F., M. VERWAY, J. DAOUD, J. GILLARD, K. HASSANI-ARDAKANI, *et al*. **Annexin1 regulates DC efferocytosis and cross-presentation during Mycobacterium tuberculosis infection.** J. Clin. Invest v.125: 752-768, 2015.

UENO, N., WILSON, M. E. **Receptor-mediated phagocytosis of Leishmania: implications for intracellular survival.** Trends Parasitol, v. 28, n. 8, p. 335-344, 2012.

VAGO JP, NOGUEIRA CR, TAVARES LP, SORIANI FM, LOPES F, RUSSO RC, *et al*. **Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis.** *Journal of leukocyte biology* **92(2): 249-258, 2012.**

VAGO JP, TAVARES LP, GARCIA CC, LIMA KM, PERUCCI LO, VIEIRA EL, *et al*. **The role and effects of glucocorticoid-induced leucine zipper in the context of inflammation resolution.** *Journal of immunology* **194(10): 4940-4950.,2015.**

VITALE F, REALE S, VITALE M, PETROTTA E, TORINA A, CARACAPPA S. **TaqMan-Based detection of Leishmania infantum DNA using**

canine samples. Ann N Y Acad Sci, v.1026(1), p.139-143. 2004.

VON, STEBUT. E . Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. **Eur J Dermatol, v 17: 115-122, 2007**

WANG, XICHAO., CHEN, QUN., XING, DA; **Focal Adhesion Kinase Activates NF- κ B via the ERK1/2 and p38MAPK Pathways in Amyloid- β 25-35-Induced Apoptosis in PC12 Cells.** Journal of Alzheimer's Disease, v. 32, no. 1, pp. 77-94, 2012.

WATANABE, Y., HAMAGUCHI-TSURU, E., MORIMOTO, N., NISHIO, Y., YAGYU, K., KONISHI, Y., TOMINAGA, M., MIYAZAKI, J., FURUYA, M., TOMINAGA, A. **IL-5-Induced Eosinophils Suppress the Growth of Leishmania amazonensis In Vivo and Kill Promastigotes In Vitro in Response to Either IL-4 or IFN-gamma.** *DNA Cell Biol*, v. 23, n. 7, p. 412-418, 2004.

WHO. **Control of leishmaniasis: report of a meeting of the WHO expert Committee on the Control of Leishmaniasis.** Genova: 22-26, 2010 **OK**

WICKMAN, G., JULIAN, L., OLSON, M. F. **How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies.** *Cell Death Differ*, v. 19, n. 5, p. 735-742, 2012.

WILLIAMS, S. L., MILNE, I. R., BAGLEY, C. J., GAMBLE, J. R., VADAS, M. A., PITSON, S. M., KHEW-GOODALL, Y. **A proinflammatory role for proteolytically cleaved annexin A1 in neutrophil transendothelial migration.** *J Immunol*, v. 185, n. 5, p. 3057-3063, 2010.

WOZNIOK, I., HORNBACH, A., SCHMITT, C., *et al.*. **Induction of ERK-kinase signalling triggers morphotype-specific killing of *Candida albicans* filaments by human neutrophils.** *Cellular Microbiology*. V.10, p. 807– 820, 2008.

YAMADA, T., TANI, Y., NAKANISHI, H., TAGUCHI, R., ARITA, M., ARAI, H. **Eosinophils promote resolution of acute peritonitis by producing proresolving mediators in mice.** *FASEB J*, v. 25, n. 2, p. 561-568, 2011.

YAMAMOTO, YUMI and GAYNOR, B, RICHARD. **Role of the NF- κ B Pathway in the Pathogenesis of Human Disease States.** *Current Molecular Medicine*. p. 287 – 286, 2001.

YANG, ZIYAN., MOSSER, DAVID., XIA ZHANG. **Activation of the MAPK, ERK, following *Leishmania amazonensis* Infection of Macrophages.** The journal of immunology, v. 177, p. 1077 – 1085, 2007

YONA, S., J. C. BUCKINGHAM, M. PERRETTI, AND R. J. FLOWER. **Stimulus-specific defect in the phagocytic pathways of annexin 1 null macrophages.** Br. J. Pharmacol. 142: 890-898, 2004.

XIN, LIJUN., LI, KUI., SOONG, LYNN., **Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes.** Molecular Immunology, v. 45, p. 3371 – 3382, 2008

ZHANG, S., WANG, Q. **Factors determining the formation and release of bioactive IL-12: regulatory mechanisms for IL-12p70 synthesis and inhibition.** *Biochem Biophys Res Commun*, v. 372, n. 4, p. 509-512, 2008.

Anexo A – Produção Científica durante o processo de doutoramento.

Artigo 1:

OLIVEIRA, G. L; FIGUEIREDO, L. A; MOURA, S. A. L; SILVA, G. R; **Methotrexate Locally Released from Poly(e-Caprolactone) Implants: Inhibition of the Inflammatory Angiogenesis Response in a Murine Sponge Model and the Absence of Systemic Toxicity** J Pharm Sci. V.104(11), p.:3731-42, 2015.

Artigo 2:

OLIVEIRA, G.L., TESTASSICA, M.C.S *et al.* **Annexin A1 Is Involved in the Resolution of Inflammatory Responses during *Leishmania braziliensis* Infection.** J Immunol, v.198, p. 3227-3236, 2017.

Artigo 3:

OLIVEIRA, G. L; MIRANDA, M. B; MOURA, S. A. L; SILVA, G. R. **Tacrolimus delivered from polymeric implants suppressed inflammation and angiogenesis in vivo without inducing nephrotoxicity, hepatotoxicity, and myelosuppression.** Journal of Drug Delivery Science and Technology. V.43, p. 487–495, 2018