



Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde
Mestrado

**INVESTIGAÇÃO DO PROCESSO DE POLARIZAÇÃO EM
MACRÓFAGOS M1 E M2 DURANTE INFECÇÃO POR
*Leishmania amazonensis***

LUIS DOUGLAS MIRANDA SILVA

São Luís

2018

LUIS DOUGLAS MIRANDA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DO PROCESSO DE POLARIZAÇÃO EM
MACRÓFAGOS M1 E M2 DURANTE INFECCÃO POR
*Leishmania amazonensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a
Lucilene Amorim Silva

São Luís - MA

2018

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Miranda Silva, Luis Douglas.
INVESTIGAÇÃO DO PROCESSO DE POLARIZAÇÃO EM MACRÓFAGOS
M1 E M2 DURANTE INFECÇÃO POR *Leishmania amazonensis* / Luis
Douglas Miranda Silva. - 2018.
71 f.

Orientador(a): Lucilene Amorim Silva.
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luis, 2018.

1. Infecção. 2. *Leishmania amazonensis*. 3.
Macrófagos. 4. Polarização. I. Amorim Silva, Lucilene.
II. Título.

Luis Douglas Miranda Silva

**IVESTIGAÇÃO DO PROCESSO DE POLARIZAÇÃO EM
MACRÓFAGOS M1 E M2 DURANTE INFECÇÃO POR *Leishmania
amazonensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação
em Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Maranhão, como requisito para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Lucilene Amorim Silva
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Paulo Vitor Soeiro
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Aramys Reis
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Eduardo Martins de Sousa
CEUMA

Fiz, concluí, tudo que queria
E foi mais do que pensei que seria
Vou deixar minha marca para que todos saibam
Eu estava aqui
(Beyoncé – I was here)

Dedico este trabalho à minha família por todo amor,
carinho e apoio

Agradecimentos

Primeiramente, quero agradecer a Deus pelo dom da vida, por estar ao meu lado em todos os momentos de provações e por todas as bênçãos concedidas ao longo desses anos.

À minha mãe (Vânia Aldenora), pai (Antônio Luis) e irmão (Vinicius Miranda) pelo apoio em todas as dificuldades e nos bons momentos que a vida proporciona. Mas principalmente à minha mãe, que é minha fonte de inspiração e força pra levantar todos os dias para seguir em frente em busca de um futuro promissor. Faltam-me palavras pra descrever o quão importante és na minha vida, mas de algo tenho certeza... É a pessoa que mais amo nesse mundo.

À minha orientadora/mãe científica Lucilene Amorim, por toda paciência, carinho e aprendizado ao longo desses 5 anos. E com o passar desse tempo, pude perceber o seu carinho em atitudes que só pessoas que se importam as fazem. Todos os “puxões de orelha”, conselhos e aqueles abraços desajeitados, mostram o quanto ela quer o melhor pra você. Obrigado por tudo, professora Lucilene, e sei que posso contar com você sempre que precisar, assim como você pode contar comigo. E o que sou hoje nesse mundo da pesquisa, pode ter certeza que você é grande responsável por isso.

À professora Flávia Nascimento, minha vó científica, por todo conhecimento em conversas, seminários ou na bancada, que pude aprender com uma das cientistas de destaque do nosso estado e país. Algo que nunca irei esquecer é que toda vez quando nos encontramos e nos abraçamos, sinto o carinho enorme que ela passa nesse gesto. E se não fosse pelo seu “sim” ao meu pedido de integrar a Família LIF no fim de 2012, eu não faria parte de um dos laboratórios com maior prestígio do Maranhão.

Ao corpo docente do LIF, professoras Ana Paula, Márcia e Rosane que são mulheres pesquisadoras fortes e inspiradoras. E por todo ensino, aprendizado, conhecimento e carinho ao longo desse tempo que faço parte do LIF.

Ao meu grande amigo de todas as horas, Diego Lindoso, que esse ano fazem 7 anos que nos conhecemos, e já aprendi e tenho aprendido coisas com ele que só agregam para o lado bom. Obrigado por fazer parte da minha vida.

Aos meus amigos do LIF, Lillian, Liana, Jefferson, Patrícia, Aluísio, André, Johnny, Thiare, Luana, Carol, Andressa, Carlene, Éder, Dona Joana e a todos outros integrantes por todo apoio ao longo do mestrado, pois sabemos o quanto não é fácil passar por essa etapa sem a ajuda de pessoas que integram nossas vidas.

Aos meus grandes amigos, Junior, Flávio e Ana Paula por toda amizade, amor, carinho e apoio.

À Universidade Federal do Maranhão (UFMA) pela infra-estrutura disponibilizada para o desenvolvimento e concretização deste trabalho.

A todos os professores do curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, por todo ensino e conhecimentos ao longo desses dois anos que foram de fundamentais na minha formação acadêmica e no profissional que irei me tornar.

A CAPES pelas bolsas concedidas e pelo incentivo na pesquisa.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Contexto Histórico.....	3
2.2 Sistema Fagocítico Mononuclear	4
2.3 Ontogenia dos macrófagos	5
2.4 Macrófagos Residentes.....	7
2.5 Funções dos macrófagos.....	8
2.5.1 Reconhecimento de patógenos	8
2.5.2 Fagocitose.....	9
2.5.3 Relação com a imunidade adaptativa	10
2.5.4 Ativação de macrófagos	11
2.6 Relação de macrófagos M1 e M2 em patologias.....	12
2.7 Leishmaniose Cutânea.....	13
2.8 Aspectos biológicos da <i>Leishmania</i>	14
2.9 Fatores de evasão da resposta imune por <i>Leishmania</i>	15
2.10 Macrófagos M1 e M2 na resposta a infecção por <i>Leishmania spp.</i>	16
3 OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo Geral	19
3.2 Objetivos Específicos	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Cultivo de <i>Leishmania amazonensis</i>	20
4.2 Cultura de macrófagos RAW 264.7	20
4.3 Delineamento experimental.....	20
4.4 Polarização de macrófagos RAW 264.7.....	21
4.5 Infecção dos Macrófagos.....	21
4.6 Avaliação da taxa de infecção	21
4.7 Dosagem de Óxido Nítrico	22
4.8 Inibição da produção de Óxido Nítrico	Erro! Indicador não definido.
4.9 Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio	22
4.10 Recuperação e avaliação da viabilidade de amastigotas dos macrófagos	22

4.11	Quantificação de citocinas.....	23
4.12	Imunofenotipagem.....	23
4.13	Análise estatística	24
5	RESULTADOS	25
5.1	A infecção por <i>L. amazonensis</i> é maior em macrófagos M1.....	25
5.2	A produção de óxido nítrico aumenta em macrófagos M1 infectados por <i>L. amazonensis</i>	27
5.3	Alta produção de NO aumenta a taxa de infecção de macrófagos M1.....	28
5.4	Inibição na produção de NO reduz taxa de infecção por <i>L. amazonensis</i>	29
5.5	Macrófagos M1 apresentam redução na produção de peróxido de hidrogênio.....	30
5.6	A inibição de NO induz aumento na morte de <i>L. amazonensis</i>	31
5.7	Avaliação da produção de citocinas de macrófagos M0, M1 e M2 infectados por <i>L. amazonensis</i>	32
5.8	A infecção por <i>L. amazonensis</i> aumenta a expressão de moléculas co-estimulatórias e iNOS em macrófagos M1.....	33
6	DISCUSSÃO	35
7	CONCLUSÃO	41
8	REFERÊNCIAS	42
9	APÊNDICE	51

Lista de Abreviações

- APC – *Antigen-presenting cell* (célula apresentadora de antígeno)
- CCL- 22 – proteína quimioatrante de monócitos
- CCL-17 – *Thymus and activation regulated chemokine* (TARC)
- CD163 – Cluster of Differentiation 163
- CD206 – Cluster of Differentiation 206 ou receptor de manose
- CD80 – Cluster of Differentiation 80
- CD86 – Cluster of Differentiation 86
- COX2 – Ciclo-oxigenase-2
- DAMP – *Damage-associated molecular patterns* (padrões moleculares associados ao dano)
- DHR- Dihydrorhodamine 123
- EROS – Espécies reativas de oxigênio
- GM-CSF – *Granulocyte-macrophage colony-stimulating fator* (fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos)
- HMGB1 – *High mobility group box 1*
- HSP – *heat-shock proteins*
- IFN- γ – Interferon gama
- IL- 10 – Interleucina 10
- IL- 13 – Interleucina 13
- IL- 4 – Interleucina 4
- IL-12 – Interleucina 12
- IL-1 β – Interleucina 1 beta
- IL-3 – Interleucina 3
- IL-6 – Interleucina 6
- iNOS – Óxido nítrico sintase
- LC- Leishmaniose Cutânea
- LPS – Lipopolissacarídeo
- M1 – Macrófagos M1
- M2 – Macrófagos M2
- M-CSF – *Macrophage colony-stimulating fator* (fator estimulante de macrófagos)
- MIF – Média da intensidade de fluorescência

MHC I – Complexo principal de histocompatibilidade classe I

MHC II- Complexo principal de histocompatibilidade classe II

MOI- Multiplicidade de infecção

NO – Óxido nítrico

NOX2 – Isoforma NOX2

O₂⁻ - Ânion superóxido

PAMP's – *Pathogen-associated molecular pattern* (padrões moleculares associados a patógenos)

PMA – *Phorbol 12-myristate 13-acetate*

PPAR γ – *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma*

PPR's – *Pattern recognition receptor* (receptor de reconhecimento padrão)

T CD4 – Linfócito T auxiliar

T CD8 – Linfócito T citotóxico

TAM's – *Tumor-associated macrophages* (macrófagos associados ao tumor)

TGF- β – *Transforming growth factor beta* (fator de transformação do crescimento beta)

Th1 – Linfócito T auxiliar perfil 1

Th2- Linfócito T auxiliar perfil 2

TNF- α – *Tumor necrosis factor alpha* (fator de necrose tumoral alfa)

TLR – *Toll like receptor* (receptor semelhante a Toll)

Lista de Ilustrações

Figura 1. Ellie Metchnikoff e as suas ilustrações de macrófagos fagocitando bactérias.	3
Figura 2. Função de células apresentadores de antígenos (APC's) na ativação da resposta imune adaptativa.	5
Figura 3. Hematopoiese de macrófagos.	7
Figura 4. Macrófagos residentes teciduais.	8
Figura 5. Macrófagos M1/M2.	13
Figura 6. Infecção de macrófagos M0, M1 e M2 por <i>L. amazonensis</i> .	27
Figura 7. Avaliação microscópica de macrófagos M0, M1 e M2 infectados por <i>L. amazonensis</i>	28
Figura 8. Avaliação da produção de óxido nítrico de macrófagos M0, M1 e M2 infectados por <i>L. amazonensis</i>	29
Figura 9. Correlação entre a taxa de infecção e produção de óxido nítrico de macrófagos M0, M1 e M2 infectados por <i>L. amazonensis</i>	30
Figura 10. Taxa de infecção de macrófagos tratados com aminoguanidina	31
Figura 11. Produção de H ₂ O ₂ por macrófagos M0, M1 e M2	32
Figura 12. Viabilidade de amastigotas dos macrófagos M0, M1 e M2 <i>L. amazonensis</i>	33
Figura 13. Quantificação de citocinas de macrófagos RAW 264.7 polarizados e infectados por <i>L. amazonensis</i> .	34
Figura 14. Expressão de iNOS e CD80 em macrófagos M0, M1 e M2 infectados por <i>L. amazonensis</i> .	35
Figura 15. Expressão de CD86 e F4/80 em macrófagos M0, M1 e M2 infectados por <i>L. amazonensis</i> .	36
Figura Suplementar 1. Avaliação da produção de óxido nítrico, citocinas e expressão de marcadores celulares na padronização da polarização de macrófagos	55
Figura Suplementar 2. Aspectos morfológicos na polarização de macrófagos.	56
Figura Suplementar 3. Histograma do painel de marcações de macrófagos M0, M1 e M2	57

RESUMO

Os fagócitos são células fundamentais na resposta a diversos tipos de infecções e dentre elas podemos destacar os macrófagos, os mesmos são caracterizados pela alta plasticidade o que possibilita a polarização rápida para perfis diferentes, com funções distintas. A literatura relata que a infecção por espécies de parasitos, a exemplo da *Leishmania* sp., é capaz de induzir a polarização de macrófagos M1 para M2 com consequente agravamento da infecção. Dessa forma, o presente trabalho visa investigar especificamente a polarização de macrófagos M1 ou M2 durante infecção por *Leishmania amazonensis*. Para a realização dos ensaios, macrófagos RAW 264.7 não estimulados (M0), polarizados para M1 e M2 foram infectados com *L. amazonensis* na proporção de 10 parasitos para 1 macrófago por 24 h. Em seguida, foram avaliados a taxa de infecção, dosagem de óxido nítrico (NO), quantificação das citocinas, produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Para os ensaios da inibição da iNOS foi realizada pelo uso da droga aminoguanidina, enquanto a viabilidade das amastigotas foi avaliado por marcação via AnexinaV/Iodeto de Propídio. A expressão de iNOS, CD80/86 e F4/80 foram avaliados por imunofenotipagem. Nossos dados mostraram que a taxa de infecção pelo parasito foi maior nos macrófagos M1, além destes apresentarem aumento na produção de NO, estes dados estão correlacionados para este grupo. Os macrófagos quando tratados com aminoguanidina apresentaram redução na taxa de infecção para todos os grupos. Os M1 apresentaram baixa produção de peróxido de hidrogênio, diferentemente dos macrófagos M0 e M2. Já os dados de viabilidades das amastigotas demonstraram que houve maior porcentagem apoptose dos parasitos recuperados de macrófagos submetidos ao tratamento com inibidor de iNOS. As citocinas inflamatórias (IL-6, TNF- α) e a quimiocina MCP-1, também mostraram-se aumentadas nos macrófagos M1, além de uma super expressão de iNOS, CD86/80 e F4/80 nestas células quando infectadas pelo o parasito. Com base nesses dados, podemos concluir que a infecção por *L. amazonensis* em macrófagos M1, demonstrou ser capaz de potencializar a produção de mediadores inflamatórios característicos desse fenótipo, onde vale destacar o óxido nítrico, que age de forma deletéria durante a resposta ao parasito culminando no agravamento da infecção.

Palavras chave: macrófagos, óxido nítrico, inflamação, infecção, *Leishmania amazonensis*

ABSTRACT

Phagocytes are fundamental cells in the types of pixels and the pixels can be highlighted for the macrophages, they are characterized by the high plasticity of that allows a fast polarization for different profiles, with different functions. A literature on parasite species infection, an example of *Leishmania* sp., Is capable of inducing a polarization of M1 macrophages into M2 with consequent worsening of infection. Thus, the present work aims to investigate a polarization of M1 or M2 macrophages during infection by *Leishmania amazonensis*. Assays of the non-stimulated RAW 264.7 macrophages (M0), polarized for M1 and M2 were infected with *L. amazonensis* at the ratio of 10 parasites to 1 macrophage for 24 h. Afterwards, the infection rate, nitric oxide (NO) dosage, cytokine quantification, hydrogen peroxide production (H₂O₂) were analyzed. In the report of inhibition of iNOS was carried out by the use of the drug aminoguanidine, while a route of the amastigotes was validated by labeling via Annexin V / Propidium Iodide. Expression of iNOS, CD80 / 86 and F4 / 80 were found by immunophenotyping. Our data were recorded as a parasite rate for M1 macrophages, and they were increased in NO production, these data are correlated for this group. Macrophages when treated with aminoguanidine have been reduced in infection rate for all groups. M 1 and the low production of hydrogen peroxide, unlike macrophages M0 and M2. The viability data of the amastigotes demonstrated that there were higher percentages of apoptosis of parasites recovered from macrophages throughout the treatment with iNOS inhibitor. Inflammatory cytokines (IL-6, TNF- α) and an MCP-1 chemokine were also shown to be increased in M1 macrophages, as well as overexpression of iNOS, CD86 / 80 and F4 / 80 present in cells when infected by parasite Based on data, we can conclude that *L. amazonensis* infection in M1 macrophages has been shown to potentiate a production of mediators related to the characterization of this phenotype, where it is worth mentioning nitric oxide, which deleterious age during a response to parasite culminating without worsening of the infection.

Key words: macrophages, nitric oxide, inflammation, infection, *Leishmania amazonensis*

1 INTRODUÇÃO

Os macrófagos são células fagocíticas do sistema imunológico que fazem parte da resposta imune inata e medeiam respostas imunes adaptativas, com função de manutenção da homeostase no organismo (MILLS, 2014). Foram descobertos por Ellie Metchnikoff durante experimentos com larvas de estrelas-do-mar no qual observou a presença de células capazes de conferir ‘proteção’ ao hospedeiro frente a invasão de partículas estranhas através do processo chamado fagocitose (GORDON, 2008).

Os macrófagos são potentes agentes microbicidas e produtores de citocinas e quimiocinas, além de serem classificados como células apresentadoras de antígenos (APCs) e participam ativamente da resposta inflamatória inicial (KAMBAYASHI & LAUFER, 2014). No entanto, essas células também podem apresentar propriedades relacionadas a reparação tecidual promovendo a cicatrização pela produção de fatores de crescimento (MILLS, 2015).

Esses fagócitos são células hematopoiéticas provenientes de monócitos que são originados na medula óssea por meio da linhagem mieloide. Os monócitos que circulam no sangue migram para os tecidos e diferenciam-se em macrófagos nesses locais. Os macrófagos que residem nos tecidos apresentam diferentes nomenclaturas, sendo estas Células de Kupfer (macrófagos do fígado), Células de Langerhans (macrófagos da pele) ou microglia (macrófagos do cérebro) que tem como função manutenção e assegurar a homeostase nesses órgãos frente às infecções ou processos inflamatórios (LAVIN et al., 2015).

Dependendo do estímulo no microambiente, podem ser ativados por vias diferentes, a via clássica ou via alternativa, que culminam na polarização de macrófagos M1 e M2, respectivamente. Os macrófagos M1 são ativamente microbicidas e principalmente envolvidos em processos inflamatórios, enquanto os macrófagos M2 estão diretamente relacionados aos processos de remodelamento tecidual e cicatrização (MURRAY et al., 2014)

O bom funcionamento e equilíbrio entre essas duas populações de macrófagos é de fundamental importância para homeostase do organismo, uma vez que, a ocorrência da atividade exacerbada por um destes fenótipos pode ocasionar o desenvolvimento de patologias que envolvem doenças inflamatórias crônicas ou aumento da atividade imunossupressora por macrófagos M1 e M2, respectivamente (MILLS, 2015)

As patologias que envolvem infecções parasitárias, a exemplo das Leishmanioses, que tem como agente etiológico o protozoário do gênero *Leishmania* spp., destaca-se a possibilidade da capacidade do parasito em subverter a ação de macrófagos M1, que são caracterizados pelo potencial microbicida devido a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e óxido nítrico (NO), a polarizarem para o perfil M2, assim causando a progressão da infecção, uma vez que, macrófagos M2 ao metabolizarem a L-arginina disponível via arginase-1 produzem ornitinas e poliaminas para reparação tecidual (RATH et al., 2014) que podem ser utilizados pelo parasito, a fim de promover o aumento da proliferação intracelular na célula hospedeira causando ao agravamento da infecção (COLOTTI & ILARI, 2010).

No caso da infecção por *Leishmania amazonensis*, poucos trabalhos relatam que o parasito na sua forma amastigota é capaz de expor a fostatildicerina na superfície celular (mimetismo apoptótico) (WANDERLEY et al., 2006), sendo este um fosfolipídio exposto por células apoptóticas e quando reconhecido por fagócitos parasitados pode direcionar ao aumento do metabolismo da L-arginina disponível sendo esta consumida via arginase (TAKELE et al., 2013) o que pode levar a polarização para macrófagos M2, assegurando o estabelecimento do parasito.

Nesse contexto, esse trabalho visou investigar como se dá o processo de polarização de macrófagos M1 ou M2 durante a infecção especificamente por *Leishmania amazonensis*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Contexto Histórico

Ellie Metchnikoff (1845-1916) (Figura 1), considerado o “pai da imunidade inata” foi um zoologista russo pioneiro na descrição dos macrófagos. Em suas pesquisas descobriu que a imunidade de animais invertebrados havia muito mais semelhanças com a de vertebrados que se imaginava (GORDON, 2007). E dentre as principais características dessas células, denominadas de macrófagos por conta do grande tamanho que apresentavam, foi inicialmente observada a capacidade de ingestão de partículas, processo denominado de fagocitose (KORZH e BREGESTOVSKI, 2016).

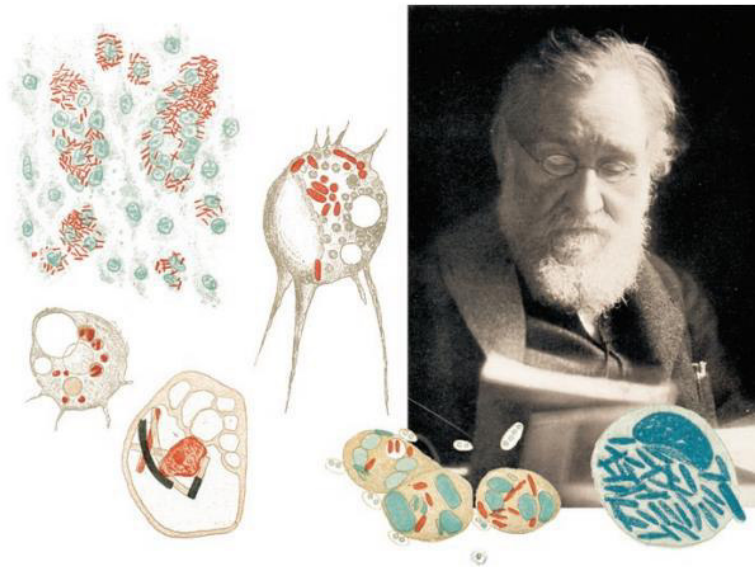


Figura 1. Ellie Metchnikoff e as suas ilustrações de macrófagos fagocitando bactérias. Em suas primeiras observações dos fagócitos denominados de macrófagos (células grandes) e micrófagos (células pequenas), Ellie os descreve quanto ao seu tamanho e capacidade fagocitar partículas estranhas. Fonte: GORDON, 2008

Essa capacidade dos macrófagos de ingerir agentes estranhos foi comprovada a partir da “Teoria da Fagocitose” (1883), pressuposta por Ellie Metchnikoff que realizou a introdução de um espinho de roseira em uma das larvas de estrela-do-mar de seu experimento e logo em seguida foi observado que o mesmo ficou completamente rodeado por macrófagos (TAUBER, 2003; GORDON, 2008).

Dessa forma, pode-se constatar que os macrófagos desempenhavam um papel fundamental na resposta imune através da ingestão e eliminação de microrganismos invasores, assegurando a homeostase e proteção do hospedeiro contra infecções através da imunidade inata (TAN & DEE, 2009). Além disso, foi observado que essas células eram capazes de migrarem para sítios inflamatórios por estarem distribuídas no sistema circulatório e linfático ou até mesmo residirem alguns tecidos (GORDON, 2008)

Anos mais tarde, mesmo com as controvérsias da comunidade científica em relação à teoria de Ellie, a “Teoria da Fagocitose” foi complementada com a teoria da imunidade humoral proposta por Paul Erlich no contexto da resposta imune, conferindo para ambos um prêmio Nobel em 1908 pela importância e contribuição de suas pesquisas (KAUFMANN, 2008). Assim possibilitando o avanço de novos estudos no contexto da importância dos macrófagos na resposta imune, sendo este um dos principais fagócitos do sistema fagocítico mononuclear.

2.2 Sistema Fagocítico Mononuclear

O Sistema de Fagócitos Mononucleares é composto por monócitos, células dendríticas e macrófagos (JENKINS e HUME, 2014).

Os monócitos são células que circulam pelo sangue periférico e compõe cerca de 2 a 10% do total de leucócitos, desempenham papel fundamental durante o processo inflamatório, pois migram para o sítio infeccioso e exercem a função de fagocitar e eliminar quaisquer agentes estranhos (RENA et al. 2001). Vale destacar que os monócitos são dotados da capacidade de diferenciação em células dendríticas e macrófagos, que são considerados fagócitos mais especializados na ingestão de microrganismos, além da capacidade de apresentação de antígenos após esse processo (GUILLIAMS et al. 2014).

As células dendríticas e macrófagos, após reconhecimento, fagocitose e processamento do microrganismo, possuem a capacidade de apresentarem peptídeos na sua superfície celular, sendo denominadas de células apresentadoras de antígenos (APCs). Em seguida é realizado o reconhecimento por células T, sendo este um processo essencial na ativação da imunidade adaptativa (KAMBAYASHI & LAUFER, 2014)

As APCs estabelecem essa ponte entre imunidade inata e adaptativa (Figura 2), na qual medeiam uma resposta mais efetiva contra aos agentes infecciosos. Caso esses fagócitos

não desempenhem seu papel de forma eficiente podem comprometer todo o desenvolvimento da resposta imune adaptativa por células T (KAMBAYASHI e LAUFER, 2014)

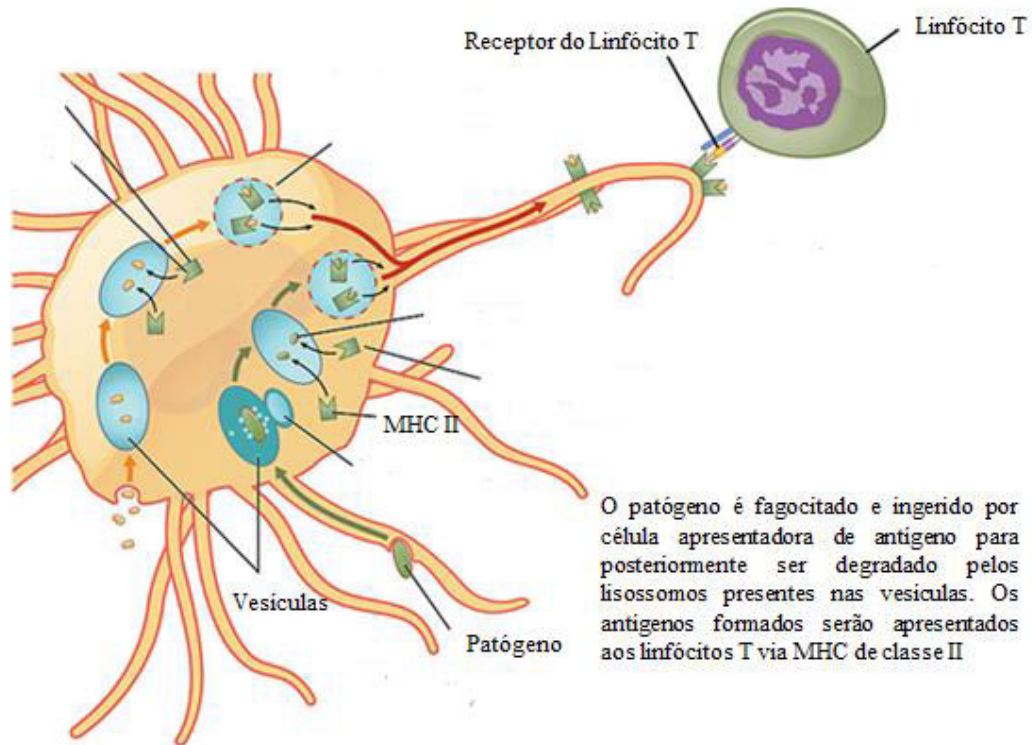


Figura 2. Função de células apresentadoras de antígenos (APC's) na ativação da resposta imune adaptativa. Após reconhecimento e fagocitose de antígenos, macrófagos e células dendríticas expõem peptídeos em sua superfície, para que ocorra o reconhecimento por células T e consequente ativação da imunidade adaptativa, assim ampliando a resposta imune. Fonte: ANATOMY & PHYSIOLOGY, 2015.

2.3 Ontogenia dos macrófagos

Os macrófagos têm sua origem na medula óssea através da diferenciação de células pluripotentes. No entanto, podem também ser formados em órgãos hematopoiéticos como saco vitelínico e baço (WYNN, CHAWLA & POLLARD, 2013).

As células hematopoiéticas são precursoras das linhagens linfoides e mieloides, uma vez que, dependendo do estímulo ao qual são submetidas podem ser direcionadas para qualquer uma dessas linhagens celulares (DOMEN et. al., 2006). Dessa forma, os monócitos que fazem parte da linhagem mielóide, são produzidos na medula óssea a partir de células

tronco multipotentes, sendo assim inicialmente formados os monoblastos que, em seguida, se transformarão em pró-monócitos e posteriormente em monócitos para poderem circular pelo sangue periférico, com conseqüente migração para os tecidos e transformação em macrófagos (GEISSMANN et al. 2010).

Esse processo de diferenciação de monócitos ocorre devido à ação de citocinas, como: interleucina-3 (IL-3) que aumenta a proliferação de células hematopoiéticas da linhagem mieloide; GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating fator) responsável por estimular a produção de granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e monócitos; além do M-CSF (macrophage colony-stimulating fator) considerado um fator de crescimento na diferenciação e sobrevivência de monócitos e macrófagos durante a hematopoese (GEISSMANN et al. 2010).

Alguns estudos mais recentes já comprovaram que os macrófagos residentes de tecidos não são apenas derivados de monócitos, pois esses fagócitos podem também ser originados no saco vitelínico durante o desenvolvimento embrionário (Figura 3) (WYNN et. al., 2013; VAROL et. al., 2015).

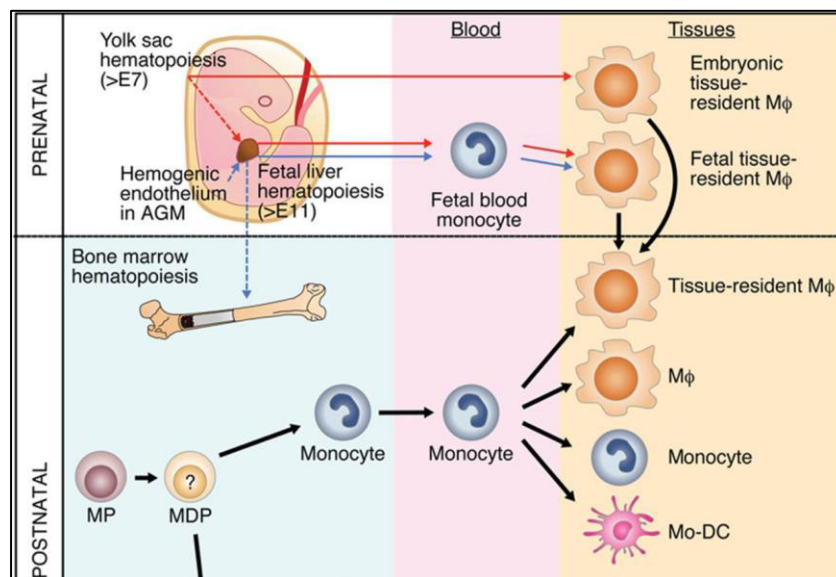
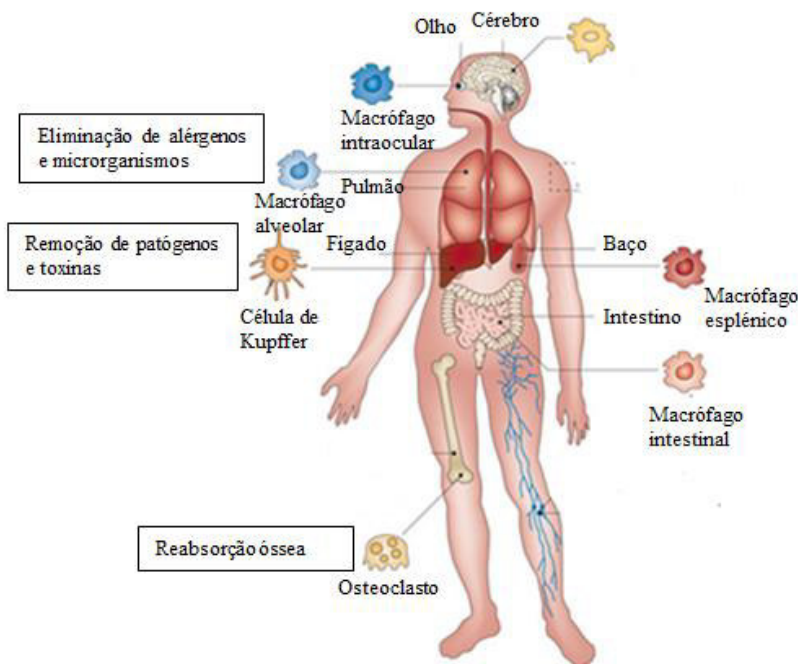


Figura 3. Desenvolvimento de macrófagos. A formação dos macrófagos se dá durante o desenvolvimento embrionário no saco vitelínico, constituindo a população de macrófagos residentes nos tecidos. Os monócitos circulantes do sangue originados a partir de células pluripotentes da medula óssea, também contribuem na formação da população de macrófagos residentes teciduais. Fonte: CYBULSKY et. al., 2016

2.4 Macrófagos Residentes

Os macrófagos, por sua vez, podem estar presentes em diferentes tecidos do organismo e por conta da sua característica plástica e heterogênea, desempenham funções onde estão relacionadas diretamente ao microambiente no qual se encontram. E dependendo do tecido onde essa população de fagócitos está presente, são denominados de diferentes formas (Figura 4) (VAROL et. al., 2015).



Nature Reviews | Immunology

Figura 4. Macrófagos residentes teciduais. Os macrófagos teciduais derivados do saco vitelínico ou monócitos têm como finalidade manter a homeostase nos órgãos através do processo de fagocitose, apresentação de antígeno e ativação da resposta imune adaptativa. Fonte: MURRAY e WYNN, 2011.

No fígado, a população de macrófagos é designada por células de Kupfer, que desempenham o papel de manutenção do órgão através da “limpeza” de patógenos e toxinas presentes, além de fazer parte da regeneração hepática após injúria, enquanto os macrófagos alveolares presentes no pulmão são responsáveis em eliminar partículas de poeira, alérgenos e microrganismos patogênicos (LAVIN et al., 2015).

Já as células de Langerhans (macrófagos presentes na pele) medeiam a imunovigilância. Os macrófagos dos ossos chamados de osteoclastos desempenham função na

reabsorção óssea. Os macrófagos intestinais reconhecem e removem bactérias entéricas, além de estarem envolvidos na tolerância à alimentos e homeostase frente a microbiota. No caso da microglia, macrófago presente no sistema nervoso central, desempenha papel de vigilância, remoção de debris celulares e fazem parte do desenvolvimento das redes neurais (LAVIN et al., 2015).

Assim, é perceptível que a função desses macrófagos residentes está adaptada aos tecidos onde estão presentes, garantindo a manutenção e homeostase (GINHOUX & JUNG, 2015).

2.5 Funções dos macrófagos

2.5.1 Reconhecimento de patógenos

Durante a infecção por patógenos aos tecidos, os macrófagos estão entre as principais células da resposta imune inata. O primeiro passo dessa resposta é o reconhecimento do microrganismo através de receptores de superfície (CHAWLA, 2010).

Os macrófagos apresentam diversos receptores de superfície chamados de receptores de reconhecimento padrão (*pattern-recognition receptors* - PRRs) e estes não estão presentes apenas na superfície celular, mas aparecem no citoplasma e endossoma dessas células. E dentre as principais famílias de receptores podemos destacar os *Toll-like* (TLR) (TAKEUCHI & AKIRA, 2010).

Os receptores da família *Toll* (Tabela 1) são distribuídos na membrana celular e endossoma. O reconhecimento por esses receptores é principalmente de padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular pattern* - PAMPs), que são componentes microbianos específicos de classes de patógenos, como bactérias, fungos, vírus e protozoários. Mas também podem reconhecer padrões moleculares associados ao dano celular (*damage-associated molecular pattern* - DAMPs), como HSP e HMBG1 via TLR 4 e 2, respectivamente (GORDON, 2002; KAWAI & AKIRA, 2010).

Quadro 1. Localização e antígenos que são reconhecidos por receptores *Toll*.

TLRs	Local	PAMPs
TLR2	Membrana celular	Peptidoglicano
TLR3	Endossoma	dsRNA viral
TLR4	Membrana celular	LPS
TLR5	Membrana celular	Flagelina
TLR6/TLR2	Membrana celular	Lipoproteínas, carboidratos
TLR7 e TLR8	Endossoma	ssRNA viral
TLR9	Endossoma	DNA

Após esse reconhecimento, é desencadeada uma série de sinais de transdução nos macrófagos que estimula a responderem de forma efetiva através da fagocitose e mecanismos microbicidas (KAWASAKI & KAWAI, 2014).

2.5.2 Fagocitose

A fagocitose é um processo característico dos macrófagos e de outros fagócitos, além de ser um dos principais mecanismos da resposta imune inata que se dá basicamente pela ingestão de partículas estranhas ou células mortas. A partir da etapa de reconhecimento inicial por receptores de superfície de PAMPs ou até mesmo de partículas opsonizadas por anticorpos ou componentes do sistema complemento, os macrófagos são estimulados a iniciarem o processo de fagocitose (RUSSEL et al., 2009).

A degradação da partícula estranha acontece através da formação de vacúolos a partir do momento em que é reconhecida, uma vez que ocorre a emissão de prolongamentos chamados de pseudópodes pelos macrófagos, a fim de envolver a partícula para internalização dentro do vacúolo fagocítico (fagossoma). Em seguida ocorre a fusão do fagossoma com lisossoma, que contém enzimas capazes de causar a degradação, além da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO) que resultam na morte do microrganismo (ERWIG & GOW, 2016)

Após esse processo, os peptídeos formados irão ser conduzidos pela molécula de MHC II até a superfície celular para que ocorra a apresentação de antígenos aos linfócitos T, sendo de suma importância na estimulação da resposta imune adaptativa (KAMBAYASHI & LAUFER, 2014).

Assim como o reconhecimento de patógenos pelos PRRs, a fagocitose por macrófagos resulta na liberação de mediadores inflamatórios, que incluem citocinas como IL-6, TNF- α e IL-12 que em conjunto podem induzir o aumento da resposta inflamatória. Mas vale lembrar que se faz necessário tal resposta ser seguida pela atividade anti-inflamatória para que haja equilíbrio direcionando a homeostase do hospedeiro (CHAWLA, 2010)

2.5.3 Relação com a imunidade adaptativa

Os macrófagos são caracterizados como células apresentadoras de antígenos (APCs) e no contexto da resposta inflamatória a patógenos, possuem papel fundamental na interação da resposta inata com a adaptativa (KAMBAYASHI & LAUFER, 2014).

No desenvolvimento de uma infecção, que corresponde ao início da resposta inflamatória, células presentes no sangue migram para o sítio infeccioso a fim de controlar e destruir o agente invasor, dentre estas se destacam os monócitos, que ao chegar ao foco da inflamação se diferenciam em macrófagos inflamatórios (GINHOUX & JUNG, 2015). Esses macrófagos reconhecem e fagocitam os patógenos, destruindo-os via produção de mediadores microbicidas, para promover a apresentação de antígenos aos linfócitos T (HUME, 2008).

Os peptídeos formados a partir da degradação do patógenos são expostos na superfície celular através da molécula de MHC de classe II, sendo reconhecidos por receptores específicos dos linfócitos T CD4 ou auxiliares, e via MHC de classe I por linfócito T CD8 ou citotóxicos (HOHL, 2015). A relação APC e linfócitos T é essencial para ativação e produção de citocinas, como INF- γ , que auxiliam no aumento da ativação microbicida dos macrófagos (HOHL, 2015).

2.5.4 Ativação de macrófagos

Os macrófagos quando ativados aumentam a sua atividade celular a fim de promover suas funções dependendo do microambiente no qual se encontram (CHAWLA, 2010).

A ativação dos macrófagos pode ser distinguida dependendo do estímulo ao qual são submetidos, uma vez que podem ser ativados por duas vias, a via clássica e a via alternativa. Os macrófagos ativados por essas vias apresentam diferenças quanto a sua definição e função, onde podem vir agir de forma conjunta para manutenção e homeostase do hospedeiro frente alguma infecção (ITALIANI & BORASCHI, 2014).

Os macrófagos ativados pela via clássica são denominados de macrófagos M1 e exercem papel fundamental na proteção contra agentes infecciosos e células tumorais, devido a sua alta produção de mediadores inflamatórios (MILLS, 2015). Esses macrófagos, quando estimulados com citocinas como INF- γ , TNF- α ou até mesmo lipopolissacarídeos (LPS), são direcionados à ativação clássica que é caracterizada pela secreção de citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12 e IL-23 e quimiocinas, como MCP-1 (MILLS, 2015). Células do fenótipo M1 também são capazes de produzir espécies reativas de oxigênio (EROs), bem como o óxido nítrico (NO) via metabolismo da L-arginina pela enzima iNOS, que culmina na alta atividade microbicida, além de serem capazes de promover a diferenciação de linfócitos T *naive* para o perfil Th1 (Figura 5) (MILLS & KLAUS, 2014).

A ativação alternativa dos macrófagos é definida como macrófagos M2, sendo caracterizados principalmente pela reparação de danos e remodelamento tecidual após atividade inflamatória. Este fenótipo também está relacionado a atividade imunossupressora e promoção do crescimento tumoral (MILLS & KLAUS, 2014).

Os estímulos relacionados a polarização dos macrófagos M2 são citocinas do tipo IL-4, IL-13, IL-10 ou padrões moleculares associados ao dano (DAMPs). Os macrófagos M2, por sua vez, liberam citocinas IL-10, TGF- β e as quimiocinas CCL-17 e CCL-22 (MURRAY et al., 2014; MILLS, 2015). E diferente dos macrófagos M1, esse fenótipo utiliza a L-arginina disponível via enzima arginase para produção de ornitinas e poliaminas que favorecem o aumento da remodelação do tecido (Figura 5) (RATH et al., 2014).

Outros fatores que diferenciam macrófagos M1 e M2 é quanto à expressão de marcadores de superfície, o fenótipo M1 apresenta aumento da expressão da molécula MHC de classe II, do marcador CD68 e de moléculas co-estimulatórias CD80/CD86, enquanto o

perfil M2 demonstra alta expressão para CD163 e do receptor de manose (CD206) (MILLS, 2015; CHÁVEZ-GALÁN et al. 2015).

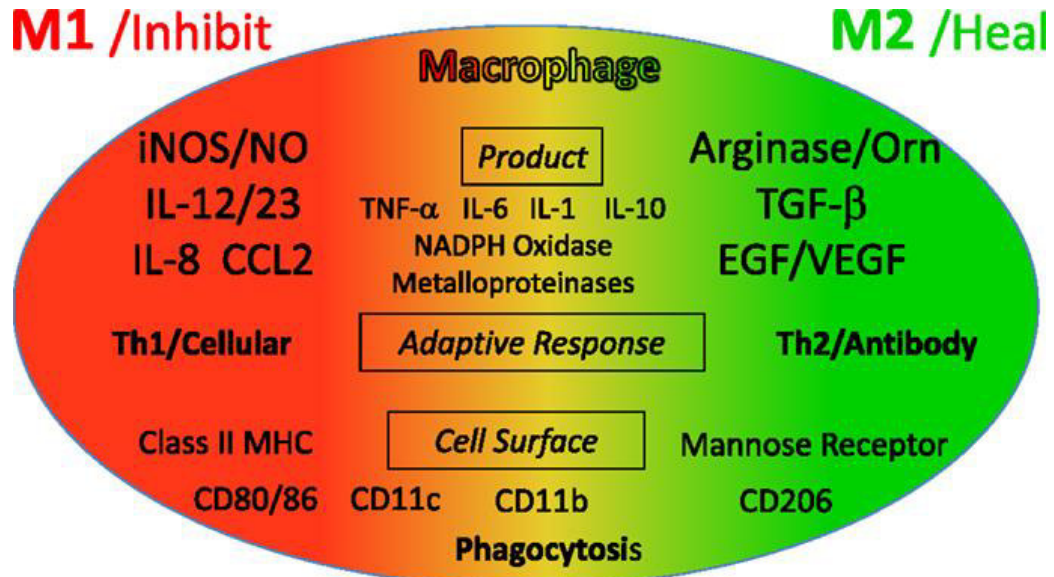


Figura 5. Macrófagos M1/M2. A polarização de macrófagos para M1/M2 apresenta diferenças quanto à expressão de moléculas, produção de citocinas, metabolização da arginina e indução da resposta mediada por células T. Fonte: MILLS, 2015

Vale ressaltar, que essas duas populações de macrófagos devem estar em equilíbrio para que mantenham a homeostase e proteção do organismo. Uma vez que ocorra o desequilíbrio, a atividade exacerbada por parte de macrófagos, M1 ou M2, pode direcionar ao desenvolvimento de doenças inflamatórias ou proporcionar imunossupressão do hospedeiro, respectivamente (LIU et al. 2014; MILLS, 2015; SICA et. al., 2015).

2.6 Relação de macrófagos M1 e M2 em patologias

Os macrófagos podem estar relacionados ao desenvolvimento das mais diversas patologias. O microambiente é um fator crucial na ativação e consequente polarização desses macrófagos para o perfil M1 ou M2, que por sua vez podem promover o desenvolvimento de doenças devido à atividade exacerbada desses fenótipos (CASSETTA, et. al., 2011).

Na aterosclerose, uma doença inflamatória cardiovascular crônica, os monócitos e macrófagos possuem papel fundamental no desenvolvimento dessa enfermidade, uma vez que promovem a resposta inflamatória na placa aterosclerótica (LIU et al., 2015).

A placa aterosclerótica é formada a partir da disfunção de células endoteliais da parede arterial que secretam diversas quimiocinas, assim causando a migração de monócitos que se diferenciam em macrófagos M1. Esse processo culmina na digestão e consequente acumulação de lipídios nesses fagócitos da parede vascular, além da secreção de citocinas pró-inflamatórias, assim causando as primeiras lesões ao coração que pode resultar em ataque cardíaco (MANTOVAN et. al., 2009; LIU et al., 2015).

No câncer, os macrófagos M2 que estão relacionados a promoção da tumorigênese e favorecimento de metástase, são denominados de macrófagos associados a tumores (TAMs). Os monócitos circulantes são recrutados para o microambiente tumoral via secreção de citocinas e quimiocinas pelas próprias células tumorais, a fim de promoverem a diferenciação em macrófagos M2 (QIAN & POLLARD, 2010).

Nas primeiras fases do desenvolvimento do tumor, os macrófagos presentes podem adquirir o perfil M1 de forma que inibe a angiogênese, além de produzir mediadores como NO que induzem a morte das células tumorais e desviam a resposta imune adaptativa para o perfil Th1. No entanto, esses macrófagos M1 podem posteriormente polarizarem para o perfil M2 por conta da influência de estímulos, por exemplo, a ação da citocina IL-10, presentes no microambiente tumoral (KOMOHARA et. al., 2014).

Vale ressaltar que macrófagos M1 e M2 também estão envolvidos na cura ou progressão de doenças infecciosas causadas por parasitos, nesse caso destaco a importância dessas células na Leishmaniose Cutânea (MILLS, 2015)

2.7 Leishmaniose Cutânea

A Leishmaniose Cutânea (LC) é uma doença infecciosa causada por parasitos do gênero *Leishmania*, considerada uma antropozoonose, não contagiosa, sendo necessária a presença de um vetor para que haja a transmissão. As lesões geralmente aparecem no local onde ocorreu o inoculo do protozoário, seguido de uma vermelhidão na pele por uma pápula que úlcera e expande a uma lesão em forma de cratera ou evolui em forma nodular (OPS, 2013).

Estima-se que cerca de 88 países do mundo dos quatro continentes (Europa, Ásia, África e Américas) são acometidos por tal doença, com ocorrência principalmente em países de região tropical. As principais espécies de *Leishmania* que causam LC nas Américas são a *L. brasiliensis*, *L. mexicana* e *L. amazonensis* (WHO, 2015).

No Brasil, a Leishmaniose Cutânea atinge todos os estados brasileiros, sendo considerado um importante problema de saúde pública, com ampla distribuição e concentração de casos em algumas regiões (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Nos estados de Pernambuco (ARAÚJO, 2014), São Paulo (CARLOS et. al., 2015), Amazonas (REIS et. al, 2013), Rio de Janeiro (AGUIAR et al., 2014) e Maranhão (COELHO-NETO et. al., 2012) a consequência de tantos casos é em decorrência da contínua atividade antrópica em locais silvestres do ciclo de transmissão entre os hospedeiros vertebrados selvagens e o flebotomíneo vetor do protozoário, e devido a adaptação do díptera em áreas de ambiente peridoméstico onde há participação de animais domésticos como reservatórios (NEGRÃO & FERREIRA, 2014).

No entanto, a capacidade de subversão e virulência do parasito a resposta imune do indivíduo infectado, também pode ser um fator considerado na persistência da doença que culmina no aumento de registros epidemiológicos.

2.8 Aspectos biológicos da *Leishmania*

Os parasitos do gênero *Leishmania* pertencem à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. Cerca de 20 espécies são patogênicas ao homem e apresentam ciclo de vida heteroxênico (alternância entre hospedeiros vertebrados e insetos vetores). As duas principais formas mais estudadas do parasito são a amastigota, aflagelada e forma intracelular presente no interior de células fagocíticas; e a promastigota, forma flagelada e infectante transmitida pelo vetor (ALEMAYEHU & ALEMAYEHU, 2017).

O ciclo de transmissão se dá basicamente da seguinte forma, a fêmea do flebotomíneo durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado ingere células fagocíticas parasitadas. As células são rompidas, assim liberando a forma amastigota que posteriormente se diferencia em promastigota no intestino do invertebrado. Em seguida, as promastigotas migram para a

proboscíde do vetor, e quando houver outro repasto sanguíneo um novo indivíduo será infectado (ALEMAYEHU & ALEMAYEHU, 2017)

Diferentes espécies de *Leishmania* podem causar a Leishmaniose Cutânea, no entanto a doença não é restringida apenas a lesões na pele. As mucosas também podem ser atingidas, sendo assim caracterizada como Leishmaniose Mucocutânea, pois dependendo do tipo de espécie que o indivíduo foi infectado pode vir a apresentar diferentes manifestações clínicas (OPS, 2013).

Dessa forma, destaco os fatores que influenciam diretamente nesses casos, sejam pela resistência aos fármacos, mecanismos de evasão da resposta imune e/ou proteínas presentes na membrana do parasito que induzem a progressão e persistência da infecção.

2.9 Fatores de evasão da resposta imune por *Leishmania*

Existem muitos fatores de virulência relacionados aos parasitos do gênero *Leishmania*. A capacidade inicial de evadir da resposta imune extracelular ou por alterações na membrana da promastigota, que impede a ligação do sistema complemento C5b ao protozoário dificultando a formação do complexo MAC. Assim como, aumento da expressão da molécula gp63 que cliva C3b, causando sua inativação e impedindo também a formação de MAC. O processo de opsonização é dificultado pelo parasito e consequentemente facilita a entrada do mesmo ao interior da célula-alvo para iniciar o processo de infecção intracelular (ZAND & NARASU, 2012; GURUNG & KANNEGANTI, 2015).

O parasito já dentro da célula inicia o processo de diferenciação para forma amastigota, a molécula chamada de lipofosfoglicano presente na membrana é responsável de inibir a fusão do fagossomo ao lisossomo que contem enzimas proteolíticas capazes de causar a degradação do protozoário (ZAND & NARASU, 2012). Assim, formando vacúolos parasitóforos que permitem a multiplicação da *Leishmania* na sua forma amastigota, que ocasiona posteriormente a lise do fagócito, liberando os parasitos para que possam infectar outras células. No entanto, a gp63 também é responsável de inibir a ação das enzimas presentes no lisossomo caso ocorra à formação do fagolisossomo ((PODINOVSKAIA & DESCOTEAUX, 2015)

A forma amastigota também consegue evadir da ação de mediadores microbicidas como o óxido nítrico, sendo este um dos principais agentes leishmanicidas. Essa inibição

ocorre via produção de enzimas como catalase e superóxido dismutase que asseguram proteção contra a explosão oxidativa exercida por macrófagos frente à infecção (VAN ASSCHE et al., 2011). Além disso, também pode inativar a proteína quinase C, onde a mesma está relacionada a regulação da atividade microbicida de fagócitos através da geração de espécies reativas de oxigênio (NATHAN & SHILOH, 2000)

2.10 Macrófagos M1 e M2 na resposta a infecção por *Leishmania spp.*

No contexto da resposta à infecção por *Leishmania spp.*, destacam-se os macrófagos que tem como função reconhecer e eliminar o agente infeccioso através da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. E essas células quando estimuladas por citocinas inflamatórias como IFN- γ e TNF- α , atuam de modo sinérgico na sua ativação e polarização para o perfil M1. A atividade leishmanicida é pontencializada por meio da produção de óxido nítrico (NO) que leva à morte do parasito intracelular da célula hospedeira e de outras infectadas adjacentes, devido à capacidade do NO difundir através das membranas celulares (SCOTT & NOVAIS, 2016).

Em estudo relacionado à Leishmaniose Visceral, demonstrou-se que no sobrendante de culturas *in vitro* de macrófagos oriundos dos linfonodos de cães infectados pelo parasito, houve baixa atividade de arginase, enquanto para óxido nítrico e prostaglandina maiores concentrações, sugerindo a predominância de macrófagos M1 na resposta imune e conseqüentemente o aumento da citocina inflamatória TNF- α (VENTURIN et al., 2016)

Outras pesquisas apontam o papel desse perfil de macrófagos na Leishmaniose Cutânea. Pela participação do receptor ativado por proliferador de peroxisoma (*Peroxisome proliferator-activated receptor* – PPRA) na polarização de macrófagos infectados por *L. mexicana*. Onde a inibição desse receptor com antagonistas, nesse caso em específico para PPRA- γ , induz a polarização de macrófagos para o fenótipo M1 com conseqüente redução na carga parasitária, devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio que culminou na maior atividade microbicida (DÍAZ-GANDARILLA et al., 2013).

Assim como produtos oriundos de animais também podem induzir a polarização de macrófagos e melhorar a resposta na infecção por *Leishmania*, exemplo disso é o uso da crotoxina. O principal componente encontrado no veneno da espécie de serpente *Crotalus*

durissus terrificus, é capaz de polarizar macrófagos infectados por *L. amazonensis* para o perfil M1, pelo aumento da atividade fagocítica; produção de óxido nítrico e citocinas inflamatórias; redução de parasitas no interior da célula e mudanças morfológicas características desse fenótipo (FARIAS et al., 2017)

Já os macrófagos ativados pela via alternativa (M2) quando infectados pelo parasito promovem a progressão da infecção. Devido à produção de ornitinas e poliaminas, que são produtos característicos desse fenótipo pela metabolização da arginina via arginase, sendo utilizados como substrato para benefício próprio no crescimento e proliferação pelo parasito intracelular (LIU & UZONNA, 2012).

Segundo Moreira e colaboradores, 2016, cães com Leishmaniose Visceral apresentam um predomínio da população de macrófagos M2 em granulomas e infiltrados inflamatórios de amostras da pele, linfonodo e baço. Dessa forma, destacam que a alta carga parasitária para *Leishmania infatum* está relacionada com a maior proporção desse perfil celular nos cães.

E em relação à mesma doença, nesse caso em humanos, os resultados não são diferentes. Pacientes na Índia que tiveram calazar e após tratamento apresentaram sequelas na pele (lesões dérmicas crônicas), possuem uma maior população de monócitos/macrófagos que tendem ao perfil M2, pela menor expressão de TLR2/4 e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio; aumento da expressão de mRNA para esse fenótipo e marcadores 206, ARG1 (arginase 1) (MUKHOPADHYAY et al., 2015)

Em 2000, Mills e colaboradores, já mencionavam que fatores de resistência e susceptibilidade a infecção por *Leishmania* em modelos animais não estavam apenas relacionados ao padrão de respostas por células T, mas populações de macrófagos M1 e M2 também eram mediadores relacionados a esse contexto. Por exemplo, a resistência de camundongos C57BL/6 poderia estar relacionado a predominância de macrófagos M1 e linfócitos Th1, enquanto a suscetibilidade de camundongos Balb/c era em decorrência da maior população de macrófagos M2 e linfócitos Th2.

Mills (2015) em sua relevante revisão sobre o papel destas células na leishmaniose, sugeriu que as respostas de macrófagos M1 estão ligadas a intensa produção de IL-12 e IL-8, bem como da proteína quimioatratante de monócitos (CCL2/MCP-1) e aumento da expressão de moléculas de superfície celular CD80 ou 86. Já as células M2 estão associadas à secreção de TGF- β (fator de crescimento tumoral beta) e à produção dos fatores de crescimentos, por

exemplo, o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) ou EGF (fator de crescimento epidermal), e maior expressão de CD163 ou 206 na superfície da célula, amplificando assim respostas com perfil Th2.

E quando se trata da resposta imune para *Leishmania amazonensis*, espécie responsável pela Leishmaniose Cutânea (LC), apresenta um perfil fora do comum, para o padrão mediado por linfócitos Th1/Th2 quando comparado com as espécies presentes na Eurásia e África, o que dificulta os estudos para tratamento e controle da LC (BOGGIATTO et al., 2009). Segundo Soog (2012), o controle da infecção por *L. amazonensis* ainda é muito controverso, pois assim como em humanos, camundongos infectados por este parasito apresentam uma resposta atenuada e mista do perfil Th1/Th2, onde vale ressaltar que estes perfis de resposta mediados por células T estão diretamente relacionados a polarização de macrófagos para perfis “clássicos” (M1) ou “alternativos” (M2), respectivamente (MILLS & LEY, 2014).

Apesar destes macrófagos por muitas vezes serem relacionados como pró e anti-inflamatórios (M1 e M2), muitos autores chamam atenção para a “plasticidade” que podem apresentar frente às infecções por protozoários. Nesse caso, a capacidade da *Leishmania* em subverter e modular a resposta dessas células a seu benefício próprio abre espaço para mais pesquisas a respeito das populações de macrófagos M1 e M2, no que se refere às infecções como a Leishmaniose Cutânea (RAES et al., 2007; CASSETTA et al., 2011; SICA et al., 2015).

Dessa forma, visamos investigar se a infecção por *L. amazonensis* pode ser capaz de reverter a polarização de macrófagos M1 para o perfil M2, assim causando o agravamento da doença em virtude do microambiente favorável a proliferação e estabelecimento do parasito nestas células infectadas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a polarização de macrófagos M1/M2, no contexto da infecção por *L. amazonensis*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a predisposição de diferentes fenótipos de macrófagos na infecção por *L. amazonensis*;

- Avaliar a resposta microbicida de macrófagos polarizados infectados por *Leishmania amazonensis* via produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio quando tratados ou não com aminoguanidina

- Verificar a viabilidade das amastigotas, após infecção de macrófagos

- Avaliar a capacidade da infecção por *Leishmania amazonensis* em alterar o perfil de citocinas produzidas por macrófagos polarizados;

- Verificar a capacidade do parasito em alterar a expressão de marcadores celulares das populações de macrófagos durante a infecção.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo de *Leishmania amazonensis*

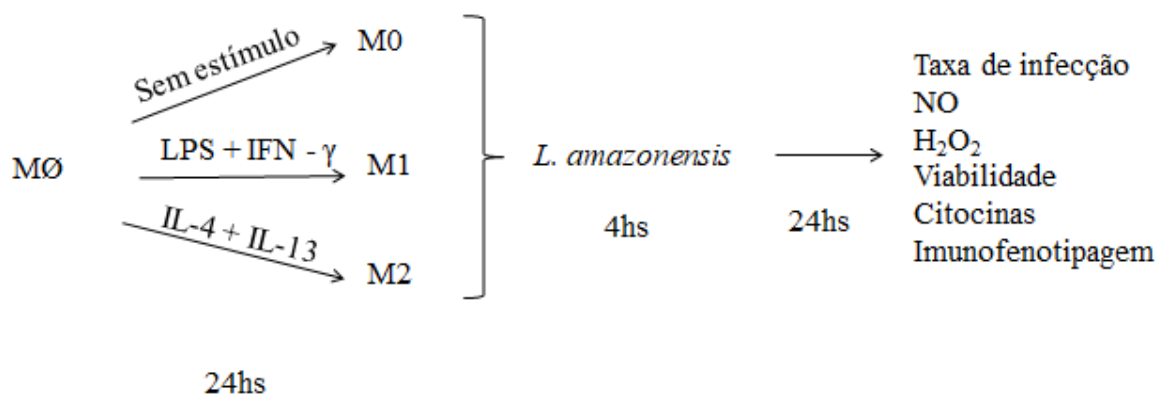
As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/1987/BA-125) foram cultivadas no Laboratório de Imunofisiologia (UFMA) em garrafas para cultura estéreis contendo meio Schneider (SIGMA), gentamicina (50 µg/mL) e suplementado com Soro Fetal Bovino (GIBCO) 10%, sendo acondicionadas em câmara de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) à 27°C.

4.2 Cultura de macrófagos RAW 264.7

Os macrófagos de linhagem murina RAW 264.7 (doados pelo Laboratório de Imunologia Aplicada – Rio de Janeiro) foram mantidos em garrafas de cultivo celular estéreis com meio RMPI-1640 (SIGMA) contendo penicilina (100 µg/mL), estreptomicina (100 U/mL), anfotericina B (0,25 µg/mL) e suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) em estufa a 5% de CO₂ à 37 °C.

4.3 Delineamento experimental

Segue abaixo um esquema do delineamento experimental do presente estudo:



4.4 Polarização de macrófagos RAW 264.7

Para realização da polarização dos macrófagos, utilizou-se 1×10^6 /mL de células em meio RPMI-1640 suplementado a 1% com SFB. As células foram adicionadas num volume de 100 μ L por poço em placa de 96 poços de fundo chato ou 1×10^5 em 500 μ L/poço para placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro de 13mm. Em seguida os macrófagos foram acondicionados por 1 hora em estufa de CO₂ a 5% para aderência ao fundo da placa ou lamínula.

Após esse período, os macrófagos foram submetidos a estímulos específicos para polarização de cada fenótipo. Nesse caso, para o M1 foram utilizados LPS (*Escherichia coli* – Sigma) (2000 ng/mL) e IFN- γ (PeproTech) (100 ng/mL), enquanto para M2, IL-4 (PeproTech) (400 ng/mL) e IL-13 (PeproTech) (200 ng/mL). Além disso, vale ressaltar que no ensaio, macrófagos que não receberam estímulo foram denominados como M0. Em seguida, as células novamente foram incubadas em estufa por um período de 24h antes de serem utilizados para os ensaios posteriores (YING et al., 2013)

4.5 Infecção dos Macrófagos

Estabelecidos os grupos de macrófagos M0, M1 e M2 após a indução da polarização para cada perfil, as células foram co-incubadas com promastigotas de *Leishmania amazonensis* na proporção de um macrófago para dez parasitos (1:10) por 4 horas em estufa a 5% de CO₂ à 37 °C. Em seguida, os poços foram lavados com meio RPMI-1640 para remoção dos parasitos extracelulares e meio RPMI foi resposto para novamente os fagócitos serem incubados em estufa por 24h para realização dos próximos ensaios.

4.6 Avaliação da taxa de infecção

Após o período de infecção por *L. amazonensis* dos macrófagos polarizados e infectados em placas de 24 poços. As lamínulas foram retiradas, lavadas com PBS estéril e coradas pelo kit Instant-Prov®, para análise em microscópio óptico com óleo de imersão na objetiva de 100x. A contagem foi de 100 macrófagos por campo e da quantidade de amastigotas presentes no citoplasma dos macrófagos infectados, para calcular-se a taxa de infecção com a seguinte fórmula (PATRÍCIO, 2011).

$$\text{Taxa de infecção} = \% \text{ de macrófagos infectados} \times \frac{\text{n}^\circ \text{ de amastigotas}}{\text{n}^\circ \text{ total de macrófagos}}$$

4.7 Dosagem e Inibição de Óxido Nítrico

A dosagem de óxido nítrico foi realizada em dois momentos nos ensaios. Após a polarização dos macrófagos para o perfil M1 e M2, enquanto o segundo foi após a infecção. Dessa forma, foram transferidos 50µL do sobrenadante da cultura e adicionado mais 50 µL do reagente de Griess em placa de 96 poços para ser incubada por 10 minutos ao abrigo da luz. A leitura da absorbância foi realizada por espectrofotômetro a 540nm (DING et al., 1988). E os valores obtidos foram analisados com base numa curva de concentração.

Para avaliar a influência do óxido nítrico na infecção de macrófagos, foi realizada a inibição da sua produção via tratamento por aminoguanidina (1mM), nos momentos de indução da polarização e infecção pelo parasito (PEREIRA, 2015)

4.8 Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio

A avaliação da produção de peróxido de hidrogênio foi realizada pelo uso do marcador chamado dihidrorodamina 123 (DHR) (Sigma Aldrich).

Para o ensaio foram adicionados 100µL de PBS (*phosphate buffered saline* – tampão fosfato-salino) na placa de cultura que continha os macrófagos. Em seguida foram definidos os seguintes grupos: DHR (macrófagos marcados com DHR (375ng/mL)) e PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*) + DHR (macrófagos estimulados com PMA (50 nM) por 1h antes da marcação para DHR). Após a adição do DHR foi necessária a incubação em estufa a 37°C por 10min. A leitura foi realizada por citômetro de fluxo *Guava® easyCyte* (CHEN & JUNGER, 2012)

4.10 Recuperação e avaliação da viabilidade de amastigotas dos macrófagos

Após o tempo de infecção dos macrófagos, o meio foi removido da placa de cultura de 96 poços para adição de PBS (contendo SDS 0,05%) num volume de 20µL. A placa foi

agitada por 30 segundos para lise dos macrófagos (M0, M1 e M2) e liberação das amastigotas. Em seguida, foram adicionados 180µL de PBS as amastigotas recuperadas para serem transferidas para uma placa de 96 poços de fundo U (JAIN et al., 2012).

A placa foi centrifugada a 3000 rpm/10 min/ 8°C. Após centrifugação foram ressuspenas em 100µL do tampão de ligação 1X do Kit FITC Annexin V Apoptosis Detetction (BD biosciences). Foi adicionado 2µL de Anexina V e 5µL de iodeto de propídio para serem incubadas por 15min ao abrigo da luz VAN GENDEREN et al., 2006).

A análise das marcações para apoptose e necrose das amastigotas foi realizada por citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Os dados foram analisados pelo programa Flow Jow®

4.11 Quantificação de citocinas

A quantificação de citocinas foi realizada pela técnica de CBA (*cytometric beads array*) a partir do sobrenadante das culturas, sendo utilizado *kit inflammatory mouse IL-6, IL-10, MCP-1, IFN-γ, TNF-α, IL-12p70* BD Biosciences (San Jose, CA, USA). Os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

A leitura das amostras foi realizada no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Após a leitura, os dados foram analisados no software Flow Jow®, onde os valores foram expressos em pg/mL para cada citocina.

4.12 Imunofenotipagem

Para realização dos ensaios de caracterização fenotípica foram cultivados 2×10^5 /200µL de macrófagos RAW 264.7, para em seguida serem submetidos à etapa de indução da polarização (item 4.2) e infecção por *L. amazonensis* (item 4.4). Os macrófagos foram desprendidos do fundo da placa com 200µL de PBS 1x gelado (EDTA 10mM). Em seguida as células foram transferidas para placa de 96poços de fundo U redondo e centrifugadas a 1300 rpm; 4°C durante 3 min. Após centrifugação o sobrendante foi descartado e adicionou-se 200µL de PBSA 1% (PBS 1x mais BSA 1%) ao *pellet* formado para ser lavado por duas vezes.

Após esses procedimentos foi adicionado aos poços 50 μ L do anticorpo Fc Block (BD Cat 553142) em 100 μ L de PBSA 1% em todos os poços para incubar por 15 min a 4°C. Adicionou-se 150 μ L de PBSA 1% e foi feita centrifugação das células a 1300 rpm; 4°C durante 3 min.

O sobrenadante foi descartado novamente e o *pellet* desprendido para ser incubado durante 20 min ao abrigo da luz a 4°C com 100 μ L do mix de anticorpos de superfície para marcação dos macrófagos M1 e M2. Foram utilizados os anticorpos anti-CD86, anti-CD80 e anti-F4/80 (BD Pharmingen).

Passado o período de incubação foi adicionado mais 100 μ L de PBSA 1% para o *pellet* ser centrifugado por mais duas vezes (1300 rpm / 4°C / 3 min). Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% e incubadas por 15 min a 4°C ao abrigo da luz, para em seguida serem novamente lavadas por mais duas vezes com PBSA 1%.

A marcação intracelular NOS2 (BD Pharmingen) foi realizada após as etapas acima, uma vez que as células foram lavadas por duas vezes com PERM/WASH 1x para serem incubadas por 20 min a 4°C no escuro.

Em seguida o sobrenadante foi descartado e as células incubadas com 100 μ L de anti-iNOS por 20 min a 4°C ao abrigo da luz. Após essa etapa foi realizada mais duas lavagens com PERM/WASH 1x (1300 rpm / 4°C / 3 min), para ressuspender o *pellet* em 150 μ L de PBSA 1%.

Os macrófagos foram transferidos para tubos de leitura de FACS para a avaliação da expressão dos marcadores por citometria de fluxo, utilizando o aparelho FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Os dados foram analisados pelo programa Flow Jow®

4.13 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc.). O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para averiguar a normalidade dos dados. Em seguida, realizou-se ANOVA com pós-teste de Bonferroni e Correlação de Pearson para variáveis paramétricas ou o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste Duns para variáveis não paramétricas. Em todos os casos, os resultados foram considerados significantes quando, $p < 0,05$. Os dados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão.

5 RESULTADOS

5.1 A infecção por *L. amazonensis* é maior em macrófagos M1

Para controle da infecção por *Leishmania* se faz necessário à fagocitose e eliminação do parasito intracelular, assim verificamos o comportamento de macrófagos M0, M1 e M2 infectados por *L. amazonensis*. Os resultados demonstram que em macrófagos M1 há menor percentual de promastigotas extracelulares em relação ao M0 (Figura 6A), enquanto na análise em microscópio óptico, para inferência da taxa de infecção, conforme fórmula citada anteriormente. A população M1 apresenta aumento na taxa de infecção (Figura 6B) com maior presença de amastigotas (Figura 6C, 7C e D) quando comparada ao M0 e M2. No entanto, os macrófagos M2 (Figura 6B, 7E e F) apresentaram aumento na taxa de infecção somente em relação ao grupo M0.

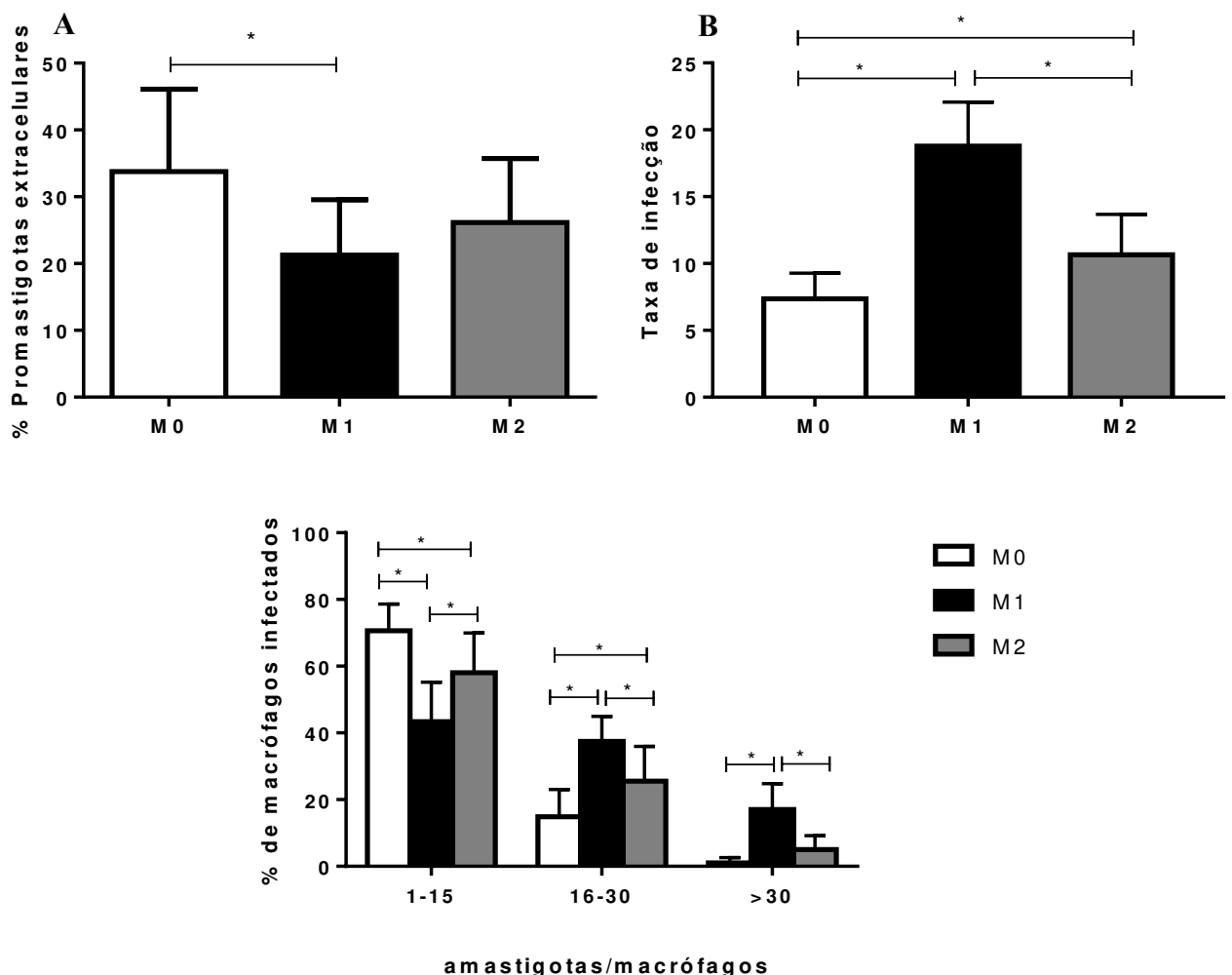


Figura 6. Infecção de macrófagos M0, M1 e M2 por *L. amazonensis*. Taxa de infecção de macrófagos RAW 264.7 (1×10^5) não polarizados (M0) e previamente polarizados com LPS (2000 ng/mL) e IFN- γ (100 ng/mL) para M1 e IL-4 (400 ng/mL) e IL-13 (200 ng/mL) para M2 que posteriormente foram infectados por *L. amazonensis* (1×10^6). (A) Percentual de promastigotas extracelulares após 4 horas de co-incubação com os macrófagos. (B) Taxa de infecção de macrófagos após 24hs de infecção. (C) Estratificação do número de amastigotas por macrófagos. Os dados são apresentados (media \pm o desvio padrão da média) sendo considerados significantes com $p < 0,05$ *(Teste One-way ANOVA com pós-teste Bonferroni).

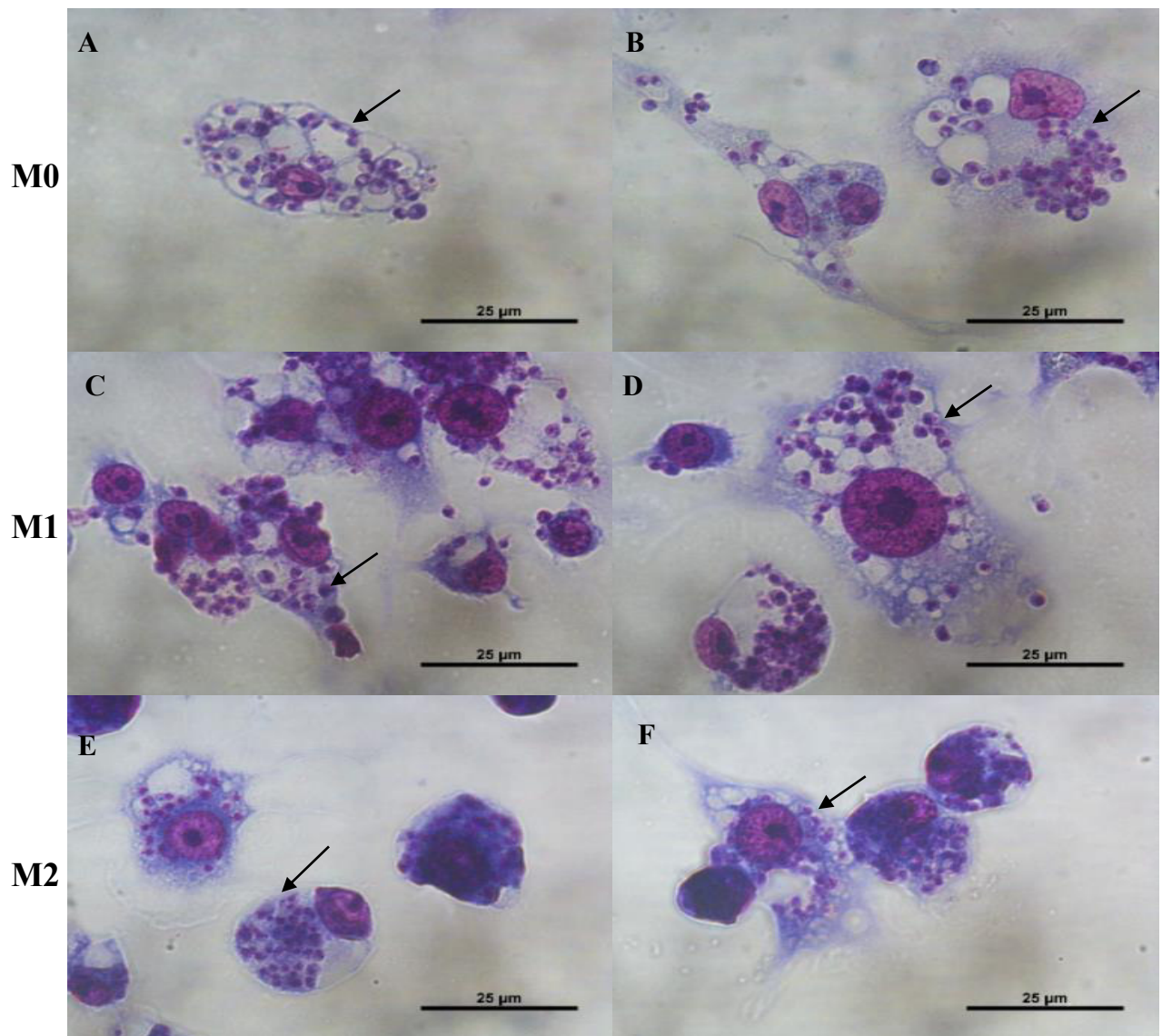


Figura 7. Avaliação microscópica de macrófagos M0, M1 e M2 infectados por *L. amazonensis*. Macrófagos RAW 264.7 (1×10^5) não polarizados (M0) e previamente polarizados (M1 e M2) infectados por *L. amazonensis* avaliados em microscópio óptico com câmera acoplada em objetiva de 40x e 100x. M0 (Fig. 7A e 7B), M1 (Fig. 7C e 7D) e M2 (Fig. 7E e 7F). As setas indicam amastigotas.

5.2 A produção de óxido nítrico aumenta em macrófagos M1 infectados por *L. amazonensis*

Logo após infecção pelo parasito, os macrófagos são dotados de mecanismos leishmanicidas que podem levar ou não a morte do parasito, dentre eles destaco a produção de óxido nítrico. E em nosso estudo, os macrófagos M1 infectados por *L. amazonensis* obtiveram maior produção de NO que os grupos M0 e M2 também infectados (Figura 8). Ainda, quando é feita a comparação entre M1 que não foi submetido à infecção, é evidente a maior produção da população M1 infectada (Figura 8).

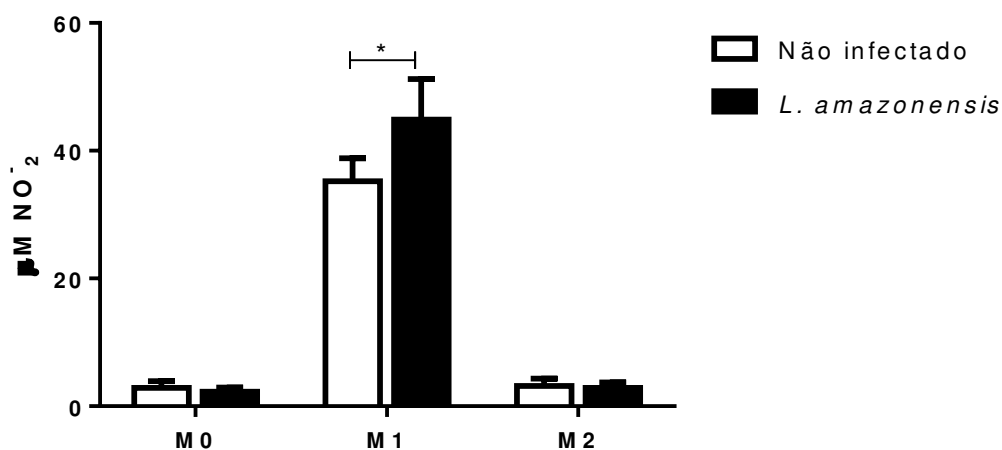


Figura 8. Avaliação da produção de óxido nítrico de macrófagos M0, M1 e M2 infectados por *L. amazonensis*. Produção de óxido nítrico de RAW 264.7 (1×10^5) não polarizados (M0) e previamente polarizados com LPS (2000 ng/mL) e IFN- γ (100 ng/mL) para M1 e IL-4 (400 ng/mL) e IL-13 (200 ng/mL) para M2 que posteriormente foram infectados por *L. amazonensis* (1×10^6). Os dados são apresentados como média \pm o desvio padrão da média, sendo considerados significantes com $p < 0,05$ * (Teste Two-way ANOVA com pós teste Bonferroni).

5.3 Alta produção de NO aumenta a taxa de infecção de macrófagos M1

Podendo haver uma possível relação entre o aumento da taxa de infecção com a superprodução de óxido nítrico por macrófagos M1. Verificamos que os resultados abaixo demonstram uma correlação crescente entre esses dois parâmetros do nosso estudo para o grupo M1 (Figura 9B).

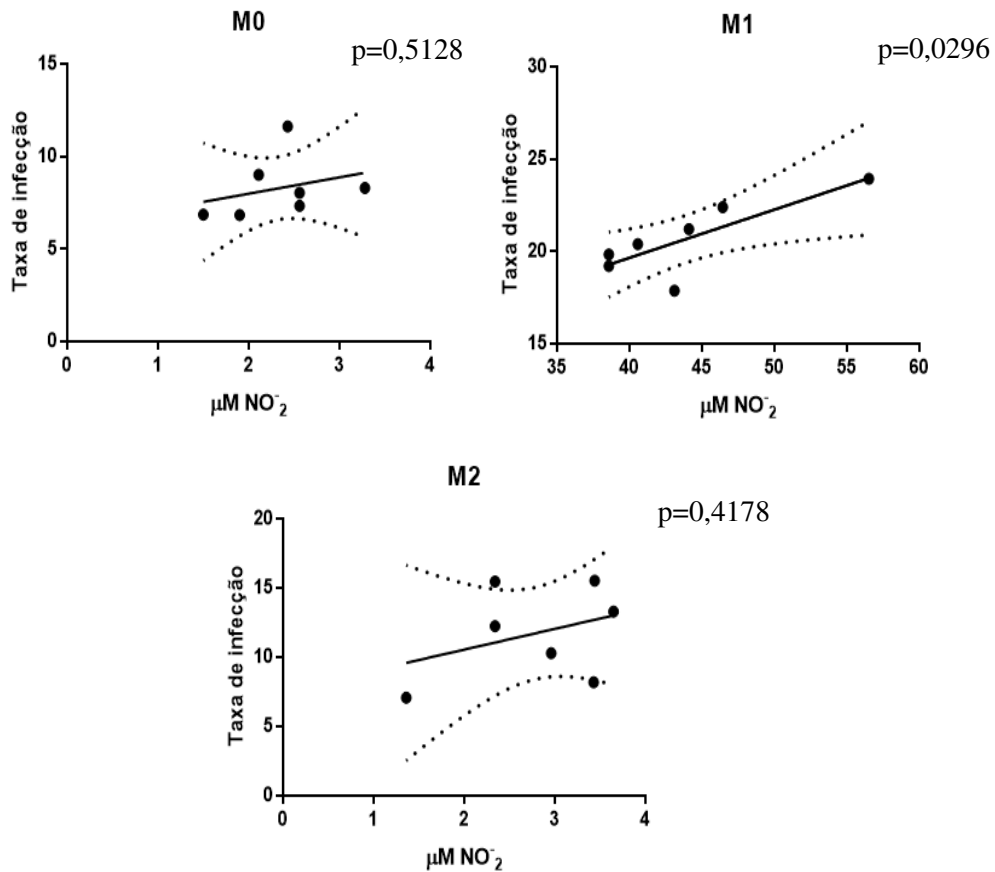


Figura 9. Correlação entre a taxa de infecção e produção de óxido nítrico de macrófagos M0, M1 e M2 infectados por *L. amazonensis*. A produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7 (1×10^5) não polarizados (M0) e previamente polarizados com LPS (2000 ng/mL) e IFN- γ (100 ng/mL) para M1 e IL-4 (400 ng/mL) e IL-13 (200 ng/mL) para M2 que posteriormente foram infectados por *L. amazonensis* (1×10^6), correlacionado com a taxa de infecção pelo parasito. Os dados apresentados são considerados significantes com $p < 0,05$ (Teste Correlação de Pearson).

5.4 Inibição na produção de NO reduz taxa de infecção por *L. amazonensis*

Visto que há uma possível influencia da produção de óxido nítrico na taxa de infecção em macrófagos M1. Fomos avaliar se inibindo esse mediador, refletia na infecção desses fagócitos. Os macrófagos que receberam tratamento com aminoguanidina (Ag) apresentaram redução na taxa de infecção. Tal redução foi observada entre todos os grupos (Figura 10).

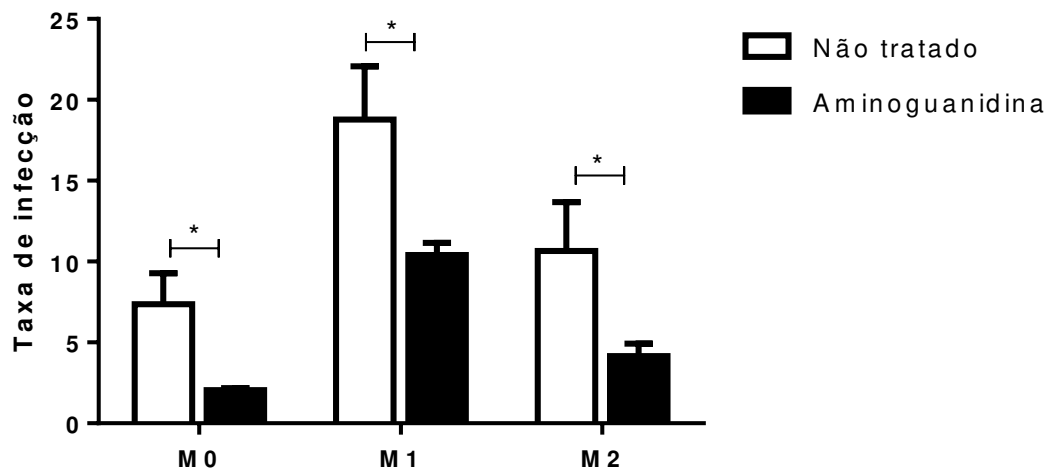


Figura 10. Taxa de infecção de macrófagos tratados com aminoguanidina. Macrófagos RAW 264.7 (1×10^5) não polarizados (M0) e previamente polarizados com LPS (2000 ng/mL) e IFN- γ (100 ng/mL) para M1 e IL-4 (400 ng/mL) e IL-13 (200 ng/mL) para M2 que posteriormente foram infectados com *L. amazonensis* (1×10^6), sendo tratados ou não com aminoguanidina (1mM) durante as 24h de infecção. Os dados são apresentados como média \pm o desvio padrão da média, sendo considerados significantes com $p < 0,05$ * (Teste Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni).

5.5 Macrófagos M1 apresentam redução na produção de peróxido de hidrogênio

Além do óxido nítrico, outros mediadores leishmanicidas são as espécies reativas de oxigênio produzidas por macrófagos. Dessa forma, avaliamos a produção de peróxido de hidrogênio, uma vez que, as populações de macrófagos M1 (infectados ou não pelo parasito) apresentaram redução na produção de H_2O_2 até mesmo quando estimulados com PMA. Diferentemente dos macrófagos M0 e M2 que apresentaram aumento na produção desse mediador (Figura 11).

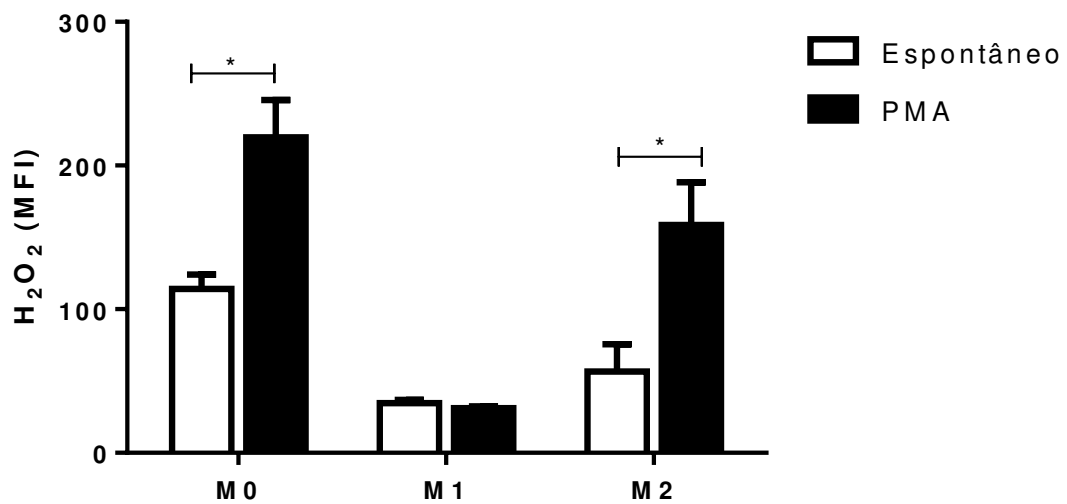


Figura 11. Produção de H_2O_2 por macrófagos M0, M1 e M2. A avaliação da produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos RAW 264.7 (1×10^5) não polarizados (M0) e previamente polarizados com LPS (2000 ng/mL) e IFN- γ (100 ng/mL) para M1 e IL-4 (400 ng/mL) e IL-13 (200 ng/mL) para M2 que posteriormente foram infectados por *L. amazonensis* (1×10^6) via marcação com DHR. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão, sendo considerados significantes com $p < 0,05$ *(Teste One-way ANOVA com pós-teste Bonferroni).

5.6 A inibição de NO induz aumento na morte de *L. amazonensis*

Para de fato averiguar a influência da produção de óxido nítrico na infecção de macrófagos, fomos investigar a viabilidade das amastigotas recuperadas, visto que, há diferença quanto a todos os perfis de macrófagos. Os grupos M0, M1 e M2 que não foram submetidos ao tratamento para inibição de NO, apresentam menor porcentagem de apoptose para o parasito quando comparado àqueles que receberam aminoguanidina (Ag) (Figura 12).

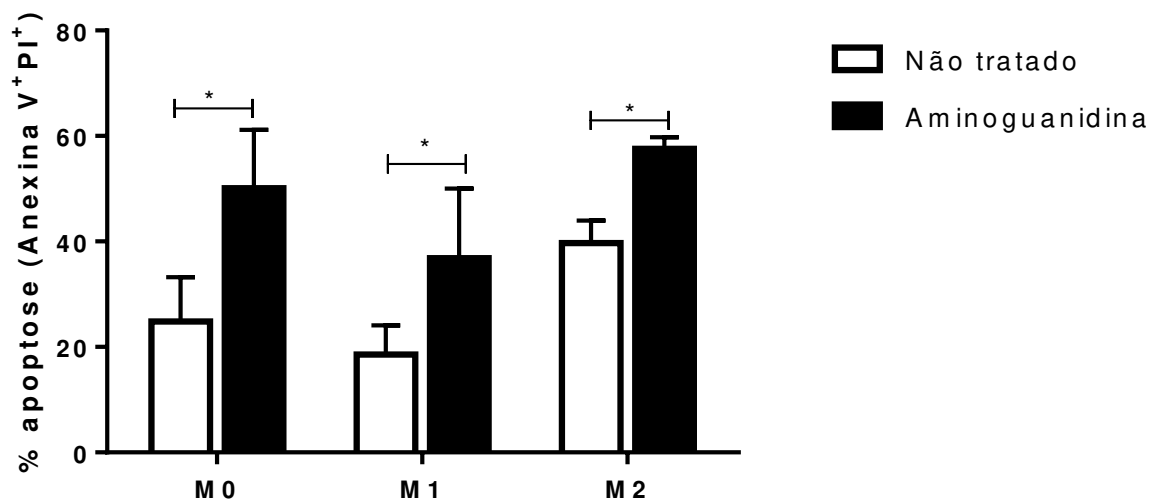


Figura 12. Viabilidade de amastigotas dos macrófagos M0, M1 e M2 infectados por *L. amazonensis*.

A avaliação da viabilidade das amastigotas recuperadas de macrófagos RAW 264.7 (1×10^5) não polarizados (M0) e previamente polarizados (M1 e M2) tratados ou não com aminoguanidina (1mM) infectados com *L. amazonensis* (1×10^6) via marcação com Anexina V/ Iodeto de Propídio. Os dados são apresentados (média \pm desvio padrão) sendo considerados significantes com $p < 0,05$ *(Kruskal-Walis com pós-teste Duns).

5.7 Avaliação da produção de citocinas de macrófagos M0, M1 e M2 infectados por *L. amazonensis*

A produção de citocinas foi quantificada no sobrenadante das culturas celulares já detalhadas aqui. Os dados abaixo demonstram que houve secreção significativa de IL-6 e IL-10 apenas pelos macrófagos M1 infectados. E vale ressaltar, que essa produção foi inferior quando comparada ao mesmo fenótipo que não foi submetido a infecção (Figuras 13A e 13D).

Em relação ao fator de necrose tumoral alfa, foi detectado aumento nos macrófagos M1 infectados ou não pelo parasito (Figura 13B), o mesmo não ocorreu com as células M2, onde apenas os infectados tiveram produção significativa desta citocina, bem como aconteceu com a quimiocina MCP-1 (Figura 13C).

As demais citocinas IFN- γ e IL-12p70, não apresentaram concentrações detectáveis nas amostras estudadas.

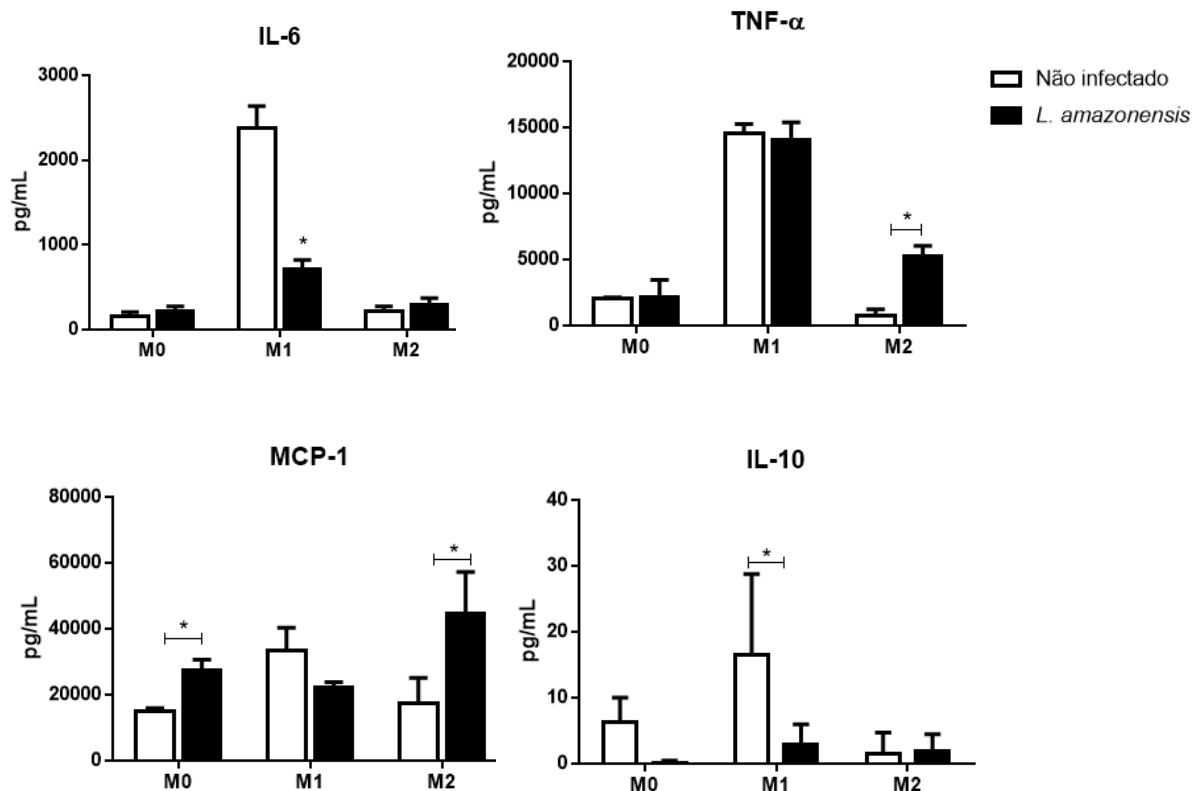


Figura 13. Quantificação de citocinas de macrófagos RAW 264.7 polarizados e infectados por *L. amazonensis*. Produção de citocinas (pg/mL) IL-6 (Fig. 13A), TNF- α (Fig. 13B), MCP-1 (Fig. 13C) e IL-10 (Fig. 13D) de macrófagos RAW 264.7 (1×10^5) não polarizados (M0) e previamente polarizados (M1 e M2) infectados por *L. amazonensis*. Os dados são apresentados (média \pm desvio padrão) sendo considerados significantes com $p < 0,05$ * (diferença entre o mesmo grupo) (Teste ANOVA com pós-teste Bonferroni ou Kruskal-Wallis com pós teste Duns).

5.8 A infecção por *L. amazonensis* aumenta a expressão de moléculas co-estimulatórias e iNOS em macrófagos M1.

A expressão de marcadores típicos para os fenótipos distintos de macrófagos é essencial no diagnóstico da polarização M1 e M2. Assim foi observado que a expressão da iNOS aumentou em macrófagos M1 infectados (Figura 14A e 14B), como das moléculas co-estimuladas CD80 (Figura 14C e 14D) e CD86 (Figura 15A e 15B), enquanto que a expressão de F4/80 aumentou em todos os grupos que foram submetidos a infecção (Figura 15C).

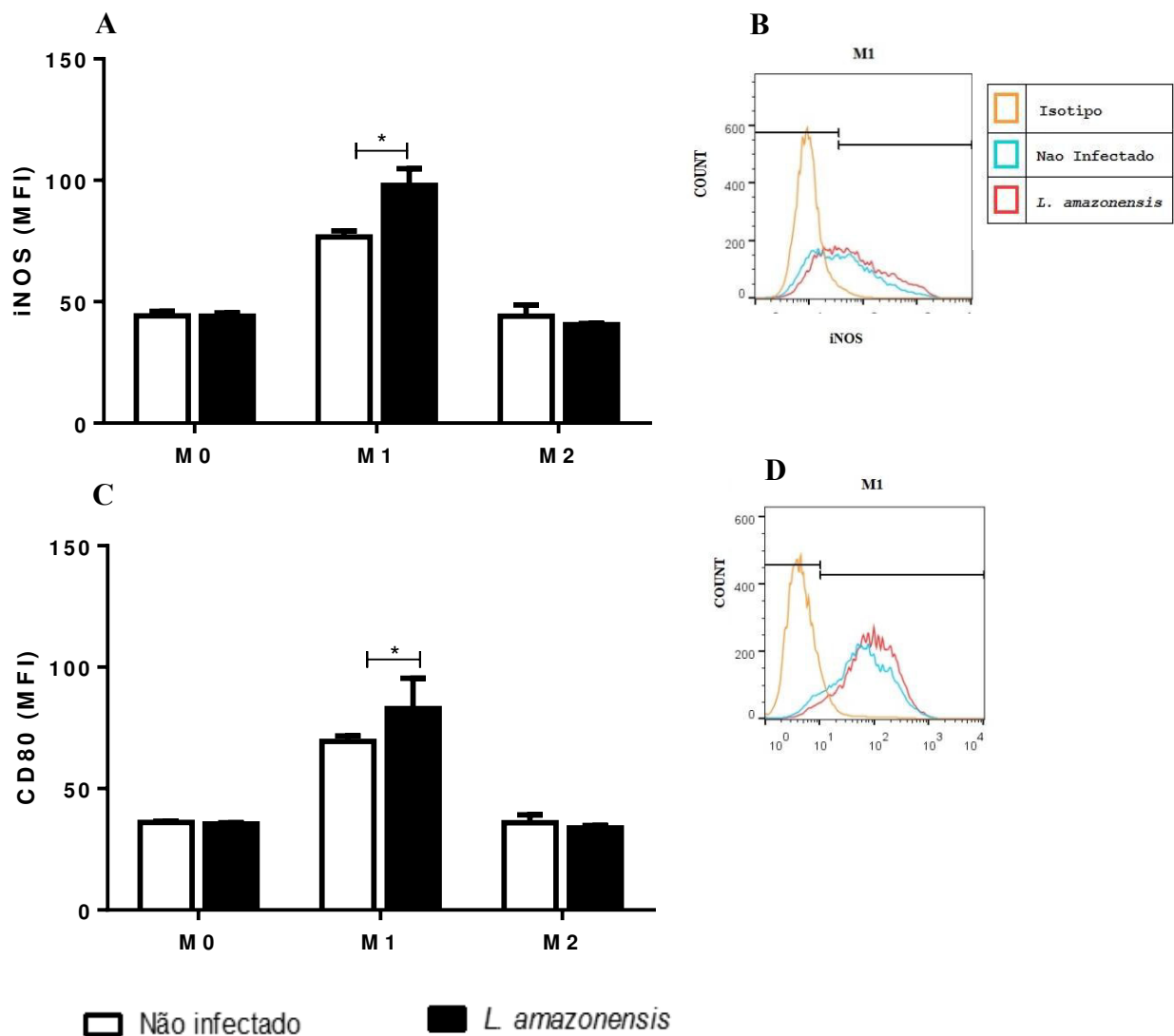


Figura 14. Expressão de iNOS e CD80 em macrófagos M0, M1 e M2 infectados por *L. amazonensis*. A expressão de iNOS (Fig. 14A) e CD80 (Fig. 14C) em macrófagos RAW 264.7 (1×10^6) não polarizados (M0) e previamente polarizados (M1 (Fig. 14 B e D) e M2) infectados por *L. amazonensis*. Os dados são apresentados (média \pm desvio padrão) sendo considerada significantes com $p < 0,05$ * diferença entre o mesmo grupo (Teste Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni)

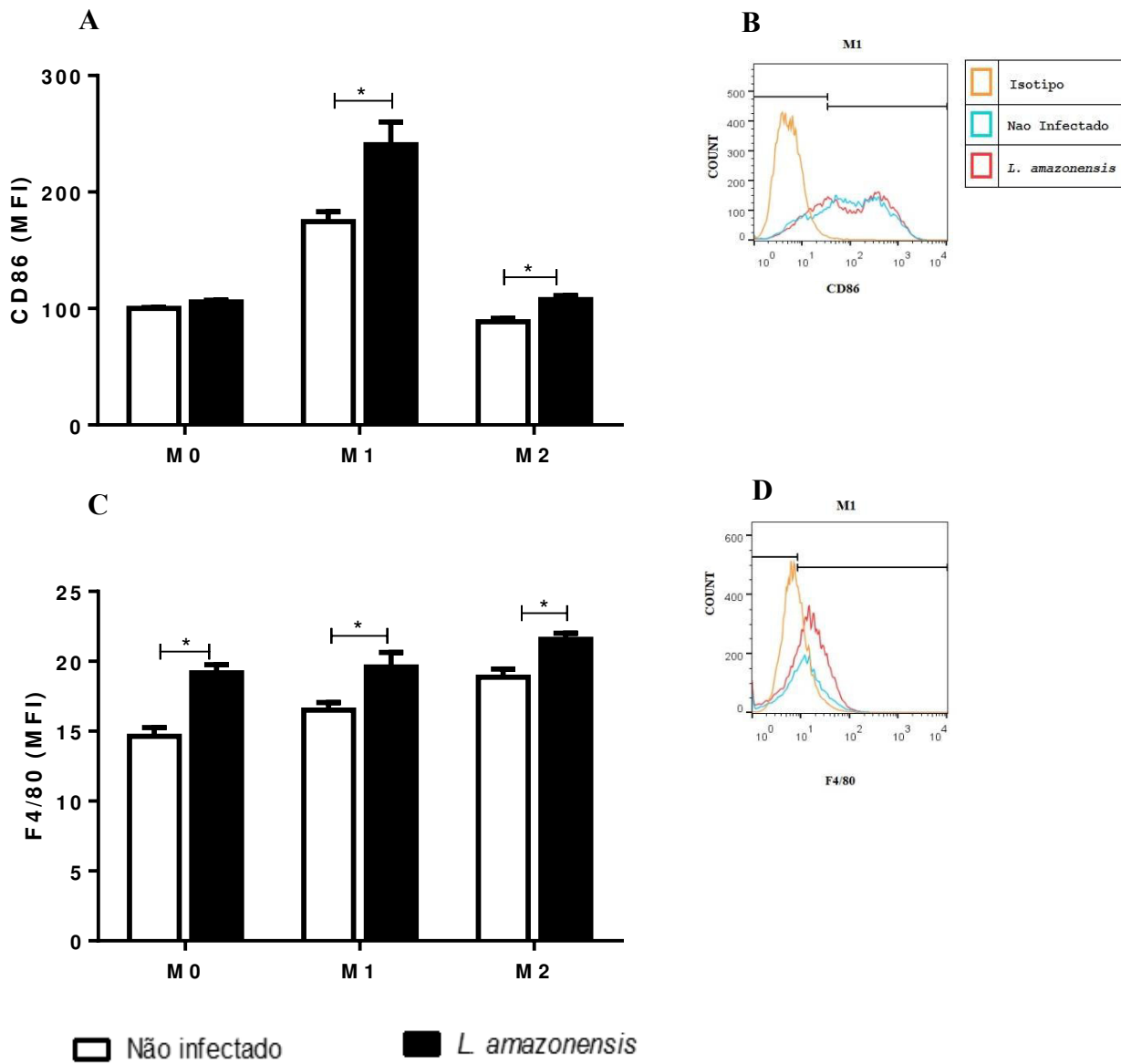


Figura 15. Expressão de CD86 e F4/80 em macrófagos M0, M1 e M2 infectados por *L. amazonensis*. A expressão de CD86 (Fig. 15A) e F4/80 (Fig. 15C) em macrófagos RAW 264.7 (1×10^6) não polarizados (M0) e previamente polarizados (M1 (Fig. 16 B e D) e M2) infectados por *L. amazonensis*. Os dados são apresentados (média \pm desvio padrão) sendo considerada significantes com $p < 0,05$ * diferença entre o mesmo grupo (Teste Two-way ANOVA com pós teste Bonferroni)

6 DISCUSSÃO

A plasticidade dos macrófagos está relacionada a estímulos específicos, que direcionam a polarização para diferentes populações de macrófagos (MILLS & LEY, 2014).

Como apresentado neste trabalho, uma vez que foi utilizado lipopolissacarídeo combinado com IFN- γ para obtenção de macrófagos M1 e citocinas IL-4 mais IL-13 na promoção de macrófagos M2 (MURRAY et al., 2014).

Dentre os fatores que podem nos direcionar a distinguir de fato essas duas populações antes dos ensaios de infecção, destacamos a produção de óxido nítrico, o aumento ou baixa expressão de marcadores, e características morfológicas utilizadas no diagnóstico de macrófagos M1/M2 (Fig. S1) (RATH et al., 2014).

Nesse contexto, é interessante identificar até que ponto os estímulos inerentes ao sistema imunológico, como nos casos de infecções por protozoários, podem direcionar ou reverter o perfil de macrófagos M1/M2 do hospedeiro.

A infecção por parasitos por si só é capaz de ativar fagócitos durante a resposta inflamatória, assim que é reconhecido por receptores de superfície, vias de sinalização são ativadas que culminam no aumento da atividade celular (KAYE & SCOOT, 2011; SICA et al., 2015).

Dessa forma, avaliamos o potencial da infecção por *L. amazonensis* em macrófagos M0, M1 e M2, visto que apresentam diferenças quanto à taxa de infecção. O fenótipo M1 obteve o maior número de amastigotas por macrófagos em relação aos outros grupos (Fig. 6B e C, 7B e C), seguido pelo M2 quando comparado ao M0 (Fig. 6B e C, 7E e F). Os macrófagos M1 e M2, por já estarem previamente ativados apresentam-se predispostos a uma maior atividade celular e, conseqüentemente maior fagocitose do parasito (6A).

A maior predisposição inicial na infecção pelo parasito em macrófagos M1 deve-se principalmente pela alta atividade fagocítica dessa população na resposta a patógenos (ISIDRO & APPLEYARD, 2016). Visto que apresentam maior expressão de receptores de fagocitose (receptor de complemento 1 e 3) que são importantes na infecção e internalização da forma promastigota (UENO & WILSON, 2012).

Os macrófagos quando infectados por parasitos, se destacam pela variedade de mecanismos microbicidas para controlar e eliminar o agente intracelular. Dentre estes destacamos a produção de óxido nítrico, que é considerado um dos principais mediadores leishmanicida (BOGDAN, 2015).

Na Fig. 8, mostramos que a produção de NO é aumentada nos macrófagos M1 infectados por *L. amazonensis*. Assim, é possível sugerir que tal aumento ocorre devido à capacidade do parasito em estimular a atividade do complexo inflamassoma, que induz a produção da citocina IL-1 β e TNF- α , sendo estas autócrinas, que atuam no aumento da ativação e produção de óxido nítrico das células parasitadas. Além disso, o NO produzido pode difundir e atuar em células vizinhas levando a morte do agente infeccioso (LIMA-JUNIOR et al., 2013).

Porém, o óxido nítrico nas leishmanioses pode possuir um duplo papel quando produzido de modo exacerbado, promovendo vasodilatação e consequente aumento da diapedese. Esses fatores resultam numa intensa resposta inflamatória nos pacientes, causando destruição tecidual, agravamento da doença (SCOTT & NOVAIS, 2016) e possível supressão da atividade celular (KOBAYASHI, 2010).

Quando foram analisadas a taxa de infecção dos macrófagos e a produção de óxido nítrico (Fig. 9), observamos nas populações M1 uma correlação positiva entre esses achados (Fig. 9B). Dessa forma, podemos supor que a grande presença de amastigotas por macrófagos nesse grupo, ocorreu por conta da produção de óxido nítrico de forma exacerbada frente à resposta induzida pelo parasito, que culmina num possível efeito deletério nesses macrófagos causando o agravamento da infecção. Fato este demonstrado, quando a produção de NO foi inibida via tratamento com aminoguanidina (Figura 10), onde houve redução da taxa de infecção de todos os grupos de macrófagos do presente estudo.

Dados de Leishmaniose Canina mostrados por Silva (2011) evidenciam que a alta secreção de NO está relacionada à progressão da infecção, devido ao possível efeito imunossupressor dessa molécula. Em outras infecções por protozoários, como *Trypanosoma cruzi*, a citocina IL-6 regula a atividade excessiva da produção de óxido nítrico em camundongos, através da inibição de IL-1 β aumentando a taxa de sobrevivência. Além de promover o estabelecimento de macrófagos M2 no coração infectado pelo parasito, assim reduzindo a atividade inflamatória local (SANMARCO et al., 2017).

Em modelo de infecção por fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, Nascimento et al. (2002) ao realizarem culturas de macrófagos *in vitro*, oriundos de camundongos B.10, demonstraram que a susceptibilidade dessa linhagem está relacionada a alta e persistente produção de NO, que culmina no aumento da carga fúngica.

Já estudos com monócitos oriundos de pacientes que apresentavam Leishmaniose Cutânea causada por *Leishmania brasiliensis*, demonstraram que o aumento da lesão também estava diretamente relacionado com a alta produção de óxido nítrico (CARNEIRO et al., 2016).

Além da dosagem de NO, foi verificada a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos macrófagos, via marcação por DHR, onde os dados demonstraram que houve baixa produção nos macrófagos M1 mesmo quando estimulados com PMA, diferente daqueles para o fenótipo M0 e M2 (Fig. 11).

Porém é necessário ressaltar que durante o reconhecimento por receptores de membrana e consequente fagocitose do parasito, o “burst oxidativo” via NADPH oxidase é iniciado. Este mecanismo é de suma importância na geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), onde destacamos o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que atua em componentes celulares do parasito, como proteínas e lipídios, além de causar aumento da permeabilidade da membrana e danos ao DNA que culmina na morte da *Leishmania* (SCOTT & NOVAIS, 2016).

No entanto, a diminuição presente nos macrófagos M1 (Fig. 11) deve-se possivelmente a mecanismos anti-oxidantes pela molécula de óxido nítrico. Assim, confere proteção a célula frente ao efeito tóxico causado pelo peróxido de hidrogênio ou pelo balanço redox, que consiste na capacidade do NO antagonizar NOX2 durante sua montagem através da ativação de PPAR γ , resultando na inibição da subunidade p47, sendo esta necessária para a ativação de NOX2. Dessa forma, a produção de ânio superóxido (O_2^-) é reduzida na presença de altas produções de óxido nítrico, sendo capaz também de inibir COX2 que culmina na redução da produção de EROS (WINK et al., 2011).

Outro fator relevante na infecção por *Leishmania amazonensis* em nosso estudo foi avaliar a viabilidade do parasita intracelular, uma vez que são dotados de mecanismos de evasão que garantem à sua sobrevivência das ações microbicidas de fagócitos (VAN ASSCHE et al., 2011).

Diante do pressuposto e da possível influência do NO na infecção, foi observado que os macrófagos M0, M1 e M2 quando tratados pelo inibidor da iNOS apresentaram maior porcentagem de amastigotas marcadas para Anexina V/PI (Fig. 12)

Pereira, 2015 quando tratou com aminoguanidina macrófagos peritoneais de diferentes linhagens de camundongos (Balb/c, C57BL /6 e C3H/He), ressalta que há uma acentuada

redução na taxa de infecção nos fagócitos tratados com a droga nas primeiras 24 horas. Já Carmo et al., 2010, quando adiciona LPS e TNF a culturas de macrófagos Balb/c infectados por *L. amazonensis* induz o aumento na produção de NO, porém sem redução nas amastigotas. No entanto, vale ressaltar que no mesmo trabalho, a adição da aminoguanidina causou redução do óxido nítrico sem haver alteração no número de amastigotas.

Sugerimos com isso, que de fato há influência do óxido nítrico com possível efeito deletério, principalmente no perfil M1, favorecendo a infecção por *Leishmania amazonensis* garantindo a maior sobrevivência do parasito intracelular.

Por outro lado, macrófagos quando ativados são direcionados a produzir mediadores como citocinas e quimiocinas que são fatores que contribuem na resposta ao parasito (DUQUE & DESCOTEAUX, 2014). Em nossos dados demonstramos que a secreção de IL-6 foi reduzida no grupo M1 infectado (Fig.13A), enquanto TNF- α aumentou no M2 (Fig. 13B), bem como para MCP-1 nos grupos M0 e M2 (Fig. 13C) e IL10 nas células M1 (Fig. 13D).

O aumento da produção de IL-6 e TNF- α durante a infecção por espécies de *Leishmania* é induzido via degradação da GP63, sendo esta uma das moléculas relacionadas a virulência e mais abundante na superfície celular do parasito (OLIVIER et al., 2012). Essas citocinas desempenham função no recrutamento, assim como a quimiocina MCP-1, e na ativação celular de fagócitos para o sítio inflamatório, o que pode favorecer a infecção de novas células na fase aguda principalmente em modelos *in vivo* (DUQUE & DESCOTEAUX, 2015).

Já IL-10 encontrava-se reduzida no grupo M1 infectado, uma vez que esta citocina é uma importante reguladora da resposta imune a protozoários do gênero *Leishmania*. Principalmente devido à capacidade em controlar a ativação de macrófagos por INF- γ e TNF- α , assim promovendo a supressão da resposta inflamatória mediada por esses fagócitos (DUQUE & DESCOTEAUX, 2015).

No entanto, a produção de mediadores imunes por macrófagos como espécies reativas de oxigênio, citocinas (IL-6, TNF- α , IL-10) e metaloproteinases não são consideradas de fato bons marcadores para avaliação da polarização de macrófagos. Muitas populações destas células são capazes de produzi-las, porém a geração de óxido nítrico ou ornitinas, além da expressão de marcadores celulares como CD80/86 e CD206 são de suma importância no diagnóstico de macrófagos M1 e M2 (MILLS, 2015).

No presente estudo a análise da expressão dos marcadores iNOS, CD80, CD86 e F4/80 de macrófagos M0, M1 e M2 infectados por *L. amazonensis* demonstrou que o grupo M1 apresentou aumento para iNOS (Fig. 14A e 14B) o que está de acordo com aumento da produção de óxido nítrico (Fig. 10).

Além das moléculas co-estimulatórias CD80 (Fig. 15C e 15D), CD86 (Fig. 15A e 15B), assim como da expressão do marcador F4/80 (Fig. 15C e 15D) que distingue os macrófagos de outras células. Esses resultados demonstram, que os macrófagos M1 por estarem previamente ativados e quando co-incubados com a *Leishmania amazonensis*, aumentam a produção e expressão de mediadores característicos desse fenótipo na resposta inicial ao parasito, com propósito de controlar e solucionar a infecção (MILLS, 2015).

Outras espécies de *Leishmania*, também são capazes de causar alterações em moléculas expressas por fagócitos mononucleares, seja por aumento ou redução da expressão. QI, et al., 2001 evidenciam que células dendríticas originadas de camundongos da linhagem Balb/c ou Hej quando incubadas por 24hs com amastigotas ou promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) vivas ou mortas, induzem uma regulação positiva na expressão de marcadores para CD80 e CD86. As espécies *L. brasiliensis*, *L. infantum*, também são capazes de induzir aumento da molécula có-estimulária CD86 em células dendríticas (FALCÃO et al., 2016) ou *L. chagasi* em macrófagos humanos (ALMEIDA, CARDOSO & BARRAL-NETO, 2003).

Por outro lado, a regulação negativa na expressão de CD80/86 causada pela ação da citocina IL-10, pode favorecer a infecção por *Leishmania amazonensis* em camundongos Balb/c quando co-infectados na presença da saliva de *Lutzomyia longipalpis*, devido a prevenção da proliferação de células T antígenos-específicas e da produção de citocinas em resposta ao parasito (NORSWORTHY, 2004)

Porém, acreditamos que o aumento da atividade inflamatória do perfil M1 em decorrência da infecção que culmina na maior expressão desses marcadores, possa ser favorável para o estabelecimento de *L. amazonensis*. Embora estudos mencionem que espécies de *Leishmania* conseguem se sobressair e manter a sua sobrevivência no microambiente que predomina macrófagos M2 (CHAN et. al., 2012; MUKHOPADHYAY et al., 2015), devido a capacidade da forma amastigota utilizar dos produtos desse fenótipo (ornitinas e poliaminas) para benefício próprio na proliferação e consequente progressão da infecção (COLOTTI & ILARI, 2010; LIU & UZONNA, 2012).

Os nossos resultados refutam o paradigma M1/M2 na resposta imune mediada por macrófagos na infecção por *L. amazonensis*, visto que houve potencialização da ativação de macrófagos M1, com aumento de mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico que agiu de forma deletéria na população com este perfil. Esses achados culminaram no agravamento da infecção. Dessa forma, podemos evidenciar que num contexto de infecção por *Leishmania amazonensis* a predominância e aumento da expressão do perfil celular de macrófagos M1 no microambiente, possam ser favoráveis ao parasito.

7 CONCLUSÃO

- ✓ Os macrófagos M1 apresentam maior taxa de infecção em comparação aos demais fenótipos estudados;
- ✓ A infecção induziu maior ativação de macrófagos M1 com aumento da produção de mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico;
- ✓ Houve redução na produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos M1, o que direciona ao balanço na resposta inflamatória e garantindo menor toxicidade as células presentes no microambiente;
- ✓ A alta produção de óxido nítrico por macrófagos M1 infectados atua de forma deletéria na população desse perfil, assim causando a supressão das células e consequente agravamento da infecção;
- ✓ A infecção pelo parasito altera aumentando a expressão de marcadores celulares característicos de macrófagos M1, resultando na maior atividade celular que culmina na maior produção dos mediadores inflamatórios favorecendo o estabelecimento do parasito nas células infectadas.

8 REFERÊNCIAS

- AGUIAR, G. M. de, AZEVEDO, A. C. R. de, MEDEIROS, W. M. de, ALVES, J. R. C., & RENDEIRO, V. Aspects of the ecology of Phlebotomines (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in an area of Cutaneous Leishmaniasis occurrence, municipality of Angra dos Reis, Coast of Rio De Janeiro State, Brazil. **Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 56(2), 143–149. (2014). <https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000200010>
- ALEMAYEHU, B., & ALEMAYEHU, M. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. **Health Science Journal**, v. 11, n. 4, p. 1-12. (2017). <https://doi.org/10.21767/1791-809X.1000519>
- ALMEIDA, M.C. de; CARDOSO, S.A.; BARRAL-NETTO, M.. *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage. **International Journal For Parasitology**, v. 33, n. 2, p.153-162, 2003. [http://dx.doi.org/10.1016/s0020-7519\(02\)00266-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0020-7519(02)00266-7).
- ANATOMY & PHYSIOLOGY. **The adaptive immune response: t lymphocytes and their functional**. Disponível em: <<https://www.quizover.com/anatomy/section/professional-antigen-presenting-cells-by-openstax>>
- ARAÚJO, A. R. de. Fatores de risco associados à leishmaniose tegumentar americana em área endêmica do estado de Pernambuco, Brasil. 2014. 92f. **Dissertação** (Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2014
- BOGDAN, C.. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. **Trends In Immunology**, [s.l.], v. 36, n. 3, p.161-178. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2015.01.003>.
- BOGGIATTO, P. M., JIE, F., GHOSH, M., GIBSON-CORLEY, K. N., RAMER-TAIT, A. E., JONES, D. E., & PETERSEN, C. A. Altered Dendritic Cell phenotype in response to *Leishmania amazonensis* amastigote infection is mediated by MAP Kinase, ERK. **The American Journal Of Pathology**, v. 174, n. 5, p.1818-1826, 2009 <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2009.080905>.
- CARLOS, M. M., IGNATTI, C., & ROSA, M. R. Leishmaniose tegumentar americana: incidência no Vale do Ribeira/São Paulo, Brasil. **Revista Recien - Revista Científica de Enfermagem**, v. 5, n. 15, p. 3–10. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.24276/rrecien2358-3088.2015.5.15.3-10>.
- CARMO, E. V. de S.; KATZ, S.; BARBIÉRI, C. L. Neutrophils reduce the parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected macrophages. **Plos One**, v. 5, n. 11, p.1-8, 3. 2010. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0013815>.
- CARNEIRO, P. P., CONCEIÇÃO, J., MACEDO, M., MAGALHÃES, V., CARVALHO, E. M., & BACELLAR, O. The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. **Plos One**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.1-16, 3 fev. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0148084>.

CASSETTA, L., CASSOL, E., & POLI, G. Macrophage polarization in health and disease. **The Scientific World Journal**, v. 11, p.2391-2402, 2011. <http://dx.doi.org/10.1100/2011/213962>.

CHAN, M. M., ADAPALA, N., & CHEN, C. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ -mediated polarization of macrophages in *Leishmania* infection. **Ppar Research**, v. 2012, p.1-11, 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/796235>.

CHÁVEZ-GALÁN, L., OLLEROS, M. L., VESIN, D., & GARCIA, I. Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169+ and TCR+ Macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p.1-15, 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00263>.

CHAWLA, A.. Control of Macrophage Activation and Function by PPARs. **Circulation Research**, v. 106, n. 10, p.1559-1569, 2010. <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.110.216523>.

CHEN, Y., & JUNGER, W. G. Measurement of Oxidative Burst in Neutrophils. **Methods in Molecular Biology**, p.115-124, 2011. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-527-5_8.

COELHO-NETO, G.T.; RODRIGUES, F.M.D; MENEZES, J.G.P.B; GAMA, M.E.A; GONÇALVES, E.G.R; SILVA, A.R.; LAURENTI, M.D.; SILVEIRA, FT; CORBETT, CEP; GOMES, CIMC. Estudo epidemiológico de pacientes com leishmaniose tegumentar americana em Buriticupu, Pré-Amazônia maranhense. **Rev. Ciênc. Saúde**, v.14, n.2, p. 133-138, 2012.

COLOTTI, G., & ILARI, A. Polyamine metabolism in *Leishmania*: from arginine to trypanothione. **Amino Acids**, v. 40, n. 2, p.269-285, 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-010-0630-3>.

CYBULSKY, M. I.; CHEONG, C.; ROBBINS, C. S. Macrophages and Dendritic Cells. **Circulation Research**, v. 118, n. 4, p.637-652, 18 fev. 2016. <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.115.306542>.

DÍAZ-GANDARILLA, J. A., OSORIO-TRUJILLO, C., HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, V. I., & TALAMÁS-ROHANA, P. PPAR Activation Induces M1 Macrophage Polarization via cPLA2-COX-2 Inhibition, Activating ROS Production against *Leishmania mexicana*. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2013, p.1-13, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/215283>

DING, A. H., NATHAN, C. F., & STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **The Journal of Immunology**, v. 141, n. 7, p. 2407-2412, 1988. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/cgi/reprint/141/7/2407.pdf>

DOMEN, J.; WAGERS, A.; WEISSMAN, I. L. Bone marrow (Hematopoietic) stem cells. **Regenerative Medicine**. Washington, DC: Department of Health and Human Services, p. 13-34, 2006.

DUQUE, G. A.; DESCOTEAUX, A.. *Leishmania* survival in the macrophage: where the ends justify the means. **Current Opinion In Microbiology**, v. 26, p.32-40, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2015.04.007>.

DUQUE, G. A.; DESCOTEAUX, A.. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p.1-12, 2014. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491>.

ERWIG, L. P.; GOW, N. A. R.. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 3, p.163-176, 2016. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2015.21>.

FALCÃO, S. DE A. C., JARAMILLO, T. M. G., FERREIRA, L. G., BERNARDES, D. M., SANTANA, J. M., & FAVALI, C. B. F. . *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*: Differences and similarities to evade the innate immune system. **Frontiers in Immunology**, 7, 287, 2016. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00287>.

GEISSMANN, F., MANZ, M. G., JUNG, S., SIEWEKE, M. H., MERAD, M., & LEY. Development of monocytes, macrophages, and dendritic Cells. **Science**, v. 327, n. 5966, p.656-661, 2010. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1178331>.

GINHOUX, F.; JUNG, S.. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 6, p.392-404, 2014. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3671>.

GORDON, S.. Elie Metchnikoff: Father of natural immunity. **European Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 38, n. 12, p.3257-3264, 2008. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200838855>.

GORDON, S.. Pattern Recognition Receptors. **Cell**, v. 111, n. 7, p.927-930, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01201-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01201-1).

GORDON, S.. The macrophage: Past, present and future. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 1, p.9-17, 2007. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200737638>.

GUILLIAMS, M., GINHOUX, F., JAKUBZICK, C., NAIK, S. H., ONAI, N., SCHRAML, B. U., YONA, S. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 8, p.571-578, 18 jul. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3712>.

GURUNG, P., & KANNEGANTI, T. D. Innate immunity against *Leishmania* infections. **Cellular Microbiology**, 2015. <https://doi.org/10.1111/cmi.12484>.

HOHL, T. M. Cell-mediated defense against infection. **Mandell, Douglas and Bennett's, editors. Principle and practice of infectious diseases. 8th ed. Philadelphia: Saunders**, p. 50-69, 2015.

HUME, D. A. Macrophages as APC and the Dendritic Cell Myth. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 9, p.5829-5835, 2008. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.181.9.5829>.

ISIDRO, R. A., & APPELYARD, C. B.. Colonic macrophage polarization in homeostasis, inflammation, and cancer. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 311, n.1, p. 59–73, 2016 <http://doi.org/10.1152/ajpgi.00123.2016>.

ITALIANI, P., & BORASCHI, D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. **Frontiers in Immunology**, 5, 514, 2014. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00514>.

JAIN, S. K., SAHU, R., WALKER, L. A., & TEKWANI, B. L .A Parasite Rescue and Transformation Assay for Antileishmanial screening against intracellular *Leishmania donovani* amastigotes in THP1 Human acute monocytic leukemia cell line. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, (70), 4054. Advance online publication. (2012). <http://doi.org/10.3791/4054>.

JENKINS, S. J.; HUME, D. A. Homeostasis in the mononuclear phagocyte system. **Trends in immunology**, v. 35, n. 8, p. 358-367, 2014. <http://doi:10.1016/j.it.2014.06.006>.

KAMBAYASHI, T.; LAUFER, T. M.. Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell?. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 11, p.719-730, 17 out. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3754>.

KAUFMANN, S. H. Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. **Nature Immunology**, v. 9, n. 7, p.705-712, 2008. <http://dx.doi.org/10.1038/ni0708-705>.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature Immunology**, v. 11, n. 5, p.373-384. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1863>.

KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p.1-8, 25 set. 2014 <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>.

KAYE, P.; SCOTT, P.. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604, 2011. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2608>.

KOBAYASHI, Y.. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. **Journal Of Leukocyte Biology**, v. 88, n. 6, p.1157-1162, 2010. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0310149>.

KOMOHARA, Y.; JINUSHI, M.; TAKEYA, M.. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. **Cancer Science**, v. 105, n. 1, p.1-8, 29 nov. 2013. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/cas.12314>.

KORZH, V.; BREGESTOVSKI, P. Elie Metchnikoff: Father of phagocytosis theory and pioneer of experiments in vivo. **Cytology and Genetics**, v. 50, n. 2, p. 143-150, 2016.

LAVIN, Y., MORTHA, A., RAHMAN, A., & MERAD, M. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 15, n. 12, p.731-744, 25 nov. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3920>.

LI, C.; LEVIN, M.; KAPLAN, D. L. Bioelectric modulation of macrophage polarization. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p.1-12, 12 fev. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/srep21044>.

LIMA-JUNIOR D, COSTA D, CARREGARO V, CUNHA L, SILVA A, MINEO T, GUTIERREZ F, BELLIO M, BORTOLUCI K, FLAVELL R, BOZZA M. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. **Nature Medicine**, v. 19, n. 7, p.909-915, 2013. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3221>.

LIU, D., & UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2, 83, 2012. <http://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00083>.

LIU, Y. C., ZOU, X. B., CHAI, Y. F., & YAO, Y. M. Macrophage polarization in inflammatory diseases. **International Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 5, p.520-529, 2014. <http://dx.doi.org/10.7150/ijbs.8879>.

MANTOVANI, A.; GARLANDA, C.; LOCATI, M. Macrophage diversity and polarization in Atherosclerosis: A question of balance. **Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology**, [s.l.], v. 29, n. 10, p.1419-1423, 20 ago. 2009. <http://dx.doi.org/10.1161/atvbaha.108.180497>.

MILLS, C. D., KINCAID, K., ALT, J. M., HEILMAN, M. J., & HILL, A. M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **The Journal of Immunology**, 164(12), 6166-6173, 2000. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>.

MILLS, C. D., THOMAS, A. C., LENZ, L. L., & MUNDER, M. Macrophage: SHIP of Immunity. **Frontiers in Immunology**, 5, 620, 2014. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00620>.

MILLS, C. D. Anatomy of a Discovery: M1 and M2 Macrophages. **Frontiers in Immunology**, [s.l.], v. 6, p.1-12, 5, 2015. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00212>.

MILLS, C. D.; LEY, K. M1 and M2 Macrophages: The Chicken and the Egg of Immunity. **Journal of Innate Immunity**, [s.l.], v. 6, n. 6, p.716-726, 2014. S. <http://dx.doi.org/10.1159/000364945>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância Sanitária em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana** – 2. ed. atual. 3ª reimpressão – Brasília, 2013.

MOREIRA, P. R. R., FERNANDO, F. S., MONTASSIER, H. J., ANDRÉ, M. R., & de OLIVEIRA VASCONCELOS, R. Polarized M2 macrophages in dogs with visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v. 226, p.69-73, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.06.032>.

MUKHOPADHYAY, D., MUKHERJEE, S., ROY, S., DALTON, J. E., KUNDU, S., SARKAR, A., CHATTERJEE, M. M2 Polarization of Monocytes-Macrophages is a hallmark of Indian post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 9, n. 10, p.1-19, 23 out. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004145>.

MURRAY, P. J., ALLEN, J. E., BISWAS, S. K., FISHER, E. A., GILROY, D. W., GOERDT, S., ... WYNN, T. A. Macrophage activation and polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. **Immunity**, v. 41, n. 1, p.14-20, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p.723-737, 2011. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3073>.

NASCIMENTO, F. R., CALICH, V. L., RODRÍGUEZ, D., & RUSSO, M. . Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 9, p. 4593-4600, 2002. doi: 10.4049/jimmunol.168.9.4593

NATHAN, C.; SHILOH, M. U.. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 97, n. 16, p.8841-8848, 2000. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.97.16.8841>.

NEGRÃO, G. N.; FERREIRA, M. E. M. C.. Considerações sobre a leishmaniose tegumentar americana e sua expansão no território brasileiro. **Revista Percursos**, v. 6, n. 1, p. 147-168, 2014.

NOGUEIRA, P. M., ASSIS, R. R., TORRECILHAS, A. C., SARAIVA, E. M., PESSOA, N. L., CAMPOS, M. A., SOARES, R. P. Lipophosphoglycans from *Leishmania amazonensis* Strains Display Immunomodulatory Properties via TLR4 and do not affect sand fly infection. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, p.1-17, 2016. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004848>.

NORSWORTHY, N. B., SUN, J., ELNAIEM, D., LANZARO, G., & SOONG, L. .Sand Fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 3, p.1240-1247, 20 fev. 2004.. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.72.3.1240-1247.2004>.

OLIVIER, M., ATAYDE, V. D., ISNARD, A., HASSANI, K., & SHIO, M. T. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 15, p.1377-1389, dez. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2012.05.014>.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Leishmaniasis en las Américas: recomendaciones para el tratamiento. **OPS**. Washington, D.C, 2013

PATRÍCIO, F. J. B. Atividade imunoestimulante e anti-Leishmania de *Chenopodium ambrosioides* L. (mastruz) [Tese de doutorado]. São Luís: Universidade Federal do Maranhão, 2011.

PEREIRA, S. S.. Suscetibilidade vs resistência: Estudo da infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em macrófagos murinos. 2015. 109 f. **Dissertação (Mestrado)** - Curso de Pós-graduação em Biologia Parasitária, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future Microbiology**, v. 10, n. 1, p.111-129, jan. 2015. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.14.103>.

QI, H., POPOV, V., & SOONG, L. *Leishmania amazonensis*-Dendritic Cell interactions in vitro and the priming of parasite-specific CD4+ T cells in vivo. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 8, p.4534-4542, 2001. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.167.8.4534>.

QIAN, B.; POLLARD, J. W. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. **Cell**, v. 141, n. 1, p.39-51, 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.014>.

RAES, G., BESCHIN, A., GHASSABEH, G. H., & DE BAETSELIER, P. Alternatively activated macrophages in protozoan infections. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, n. 4, p.454-459, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2007.05.007>.

RATH, M., MÜLLER, I., KROPF, P., CLOSS, E. I., & MUNDER, M. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. **Frontiers In Immunology**, v. 5, p.1-10, 2014. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00532>.

REIS, S.R., GOMES, L.H.M., FERREIRA, N.M., NERY, L. da R., PINHEIRO, F.G., FIGUEIRA, L. de P., SOARES, F.V., and Franco, A.M.R. Occurrence of sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the peridomestic environment in an area of transmission focus for cutaneous Leishmaniasis in Manaus, Amazon (Brazil). (2013). <https://doi.org/10.1590/S0044-59672013000100016>.

RENA, C. D. L., VIDIGAL, F. M., BARRA, A. A., SCHELB, E. J. S., TOLÊDO, L. O. D., DORNELAS, M. D. C., & RENA, R. L. . Estudo revisional sobre a morfologia e as funções dos leucócitos. **HU revista**, p. 337-344, 2001.

RUSSELL, D. G., VANDERVEN, B. C., GLENNIE, S., MWANDUMBA, H., & HEYDERMAN, R. S. The macrophage marches on its phagosome: dynamic assays of phagosome function. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 8, p.594-600, 2009. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2591>.

SANMARCO L., PONCE N., VISCONTI L., EBERHARDT N., THEUMER M., MINGUEZ Á, AOKI, M. IL-6 promotes M2 macrophage polarization by modulating purinergic signaling and regulates the lethal release of nitric oxide during *Trypanosoma cruzi* infection. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Basis Of Disease**, v. 1863, n. 4, p.857-869, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.01.006>.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p.581-592, 2016. <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2016.72>.

SICA, A., ERRENI, M., ALLAVENA, P., & PORTA, C. . Macrophage polarization in pathology. **Cellular And Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 21, p.4111-4126, 2015. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-015-1995-y>.

SILVA, L. A. . **Aspectos da Leishmaniose Visceral Canina: epidemiologia, sorologia e novas perspectivas de tratamento**. 117 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Bahia - Fio Cruz, Salvador, 2011.

TAKELE, Y., ABEBE, T., WELDEGEBREAL, T., HAILU, A., HAILU, W., HURISSA, Z., ALI, J., DIRO, E., SISAY, Y., CLOKE, T., MODOLELL, M., MUNDER, M., TACCHINI-COTTIER, F., MULLER, I., KROPF, P. Arginase Activity in the Blood of Patients with Visceral Leishmaniasis and HIV Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 1, p.1-7, 2013. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001977>.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p.805-820, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>.

TAN, S. Y.; DEE, M. K. Elie Metchnikoff (1845-1916): discoverer of phagocytosis. 2009.

TAUBER, ALFRED I. Timeline: Metchnikoff and the phagocytosis theory. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 11, p.897-901, 2003. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1244>.

UENO, N., & WILSON, M. E.. Receptor-mediated phagocytosis of Leishmania: Implications for intracellular survival. **Trends in Parasitology**. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.05.002>

VAN ASSCHE, T., DESCHACHT, M., DA LUZ, R. A. I., MAES, L., & COS, P. .Leishmania–macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology And Medicine**, v. 51, n. 2, p.337-351, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.011>.

VAN GENDEREN, H., KENIS, H., LUX, P., UNGETH, L., MAASSEN, C., DECKERS, N., REUTELINGSPERGER, C .In vitro measurement of cell death with the annexin A5 affinity assay. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p.363-367, 2006. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.55>.

VAROL, C.; MILDNER, A.; JUNG, S. Macrophages: Development and Tissue Specialization. **Annual Review Of Immunology**, v. 33, n. 1, p.643-675, 21 mar. 2015. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112220>.

VENTURIN, G. L., CHIKU, V. M., SILVA, K. L. O., de ALMEIDA, B. F. M., & de LIMA, V. M. F. M1 polarization and the effect of PGE₂ on TNF- α production by lymph node cells from dogs with visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, [s.l.], v. 38, n. 11, p.698-704, 12 set. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/pim.12353>.

UENO, N., & WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. **Trends In Parasitology**, [s.l.], v. 28, n. 8, p.335-344, ago. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2012.05.002>.

WANDERLEY, J. L. M., MOREIRA, M. E. C., BENJAMIN, A., BONOMO, A. C. & BARCINSKI, M. A. Mimicry of Apoptotic Cells by Exposing Phosphatidylserine Participates in the Establishment of Amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in Mammalian Hosts. **The Journal of Immunology**, 1834–1839 (2006). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.3.1834>.

WINK, D. A., HINES, H. B., CHENG, R. Y. S., SWITZER, C. H., FLORES-SANTANA, W., VITEK, M. P., ... COLTON, C. A. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. **Journal Of Leukocyte Biology**, v. 89, n. 6, p.873-891, 2011. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.1010550>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. LEISHMANIASIS. **WHO**. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> > . 2015

WYNN, T. A., CHAWLA, A., & POLLARD, J. W. . Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease. **Nature**, 496(7446), 445–455, 2013. <http://doi.org/10.1038/nature12034>.

YING, W., CHERUKU, P. S., BAZER, F. W., SAFE, S. H., & ZHOU, B. . Investigation of Macrophage Polarization Using Bone Marrow Derived Macrophages. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, (76), 50323, 2013. <http://doi.org/10.3791/50323>.

ZAJAC, E., SCHWEIGHOFER, B., KUPRIYANOVA, T. A., JUNCKER-JENSEN, A., MINDER, P., QUIGLEY, J. P., & DERYUGINA, E. I. Angiogenic capacity of M1- and M2-polarized macrophages is determined by the levels of TIMP-1 complexed with their secreted proMMP-9. **Blood**, v. 122, n. 25, p.4054-4067, 2013. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-05-501494>.

ZAND, M.; NARASU, I. M. *Leishmania* Mechanisms of Evasion. **International Research Journal of Applied Basic Sciences**. v. 8, n. 4, p. 419-425, 2014

9 APÊNDICE

9.1 Padronização da polarização de macrófagos RAW 264.7 e Histogramas dos marcadores para avaliação de macrófagos M0, M1 e M2 infectados por *L. amazonensis*

A avaliação foi feita com base nos dados de dosagem de óxido nítrico, expressão de iNOS, CD86/80 e F4/80 e produção de citocinas. Os macrófagos estimulados com LPS+INF- γ ou IL-4 e IL-13 para os perfis M1 e M2 respectivamente, de fato demonstraram que ocorreu a polarização para os fenótipos de macrófagos do presente estudo.

Na figura S1.A é evidente o aumento da produção de óxido nítrico para o perfil M1, que está diretamente relacionado a maior expressão da média de intensidade de fluorescência (MFI) para iNOS (Figura S1.B) quando comparado ao M0 e M2. Outro fator é o aumento da expressão para as moléculas co-estimulatórias CD80 (Figura S1.C) e CD86 (Figura S1.D) para o M1, enquanto F4/80 (Figura S1.E) apresentou aumento apenas nos macrófagos M2. A produção de citocinas inflamatórias como IL-6 (Figura S1.F), TNF- α (Figura S1.G) e da quimiocina MCP-1 (Figura S1.H) apresentaram aumentos nos macrófagos polarizados para M1, no entanto para a citocina regulatória IL-10 (Figura S1.I) não houve diferença entre os grupos.

Os aspectos morfológicos dos macrófagos polarizados podem ser fatores que contribuem na diferenciação entre essas populações. Os macrófagos M1 (Figura S2.C e S2.D) apresentaram disposição mais espalhada e formato de “estrela” (setas cheias), enquanto os macrófagos M2 (Figura S2.E e S2.F) surgem com morfologia “oval” (setas vazias).

A Figura Suplementar 3 demonstra os histogramas dos marcadores CD80/86, F4/80 e iNOS para os macrófagos M0, M1 e M2 infectados com *Leishmania amazonensis*.

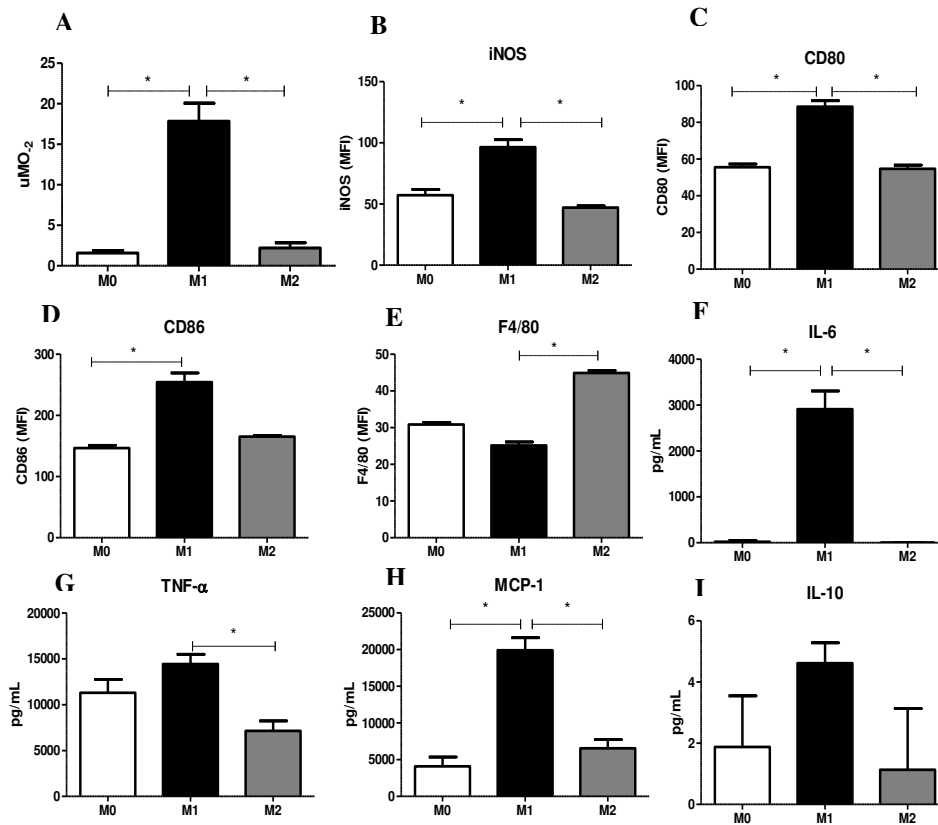


Figura Suplementar 1. Avaliação da produção de óxido nítrico, citocinas e expressão de marcadores celulares na padronização da polarização de macrófagos. Os macrófagos RAW 264.7 (1×10^5) não polarizados (M0) e previamente polarizados (M1 e M2) foram avaliados pela dosagem de óxido nítrico (Fig. 6A), expressão de marcadores para iNOS (Fig. 6B), CD80 (Fig. 6C), CD86 (Fig. 6D) e F4/80 (Fig. 6E) e quantificação de citocinas IL-6 (Fig. 6F), TNF- α (Fig. 6G), MCP-1 (Fig. 6H) e IL-10 (Fig. 6I) (Figura). Os dados são apresentados (media \pm o desvio padrão da média) sendo considerados significantes com $p < 0,05$ * (Teste ANOVA com pós teste Bonferroni ou Kruskal-Wallis com pós teste Duns).

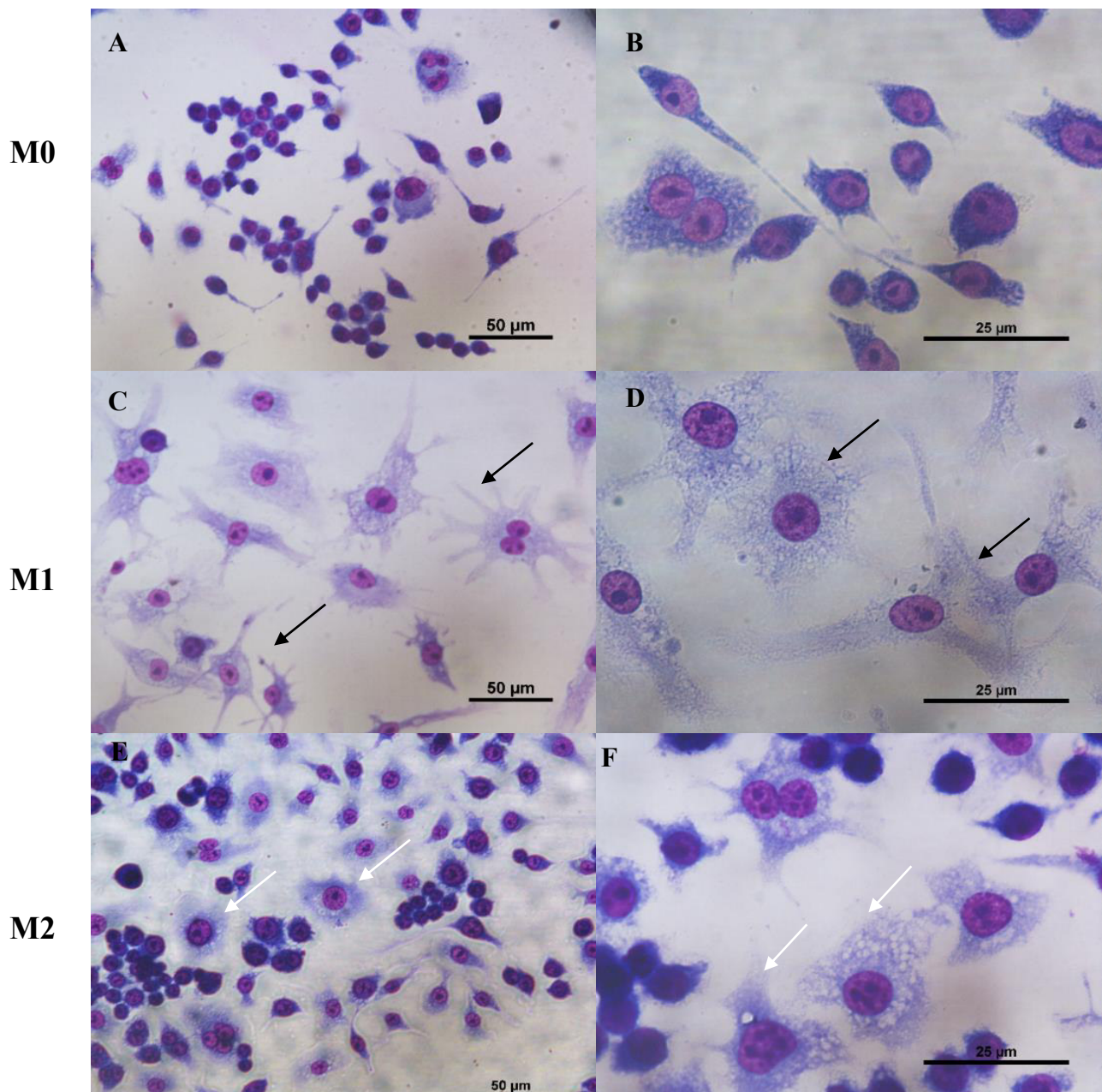


Figura Suplementar 2. Aspectos morfológicos na polarização de macrófagos. Morfologia de macrófagos RAW 264.7 (1×10^5) não polarizados (M0) e previamente polarizados (M1 e M2) avaliados em microscópio óptico com câmera acoplada em objetiva de 40x e 100x. M0 (Fig. S2.A e S2.B), M1 (Fig. S2.C e S2.D) e M2 (Fig. S2.E e S2.F). As setas pretas indicam os M1 formato “estrelado” e as setas brancas indicam os M2 formato “oval”.

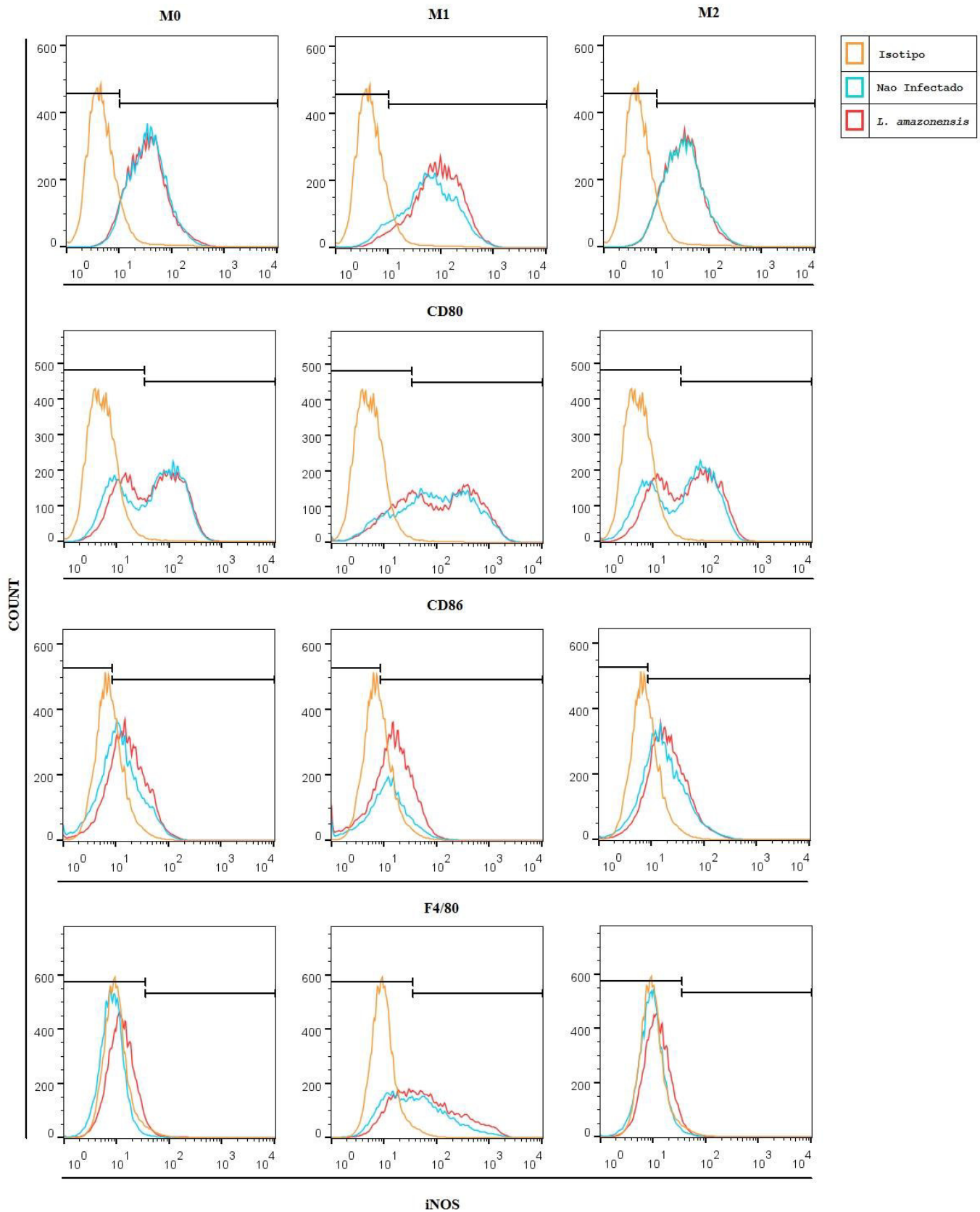


Figura Suplementar 3. Histograma do painel de marcações de macrófagos M0, M1 e M2. A expressão dos marcadores CD80, CD86, F4/80 e iNOS de macrófagos M0, M1 e M2 infectados ou não por *L. amazonensis*.

9.2 Aminoguanidina inibe a produção de óxido nítrico em macrófagos M0,M1 e M2

Para avaliação do tratamento com aminoguanidina e da sua capacidade de inibição, o sobrenadante da cultura dos macrófagos tratados foram dosados via reação de Griess. A aminoguanidina (1mM) foi capaz de inibir a produção de NO pelas células (Fig. S4).

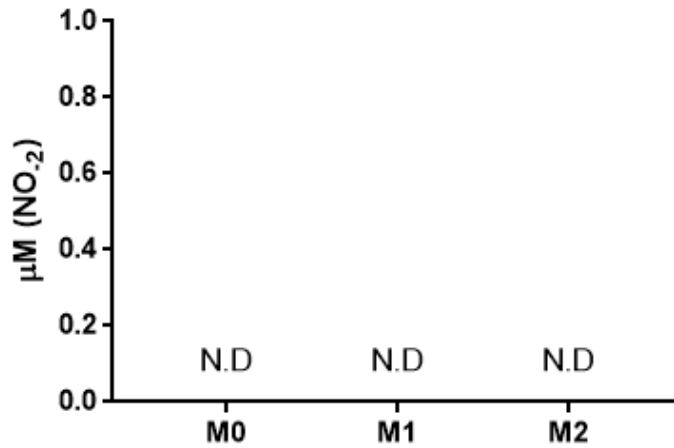


Figura Suplementar 4. Avaliação da produção de óxido nítrico por macrófagos M0,M1 e M2. Macrófagos RAW 264.7 (1×10^5) não polarizados (M0) e previamente polarizados com LPS (2000 ng/mL) e IFN- γ (100 ng/mL) para M1 e IL-4 (400 ng/mL) e IL-13 (200 ng/mL) para M2 que posteriormente foram tratados com aminoguanidina (1mM) durante 24h. Os dados são apresentados como média \pm o desvio padrão da média, sendo considerados significantes com $p < 0,05$ * (Teste Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni). ND = não detectado.