



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde  
e Medicina Investigativa**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO FERRO E DE  
PROTEÍNAS ENVOLVIDAS EM SEU METABOLISMO  
NA INFECÇÃO *IN VITRO* DE MACRÓFAGOS POR  
*Leishmania amazonensis* ou *Leishmania major***

**CAMILA VICTÓRIA SOUSA OLIVEIRA**

**Salvador - Bahia**

**2015**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde  
e Medicina Investigativa**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO FERRO E DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS  
EM SEU METABOLISMO NA INFECÇÃO *IN VITRO* DE  
MACRÓFAGOS POR *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania major***

**CAMILA VICTÓRIA SOUSA OLIVEIRA**

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Patrícia Sampaio Tavares Veras

Co-Orientadora: Dr<sup>a</sup> Juliana Perrone Bezerra de Menezes

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, para a obtenção do grau de Mestre.

**Salvador - Bahia**

**2015**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

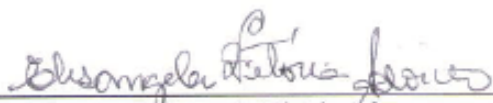
|      |  |
|------|--|
| O48e | <p>Oliveira, Camila Victória Sousa</p> <p>Avaliação do papel do ferro e de proteínas envolvidas em seu metabolismo na infecção <i>in vitro</i> de macrófagos por <i>Leishmania amazonensis</i> ou <i>Leishmania major</i>. / Camila Victória Sousa Oliveira. - 2015.<br/>112 f. : il. ; 30 cm.</p> <p>Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>a</sup> Patrícia Sampaio Tavares Veras, Laboratório de Patologia e Biontervenção.</p> <p>Dissertação (Mestrado de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2015.</p> <p>1. <i>Leishmania</i>. 2. Macrófagos. 3. Controle. 4. Susceptibilidade. 5. Ferro.<br/>I. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 616.993.161</p> |
|------|--|

"AVALIAÇÃO DO PAPEL DO FERRO NA INFECÇÃO POR Leishmania"

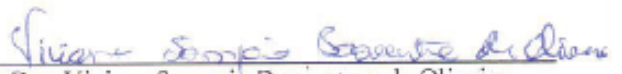
CAMILA VICTÓRIA SOUSA OLIVEIRA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Elisângela Vitória Adorno  
Professora-III  
UFBA



Dra. Viviane Sampaio Boaventura de Oliveira  
Pesquisadora  
CPqGM/FIOCRUZ



Dra. Milena Botelho Pereira Soares  
Pesquisadora Titular  
CPqGM/FIOCRUZ

*Dedico esta conquista principalmente a  
meus pais, Abelardo e Simone,  
que dedicaram uma parte de si para minha formação  
e a todos que contribuíram para esta vitória.*

## AGRADECIMENTOS

---

**A Deus**, por ter me guiado e me dado forças para enfrentar os desafios e pelo seu significado como um espírito de paz, bondade e sabedoria.

**Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – Fiocruz**, pela disponibilidade da estrutura física e pelo financiamento do presente estudo.

**Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Centro Pesquisas Gonçalo Moniz – Fiocruz**, pela oportunidade do desenvolvimento deste trabalho.

**À Dr.<sup>a</sup> Patrícia Sampaio Tavares Veras**, pela oportunidade, orientação, confiança depositada e por me mostrar como fazer ciência de qualidade.

**À Dr.<sup>a</sup> Juliana Perrone Bezerra de Menezes Fullam**, pela co-orientação, amizade, discussão e pelo apoio na correção da dissertação.

**Aos Drs.<sup>o</sup> Geraldo Gileno de Sá Oliveira, Luiz Antônio Rodrigues de Freitas, Lain Carlos Pontes-de-Carvalho e Washington Luis Conrado de Santos**, pela disponibilidade de reagentes, equipamentos e por contribuírem com discussões para o desenvolvimento do trabalho.

**À Dr.<sup>a</sup> Valéria de Matos Borges**, pelas sugestões e entusiasmo que contribuíram para o desenvolvimento do trabalho e pela disponibilidade de reagentes.

**À Dr.<sup>o</sup> Carlos Eduardo Sampaio Guedes**, pela contribuição nas discussões, sugestões, ensinamentos e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

**À Amanda Lopes Lorentz**, por ter me dado a oportunidade de participar de sua co-orientação, pelo apoio, dedicação, esforço, paciência e amizade. Obrigada por me confortar nos momentos difíceis.

**À Leila Andrade Bastos**, pelo apoio e contribuições na bancada.

**Às MSc. Beatriz Rocha Simões Dias e MSc. Niara de Jesus Almeida**, por toda a ajuda e ensinamentos, pela contribuição nas discussões, sugestões e apoio.

**Ao MSc. José Geraldo Bomfim Lima**, pelo incentivo, ensinamentos e risadas.

**Aos amigos do LPBI**, Deborah Fraga, Antônio Petersen, Lairton Borja, Manuela Solcà, Luana Palma, Isaac Queiroz, Rodrigo Araújo, Orlando Marcos, Mateus Mota, Kercia Pinheiro, Carol Versoza, Luciano Vasconcelos, Júnior Guedes, Bruna Macedo, Marcos Ferrante, Lívia Brito, Marcelo Uzêda, Camila Meira, Laís de Novaes, Yuri Silva, Amanda Fernandes, Liliane Celestino, Tiago Mota;

**À Flávia Paixão e Ana Patrícia**, pela apoio administrativo e eficiência em resolver problemas burocráticos;

**À Dr.º Cláudio Pereira Figueira e à Dr.ª Adriana Lanfredi Rangel**, da plataforma de Microscopia Eletrônica, pelos auxílios prestados.

**À Dr.ª Theolis Bessa, Dr.º Bruno Paredes, Dr.ª Luciana de Aragão, Msc. Liliane Cunha**, pelos auxílios prestados com a citometria de fluxo.

**À Coordenação de Ensino**, especialmente a Iumara Oliveira e Geiqsa Barbosa, pela competência.

**Aos colegas do curso de Mestrado**, pela cooperação mútua.

**Aos funcionários do CPqGM**, especialmente Reinaldo, Magno e aos demais membros da equipe da portaria e segurança que tornam o bom dia bastante acolhedor; Dona Lia, Dona Vanda, Cláudio e aos demais membros da equipe de serviços gerais e limpeza; Sérgio e Dona Maura, membros dos serviços de esterilização e aos membros do Biotério, pelo cuidado e fornecimento dos animais.

**Aos amigos que fiz durante minha caminhada**, em especial, aos mestres, funcionários e colegas do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia e aos demais amigos da vida.

**A minha família**: meus pais, Abelardo Oliveira Filho e Simone Meneses de Sousa Oliveira, meus irmãos, Pedro Victor Sousa Oliveira e Márcio Henrique Sousa Oliveira, e meus amores caninos, Kid, Rana e Vida, pelo amor incondicional.

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização do presente trabalho, o meu sincero agradecimento.

If you can't fly, then run  
If you can't run, then walk  
If you can't walk, then crawl  
But whatever you do,

You have to **keeping moving forward**

*Martin Luther King Jr.*



OLIVEIRA, Camila Victória Sousa. Avaliação do papel do ferro e de proteínas envolvidas em seu metabolismo na infecção *in vitro* de macrófagos por *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania major*. 112 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

## RESUMO

A leishmaniose é uma antropozoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania* e é considerada uma das principais doenças negligenciadas. Modelos experimentais são amplamente utilizados para uma melhor compreensão da doença e dos mecanismos relacionados à resistência e susceptibilidade à infecção. Macrófagos de camundongos CBA controlam a infecção por *Leishmania major* ao passo que são permissivos a *Leishmania amazonensis*. Além disso, estudos baseados em abordagem proteômica demonstraram padrões distintos de expressão proteica em macrófagos derivados de medula óssea (BMMΦ) infectados por essas espécies de *Leishmania*. Dentre as proteínas diferentemente expressas, foram identificadas proteínas envolvidas no metabolismo de ferro moduladas positivamente em macrófagos infectados por *L. amazonensis*. Adicionalmente, embora ainda existam controvérsias, diversos estudos têm abordado a participação do elemento ferro na interação parasito-hospedeiro e no estabelecimento das infecções por tripanossomatídeos, incluindo *Leishmania*. Assim, para melhor compreender os mecanismos envolvidos nessa doença, o presente estudo buscou explorar o modelo comparativo de resistência e suscetibilidade do camundongo CBA para determinar o papel do ferro na infecção por *Leishmania*. Nossa hipótese é que a expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro é modulada diferentemente em macrófagos de camundongos CBA infectados por *L. amazonensis*, em comparação à *L. major*, favorecendo a sobrevivência intracelular do parasito. Nosso objetivo foi avaliar a expressão de proteínas que participam do metabolismo de ferro, como receptor de transferrina (Tf), CD71, e heme oxigenase-1, HO-1, e determinar o efeito da modulação da disponibilidade de ferro na infecção por *Leishmania*. Observamos maior expressão de HO-1 em BMMΦ infectados por *L. amazonensis* ( $18,34 \pm \text{SD ng/mL}$ ), quando comparados a BMMΦ infectados por *L. major* ( $7,07 \pm \text{SD ng/mL}$ ), utilizando ELISA. Maior expressão de CD71 também foi observada na infecção por *L. amazonensis* (MFI 2.103) em comparação à infecção por *L. major* (MFI 472), utilizando FACS, além de uma maior ligação e captação de HoloTf (Tf carregada com ferro). Embora tenha sido observado que essas proteínas encontram-se diferentemente expressas em BMMΦ infectados por essas duas espécies de *Leishmania*, não foram observadas diferenças significativas na concentração intracelular do ferro. Em seguida, ensaios funcionais a partir da modulação da disponibilidade intracelular de ferro foram realizados com o objetivo de avaliar seu papel no desfecho da infecção por *Leishmania*. Os resultados mostraram que a depleção de ferro reduz em 90% o percentual de BMMΦ infectados por *L. amazonensis* e 70% dos infectados por *L. major*. Adicionalmente, a suplementação de ferro aumenta o percentual de BMMΦ infectados por *L. amazonensis*, de 69,64 para 82,79%, e a carga parasitária, de 2,996 para 4,001 parasitos/célula, assim como a viabilidade intracelular de *L. amazonensis* e *L. major*. Em conjunto, os dados obtidos nesse estudo indicam que, apesar de *L. amazonensis* modular positivamente a expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro, esse metal apresenta um papel importante na infecção pelas duas espécies de *Leishmania*, favorecendo a sobrevivência intracelular desse parasito.

**Palavras-chave:** *Leishmania*, Macrófagos, Controle, Susceptibilidade, Ferro.

OLIVEIRA, Camila Victória Sousa. Evaluation of role of iron and proteins involved in the etabolism in infection of macrophages *in vitro* by *Leishmania amazonensis* or *Leishmania major*. 112 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is an anthropozoonosis caused by the protozoan parasite *Leishmania* and is considered one of the main neglected diseases. Animal models are widely used to better understand the disease and the mechanisms involved in resistance and susceptibility to infection. CBA mouse macrophages control the infection by *L. major*, while are permissive to *L. amazonensis*. Proteomic studies showed different protein profiles in bone marrow macrophages (BMMΦ) infected these species of *Leishmania*. We also observed that proteins involved in iron metabolism were positively modulated in *L. amazonensis*-infected macrophages. In addition, although literature review showed controverse data, several studies have addressed the role iron plays in host-parasite interaction and the establishment of trypanosomatids infections, including *Leishmania*. To better understand the mechanisms of the disease, this study sought to evaluate in a comparative model of resistance and susceptibility, using CBA macrophages, the role iron plays in *Leishmania* infection. Our hypothesis is that the expression of proteins involved in iron metabolism is differently modulated in CBA mice macrophages infected with *L. amazonensis* in comparison to *L. major*, favoring the intracellular survival of the parasite. Our goal was to evaluate the expression of proteins involved in iron metabolism of CBA mice macrophages, such as transferrin receptor (Tf), CD71, and heme oxygenase 1 (HO-1) and determine the effect of the modulation of intracellular iron in *Leishmania* infection. Using ELISA, we confirmed a higher expression of HO-1 in *L. amazonensis*- (18.34 ng/mL) compared to *L. major*-infected CBA macrophages (7.07 ng/mL). Using FACS analysis, CD71 showed to be higher expressed in *L. amazonensis*- (MFI 2.103) than in *L. major*-infected macrophages (MFI 472), in addition to higher binding and take up of HoloTf in these cells. Although it has been observed that proteins involved in iron metabolism were differently expressed in BMMΦ infected with these *Leishmania* species, no significant differences were observed in intracellular iron concentration. To further evaluate the role iron plays in the outcome of *Leishmania* infection, we modulated iron availability to *Leishmania*-infected cells using iron chelates or iron supplements. The results show that iron depletion reduces in 90% *L. amazonensis* infection and in 70% *L. major* infection. In addition, iron supplementation increased the percentage of *L. amazonensis*-infected cells from 69.64 to 82.79% and parasite load from 2,996 to 4,001 *Leishmania*/cell, as well as in the intracellular viability of both *Leishmania* species. In sum, these data indicate that although there is a positive modulation of proteins involved in iron metabolism in *L. amazonensis* infection, this metal seems to favor the survival of both parasite species in CBA macrophages.

**Keywords:** *Leishmania*, Macrophages, Control, Susceptibility, Iron.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

---

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Metabolismo celular de ferro..   | 24 |
| <b>Figura 2.</b> Avaliação do percentual de infecção e carga parasitária na infecção de BMMΦ e macrófagos peritoneais infectados por <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i> ..... | 47 |
| <b>Figura 3.</b> Avaliação da concentração de HO-1 em BMMΦ infectados por <i>Leishmania</i> .....   | 48 |
| <b>Figura 4.</b> Avaliação da expressão de CD71 em BMMΦ infectados por <i>Leishmania</i> ...  | 50 |
| <b>Figura 5.</b> Ligação de HoloTf em macrófagos infectados por <i>Leishmania</i> .....   | 51 |
| <b>Figura 6.</b> Quantificação da ligação de HoloTf a macrófagos infetados por <i>Leishmania</i> .....  | 52 |
| <b>Figura 7.</b> Captação de HoloTf em BMMΦ infectados por <i>Leishmania</i> .....  | 53 |
| <b>Figura 8.</b> Quantificação da captação de HoloTf em BMMΦ infetados por <i>Leishmania</i> .....  | 54 |
| <b>Figura 9.</b> Concentração intracelular de ferro em BMMΦ infectados por <i>Leishmania</i> .....  | 55 |
| <b>Figura 10.</b> Efeito da modulação da disponibilidade de ferro sobre a proliferação de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....  | 57 |
| <b>Figura 11.</b> Efeito da modulação da disponibilidade de ferro sobre a viabilidade de BMMΦ.....  | 58 |
| <b>Figura 12.</b> Efeito da modulação da disponibilidade de ferro sobre a concentração intracelular deste íon em BMMΦ de camundongos CBA.....                                       | 59 |
| <b>Figura 13.</b> Depleção de ferro sobre a infecção de <i>L. amazonensis</i> .....   | 61 |
| <b>Figura 14.</b> Depleção de ferro sobre a infecção de <i>L. major</i> .....   | 63 |
| <b>Figura 15.</b> Suplementação de ferro sobre a infecção de <i>L. amazonensis</i> .....  | 65 |
| <b>Figura 16.</b> Suplementação de ferro sobre a infecção de <i>L. major</i> .....  | 67 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

|                |   |
|----------------|---|
| <b>ANOVA</b>   | Análise de variância ( <i>Analysis of Variance</i> )  |
| <b>apoTf</b>   | Apotransferrina   |
| <b>BMMΦ</b>    | Macrófagos derivados de células precursoras de medula óssea   |
| <b>B.O.D.</b>  | Demanda bioquímica de oxigênio ( <i>Biochemical Oxygen Demand</i> )   |
| <b>BV</b>      | Biliverdina   |
| <b>CD163</b>   | <i>Cluster</i> de diferenciação 163   |
| <b>CD71</b>    | <i>Cluster</i> de diferenciação 71 ou receptor de transferrina  |
| <b>CD91</b>    | <i>Cluster</i> de diferenciação 91  |
| <b>CEUA</b>    | Comissão de Ética no Uso de Animais   |
| <b>CoPP</b>    | Cobalto Protoporfirina IX   |
| <b>DAPI</b>    | <i>4'-6-diamidino-2-phenylindole</i>  |
| <b>DCT1</b>    | Transportador de cátion divalente 1 ( <i>Divalent Cation Transporter 1</i> )  |
| <b>DFO</b>     | Desferroxamina  |
| <b>DMEM</b>    | Meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco ( <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> )                         |
| <b>DMT1</b>    | Transportador de metal divalente 1 ( <i>Divalent Metal Transporter 1</i> )  |
| <b>DNA</b>     | Ácido desoxirribonucleico   |
| <b>EDTA</b>    | Ácido etilenodiamina tetracético ( <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i> )  |
| <b>ELISA</b>   | Ensaio imunoenzimático ( <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> )   |
| <b>FACS</b>    | Citometria de Fluxo ( <i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i> )   |
| <b>Fpn1</b>    | Ferroportina 1. Gene <i>SLC40A1</i>   |
| <b>Hb-Hp</b>   | Hemoglobina-haptoglobina  |
| <b>Heme-hx</b> | Heme-hemopexina   |
| <b>HEPES</b>   | Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanossulfônico<br>[ <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i> ] |
| <b>HO</b>      | Heme oxigenase  |

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| <b>HoloTf</b>                  | Holotransferrina  |
| <b>HPN</b>                     | Hepcidina   |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | Interferon- $\gamma$  |
| <b>IgG</b>                     | Imunoglobulina G  |
| <b>LAMP</b>                    | Proteína de membrana associada ao lisossomo ( <i>Lysosomal-Associated Membrane Protein</i> )  |
| <b>LC</b>                      | Leishmaniose cutânea  |
| <b>LCD</b>                     | Leishmaniose cutâneo difusa   |
| <b>Lf</b>                      | Lactoferrina  |
| <b>LFR1</b>                    | Redutase de íon férrico de <i>Leishmania</i> ( <i>Leishmania ferric Reductase 1</i> )   |
| <b>LHR1</b>                    | Resposta a heme de <i>Leishmania</i> ( <i>Leishmania Heme Response 1</i> )  |
| <b>LIP</b>                     | <i>Pool</i> intracelular de ferro ( <i>labile iron pool</i> )   |
| <b>LIT1</b>                    | Transportador de ferro de <i>Leishmania</i> 1 ( <i>Leishmania Iron Transporter 1</i> )  |
| <b>LMC</b>                     | Leishmaniose mucocutânea  |
| <b>LT</b>                      | Leishmaniose tegumentar   |
| <b>LV</b>                      | Leishmaniose visceral   |
| <b>M-CSF</b>                   | Fator estimulatório de colônia de macrófagos ( <i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> )  |
| <b>M<math>\Phi</math></b>      | Macrófagos  |
| <b>Mfrn 1/2</b>                | Transportador mitocondrial de ferro ( <i>Mitoferrin</i> )   |
| <b>MFI</b>                     | Mediana de intensidade de fluorescência   |
| <b>MHC</b>                     | Complexo principal de histocompatibilidade  |
| <b>MIF</b>                     | Média de intensidade de fluorescência   |
| <b>NNN</b>                     | Meio <i>Novy-Nicolle-MacNeal</i>  |
| <b>Nramp1</b>                  | Proteína de macrófagos associada à resistência natural do tipo 1 ( <i>Natural resistance associated macrophage protein 1</i> ). Gene <i>SLC11A1</i> |
| <b>Nramp2</b>                  | Proteína de macrófagos associada à resistência natural do tipo 2 ( <i>Natural resistance associated macrophage protein 2</i> ). Gene <i>SLC11A2</i> |
| <b>OMIM</b>                    | Herança Mendeliana em Homens Online ( <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> )  |

|                        |   |
|------------------------|---|
| <b>PCR-RT</b>          | Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase      |
| <b>pH</b>              | Potencial hidrogeniônico  |
| <b>RIPA</b>            | <i>Radio Immunoprecipitation Assay</i>  |
| <b>RNA<sub>m</sub></b> | Ácido ribonucleico mensageiro   |
| <b>RPMI</b>            | Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>                                     |
| <b>ROS</b>             | Espécies reativas de oxigênio   |
| <b>SBF</b>             | Soro bovino fetal   |
| <b>SD</b>              | Desvio-padrão ( <i>Standard deviation</i> )                                     |
| <b>SLC</b>             | Carreadores de soluto ( <i>Solute Carrier</i> )                                 |
| <b>SLC11A1</b>         | Carreadores de soluto da família 11 membro 1                                    |
| <b>SLC11A2</b>         | Carreadores de soluto da família 11 membro 2                                    |
| <b>Sn MP</b>           | Tin-mesoporfirina   |
| <b>Steap 3</b>         | Ferriredutase ( <i>six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3</i> ) |
| <b>Tf</b>              | Transferrina  |
| <b>TfR1</b>            | Receptor de transferrina 1  |
| <b>TLR</b>             | Receptores do tipo Toll ( <i>Toll Like Receptor</i> )                           |
| <b>VP</b>              | Vacúolo parasitóforo  |

# SUMÁRIO

---

|   |    |
|---|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | 17 |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....   | 19 |
| 2.1 ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE .....   | 19 |
| 2.2 PARASITO, TRANSMISSÃO E CICLO DE VIDA .....   | 19 |
| 2.3 INTERAÇÃO MACRÓFAGO- <i>LEISHMANIA</i> .....  | 20 |
| 2.4 MODELO EM CAMUNDONGOS DA LEISHMANIOSE .....   | 21 |
| 2.5 METABOLISMO DE FERRO .....  | 23 |
| 2.6 MODULAÇÃO DE PROTEÍNAS DA CÉLULA HOSPEDEIRA ENVOLVIDAS NO<br>METABOLISMO DE FERRO NA INFECÇÃO POR <i>Leishmania</i> ..... | 28 |
| 2.7 <i>Leishmania</i> E OS MECANISMOS DE AQUISIÇÃO DE FERRO NA INFECÇÃO<br>.....  | 29 |
| 2.8 FERRO E SEU PAPEL NA INFECÇÃO POR <i>Leishmania</i> .....   | 30 |
| <b>3. HIPÓTESE</b> .....  | 32 |
| <b>4. OBJETIVOS</b> .....   | 33 |
| 4.1 GERAL.....  | 33 |
| 4.2 ESPECÍFICOS.....  | 33 |
| <b>5. DESENHO EXPERIMENTAL</b> .....  | 34 |
| <b>6. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | 36 |
| 6.1 ANIMAIS .....   | 36 |
| 6.2 CULTURA DE CÉLULAS L929 E PRODUÇÃO DE SOBRENADANTE<br>CONTENDO M-CSF .....  | 36 |
| 6.3 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA.....   | 36 |
| 6.4 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEIAIS .....   | 37 |
| 6.5 CULTIVO DE PARASITOS DE <i>Leishmania</i> .....   | 37 |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 6.6       | SEPARAÇÃO DE PROMASTIGOTAS METACÍCLICAS DE <i>Leishmania</i> .....  | 38        |
| 6.7       | PLAQUEAMENTO E INFECÇÃO <i>IN VITRO</i> DE MACRÓFAGOS POR <i>Leishmania</i> .....                                     | 39        |
| 6.8       | EXPRESSÃO E QUANTIFICAÇÃO PROTEICAS EM BMMΦ INFECTADOS POR <i>Leishmania</i> .....                                    | 40        |
| 6.8.1     | Determinação da Concentração de Ho-1 .....  | 40        |
| 6.8.2     | Expressão de CD71.....  | 40        |
| 6.9       | LIGAÇÃO E INTERNALIZAÇÃO DE HoLoTf .....  | 41        |
| 6.10      | CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE FERRO.....   | 42        |
| 6.11      | MODULAÇÃO DA DISPONIBILIDADE DE FERRO .....   | 43        |
| 6.12      | VIABILIDADE DE PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania</i> EM CULTURA AXÊNICA .....  | 43        |
| 6.13      | VIABILIDADE DE BMMΦ DE CAMUNDONGOS CBA .....  | 44        |
| 6.14      | CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE FERRO EM BMMΦ DE CAMUNDONGOS CBA .....   | 44        |
| 6.15      | CARGA PARASITÁRIA E PERCENTUAL DE MACRÓFAGOS INFECTADOS POR <i>Leishmania</i> .....                                   | 44        |
| 6.16      | VIABILIDADE DE <i>Leishmania</i> INTRACELULAR EM MACRÓFAGOS INFECTADOS.....   | 45        |
| <b>7.</b> | <b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....  | <b>45</b> |
| <b>8.</b> | <b>CONSIDERAÇÕES ÉTICAS</b> .....   | <b>46</b> |
| <b>9.</b> | <b>RESULTADOS</b> .....   | <b>47</b> |
| 9.1       | PERCENTUAL DE INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS CBA INFECTADOS POR <i>L. amazonensis</i> OU <i>L. major</i> ..... | 47        |
| 9.2       | CONCENTRAÇÃO DE HO-1.....   | 48        |
| 9.3       | EXPRESSÃO DE CD71.....  | 49        |
| 9.4       | LIGAÇÃO E CAPTAÇÃO DE HOLOTf.....   | 51        |
| 9.5       | CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE FERRO.....   | 54        |



|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 9.6        | PROLIFERAÇÃO DE PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania</i> EM CULTURA AXÊNICA .....   | 56         |
| 9.7        | VIABILIDADE DE BMMΦ DE CAMUNDONGOS CBA .....  | 57         |
| 9.8        | CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE FERRO EM BMMΦ DE CAMUNDONGOS CBA .....   | 58         |
| 9.9        | EFEITO DA MODULAÇÃO DA DISPONIBILIDADE DE FERRO SOBRE A INFECÇÃO DE BMMΦ POR <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i> ..... | 59         |
| <b>10.</b> | <b>DISCUSSÃO</b> .....  | <b>68</b>  |
| <b>11.</b> | <b>CONCLUSÕES</b> .....   | <b>75</b>  |
|            | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | <b>76</b>  |
|            | <b>APÊNDICE</b> .....   | <b>92</b>  |
|            | <b>ANEXO</b> .....  | <b>113</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma antropozoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania* e é considerada uma das principais doenças negligenciadas, sendo endêmica em 98 países ou territórios, com prevalência mundial de 12 milhões de pessoas infectadas. Estima-se que 350 milhões de pessoas encontram-se sob o risco de contrair a doença (WHO, 2010; ALVAR et al., 2012). A cada ano, aproximadamente 2 milhões de casos novos são notificados, em sua maioria, em países pobres ou em desenvolvimento (WHO, 2010; SECUNDINO et al., 2011 p. 90; BORGES et al., 2011, p. 102).

A leishmaniose apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, as quais estão associadas às interações multifatoriais que dependem do vetor, espécie e virulência do parasito, resposta imune do hospedeiro e ambiente (GRIMALDI JR.; TESH, 1993).

Modelos experimentais da leishmaniose são utilizados para uma melhor compreensão da doença (HANDMAN, 2001; GUPTA; NISHI, 2011). O modelo em camundongos vem sendo utilizado para estudar diversos aspectos da doença, relacionados à resistência e susceptibilidade à infecção, como a interação parasito-hospedeiro, resposta imunológica e fatores que determinam o curso da infecção (HANDMAN, 2001; FOOTE; HANDMAN, 2005; GUPTA; NISHI, 2011).

O modelo da linhagem CBA tem sido utilizado em nosso laboratório para diversos estudos experimentais da leishmaniose, uma vez que reproduz diferentes desfechos clínicos na infecção por diferentes espécies de *Leishmania*. Dado prévios do nosso laboratório demonstraram que camundongos CBA são resistentes a infecção por *L. major*, ao passo que são susceptíveis a infecção por *L. amazonensis* (DE SOUZA et al., 2000). Além disso, estudos do nosso laboratório mostram ainda que macrófagos de camundongos CBA controlam a infecção por *L. major*, enquanto são permissivos à infecção por *L. amazonensis*, indicando que a natureza do parasito e sua interação com a célula hospedeira podem determinar a polarização da resposta imune (GOMES et al., 2003; MENEZES, 2010). Adicionalmente, demonstramos ainda que macrófagos apresentam um perfil de expressão proteica distinto em resposta à infecção por *L. amazonensis* em comparação à causada por *L. major* (MENEZES, 2010; MENEZES et al., 2013). Dentre as proteínas identificadas como diferentemente expressas em BMM $\Phi$  infectados por essas duas

espécies de *Leishmania*, foi observada a expressão aumentada de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro em BMM $\Phi$  infectados por *L. amazonensis*, quando comparada à infecção por *L. major* (MENEZES, 2010).

O fornecimento de ferro é essencial para sobrevivência de diversos organismos e o desenvolvimento de estratégias para a aquisição desse metal é necessário tanto para células de mamíferos, quanto para patógenos, principalmente sob condições limitadas deste nutriente (THEURL et al., 2005). Esse metal é fundamental na interação patógeno-hospedeiro (DOHERTY, 2007) e sua aquisição pelas células hospedeiras é importante para a sobrevivência intracelular de microrganismos (SCHAIBLE; KAUFMANN, 2004).

Existem evidências que o ferro presente nas células hospedeiras tem papel central na infecção por *Leishmania* (TAYLOR; KELLY, 2010; REYES-LÓPEZ et al., 2012). Alguns estudos têm apontado a modulação da expressão de proteínas envolvidas em atividades como transporte, armazenamento e metabolismo de ferro em células infectadas (DAS et al., 2009; LUZ et al., 2012; BEN-OTHTMAN et al., 2014). Entretanto, esses estudos não buscaram avaliar a expressão dessas proteínas em um modelo comparativo, que permita compreender a relação entre modulação da expressão de proteínas do metabolismo de ferro e os perfis de resposta à infecção. Adicionalmente, o efeito sobre a concentração intracelular de ferro em resposta à infecção por *Leishmania* em células hospedeiras ainda precisa ser melhor elucidado (DAS et al., 2009). Nesse estudo, utilizamos o modelo dicotômico de infecção por *L. amazonensis* ou *L. major* em camundongos CBA visando entender melhor o metabolismo de ferro na infecção por *Leishmania* e o papel deste nutriente na sobrevivência intracelular desse parasito. Nossa hipótese é que a expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro é modulada diferentemente em macrófagos de camundongos CBA infectados por essas duas espécies de *Leishmania*, favorecendo a sobrevivência intracelular do parasito. Assim, proteínas que participam do aumento da disponibilidade de ferro à célula, como CD71 e HO-1, estariam moduladas positivamente em células susceptíveis a infecção por *L. amazonensis*, levando a uma maior entrega desse nutriente aos parasitos em comparação a infecção por *L. major*. Desta forma, o presente trabalho busca avaliar o papel do ferro em macrófagos de camundongos da linhagem CBA infectados por *Leishmania*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada, endêmica em 98 países ou territórios de cinco continentes, compostos por Américas Latina e Central, África, Ásia e sul da Europa (WHO, 2010; ALVAR et al., 2012). Aproximadamente 350 milhões de pessoas encontram-se sob risco de contrair a doença e estima-se prevalência mundial de 12 milhões de pessoas infectadas e a incidência anual de 2 milhões, em sua maioria, em países pobres ou em desenvolvimento (WHO, 2010; SECUNDINO et al., 2011 p. 90; BORGES et al., 2011, p. 102).

Essa doença é uma antropozoonose causada por protozoários tripanossomatídeos flagelados do gênero *Leishmania*, podendo apresentar diversas formas clínicas, às quais estão associadas às interações de diferentes fatores como vetores, espécie do parasito, resposta imune do hospedeiro e ambiente (GRIMALDI JR.; TESH, 1993). As manifestações clínicas da leishmaniose são normalmente divididas em leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT) (BAILEY; LOCKWOOD, 2007). A forma visceral da doença acomete principalmente órgãos internos, enquanto a LT é caracterizada por apresentar manifestações clínicas em pele ou mucosas (WHO, 2010). A LT apresenta três formas clínicas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutâneo difusa (LCD) e leishmaniose mucocutânea (LMC). No Novo Mundo, as principais espécies causadoras de LT são *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis*, e *Leishmania mexicana*; enquanto que as descritas no Velho Mundo são *Leishmania major*, *Leishmania tropica* e *Leishmania aethiopica* (GRIMALDI JR.; TESH, 1993).

### 2.2 PARASITO, TRANSMISSÃO E CICLO DE VIDA

Os parasitos do gênero *Leishmania* spp. são protozoários digenéticos uniflagelados pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Tripanosomatidae (GRIMALDI JR.; TESH, 1993). A *Leishmania* apresenta ciclo de vida heteroxênico, tendo como hospedeiros os vertebrados mamíferos e os insetos dípteros flebotomíneos fêmeas, distribuídos em dois gêneros: *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae (GRIMALDI JUNIOR.; TESH, 1993). Seu ciclo biológico apresenta dois estágios de

desenvolvimento: promastigotas e amastigotas (GRIMALDI JR.; TESH, 1993; BORGES et al., 2011, p. 102). O estágio amastigota é observado no interior de células hospedeiras dos vertebrados, os macrófagos e, eventualmente, células dendríticas (GUPTA; NISHI, 2011; TEIXEIRA et al., 2013, p. 17), enquanto que as formas promastigotas constituem o estágio flagelado encontrado no trato digestório dos hospedeiros invertebrados. Durante seu desenvolvimento no trato digestório do inseto vetor, as formas promastigotas apresentam alguns estágios morfológicos distintos, principalmente os morfotipos procíclicos e metacíclicos, cujas diferenças entre estes estão na proliferação e infectividade do parasito (MOSSER; BRITTINGHAM, 1997).

A infecção do inseto hematófago por *Leishmania* ocorre durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo fêmea em hospedeiro vertebrado infectado (GUPTA; NISHI, 2011). As formas amastigotas ingeridas pelo inseto vetor chegam ao seu intestino médio e iniciam um processo de diferenciação, transformando-se em formas promastigotas, as quais se multiplicam por divisão binária. Progressivamente, durante o processo de diferenciação, denominado metaciclologênese, surgem formas promastigotas metacíclicas, estágio não proliferativo e infectivo. Estas formas migram para a região do intestino anterior do vetor podendo ser transmitidas para um novo hospedeiro vertebrado durante segundo repasto sanguíneo. Em seguida, as formas promastigotas são internalizadas por células fagocíticas do hospedeiro vertebrado, principalmente macrófagos, recomeçando seu ciclo de vida.

### 2.3 INTERAÇÃO MACRÓFAGO-LEISHMANIA

Diversos trabalhos contribuíram para a compreensão dos mecanismos envolvidos na interação *Leishmania*-célula hospedeira (MOSSER; ROSENTHAL, 1993; LIU; UZONNA, 2012; PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015), entretanto ainda assim existem questões que permanecem em aberto sobre os eventos envolvendo esse processo. O macrófago é a principal célula hospedeira na interação e fagocitose de *Leishmania*, desempenhando papel importante na imunidade inata e adaptativa (WANG et al., 2013). A interação macrófago-*Leishmania* é complexa, uma vez que o parasito expressa diferentes ligantes que podem interagir com múltiplos receptores da célula do hospedeiro (MOSSER; ROSENTHAL, 1993; MOSSER; MILES, 2007). A infecção de macrófagos por *Leishmania* ocorre em

diversas etapas incluindo o reconhecimento do parasito, adesão, sinalização, fagocitose e multiplicação do parasito (MOSSER; ROSENTHAL, 1993; DOMÍNGUEZ; TORAÑO, 1999; TEIXEIRA et al., 2013). Sabe-se que os eventos que ocorrem nas fases iniciais da infecção por *Leishmania* são cruciais na determinação do curso da infecção.

Após a internalização da *Leishmania* pela célula hospedeira, ocorre o processo de diferenciação das formas promastigotas em amastigotas, denominada de amastigogênese. A forma amastigota, intracelular obrigatória, é capaz de sobreviver e se multiplicar no interior de vacúolos parasitóforos (VPs) (DESJARDINS; DESCOTEAUX, 1999; TEIXEIRA et al., 2013, p. 41), que são estruturas dinâmicas (FORESTIER et al., 2011; REAL; MORTARA, 2012) com propriedades similares aos compartimentos da via endocítica do hospedeiro. Esses compartimentos são caracterizados como fagolisossomas, pois tem pH ácido, enzimas lisossomais, e suas membranas apresentam marcadores de endossomo tardio e lisossomo, incluindo microsialina, rab 7, LAMP-1, LAMP-2, ATPase vacuolar e moléculas de MHC classe I e II (ANTOINE et al., 1991; LANG et al., 1994; ANTOINE et al., 1998).

## 2.4 MODELO EM CAMUNDONGOS DA LEISHMANIOSE

Modelos experimentais da leishmaniose são utilizados para uma melhor compreensão da doença, pois apresentam algumas similaridades com a patologia humana. A infecção de camundongos de diferentes linhagens por uma variedade de *Leishmania* spp. patogênicas e com características distintas resulta no desenvolvimento de respostas imunológicas e alterações patológicas semelhantes às observadas em humanos (GUPTA; NISHI, 2011). Desta forma, o uso de modelos animais pode contribuir para o entendimento de aspectos relacionados à interação parasito-hospedeiro, bem como a resposta imunológica e os fatores que determinam o curso da infecção (FOOTE; HANDMAN, 2005; GUPTA; NISHI, 2011).

Em trabalho anterior realizado em nosso laboratório, foi estabelecido um modelo de infecção utilizando camundongos da linhagem CBA que apresentam perfis de resposta imuno-inflamatória e padrões histopatológicos diferentes à infecção por *L. amazonensis* ou *L. major* (LEMOS DE SOUZA et al., 2000). Na infecção por *L. major*, observa-se infiltrado linfocitário e macrófago com formação

de granulomas no local da lesão, além da produção de citocinas como interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e IL-10, demonstrando um perfil de resposta imune protetora com a expansão de células T CD4<sup>+</sup> *helper* tipo 1 (Th1). Por outro lado, células do linfonodo de camundongos infectados por *L. amazonensis* apresentaram uma resposta imunológica de células T CD4<sup>+</sup> *helper* tipo 2 (Th2), com produção de citocinas IL-4 e IL-10, mas não de IFN- $\gamma$ , associada a uma alta carga parasitária no local da lesão. Assim, foi demonstrado que os camundongos da linhagem CBA controlam a infecção por *L. major*, sendo, portanto, considerados resistentes, uma vez que desenvolvem pequenas lesões que curam espontaneamente de 10-12 semanas, ao passo que são permissivos à infecção por *L. amazonensis* (LEMOS DE SOUZA et al., 2000).

Adicionalmente, dados do nosso grupo demonstraram que macrófagos peritoneais de camundongos CBA infectados por essas duas espécies de *Leishmania* apresentam respostas distintas à infecção (GOMES et al., 2003), indicando que a natureza do parasito e sua interação com a célula hospedeira podem determinar a polarização da resposta imune. Além disso, no intuito de aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos das diferenças observadas durante a infecção de macrófagos por diferentes espécies de *Leishmania*, estudos baseados em abordagem proteômica foram realizados. Dessa forma, MENEZES e colaboradores (2013) demonstraram que *L. amazonensis* e *L. major* modulam de forma diferenciada a expressão proteica em macrófagos peritoneais de camundongos CBA. Similarmente aos macrófagos peritoneais inflamatórios, BMM $\Phi$  respondem de forma distinta à infecção por *L. amazonensis* e *L. major* e apresentam perfis proteicos diferenciados (MENEZES, 2010). Dentre as proteínas identificadas com expressão diferencial em BMM $\Phi$  de camundongos da linhagem CBA infectados por *Leishmania*, foram encontradas aquelas associadas às diversas funções como glicólise, tráfego intracelular, transporte de íons, defesa a antioxidantes, proteólise, apoptose, resposta inflamatória, sinalização e adesão celular, além de alguns receptores e enzimas. Adicionalmente, foram identificadas proteínas envolvidas no metabolismo de ferro, como CD71 e HO-1, as quais apresentaram modulação positiva na infecção por *L. amazonensis*, quando comparados a BMM $\Phi$  infectados por *L. major* (MENEZES, 2010).

Estudos baseados em abordagem em larga escala, como a proteômica, podem ser úteis na identificação de marcadores moleculares envolvidos no estabelecimento e controle da Leishmaniose. Em conjunto, esses dados sugerem que, a partir do primeiro contato do parasito com o macrófago, a célula hospedeira produz, de forma distinta, fatores que teriam papel importante no curso da infecção conferindo aos camundongos da linhagem CBA resistência à infecção por *L. major* e susceptibilidade à infecção por *L. amazonensis*. Assim, esse modelo tem a vantagem de permitir a avaliação da infecção por espécies distintas de *Leishmania* sobre a resposta de camundongos de mesmo *background* genético.

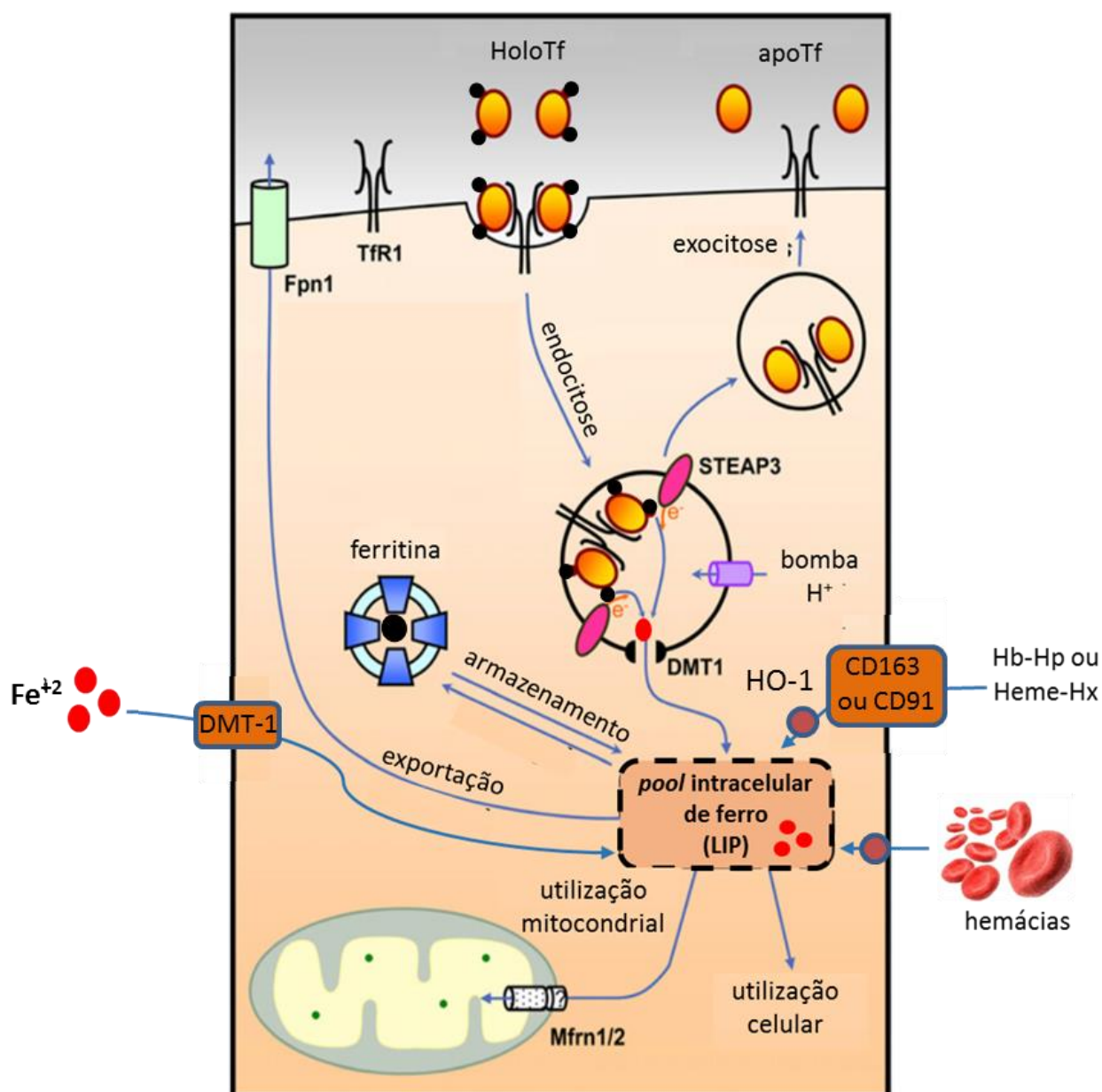
## 2.5 METABOLISMO DE FERRO

O ferro é um nutriente importante tanto para os hospedeiros vertebrados, quanto para os agentes patogênicos, uma vez que ambos utilizam esse metal como cofator para enzimas essenciais envolvidas em atividades celulares como respiração mitocondrial, metabolismo oxidativo, resposta imunológica, diversas vias metabólicas e síntese de DNA (SCHAIBLE; KAUFMANN, 2004; HUYNH; ANDREWS, 2008). Aproximadamente 60-70% do ferro encontrado no organismo humano está ligado à hemoglobina presente em eritrócitos e o restante ligado fortemente tanto à transferrina (Tf) quanto armazenado intracelularmente na forma de ferritina (BROCK, 1999; NAIRZ et al., 2010).

Nos tecidos, os macrófagos atuam no balanço de ferro, uma vez que são as principais células envolvidas na reciclagem, como também são sítios de armazenamento e retenção desse metal (LUDWICZEK et al., 2003). Além disso, devido à capacidade do ferro livre de participar da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), via reação de Fenton, os macrófagos desempenham um papel importante na homeostase do ferro e na resposta imune. A reação de Fenton catalisa a formação de peróxidos e radical hidroxil ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1992). Esses metabólitos desempenham atividade microbicida, e são também altamente tóxicos para as células de mamíferos, podendo resultar em quebras de DNA, desnaturação de proteínas e quebras de lipídios, causando lesões celulares e teciduais e morte das células (SCHAIBLE; KAUFMANN, 2004). Mecanismos relacionados à aquisição, armazenamento e exportação de ferro são



bem regulados (Figura 1), minimizando os efeitos citotóxicos do ferro livre produzido durante a reação de Fenton (TAYLOR; KELLY, 2010).



**Figura 1. Metabolismo celular de ferro.** Captação do ferro por eritrofagocitose, endocitose dos complexos Hb-Hp, Heme-Hx, TfR1-HoloTf e transporte de ferro por DMT1. Após captação do ferro, há formação do LIP com, posteriormente, armazenamento desse metal na forma de ferritina, utilização em atividades celulares ou mitocondriais e exportação via Fpn1. Abreviaturas: apoTf, apotransferrina; HoloTf, holotransferrina; TfR1 ou CD71, receptor de transferrina; Steap 3, ferriredutase; DMT1, transportador de metal divalente; LIP, *pool* intracelular de ferro; Hb-Hp, hemoglobina-haptoglobina; Heme-Hx, heme-hemopexina; CD163, receptor de Hb-Hp; CD91, receptor de Heme-Hx; Fpn1, ferroportina 1; Mfrn 1/2, transportador de ferro mitocondrial. Adaptado de Richardson et al. (2010).

Diferentes vias participam da captação de ferro por tipos celulares distintos, incluindo os macrófagos (THEURL et al., 2005). Essa captação ocorre por meio de: i) ferro ligado ao grupo heme; ii) ferro ligado à Tf por endocitose mediada por

receptor (TfR1 ou CD71, que chamaremos de CD71 ao longo do texto); iii) ferro ligado à lactoferrina; iv) ferro ligado à ferritina; v) transporte transmembrana por canais de íon.

A fagocitose e degradação de eritrócitos senescentes, ou eritrofagocitose, é uma das principais vias de aquisição e reciclagem do ferro por monócitos e macrófagos (THEURL et al., 2005; TAYLOR; KELLY, 2010). Eritrócitos senescentes são importantes fontes de ferro, uma vez que são compostos por hemoglobina (Hb), sendo esta uma hemoproteína, que apresenta o grupo prostético heme. O grupo heme é composto por um anel porfirínico, no qual o ferro encontra-se no centro ligado a quatro átomos de nitrogênio (HAMZA; DAILEY, 2012). A aquisição do ferro presente no grupo heme pode ser adicionalmente obtida por endocitose do complexo Hb-haptoglobina (Hb-Hp) ou complexo heme-hemopexina (Heme-Hx), por interação com receptores presentes na superfície celular, CD163 ou CD91, respectivamente (LARSEN et al., 2012). O grupo heme sofre degradação pela ação enzimática da heme-oxigenase (HO), resultando em clivagem oxidativa com a formação de monóxido de carbono (CO), íon ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) e biliverdina (BV) (LARSEN et al., 2012). Esta enzima apresenta duas principais isoformas, HO-1 e HO-2, sendo a HO-1 a isoforma induzível em resposta a diversos estímulos, enquanto a HO-2 encontra-se expressa constitutivamente. Embora tenha sido descrita uma nova isoforma, a HO-3, sua função foi pouco estudada (MCCOUBREY; HUANG; MAINES, 1997).

Outra via muito utilizada para aquisição de ferro por células de mamíferos é a endocitose de Tf mediada por receptor (THEURL et al., 2005). A Tf é a principal proteína transportadora de ferro presente na circulação sanguínea, apresentando dois sítios de ligação para íon férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ). Após interação da proteína Tf livre de ferro, apotransferrina (apoTf), com  $\text{Fe}^{+3}$ , esta muda sua conformação, denominando-se holotransferrina (HoloTf), que é a Tf saturada com ferro. A HoloTf apresenta alta afinidade com CD71, seu receptor específico presente na superfície celular. Após a endocitose da HoloTf, ocorre a maturação e acidificação do endossomo contendo o complexo CD71-HoloTf (TAYLOR; KELLY, 2010). Em pH ácido, o  $\text{Fe}^{+3}$  perde a afinidade pela Tf e, uma vez livre, o íon férrico é reduzido a  $\text{Fe}^{+2}$  pela ação de uma redutase férrica denominada de Steap 3 (TAYLOR; KELLY, 2010). Em seguida, o transporte do ferro do endossomo ao citoplasma é realizado pelo transportador de

metal divalente (DMT1). Paralelamente, a proteína Tf, na conformação de apoTf, permanece ligada ao CD71 e o complexo CD71-apoTf é reciclado para a superfície da célula. Após a exposição do complexo ao pH 7,4, a apoTf é liberada e o ciclo pode ser reiniciado (TAYLOR; KELLY, 2010).

A lactoferrina (Lf) é um membro da família da Tf que é encontrada na maioria das secreções, como saliva, lágrimas, bile e leite, participando na modulação da disponibilidade de ferro extracelular (JOHNSON; WESSLING-RESNICK, 2012). Além de atuar como potente quelante desse elemento, a Lf pode participar como transportador de ferro na forma de íon férrico para dentro de células (THEURL et al., 2005).

A ferritina é a principal proteína responsável pela estocagem de ferro dentro das células (THEURL et al., 2005). Esta proteína é uma macromolécula composta por 24 subunidades formada por dois tipos, H-ferritina e L-ferritina, cadeia pesada e leve, respectivamente. Essa molécula polimérica organiza-se formando uma nanocavidade (LIU; THEIL, 2005), que é capaz de armazenar até 4500 átomos de ferro (DE DOMENICO et al., 2006; TANDARA; SALAMUNIC, 2012). A captação do ferro ocorre na forma  $Fe^{+2}$ , o qual é oxidado pela atividade ferroxidase da H-ferritina, resultando no íon  $Fe^{+3}$ , sua forma de estocagem (TANDARA; SALAMUNIC, 2012). Uma vez que células do sistema imune expressam receptores para H-ferritina, a ferritina também pode ser utilizada como fonte de ferro (THEURL et al., 2005). O ferro férrico estocado na ferritina está biodisponível e pode ser mobilizado para fins metabólicos ou ser direcionado para o meio extracelular por um transportador de membrana (WANG; PANTOPOULOS, 2011).

Outra via de aquisição de ferro por células de mamíferos é através de canais iônicos transmembrana, a exemplo do DMT1 (THEURL et al., 2005), que está presente na superfície celular, além dos em endossomos iniciais. O DMT1 é membro do grupo de carreadores de solutos (SLC), que atuam como proteínas de transporte de membrana de íons divalentes, também conhecido como SLC11A2 (designação da OMIM para carreadores de soluto da família 11 membro 2), DCT1 (transportador de cátion divalente) ou Nramp2 (proteína 2 de macrófago associada à resistência natural).

O transporte do ferro de compartimentos intracelulares para o citosol também participa da manutenção do balanço de ferro em células de mamíferos, o qual é

desempenhado por uma proteína integral de membrana (FORBES; GROS, 2001), o transportador Nramp1, presente em lisossomos e endossomos tardios (GRUENHEID et al., 1997; EVANS et al., 2001; LAPHAM, PHILLIPS; BARTON, 2004) sendo codificado pelo gene *SLC11A1* (carreadores de soluto da família 11 membro A1) também denominado de *Nramp1* (proteína 1 do macrófago associada à resistência).

Outra forma de manutenção do balanço intracelular do ferro é a exportação para o meio extracelular desse metal pela ferroportina (Fpn1) que é considerado o único transportador de ferro presente na superfície celular com essa função (GANZ, 2005; SINGH et al., 2011; RAFIEE et al., 2014). Assim, como os transportadores DMT1 e Nramp1, essa proteína também é membro do grupo de carreadores de solutos SLC, codificada como SLC40A1 (DE DOMENICO; WARD; KAPLAN, 2011; MONTALBETTI et al., 2013). A indução da Fpn1 promove a mobilização e exportação do ferro presente no *pool* intracelular de ferro (LIP), levando à diminuição do ferro intracelular, assim como a exportação do ferro derivado da ferritina, resultando na diminuição dos níveis desta proteína armazenadora (NEMETH et al., 2004; DE DOMENICO et al., 2006). A expressão de Fpn1 é regulada por hepcidina (HPN), um hormônio peptídico circulante que atua sistemicamente e que apresenta um papel regulatório fundamental na homeostase de ferro (NEMETH et al., 2004; SINGH et al., 2011). Além da regulação da expressão de Fpn1, a HPN também atua na regulação da expressão de outro transportador de ferro, o DMT1 (GANZ, 2003).

O ferro captado pelas diferentes vias e liberado no meio intracelular resulta na formação do LIP. O LIP é caracterizado por ser o ferro citoplasmático disponível metabolicamente e que é retratado como uma ferramenta chave na regulação e homeostase celular desse elemento (BREUER; SHVARTSMAN; CABANTCHIK, 2008). Após a captação do ferro e o seu direcionamento ao LIP, este metal pode ser incorporado em diversas enzimas dependentes de ferro, como citocromo, catalase e peroxidase (TANDARA; SALAMUNIC, 2012), participar da síntese do grupo heme ou ser estocado em ferritina (THEURL et al., 2005; RICHARDSON et al., 2010). Além disso, o ferro pode ser conduzido para o meio extracelular pela ação da Fpn1 (THEURL et al., 2005; RICHARDSON et al., 2010).

## 2.6 MODULAÇÃO DE PROTEÍNAS DA CÉLULA HOSPEDEIRA ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DE FERRO NA INFECÇÃO POR *Leishmania*

Um dos primeiros *loci* gênicos a ser reportado como um fator genético relacionado à susceptibilidade e resistência dos hospedeiros à infecção por vários patógenos intracelulares foi *Nramp1* ou *SLC11A1* (BUSCHMAN; SKAMENE, 2001; JABADO et al., 2004). Estudos demonstraram que este gene, originalmente descrito como *Ity*, *Lsh*, *Bcg*, participa da resistência à infecção de microrganismos como por exemplo *Salmonella*, *Mycobacterium* e *Leishmania*, sendo importante na determinação do curso da infecção (GRUENHEID et al., 1997; BUSCHMAN; SKAMENE, 2001; JABADO et al., 2004). Esse gene codifica a proteína Nramp1, que é recrutada para a membrana do fagossoma, onde permanece até a maturação e formação do fagolisossomo (GRUENHEID et al., 1997; REYES-LÓPEZ et al., 2012). Estudos têm demonstrado que a presença de Nramp1 na membrana de fagolisossomos pode regular a concentração intrafagossomal de  $Fe^{+2}$ , através da depleção desse metal, limitando, desta forma, a multiplicação deste parasito (BELLAMY et al., 1999; BUSCHMAN; SKAMENE, 2001; JABADO et al., 2004; REYES-LÓPEZ et al, 2012).

Até recentemente, a participação de outras proteínas envolvidas no metabolismo de ferro no curso da infecção por *Leishmania* era pouco estudada. Das e colaboradores (2009) mostraram um aumento tempo-dependente da síntese de RNAm para CD71 em células J774A.1 infectadas por *L. major* ou *L. donovani*. Além disso, demonstraram que o aumento da expressão de CD71 após a infecção por *L. donovani* é dependente da virulência do parasito, uma vez que células infectadas com uma cepa de *L. donovani* não virulenta apresentaram pouca influência sobre a expressão dessa proteína. Por outro lado, Rabhi e colaboradores (2013) demonstraram que *L. major* inibe a expressão de RNAm do gene que codifica CD71 em BMMΦ de camundongos BALB/c e C57BL/6, sugerindo que *L. major* limita a captação de ferro pelo macrófago.

Luz e colaboradores (2012) demonstraram uma modulação positiva da HO-1 em macrófagos infectados por *L. chagasi*. Além disso, Pham e colaboradores (2005) observaram que ocorre aumento da expressão de HO-1 na infecção de macrófagos por formas amastigotas e promastigotas de *L. pifanoi*.

A modulação da expressão de DMT-1 foi adicionalmente observada em macrófagos infectados por *Leishmania*. Rabhi e colaboradores (2013) observaram o aumento da expressão de RNAm para DMT1 em BMMΦ infectados por *L. major*. A modulação de DMT1 estaria participando da regulação de ferro no citoplasma, diminuindo o acúmulo desse nutriente em VPs e o uso, subsequente, por amastigotas de *L. major*. Esses mesmos autores também observaram uma diminuição na expressão do RNAm de Fpn1 tanto em macrófagos que controlam ou não a infecção por *L. major*. Este dado sugere que este parasito limita o efluxo de ferro independente do tipo de macrófago infectado. Em relação à Fpn1 em macrófagos infectados por *L. amazonensis* foi demonstrado por Ben-Othman e colaboradores (2014) que a inibição da expressão de Fpn1, leva ao aumento do conteúdo de ferro intracelular e aumento nos níveis de transcritos de ferritina, resultando na regulação positiva desta proteína.

## 2.7 *Leishmania* E OS MECANISMOS DE AQUISIÇÃO DE FERRO NA INFECÇÃO

A *Leishmania* utiliza diversos mecanismos para aquisição de ferro (FLANNERY; RENBERG; ANDREWS, 2013). Diversos estudos desenvolvidos utilizando formas promastigotas de *Leishmania* demonstraram a presença de proteínas na superfície do parasito que atuam na aquisição de ferro mediada por Tf (VOYIATZAKI; SOTERIADOU, 1990; VOYIATZAKI; SOTERIADOU, 1992), Lf (WILSON et al., 1994) e Hb (SENGPUTA et al., 1999). Até recentemente, pouco se sabia sobre os outros mecanismos de aquisição e utilização de ferro por *Leishmania* durante a infecção. Estudos desenvolvidos por Andrews e colaboradores (2006, 2011, 2012) demonstraram diferentes mecanismos de aquisição de ferro por este parasito. Novas proteínas de membrana que participam da captação de ferro foram identificadas em formas amastigotas de *L. amazonensis*, como a proteína LFR1, uma redutase de íon férrico em *Leishmania*, que atua, portanto, na redução de  $Fe^{+3}$  em  $Fe^{+2}$  (FLANNERY et al., 2011) e o transportador de ferro de *Leishmania*, denominado LIT1. Este passou a ser considerado um fator de virulência do parasito, devido a capacidade de transportar íon ferroso para o interior do parasito, apresentando um papel importante na replicação de *Leishmania* em células hospedeiras e no desenvolvimento de lesões cutâneas em camundongos

susceptíveis à infecção (HUYNH; SACKS; ANDREWS, 2006; JACQUES; ANDREWS; HUYNH, 2010). Outra proteína presente na superfície do parasito é a proteína transmembrana LHR1, que participa da aquisição do grupo heme (HUYNH et al., 2012). Na *Leishmania*, a aquisição de ferro ocorre também via heme e endocitose de hemoglobina mediada por clatrina, sendo componentes que contribuem para sobrevivência do parasito (CARVALHO et al., 2009; AGARWAL et al., 2013). Em conjunto, esses dados mostram que a *Leishmania* é capaz de utilizar diversas fontes e estratégias na aquisição do ferro (TAYLOR; KELLY, 2010; FLANNERY; RENBERG; ANDREWS, 2013).

## 2.8 FERRO E SEU PAPEL NA INFECÇÃO POR *Leishmania*

O fato de o ferro ser apontado na literatura como fator determinante no sucesso da infecção por *Leishmania* (JABADO et al., 2004) e em razão das dificuldades e limitações no tratamento da leishmaniose (CROFT et al., 2006), a modulação do ferro vem atraindo o interesse como um possível alvo na intervenção terapêutica (TAYLOR; KELLY, 2010). Adicionalmente, abordagens que utilizam agentes quelantes de ferro e a sua suplementação tem sido utilizadas no intuito de avaliar o efeito da modulação da disponibilidade intracelular desse elemento sobre a infecção por *Leishmania*, além de outros patógenos (BORGES et al., 1998; SMITH; MEREMIKDU, 2003; ARANTES et al., 2007; FRANCISCO et al., 2008; ARANTES et al., 2011; DAS et al., 2009; MALAFAIA et al., 2011).

Dados da literatura mostraram que o tratamento com agentes quelantes de ferro é capaz de reduzir a infecção por *Leishmania* (BORGES et al., 1998; DAS et al., 2009; MALAFAIA et al., 2011). Adicionalmente, tem sido apontada que a suplementação desse elemento favorece a infecção (BORGES et al., 1998; DE CARVALHO, 2013). Desta maneira, a sobrecarga de ferro tem sido associada à susceptibilidade à infecção (WEINBERG, 2009). Contrariamente, experimentos *in vivo* mostraram que a suplementação de ferro em camundongos BALB/c infectados por *L. major* levaram à redução da carga parasitária e da progressão da lesão (BISTI et al., 2000; BISTI et al., 2006). Adicionalmente, Vale-Costa e colaboradores (2013) demonstraram que a sobrecarga do ferro está associada à eliminação de *L. infantum*.

Diante desses dados contraditórios, novos estudos sobre a modulação da disponibilidade de ferro podem contribuir para uma melhor compreensão do seu papel na infecção por *Leishmania*, uma vez que ainda não foi realizado estudo comparativo da participação desse elemento no curso da infecção utilizando modelos de resistência e susceptibilidade.



### 3. HIPÓTESE

Nossa hipótese é que há uma maior expressão de proteínas envolvidas no aumento da disponibilidade de ferro em macrófagos de camundongos da linhagem CBA infectados por *L. amazonensis*, em comparação à *L. major*, favorecendo a sobrevivência intracelular do parasito.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 GERAL

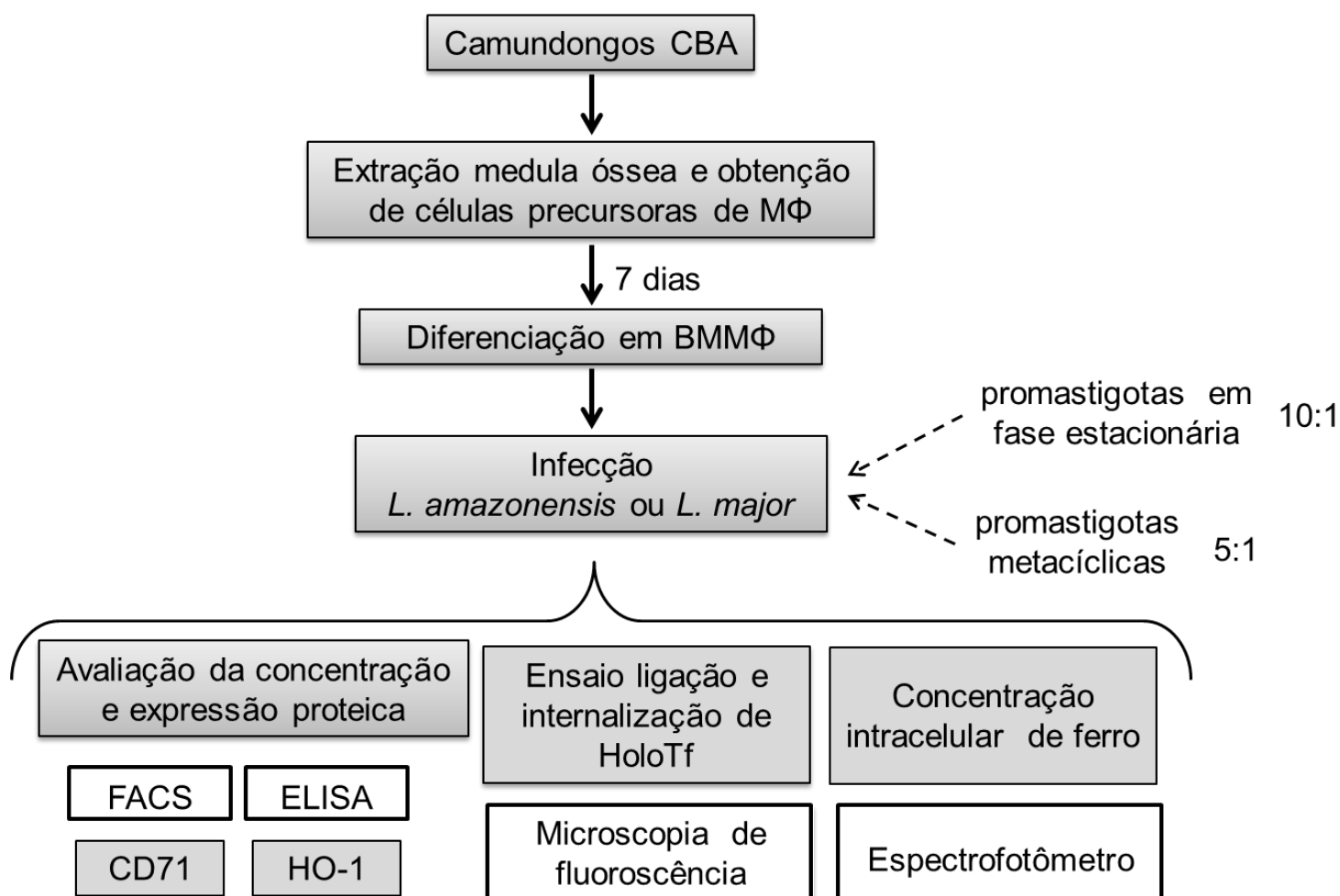
Avaliar o metabolismo de ferro e o seu papel na infecção por *Leishmania*, utilizando modelo comparativo de BMM $\Phi$  de camundongos da linhagem CBA que controlam a infecção por *L. major*, ao passo que são permissivos a infecção por *L. amazonensis*

### 4.2 ESPECÍFICOS

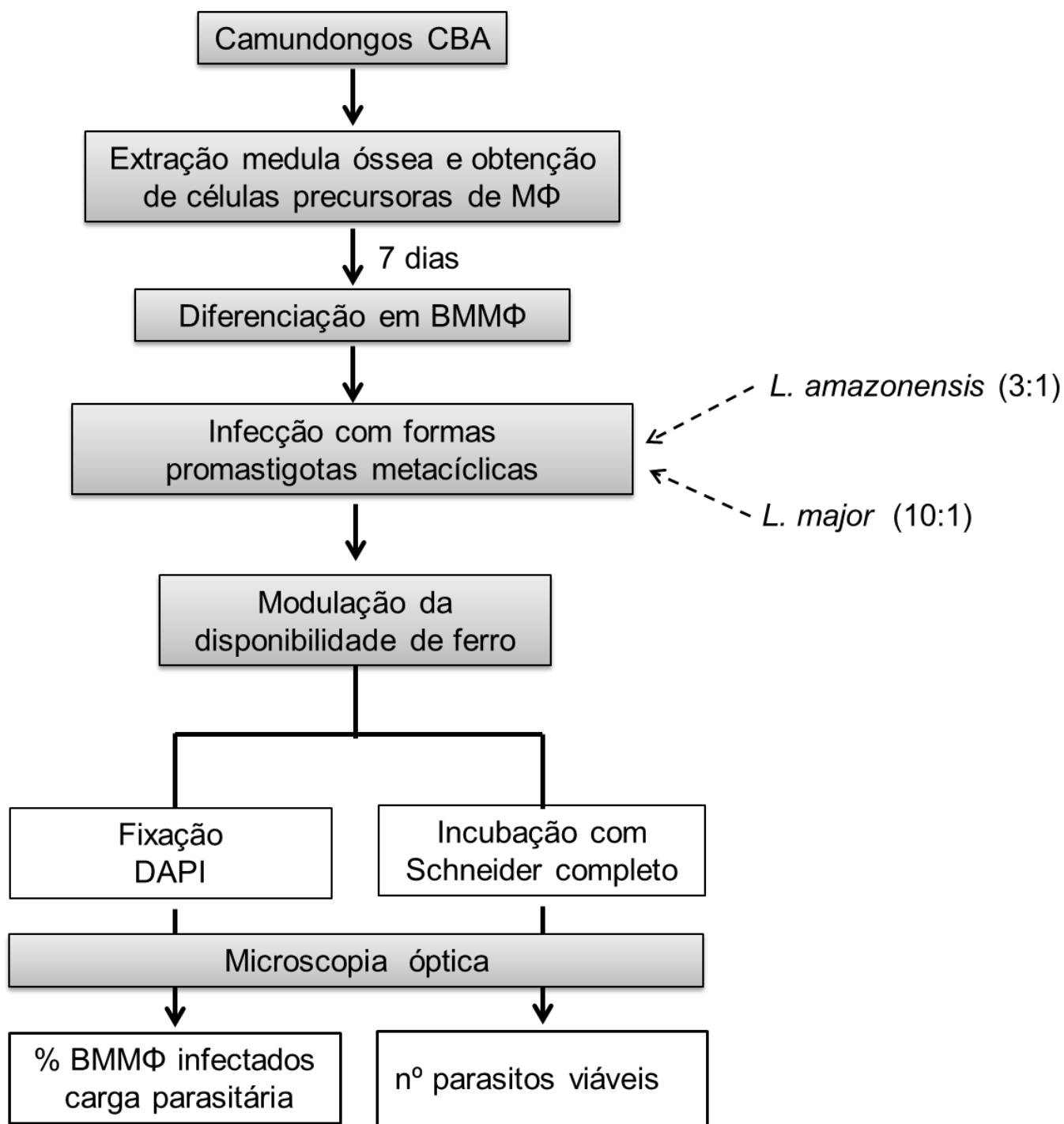
- Determinar a concentração de HO-1 em BMM $\Phi$  infectados por *Leishmania*;
- Avaliar a expressão de CD71 em BMM $\Phi$  infectados por *Leishmania*;
- Quantificar a ligação e captação de HoloTf em macrófagos infectados por *Leishmania*;
- Determinar a concentração intracelular de ferro em BMM $\Phi$  infectados por *Leishmania*;
- Determinar o efeito da modulação da disponibilidade de ferro sobre a viabilidade de promastigotas de *Leishmania* em cultura axênica;
- Avaliar o efeito da modulação da disponibilidade de ferro em BMM $\Phi$  infectados por *Leishmania*.

## 5. DESENHO EXPERIMENTAL

**ABORDAGEM I: AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DE FERRO E CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DESTE METAL EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *Leishmania***



**ABORDAGEM II: EFEITO DA MODULAÇÃO DA DISPONIBILIDADE DE FERRO  
SOBRE A INFECÇÃO POR *Leishmania***



## 6. MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 ANIMAIS

Camundongos isogênicos da linhagem CBA, fêmeas ou machos, com faixa etária de 6 a 8 semanas de idade, foram obtidos e mantidos no Biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – CPqGM/FIOCRUZ – BA. Os animais foram alimentados com ração comercial balanceada e água filtrada *ad libitum*.

### 6.2 CULTURA DE CÉLULAS L929 E PRODUÇÃO DE SOBRENADANTE CONTENDO M-CSF

Células L929, fibroblastos tumorigênicos de camundongos, foram cultivadas para obtenção de M-CSF (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*), indutor da diferenciação de células precursoras presentes na medula óssea em macrófagos. Assim, o cultivo celular foi realizado em garrafas de poliestireno de 150 cm<sup>2</sup>, na concentração de 10<sup>6</sup> células em 40 mL de meio DMEM completo [*Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Gibco) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) inativado (Gibco), 25 mM de HEPES pH 7,4 (N-2-hidroxetilpiperazina:N'-2-etano ácido sulfônico) (Sigma), 2 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma), 2 mM de glutamina (Sigma) e 10 µg/mL de ciprofloxacina (Isofarma)] em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, como descrito por Menezes (2010). Após 10-15 dias de cultura, o sobrenadante das células foi coletado e centrifugado a 300 x g, por 10 min a 4°C e, em seguida, o sobrenadante foi filtrado, aliquoteado e estocado a -20°C para posterior uso na obtenção de macrófagos derivados de medula óssea.

### 6.3 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA

Células precursoras de macrófagos, presentes na medula óssea, foram obtidas a partir da lavagem da cavidade óssea do fêmur e da tíbia de camundongos da linhagem CBA com meio RPMI completo [meio *Roswell Park Memorial Institute* 1640 suplementado com 25 mM de HEPES (Sigma), 2 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma), 20% de SBF inativado (Gibco), 200 mM glutamina (Sigma) e 10 µg/mL de ciprofloxacina (Isofarma)] e centrifugadas a 300 x g por 5 min à 4°C. Em seguida, com objetivo de lisar hemácias presentes nas amostras, uma vez que são possíveis fontes de ferro, as células precursoras foram incubadas com um tampão de lise de

eritrócitos (*Gey's Balanced Salt Solution*, G9779, Sigma) por 10 min em gelo e centrifugadas (2x) com RPMI completo, nas mesmas condições anteriores. Após a centrifugação, o sedimento celular foi desfeito utilizando agulha de 20-21 Gauge e as células foram mantidas em placas de Petri 90x15 mm com meio RPMI completo em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 18-24 h. Macrófagos residentes da medula foram eliminados por adesão à placa de Petri e as células precursoras de macrófagos, presentes no sobrenadante da cultura foram coletadas. O sobrenadante foi, em seguida, centrifugado e o *pellet* ressuspensionado em meio RPMI completo contendo 30% de sobrenadante de célula L929 (RMPI/SBN L929) (MENEZES, 2010). As células foram cultivadas em placas de Petri por 3 a 4 dias, quando as culturas celulares foram suplementadas com meio RMPI/SBN L929. Após sete dias, os BMMΦ aderidos foram recuperados por lavagem da placa de cultura com solução de PBS contendo 1 mM de EDTA, centrifugados 300 x g por 10 min à 4°C e ressuspensionados em meio DMEM completo e contados em câmara de Neubauer para realização dos experimentos.

#### 6.4 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEIAIS

Como descrito anteriormente (GOMES et al., 2003), macrófagos peritoneais pró-inflamatórios foram obtidos através da indução de ascite na cavidade intraperitoneal de camundongos CBA, pela injeção de 2,5 mL de tioglicolato de sódio a 3% (Sigma), maturado por pelo menos 30 dias. Quatro dias após a injeção do tioglicolato, os camundongos foram submetidos à eutanásia e a obtenção de macrófagos peritoneais de exsudato inflamatório foi realizada através de duas lavagens da cavidade peritoneal com 10 mL de solução de heparina sódica (Blausiegel) na concentração de 20 UI/mL em salina gelada. Em seguida, as células foram centrifugadas a 300 x g, por 10 min a 4°C e o sedimento ressuspensionado em meio DMEM completo. A quantificação do número de células foi obtida pela contagem em câmara de Neubauer para posterior realização dos experimentos.

#### 6.5 CULTIVO DE PARASITOS DE *Leishmania*

Promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/Br88/Ba-125) e *L. major* (MHOM/RI/-WR-173), derivadas de amastigotas isoladas de linfonodo da pata de camundongos resistentes C57BL/6, foram mantidas em meio ágar-sangue NNN

(*Novy-Nicolle-MacNeal*) suplementado com 3 mL de meio Schneider completo [*Schneider's Insect Medium* (Sigma) contendo 10% de SBF inativado (Gibco) e antibiótico gentamicina (Sigma) na concentração de 50 µg/mL] em garrafa de cultura de 25 cm<sup>2</sup> em estufa B.O.D. a 24°C (MENEZES, 2010). Posteriormente, as formas promastigotas dos parasitos foram cultivadas em 5 mL de meio Schneider completo em garrafa de cultura em estufa B.O.D. a 24°C. Para acompanhamento do crescimento das culturas, o número de parasitos foi quantificado periodicamente, utilizando a câmara de Neubauer, até atingirem a fase estacionária, em torno de 10<sup>8</sup> parasitos/mL. Após a cultura atingir a fase estacionária de crescimento, os parasitos foram utilizados para realização dos experimentos. Os parasitos foram passados para uma nova garrafa de cultura com meio Schneider completo por até seis passagens sucessivas.

#### 6.6 SEPARAÇÃO DE PROMASTIGOTAS METACÍCLICAS DE *Leishmania*

Promastigotas de *L. amazonensis* e *L. major* em fase estacionária foram submetidas à purificação de formas metacíclicas infectivas utilizando gradiente de Ficoll-Paque como descrito por Spath & Berveley (2001). Inicialmente, os parasitos foram centrifugados a 1.900 x g por 10 min a 25°C e, em seguida, centrifugação foi realizada em meio DMEM completo nas mesmas condições. Após a centrifugação, o sedimento foi ressuspenso em DMEM completo e os parasitos foram contados em câmara de Neubauer. Para a obtenção da fração enriquecida das formas metacíclicas de *Leishmania*, 2x10<sup>8</sup> parasitos foram adicionados em 2 mL de DMEM completo e, em seguida, foram adicionados, abaixo deste volume, 2 mL de Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences) 10% diluído em meio 199 (M199) (Sigma) e 2 mL de Ficoll-Paque a 40% diluído em PBS 1X para a formação do gradiente, sendo este submetido a centrifugação a 300 x g a 25°C por 10 min com a desaceleração ajustada para zero. As formas metacíclicas acumuladas na fase do Ficoll 10% foram recolhidas e lavadas duas vezes com solução salina a 1.900 x g por 10 min a 25°C. A contagem dos parasitos foi realizada em câmara de Neubauer para realização da infecção de BMMΦ.

## 6.7 PLAQUEAMENTO E INFECÇÃO *IN VITRO* DE MACRÓFAGOS POR *Leishmania*

Após a obtenção das células, estas foram plaqueadas em meio DMEM completo nas concentrações de  $5 \times 10^5$  em placas de 48 poços,  $2 \times 10^5$  ou  $8 \times 10^5$  em placas de 24 poços e  $2 \times 10^6$  em placas de 6 poços, a depender do objetivo de cada experimento, e mantidas em estufa suplementada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após 18-24 h do plaqueamento, as células foram lavadas duas vezes com solução de NaCl 0,9% (solução salina) estéril para a remoção de células não aderentes e *debris* celulares.

Para a realização da infecção de macrófagos com promastigotas em fase estacionárias de *Leishmania*, os parasitos foram lavados, quando a cultura atingiu a fase estacionária, três vezes com solução salina estéril gelada por centrifugações a 1900 x g, por 10 min a 4°C. Após as centrifugações, o sedimento foi ressuspenso com aproximadamente 1 mL de solução salina e passado de 15-20 vezes através de uma agulha de insulina (27,5 Gauge) para desfazer as rosetas. Em seguida, a quantificação do número de parasitos foi obtida a partir da contagem em câmara de Neubauer e o ajuste da quantidade necessária à adição na cultura de macrófagos foi realizado.

A quantidade de parasitos por célula para a realização da infecção variou a depender do experimento. Devido às diferenças em relação à infectividade em relação as formas encontradas nos estágios de vida da *Leishmania*, optamos por utilizar a taxa de infecção de 10 parasitos por células (10:1) para as formas promastigotas em fase estacionária e 5 parasitos por célula (5:1) na infecção com formas promastigotas metacíclicas. Assim como, para os ensaios que visavam quantificação do percentual de BMMΦ infectados e a carga parasitária, utilizamos a proporção de 10 parasitos por célula (10:1) para a infecção por *L. major* e 3 parasitos por célula (3:1) para *L. amazonensis*, uma vez que esta segunda espécie de *Leishmania* é mais infectiva que a primeira. Após a incubação das células com *Leishmania*, as placas foram centrifugadas a 1.500 rpm, 5 min a temperatura ambiente para abaixar e viabilizar o contato imediato dos parasitos às células e as placas contendo *L. amazonensis* foram armazenadas em estufa à 35°C e as placas contendo *L. major* foram armazenadas à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por 6 h.



## 6.8 EXPRESSÃO E QUANTIFICAÇÃO PROTEICAS EM BMMΦ INFECTADOS POR *Leishmania*

### 6.8.1 Determinação da Concentração de Ho-1

Lisados de BMMΦ não infectados ou infectados com promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis* ou *L. major* na proporção de 10:1 foram preparados para a obtenção do extrato proteico. A proteína HO-1 foi detectada por *kit* colorimétrico comercial, seguindo as especificações do fabricante (Takara) (LUZ, et al., 2012). BMMΦ incubados com 30 μM de CoPP (Frontier Scientific, Logan, UT, USA), indutor da expressão de HO-1, foram utilizados como controle positivo para a detecção de HO-1. O CoPP foi diluído em 0,1N de hidróxido de sódio (NaOH) juntamente com meio RPMI base. Após diluição das amostras e preparo do padrão, estes foram adicionados à placa juntamente com o anticorpo anti-HO-1 biotilado conjugado e incubados durante 1 h. Após lavagens, estreptoavidina ligada à peroxidase (estreptoavidina-POD) foi incubada por 1 h, e após realização de novas lavagens, o substrato foi adicionado. A leitura do resultado foi realizada por aparelho de espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm e a concentração de HO-1 foi determinada pela comparação da absorbância das amostras à curva padrão.

### 6.8.2 Expressão de CD71

A expressão de CD71 foi avaliada por citometria de fluxo (FACS). Para isto,  $8 \times 10^5$  BMMΦ foram plaqueados em placas de 6 poços e, após 6 h de infecção, células não infectadas ou infectadas com formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* ou *L. major* (5:1) foram lavadas para retirada dos parasitos não internalizados. Em seguida, um grupo de células foi re-incubado por adicionais 24 h. Após os tempos de infecção, as células aderidas foram raspadas e coletadas para centrifugação a 500 x g, 4°C por 5 min. O sedimento celular foi ressuspenso, e após a realização do bloqueio das ligações inespecíficas, as células foram plaqueadas em uma concentração final de aproximadamente  $2 \times 10^5$  célula por poço, em placa de 96 poços. Em seguida, as células foram fixadas e permeabilizadas (Kit Perm/Wash, BD Pharmingen™) e imunomarcadas com o anticorpo anti-CD71 (Purified Rat Anti-Mouse CD71, BD Pharmingen™) na concentração de 30 μg/mL e o grupo controle negativo foi incubado com IgG1 de rato (Serotec) na mesma concentração. O

anticorpo anti-rato produzido em coelho (Alexa flúor 568, Molecular Probes) foi utilizado como anticorpo-secundário. A análise da fluorescência foi realizada utilizando o filtro para o fluorocromo PE-Texas Red. Em seguida, os softwares DIVA e FlowJo foram utilizados para a realização das análises e obtenção dos histogramas. As células não marcadas foram empregadas para a delimitação do *gate* da população de interesse para cada grupo e o controle negativo foi utilizado para a determinação da positividade do grupo marcado com o anticorpo anti-CD71. O percentual de células CD71<sup>+</sup> foi obtido, assim como sua mediana de intensidade de fluorescência (MFI).

## 6.9 LIGAÇÃO E INTERNALIZAÇÃO DE HoloTf

Para realização dos ensaios de ligação e internalização de HoloTf (adaptado de Borges et al., 1998), foram utilizados macrófagos peritoneais e BMM $\Phi$ , respectivamente, plaqueados na concentração de  $2 \times 10^5$  em placas de 24 poços, contendo lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro, e infectados com formas promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis* ou *L. major* na proporção de 10:1. Macrófagos não infectados ou infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* foram lavados após 6 h de infecção para retirada dos parasitos não internalizados. Grupos celulares foram re-incubados por adicionais 24 h e 48 h. Após os tempos de infecção, as células foram incubadas com 300 nM de HoloTf conjugada à Texas Red (HoloTf-Texas Red) (Ref. T2875, 5 mg, Molecular Probes), a 4°C por 30 min, em 500  $\mu$ L de meio DMEM completo sem SBF [DMEM base suplementado com 0,2 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma), 25 mM HEPES, 2 mM glutamina (Sigma) e ciproflaxacina a 10  $\mu$ g/mL (Isofarma) e 1% de Nutridoma-SP (ROCHE)]. BMM $\Phi$  não infectados ou infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* foram lavados após 6 h de infecção e utilizados para a realização dos ensaios de internalização de HoloTf. As células foram incubadas com 300 nM de HoloTf-Texas Red a 4°C, por 30 min, em 500  $\mu$ L de meio RPMI completo sem SBF [RPMI suplementado com 0,2 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma), 2 mM de glutamina (Sigma), ciproflaxacina a 10  $\mu$ g/mL (Isofarma) e Nutridoma-SP 1% (ROCHE)]. Em seguida, as células foram lavadas com salina gelada e re-incubadas por adicionais 40 min, a 35°C, em meio RPMI completo sem SBF. Após os períodos de incubação dos ensaios de ligação e internalização de HoloTf, as células foram lavadas com salina estéril gelada e

fixadas com paraformaldeído a 4%, para avaliação em microscopia de fluorescência. A visualização das células foi realizada em microscópio Olympus BX51 e a aquisição das imagens no programa Image Pro-Plus. O número de células presentes em cada campo foi realizada no programa ImageJ pela contagem do núcleo através da marcação com *4'-6-diamidino-2-phenylindole* (DAPI) e a quantificação da fluorescência da HoloTf-Texas Red foi realizada pelo programa Volocity. O valor da média de intensidade de fluorescência por célula (MIF/célula) foi calculado para realização da análise quantitativa. A MIF/célula foi obtida pela quantificação total da fluorescência por campo dividido pelo número de células presentes marcadas com DAPI. O valor do percentual de MIF/célula foi obtido utilizando o macrófago não infectado como controle e considerando-o como 100%.

#### 6.10 CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE FERRO

Para determinar a concentração intracelular de ferro foram realizados ensaios colorimétrico baseados em ferrozina, como descrito por Riemer e colaboradores (2004). Inicialmente, BMM $\Phi$  foram plaqueados na concentração de  $2 \times 10^6$ /poço em placa de 6 poços e infectados com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* ou *L. major* na proporção de 5:1. Após os períodos de infecção, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X pH 7,4 gelada e, em seguida, após remover completamente a solução, as células foram armazenadas em freezer -20°C. Para a detecção total de ferro, as células foram lisadas com 200  $\mu$ L de hidróxido de sódio (NaOH) a 50 mM sob agitação e incubadas em atmosfera umidificada por 2 h. Uma parte do lisado celular foi utilizada para dosagem proteica pelo método de *Bradford* e outra para a determinação da concentração intracelular de ferro por ensaio baseado em ferrozina. Para a realização da quantificação de ferro, uma alíquota de 100  $\mu$ L do lisado celular foi transferida para tubo eppendorf e misturado a 100  $\mu$ L de ácido clorídrico (HCl) a 10 mM, solvente do citrato de amônio férrico utilizado para curva padrão de ferro (0-50 $\mu$ M). Em seguida, 100  $\mu$ L da solução composta por volumes iguais de HCl a 1,4M e 4,5% de permanganato de potássio (KMnO<sub>4</sub>)(Vetec) diluído em água destilada, denominada de solução liberadora de ferro. Em seguida, a mistura é incubada por 2 h a 60°C. Após esta retornar à temperatura ambiente, foi adicionada 30  $\mu$ L do reagente para a detecção do ferro [6,5mM ferrozina (Sigma), 6,5mM neocuproina (Sigma), 2,5M acetato de amônio (Sigma) e 1M ácido ascórbico

(Sigma) dissolvidos em água apirogênica]. Após 30 min da incubação da solução de detecção de ferro, 280 µL da solução de cada tubo foi transferido para um poço da placa de 96 poços e a absorbância foi medida sob o comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 550nm no aparelho de espectrofotômetro Spectramax 340pc (Molecular Devices) para a determinação do conteúdo de ferro das amostras. A concentração intracelular de ferro foi normalizada em relação à dosagem proteica determinada para cada amostra.

### 6.11 MODULAÇÃO DA DISPONIBILIDADE DE FERRO

Para estudar os efeitos da modulação da disponibilidade de ferro na infecção por *Leishmania*, foram utilizados as moléculas quelantes de ferro, Deferroxamina (Mesilato de Deferroxamina, DFO,  $C_{25}H_{48}N_6O_8 \cdot CH_4O_3S$ , Sigma-Aldrich, D9533), 2,2'-dipiridil ( $C_{10}H_8N_2$ , Sigma-Aldrich, D216305) e 1,10-fenantrolina ( $C_{12}H_8N_2$ , Sigma-Aldrich, 131377), e para suplementação de íon ferroso, sulfato ferroso heptahidratado ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , Sigma-Aldrich, F-7002). A incubação com os agentes quelantes de ferro e do sulfato ferroso foi realizada em diferentes concentrações (descritos nos itens a seguir) e testada quanto aos seus efeitos sobre a viabilidade de promastigotas de *Leishmania* em cultura axênica e viabilidade de BMM $\Phi$  de camundongos CBA. Adicionalmente, a modulação da disponibilidade de ferro foi avaliada quanto ao seu efeito sobre a infecção por *L. amazonensis* e *L. major* e parâmetros como o percentual de células infectadas, a carga parasitária e viabilidade de *Leishmania* intracelular foram avaliados.

### 6.12 VIABILIDADE DE PROMASTIGOTAS DE *Leishmania* EM CULTURA AXÊNICA

Formas promastigotas de *L. amazonensis* oriundas de cultura axênica em fase exponencial foram cultivadas em placa de 24 poços na concentração de  $10^6$ /mL em meio Schneider completo juntamente com as moléculas quelantes de ferro - DFO (50-400 µM), dipiridil (25-180 µM) ou fenantrolina (2,5-50 µM) – ou com o composto sulfato ferroso (50-500 µM). Adicionalmente, um grupo celular foi incubado apenas com meio Schneider completo, servindo como controle do experimento. Após 24, 48 e 72 h, a contagem do número de parasitos foi realizada em câmara de Neubauer

para avaliar o efeito da modulação da disponibilidade de ferro sobre a curva de proliferação de *Leishmania*.

#### 6.13 VIABILIDADE DE BMMΦ DE CAMUNDONGOS CBA

O efeito das moléculas que levam à depleção ou suplementação de ferro sobre a viabilidade de BMMΦ foi determinado a partir da contagem de células por exclusão com azul de Trypan. BMMΦ de camundongos CBA foram cultivados na concentração de  $2 \times 10^5$ /poço em placas de 24 poços e, após o período de 18-24 h, os poços foram lavados 2x com solução salina estéril e as células foram cultivadas em 1 mL de meio DMEM completo suplementado com diferentes concentrações das moléculas fenantrolina (25-75  $\mu$ M) ou sulfato ferroso (100-300  $\mu$ M). Após 48 h, as placas foram centrifugadas a 300 x g, 4°C por 10 min para abaixar as células e realizar a remoção do sobrenadante. O corante vital azul de Trypan 0,4% foi adicionado e a determinação do percentual da viabilidade celular foi estimada pela contagem de células viáveis e não-viáveis realizada pela observação em microscópio óptico invertido

#### 6.14 CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE FERRO EM BMMΦ DE CAMUNDONGOS CBA

A quantificação intracelular de ferro foi realizado em BMMΦ de camundongos CBA submetidos à condição de depleção ou suplementação de ferro pelo ensaio colorimétrico baseado em ferrozina (RIEMER et al., 2004) como descrito no item 6.10.

#### 6.15 CARGA PARASITÁRIA E PERCENTUAL DE MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *Leishmania*

BMMΦ na concentração de  $2 \times 10^5$  foram infectados como descrito no 6.7 na proporção de de 3:1 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* ou 10:1 de *L. major*. Após 6 h de infecção, as células foram lavadas duas vezes com solução salina e incubadas por adicionais 48 h. As células infectadas foram incubadas sob condições de depleção ou suplementação de ferro por 24 e 48 h. Após esses períodos de incubação, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4%, à temperatura ambiente durante 15 min e marcados com DAPI. O percentual de

células infectadas e o número médio de parasitos por macrófago infectado (carga parasitária) foram determinados em microscópio de fluorescência, utilizando a objetiva no aumento de 100x. Foram contados aleatoriamente no mínimo 400 macrófagos por réplica em sextuplicata.

#### 6.16 VIABILIDADE DE *Leishmania* INTRACELULAR EM MACRÓFAGOS INFECTADOS

BMM $\Phi$  na concentração  $2 \times 10^5$  foram cultivados em placas de 24 poços e infectados com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* na proporção de 3:1 ou *L. major* na proporção de 10:1. Após 6 h de infecção, as células foram lavadas duas vezes com solução salina e incubadas por adicionais 48 h. Após este período, as células infectadas foram incubadas sob condições de depleção e suplementação de ferro por 24 e 48 h. Após os tempos de incubação, os poços foram lavados duas vezes com solução salina e incubados com 1 mL de Schneider completo. Em seguida, as placas foram, então, transferidas para estufa B.O.D. e incubadas a 24°C. As amastigotas viáveis transformadas em formas promastigotas foram contadas no 5º ao 7º dia após incubação com Schneider. Os poços foram homogeneizados e uma alíquota foi retirada para contagem dos parasitos em câmara de Neubauer para a determinação da viabilidade de *Leishmania* intracelular dos macrófagos infectados.

## 7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os programas GraphPad Prism 5.0 e Epi Info foram utilizados para a realização das análises estatísticas. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade, Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk e D'Agostino e Person, para determinação do uso de testes paramétricos ou não paramétricos.

O teste *t* de Student foi utilizado no ensaio para avaliar a modulação da expressão de HO-1 e sua concentração intracelular na infecção de *Leishmania*, assim como ligação e captação de HoloTf-Texas Red em BMM $\Phi$  infectados por *L. amazonensis* ou *L. major*.

Nos ensaios em que avaliamos a modulação da disponibilidade de ferro sobre a infecção por *Leishmania*, o teste *one-way* ANOVA foi realizado seguido do pós-

teste Tukey e Linear Trend, quando as amostras apresentavam distribuição normal, e o teste Kruskal-Wallis seguido do pós teste Dunn's, quando as amostras não seguiam distribuição normal.

Os experimentos foram realizados em sua maioria em sextuplicata, apresentando de uma a duas réplicas experimentais. Os dados obtidos foram representados como média ou mediana  $\pm$  desvio padrão (SD) e os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando o valor de  $p < 0,05$ .

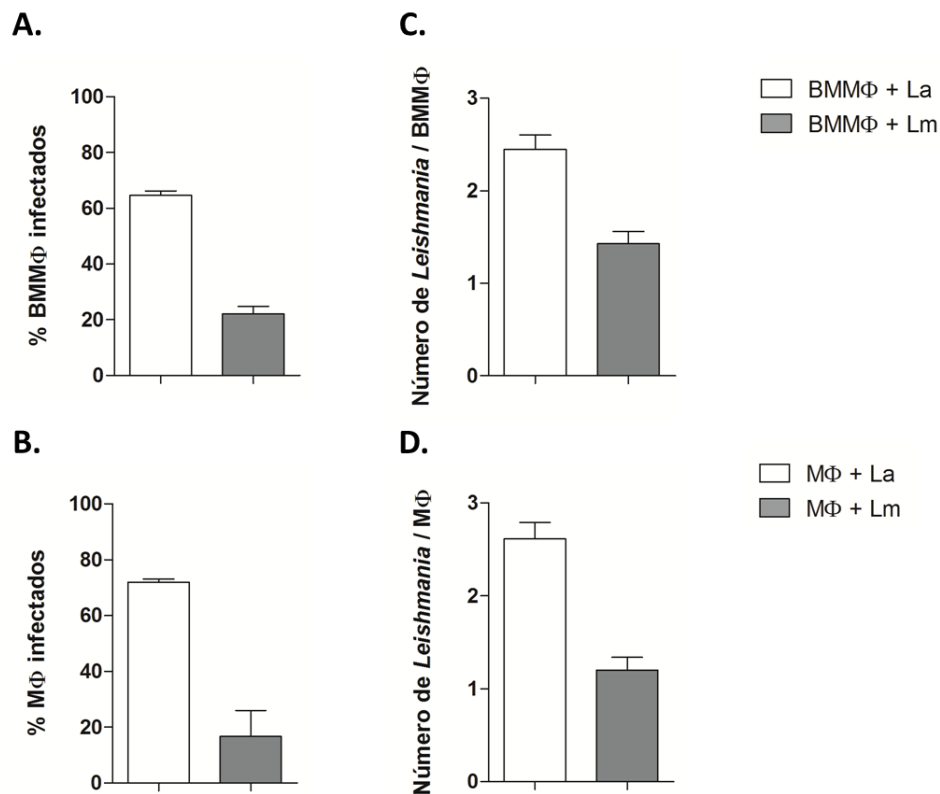
## **8. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O presente projeto está de acordo com os princípios de ética na pesquisa com animais adotados pela Lei 11.784/2008 e foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CEUA-CPqGM), sob o número de protocolo 005/2014 (ANEXO).

## 9. RESULTADOS

### 9.1 PERCENTUAL DE INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS CBA INFECTADOS POR *L. amazonensis* OU *L. major*

Inicialmente, o percentual de infecção e a carga parasitária de BMMΦ e macrófagos peritoneais infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* foram determinados (Figura 2). Os resultados mostram que os BMMΦ, de forma similar aos macrófagos peritoneais, respondem de forma distinta à infecção por essas duas espécies de *Leishmania*, confirmando que esses tipos celulares são susceptíveis a infecção por *L. amazonensis*, enquanto controlam a infecção por *L. major*. Assim, no tempo de 6h após a infecção, foram observados valores similares em que o percentual de BMMΦ infectados por *L. amazonensis* foi de 64,54%, apresentando uma média de 2,446 parasitos por célula, enquanto que 71,99% dos macrófagos peritoneais estavam infectados, com carga parasitária média de 2,612 *Leishmania*/MΦ. Por outro lado, observamos a baixa infecção por *L. major*, em que 22,07% dos BMMΦ e 16,72% dos macrófagos peritoneais estavam infectados, sendo que apresentaram valores de 1,428 e 1,2 parasitos por célula.



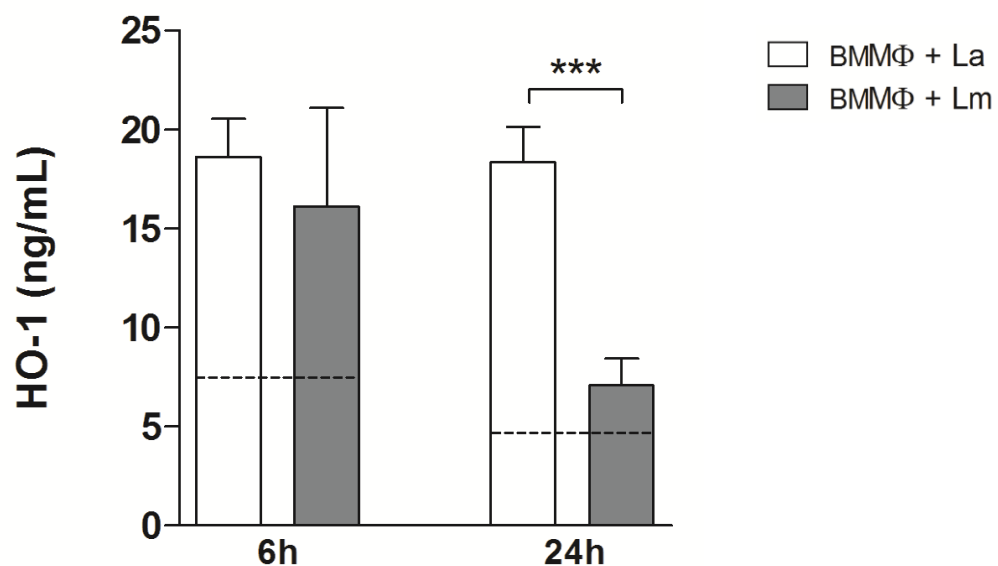
**Figura 2. Avaliação do percentual de infecção e carga parasitária na infecção de BMMΦ e macrófagos peritoneais infectados por *L. amazonensis* ou *L. major*.**  $2 \times 10^5$  BMMΦ e macrófagos peritoneais foram infectados na proporção de 5 parasitos por célula (5:1) com formas promastigotas metacíclicas e 10 parasitos por célula (10:1) com formas promastigotas em fase estacionária, respectivamente, por *L. amazonensis* ou *L. major* e avaliados quanto ao percentual de células infectadas (A e B) e o número de parasitos por célula (C e D). Após 6h de infecção, as células foram fixadas, coradas com DAPI e a contagem foi realizada em microscópio de fluorescência. Resultado representativo de 2 experimentos. As barras representam a média em triplicata ou sextuplicata  $\pm$  SD.



## ABORDAGEM I: AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DE FERRO EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *Leishmania*

### 9.2 CONCENTRAÇÃO DE HO-1

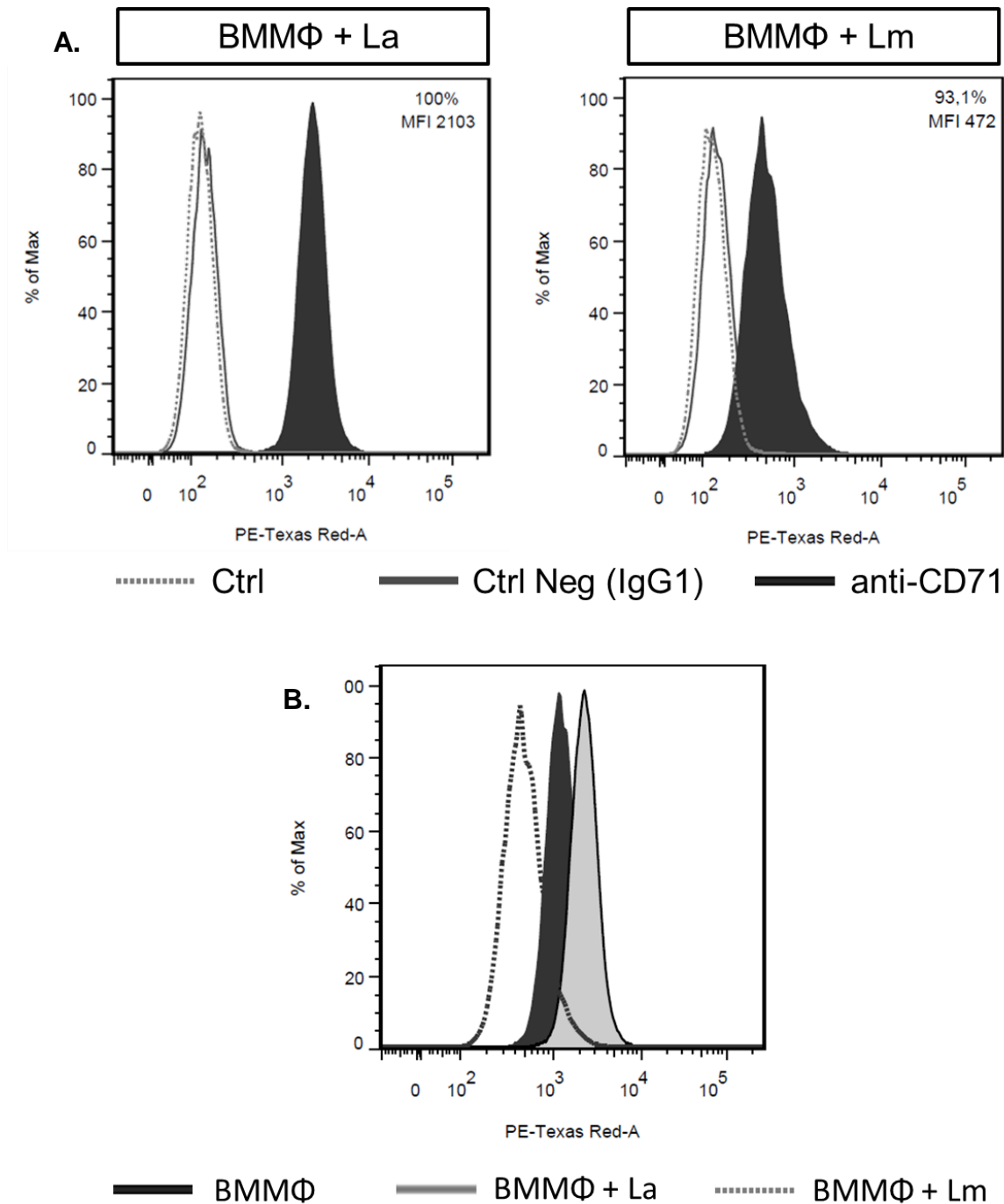
A concentração de HO-1 em BMMΦ infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* avaliada por ELISA mostrou que no tempo inicial da infecção (6 h), a expressão média foi similar entre BMMΦ infectados por *L. amazonensis* e *L. major*, respectivamente, 18,62 e 16,12 ng/mL. Além disso, esses resultados indicam que a infecção por *Leishmania* modula positivamente a expressão de HO-1 no tempo inicial da infecção em relação aos BMMΦ não infectados (Figura 3). No entanto, 24 h após a infecção observamos que o aumento na concentração de HO-1 é mantida apenas em BMMΦ infectados por *L. amazonensis* (18,34 ng/mL), enquanto houve uma redução da concentração da enzima nas células infectadas por *L. major* (7,07 ng/mL) (Figura 3).



**Figura 3. Avaliação da concentração de HO-1 em BMMΦ infectados por *Leishmania*.** BMMΦ infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* foram avaliados quanto à quantidade de HO-1. Para isto,  $5 \times 10^5$  BMMΦ foram plaqueados em placas de 48 poços e infectados com promastigotas na fase estacionária de *L. amazonensis* ou *L. major* na proporção de 10:1. Após 6 h de infecção, as células foram lavadas com solução salina, para a retirada dos parasitos não internalizados. Em seguida, um grupo foi re-incubado por adicionais 24 h. Após 6 e 24 h de infecção, os BMMΦ foram lisados com tampão de lise e a concentração de HO-1 foi avaliada por ELISA. BMMΦ não infectados, representados pela linha tracejada, apresentaram valores médios de 7,449 ng/mL e 4,871 ng/mL nos tempos de 6 e 24 h, respectivamente. Os valores no gráfico representam a média  $\pm$  SD de um experimento representativo de dois experimentos independentes realizados em quintuplicata. Test *t* de Student \*\*\* $p < 0,0001$ .

### 9.3 EXPRESSÃO DE CD71

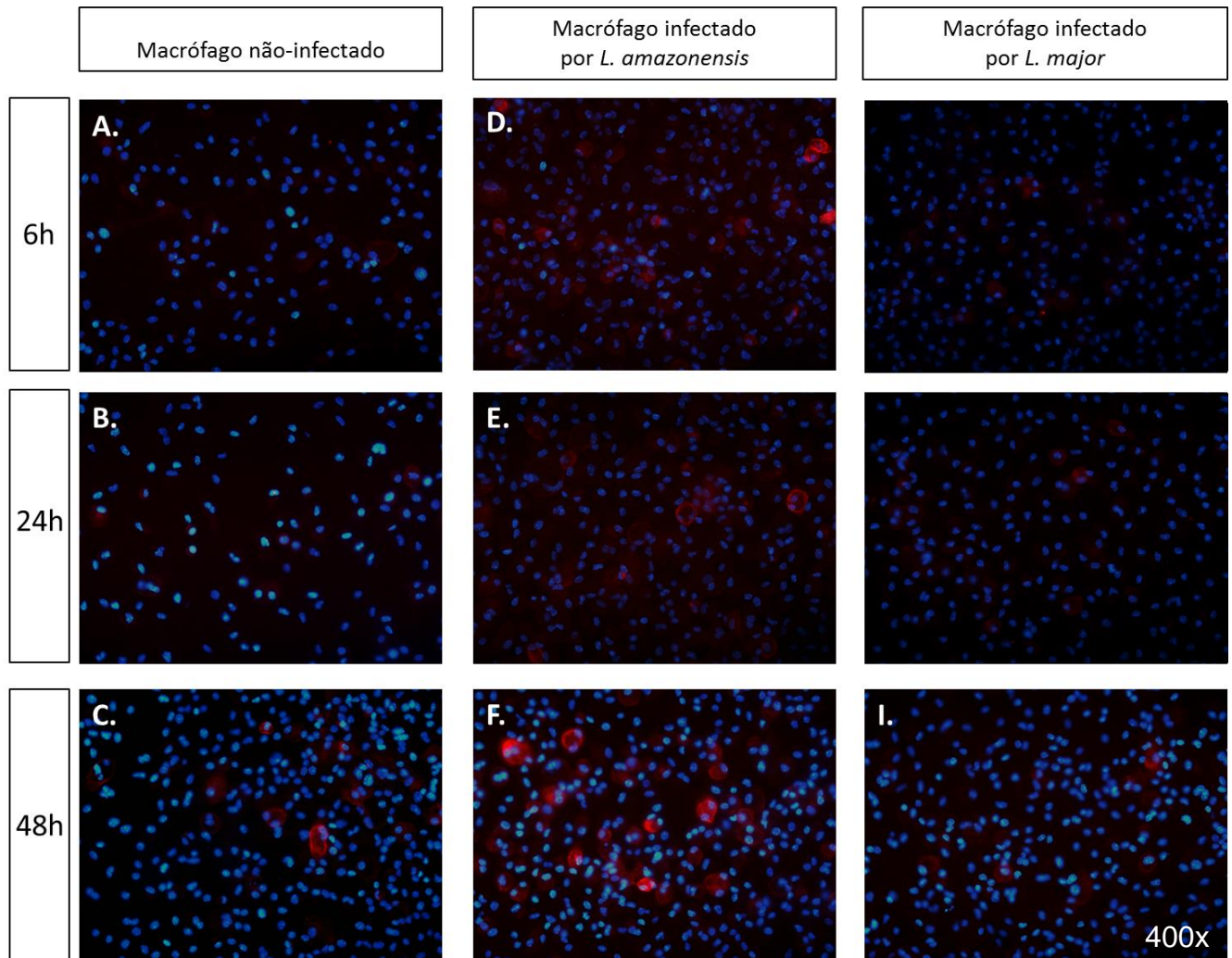
A avaliação da expressão de CD71 em BMM $\Phi$  infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* imunomarcados com anticorpo anti-CD71 mostrou que, após 24 h, 100% dos BMM $\Phi$  infectados por *L. amazonensis* eram CD71<sup>+</sup> comparados a 93,1% dos BMM $\Phi$  CD71<sup>+</sup> infectados por *L. major* (Figura 4). Essa maior expressão também foi detectada em relação aos valores de mediana de intensidade de fluorescência (MFI) em BMM $\Phi$  infectados por *L. amazonensis* que apresentaram um valor de 2.103, aproximadamente 4,5 vezes maior que o valor de MFI de 472 detectado em BMM $\Phi$  infectados por *L. major*.



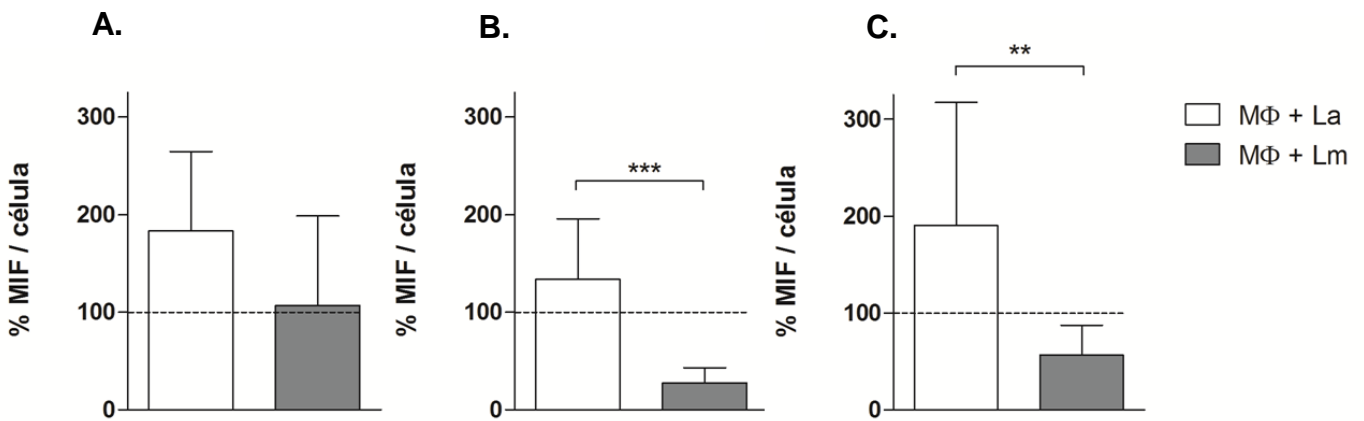
**Figura 4. Avaliação da expressão de CD71 em BMMΦ infectados por *Leishmania*.** BMMΦ foram plaqueados e, posteriormente, infectados com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* ou *L. major* na proporção de 5:1. Após 24 h de infecção, os macrófagos foram coletados e  $2 \times 10^5$  foram plaqueados em placas de 96 poços, fixados e permeabilizados e, em seguida, imunomarcados para a avaliação da expressão de CD71. A imunomarcagem de CD71 foi realizada utilizando o anticorpo primário monoclonal anti-CD71, seguido do anticorpo secundário conjugado ao PE-Texas Red. A avaliação da marcação de CD71 foi realizada por FACS e o percentual de células CD71<sup>+</sup> e o MFI foram determinados por análise no FlowJo. Resultado de um experimento. **A.** População de BMMΦ infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* não marcadas, controle negativo (marcadas com IgG1) e imunomarcadas com o anticorpo anti-CD71; **B.** BMMΦ não infectados ou infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* e imunomarcados com o anticorpo anti-CD71. BMMΦ não infectados foram utilizados como controle, o qual apresentou MFI de 1145.

#### 9.4 LIGAÇÃO E CAPTAÇÃO DE HOLOTf

A quantificação da ligação de HoloTf medida por microscopia de fluorescência (Figura 5) mostrou que macrófagos peritoneais infectados por *L. amazonensis* apresentaram um maior percentual de ligação com HoloTf-Texas Red em comparação aqueles infectados por *L. major* em todos os tempos avaliados de 6, 24 ou 48 h (Figura 6).

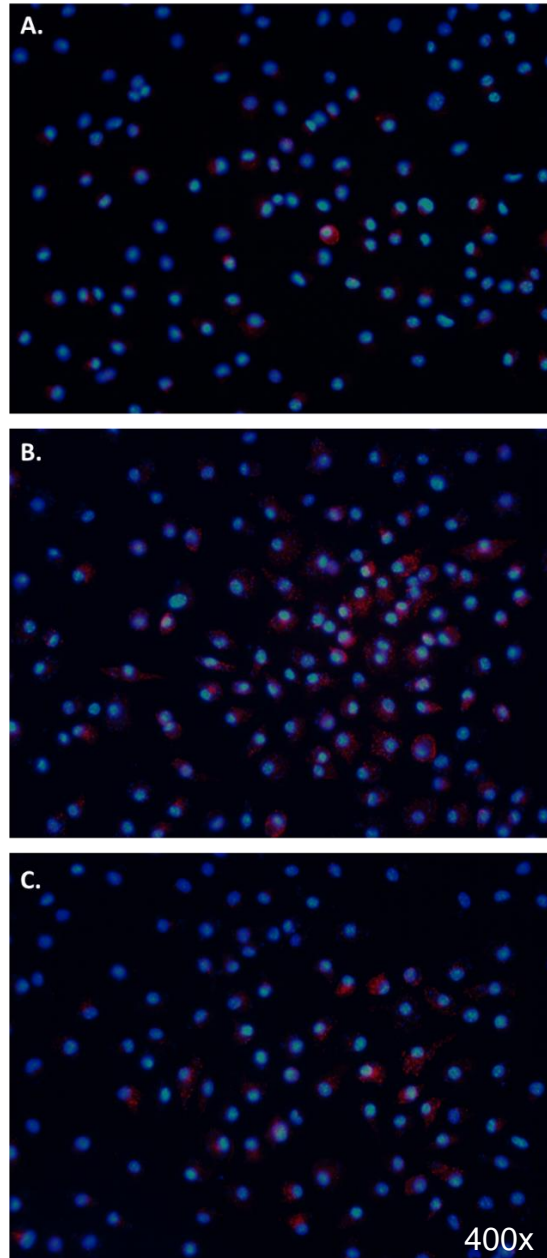


**Figura 5. Ligação de HoloTf em macrófagos infectados por *Leishmania*.** Macrófagos peritoneais foram plaqueados na concentração de  $2 \times 10^5$  por poço e, posteriormente, infectados com promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis* ou *L. major* na proporção de 10:1. Após o período de infecção, as células foram lavadas com salina estéril e submetidas ao ensaio de ligação de HoloTf-Texas Red conforme descrito no item 6.9. Em seguida, as células foram fixadas e analisadas por microscopia de fluorescência. **A, B e C.** macrófagos não infectados; **D, E e F.** macrófagos infectados por *L. amazonensis* e **G, H e I.** macrófagos infectados por *L. major* 6, 24 e 48 h após infecção, respectivamente. Os núcleos foram corados com DAPI (azul) e as imagens foram obtidas utilizando um aumento de 400x. Foram realizados dois experimentos para avaliação da ligação de HoloTf-Texas Red em macrófagos infectados por *Leishmania*.



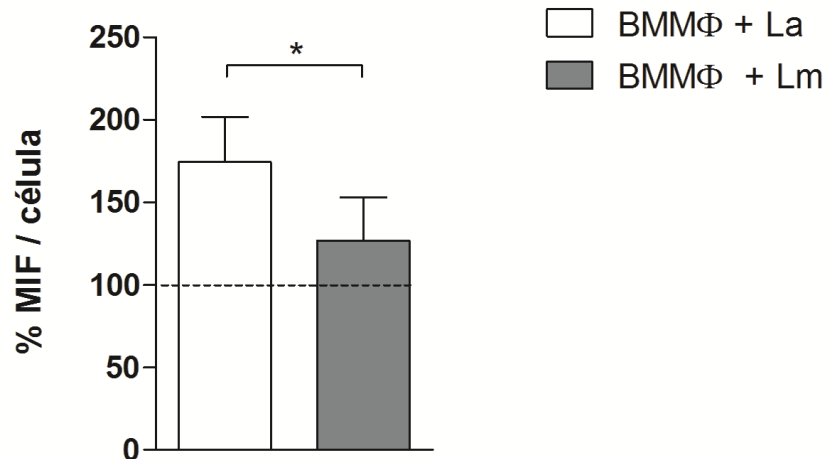
**Figura 6. Quantificação da ligação de HoloTf a macrófagos infectados por *Leishmania*.** Macrófagos peritoneais infectados por *Leishmania* foram submetidos aos ensaios de ligação de HoloT-Texas Red, como descrito no item 6.9. Em seguida, os diferentes grupos celulares foram fixados e imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência e analisadas no programa Volocity para quantificação da intensidade de fluorescência para a HoloTf-Texas Red. A frequência das marcações para DAPI foi realizada, através do Image J, para determinação do número total de células por imagem. A média da intensidade de fluorescência (MIF) por célula foi obtida pela razão da quantificação da intensidade de fluorescência sobre quantificação total de células por imagem. MIF de macrófagos não infectados foi determinado e utilizado como controle, sendo considerado 100%, representado pela linha tracejada. MIF de células infectadas por *Leishmania* foi obtido a partir do cálculo  $MIF\ teste \times 100 / MIF\ controle$ . Os gráficos representam resultado de um experimento representativo de dois experimentos realizados independentes. **A.** macrófagos infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* após 6 h de infecção; **B.** 24 h e **C.** 48 h. Teste *t* de Student, \* $p < 0,05$

A captação de HoloTf por BMMΦ infectados por *Leishmania* foi evidenciada por microscopia de fluorescência (Figura 7).



**Figura 7. Captação de HoloTf em BMMΦ infectados por *Leishmania*.** BMMΦ foram plaqueados na concentração de  $2 \times 10^5$  por poço e, posteriormente, infectados com promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis* ou *L. major* na proporção de 10:1. Após 6 h de infecção, as células foram submetidas ao ensaio de captação de HoloTf-Texas Red conforme descrito no item 6.9. As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência utilizando um aumento de 400x: **A.** BMMΦ não infectados; **B.** BMMΦ infectados por *L. amazonensis* e **C.** BMMΦ infectados por *L. major* após 6 h de infecção.

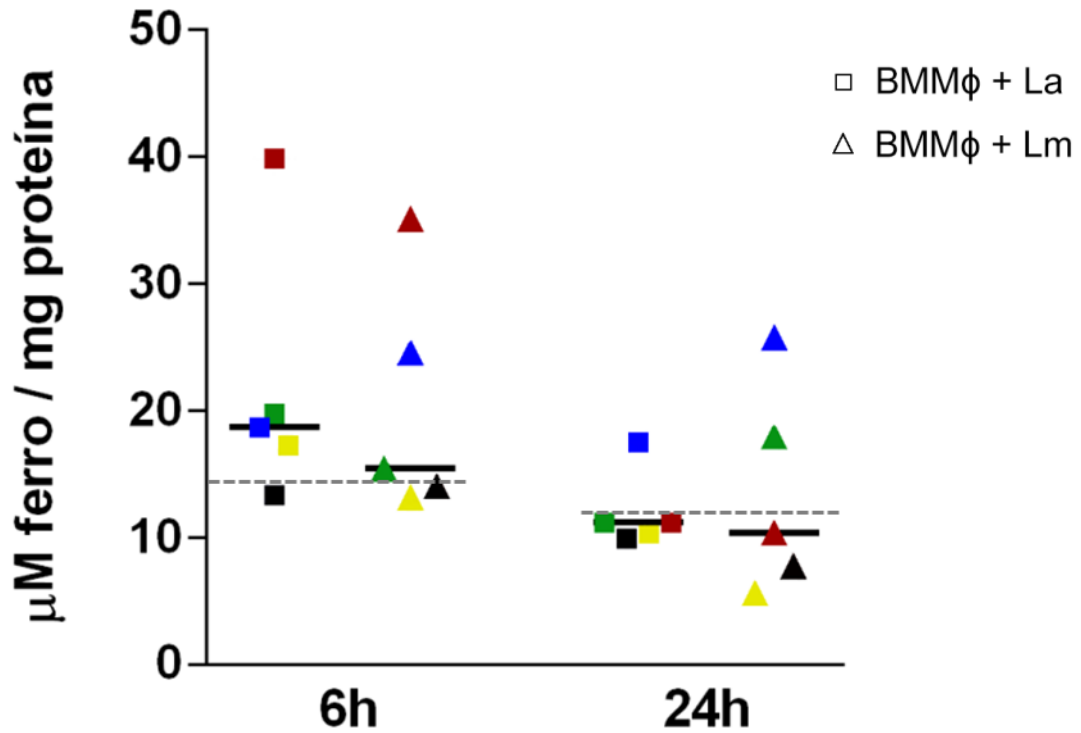
A análise quantitativa da captação de HoloTf-Texas Red por BMMΦ infectados por *Leishmania* mostrou que BMMΦ infectados por *L. amazonensis* (174,4%) apresentaram um maior percentual de captação de HoloTf em comparação com aqueles infectados por *L. major* (126,8%) (Figura 8).



**Figura 8. Quantificação da captação de HoloTf em BMMΦ infectados por *Leishmania*.** BMMΦ foram infectados por *Leishmania* foram submetidos ao ensaio de captação de HoloTf-Texas Red conforme descrito no item 6.9. Em seguida, os diferentes grupos celulares foram fixados e imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência e analisadas no programa Volocity para quantificação da intensidade de fluorescência para a HoloTf-Texas Red. A frequência das marcações para DAPI foi realizada, através do Image J, para determinação do número total de células por imagem. A média da intensidade de fluorescência (MIF) por célula foi obtida pela razão da quantificação total da fluorescência sobre quantificação total de células por imagem. MIF de macrófagos não infectados foi determinado e utilizado como controle, sendo considerado 100%, representado pela linha tracejada. MIF de células infectadas por *Leishmania* foi obtido a partir do cálculo  $MIF\ teste \times 100 / MIF\ controle$ . Teste *t* Student \*  $p=0,0119$

## 9.5 CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE FERRO

Após 6 e 24 h de infecção, não observamos diferença na concentração intracelular de ferro entre BMMΦ infectados por *L. amazonensis* e *L. major* (Figura 9). Após 6 h de infecção, os lisados de células infectadas por *L. amazonensis* ou *L. major* apresentaram um acúmulo de ferro de 18,74 e 15,49  $\mu\text{M}$  de ferro/mg proteína, respectivamente. No tempo de 24 após a infecção, a concentração intracelular de ferro de BMMΦ infectados por *L. amazonensis* ou *L. major*, respectivamente, foi de 11,23 e 10,43  $\mu\text{M}$  ferro/mg proteína.



**Figura 9. Concentração intracelular de ferro em BMMΦ infectados por *Leishmania*.** BMMΦ foram infectados com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* ou *L. major* e, posteriormente, a quantificação de ferro intracelular foi realizada por ensaio colorimétrico baseado em ferrozina. Quantificação proteica das amostras foi realizada paralelamente para normalização do resultado. BMMΦ não infectados, representados pela linha tracejada, apresentaram um acúmulo de ferro de 14,91 e 11,91 µM no tempo de 6 e 24 h após infecção, respectivamente. Os valores representam a mediana de cinco ensaios independentes realizados (representados em diferentes cores) em triplicata a sextuplicata ± erro-padrão.

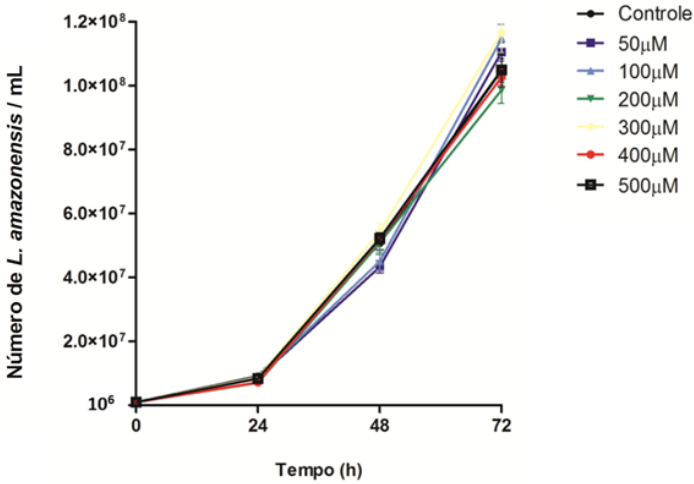


## ABORDAGEM II: EFEITO DA MODULAÇÃO DA DISPONIBILIDADE DE FERRO SOBRE A INFECÇÃO POR *Leishmania*

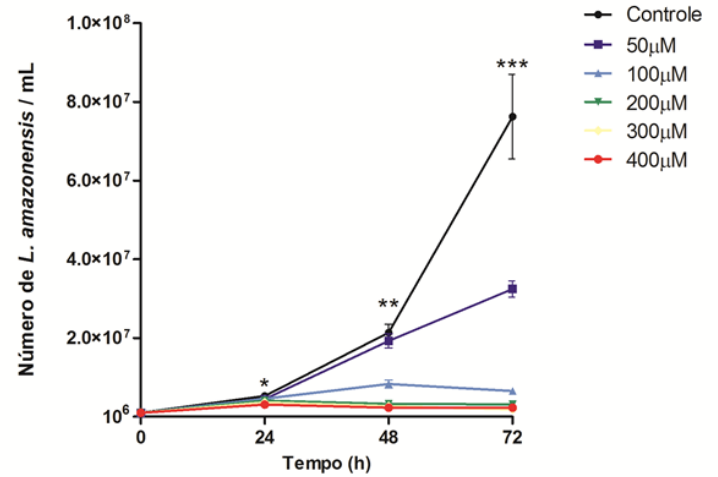
### 9.6 PROLIFERAÇÃO DE PROMASTIGOTAS DE *Leishmania* EM CULTURA AXÊNICA

Incubação com o sulfato ferroso não causou alteração sobre a proliferação de promastigotas de *L. amazonensis* (Figura 10A). Em contrapartida, o cultivo com os diferentes quelantes de ferro avaliados causou a redução da proliferação de *L. amazonensis* de maneira concentração dependente (Figura 10). Assim, a incubação com a molécula DFO apresentou percentuais de redução estatisticamente significante de 57,44%; 91,43%; 95,86%; 97,63%; 97% do número de promastigotas de *L. amazonensis*, em relação ao controle, após 72 h de exposição às concentrações de 50, 100, 200, 300 e 400  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Figura 10B). Os quelantes de ferro, dipiridil e fenantrolina, também causaram redução na proliferação de *L. amazonensis*. O dipiridil causou a redução de 66,11%; 96,33%; 99,55%; 99,87%, 99,95%, às concentrações de 25, 50, 100, 140 e 180  $\mu\text{M}$ , respectivamente, sendo todas estatisticamente significantes (Figura 10C). A incubação com fenantrolina após 72h de exposição causou redução com valores acima de 99% nas concentrações de 2,5; 6,25; 12,5; 25 e 50  $\mu\text{M}$ , sendo esses valores de 99,06%, 99,98%; 99,98%; 99,99%; 100% (Figura 10D).

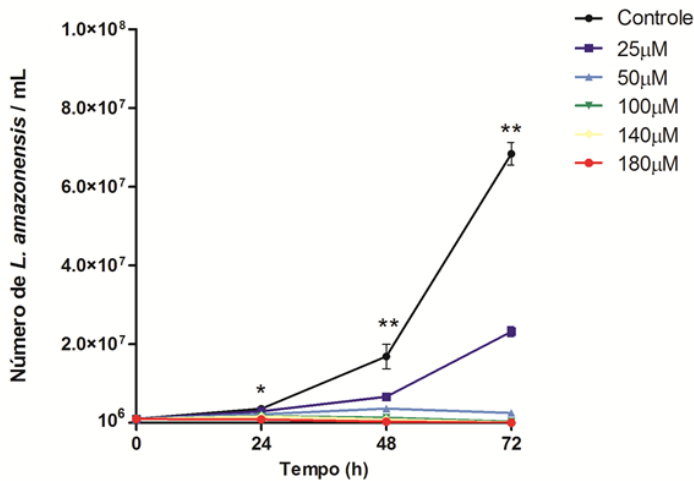
### A. Sulfato Ferroso



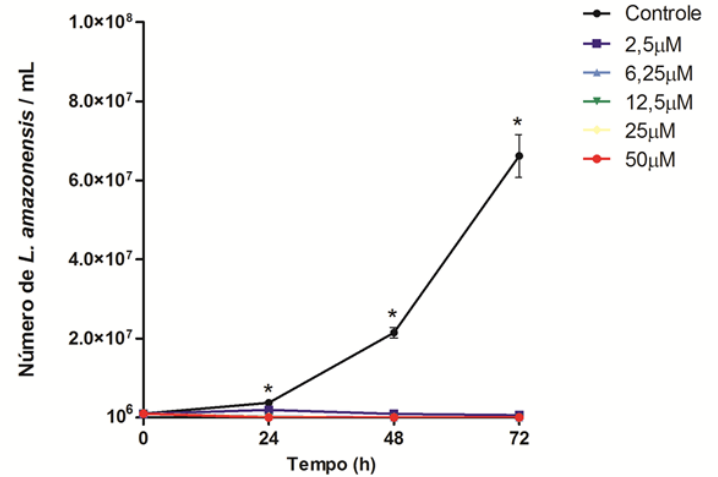
### B. DFO



### C. Dipiridil



### D. Fenantrolina

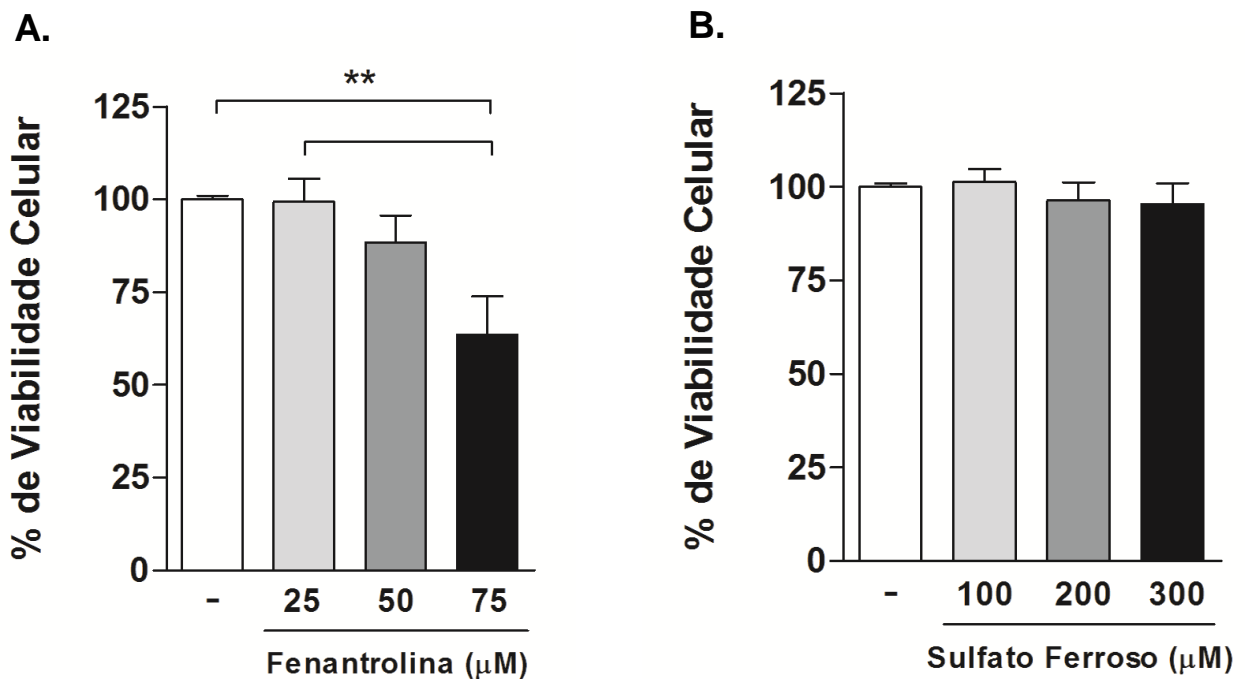


**Figura 10. Efeito da modulação da disponibilidade de ferro sobre a proliferação de promastigotas de *L. amazonensis*.** Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas com moléculas moduladoras da disponibilidade de ferro: **A.** sulfato ferroso, **B.** DFO; **C.** Dipiridil e **D.** Fenantrolina, em diferentes concentrações. Os valores representam a média do número de *Leishmania* de um ensaio realizado em quadruplicata a sextuplicata  $\pm$  desvio-padrão. Teste *t* Student  $*p < 0,05$ ;

## 9.7 VIABILIDADE DE BMM $\Phi$ DE CAMUNDONGOS CBA

Uma vez que a fenantrolina se mostrou mais eficaz na redução do número de promastigotas de *Leishmania* em cultura axênica, este quelante foi escolhido, juntamente

com o sulfato ferroso, para a realização da avaliação do efeito da modulação de ferro sobre a infecção *in vitro* por *Leishmania*. A análise da viabilidade celular de BMM $\Phi$  pelo azul de Tripán mostrou que a fenantrolina, causou uma redução estatisticamente significativa de 36,53% na viabilidade celular apenas na concentração de 75  $\mu$ M (ANOVA, Figura 11A). O sulfato ferroso não causou alterações significativas no número de células viáveis nos grupos de BMM $\Phi$  nas diferentes concentrações testadas, 100, 200 e 300  $\mu$ M (Figura 11B).

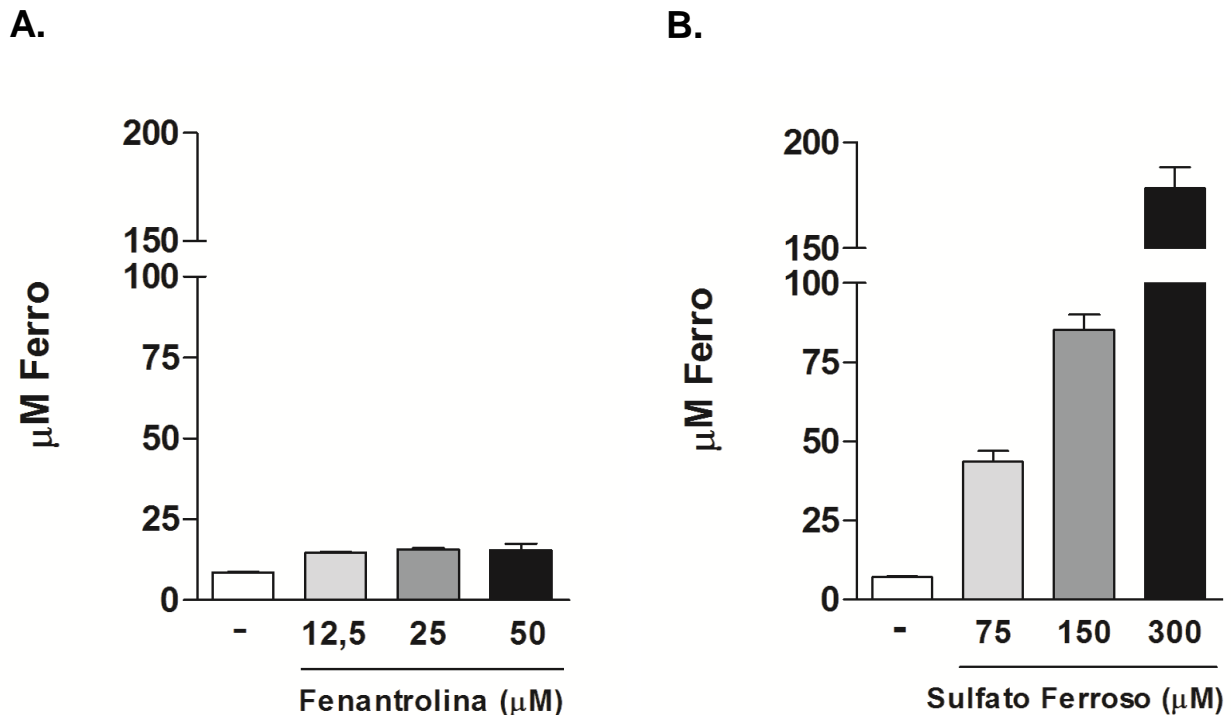


**Figura 11. Efeito da modulação da disponibilidade de ferro sobre a viabilidade de BMM $\Phi$ .** BMM $\Phi$  de camundongos CBA ( $2 \times 10^5$ /poço), foram expostos a fenantrolina nas concentrações de 25, 50 e 75  $\mu$ M (A) ou a sulfato ferroso nas concentrações de 100, 200 e 300  $\mu$ M (B). Após 48 h, a contagem do número de células viáveis ou não viáveis foi realizada para a determinação do percentual de viabilidade usando azul de Tripán por contagem direta em microscópio óptico invertido. Os valores representam a média de um ensaio realizado em sextuplicata  $\pm$  desvio-padrão. ANOVA \*\*  $p < 0,05$

## 9.8 CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE FERRO EM BMM $\Phi$ DE CAMUNDONGOS CBA

BMM $\Phi$  incubados com 12,5, 25 e 50  $\mu$ M de fenantrolina apresentou uma média de concentração intracelular de ferro de 14,57; 17,71 e 15,50  $\mu$ M de ferro, valor estatisticamente similar ao do controle de 8,58  $\mu$ M (Figura 12A). Como esperado, foi observado que a suplementação de ferro aumentou os níveis intracelulares desse íon.

Assim, após 48 h de incubação com 75, 150 e 300  $\mu\text{M}$  de sulfato ferroso, os BMM $\Phi$  atingiram valores médios de ferro intracelular de 43,50, 85,22 e 178,2  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Estes valores correspondem a um aumento na concentração de ferro de 6,16; 12,08 e 25,26 vezes em comparação ao grupo controle, que apresentou valor médio de 7,05  $\mu\text{M}$  (Figura 12B).



**Figura 12. Efeito da modulação da disponibilidade de ferro sobre a concentração intracelular deste íon em BMM $\Phi$  de camundongos CBA.** BMM $\Phi$  de camundongos CBA ( $2 \times 10^5$ /poço) foram expostos a fenantrolina nas concentrações de 25, 50 e 75  $\mu\text{M}$  (A) ou a sulfato ferroso, nas concentrações de 100, 200 e 300  $\mu\text{M}$  (B). Após 48 h, as células foram congeladas para posterior quantificação intracelular de ferro pelo ensaio colorimétrico baseado em ferrozina. O resultado representa a média  $\pm$  desvio-padrão de um ensaio realizado.

### 9.9 EFEITO DA MODULAÇÃO DA DISPONIBILIDADE DE FERRO SOBRE A INFECÇÃO DE BMM $\Phi$ POR *L. amazonensis* ou *L. major*

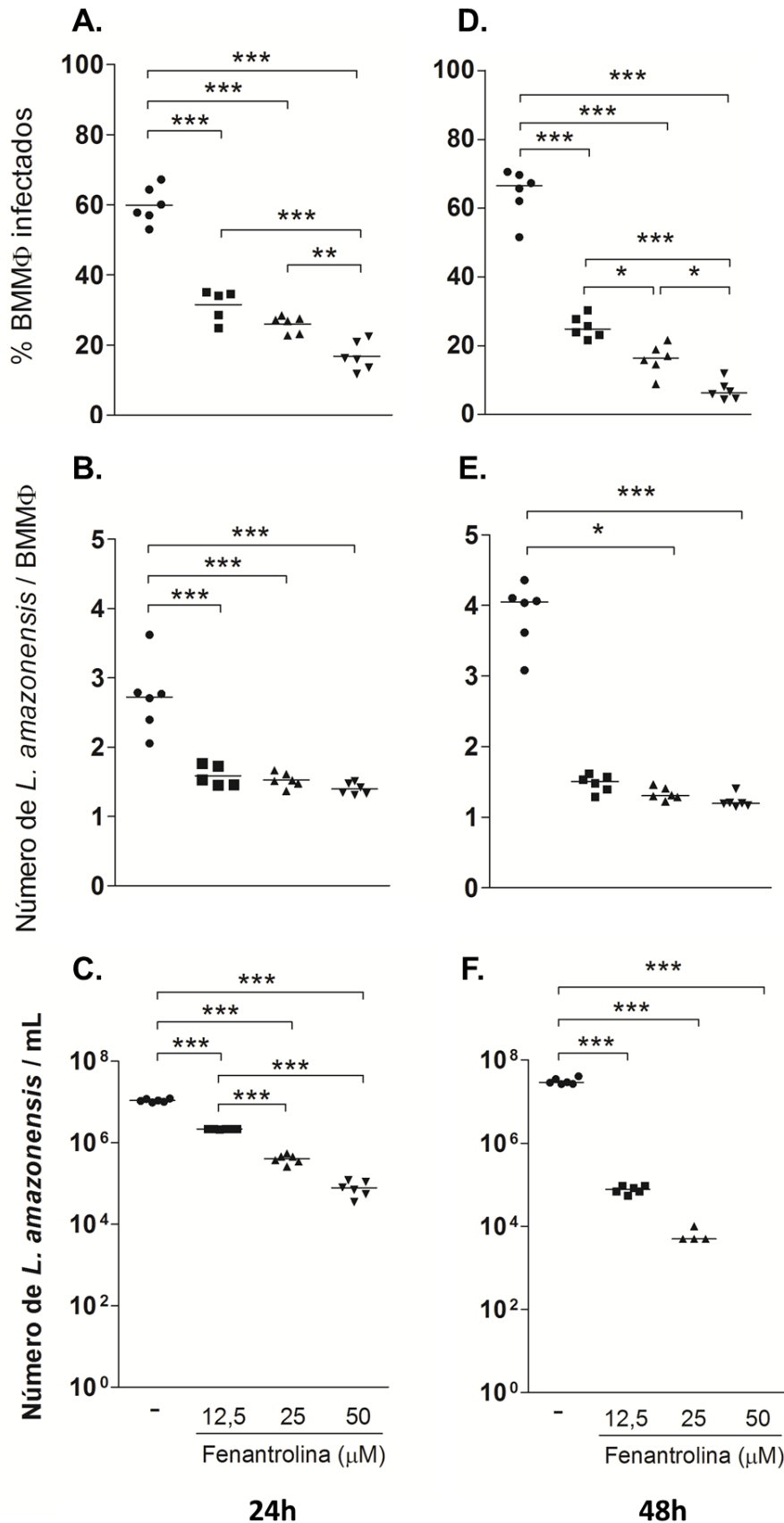
Foi observado que a exposição à fenantrolina causou redução significativa na carga parasitária e no percentual de BMM $\Phi$  infectados por *L. amazonensis* ou *L. major*, além da viabilidade intracelular das duas espécies de parasitos (Figura 13).

A fenantrolina causou diminuição no percentual de BMM $\Phi$  infectados por *L. amazonensis*, no tempo de 24 h, com valores de 34,13%, 26,96% e 16,06% nas concentrações de fenantrolina de 12,5, 25 e 50  $\mu\text{M}$ , respectivamente em comparação com

58,88% de BMMΦ infectados no grupo controle não tratado. (Figura 13A, ANOVA, Linear Trend,  $p < 0,0001$ ). O quelante de ferro também reduziu o número de parasitos por célula, de 1,53; 1,519 e 1,383 nos grupos tratados com 12,5, 25 e 50  $\mu\text{M}$  de fenantrolina, respectivamente, em comparação a 2,738 do grupo controle (Figura 13B, ANOVA, Linear Trend,  $p < 0,0001$ ).

O percentual de BMMΦ infectados por *L. amazonensis* após 48 h tratados com fenantrolina foi também reduzido para valores de 24,89%, 16,41% e 6,337% nas concentrações de 12,5, 25 e 50  $\mu\text{M}$ , respectivamente, em comparação ao grupo controle (66,52%). (Figura 13D, ANOVA, Linear Trend,  $p < 0,0001$ ). Os valores medianos do número de *Leishmania* por célula foi de 1,507, 1,304 e 1,196 nas concentrações de 12,5, 25 e 50  $\mu\text{M}$  de fenantrolina, respectivamente, em relação ao grupo controle de 4,049 (Figura 13E).

Após 24 h de exposição à fenantrolina, foram observadas reduções na viabilidade intracelular de *L. amazonensis* de 79,86%, 96,27% e 99,28% nas concentrações de 12,5, 25 e 50  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Figura 13C, ANOVA, Linear Trend,  $p < 0,0001$ ). Similarmente, a exposição da fenantrolina por 48 h causou redução acentuada do número de promastigotas viáveis de 99,74%, 99,98% nos grupos tratados com 12,5 e 25  $\mu\text{M}$  e uma redução de 100% no grupo tratado com 50  $\mu\text{M}$  do quelante de ferro (Figura 13F, ANOVA, Linear Trend,  $p < 0,0001$ ), sendo que o valor de IC<sub>50</sub> 48 h calculado foi de 3,0053  $\mu\text{M}$ .

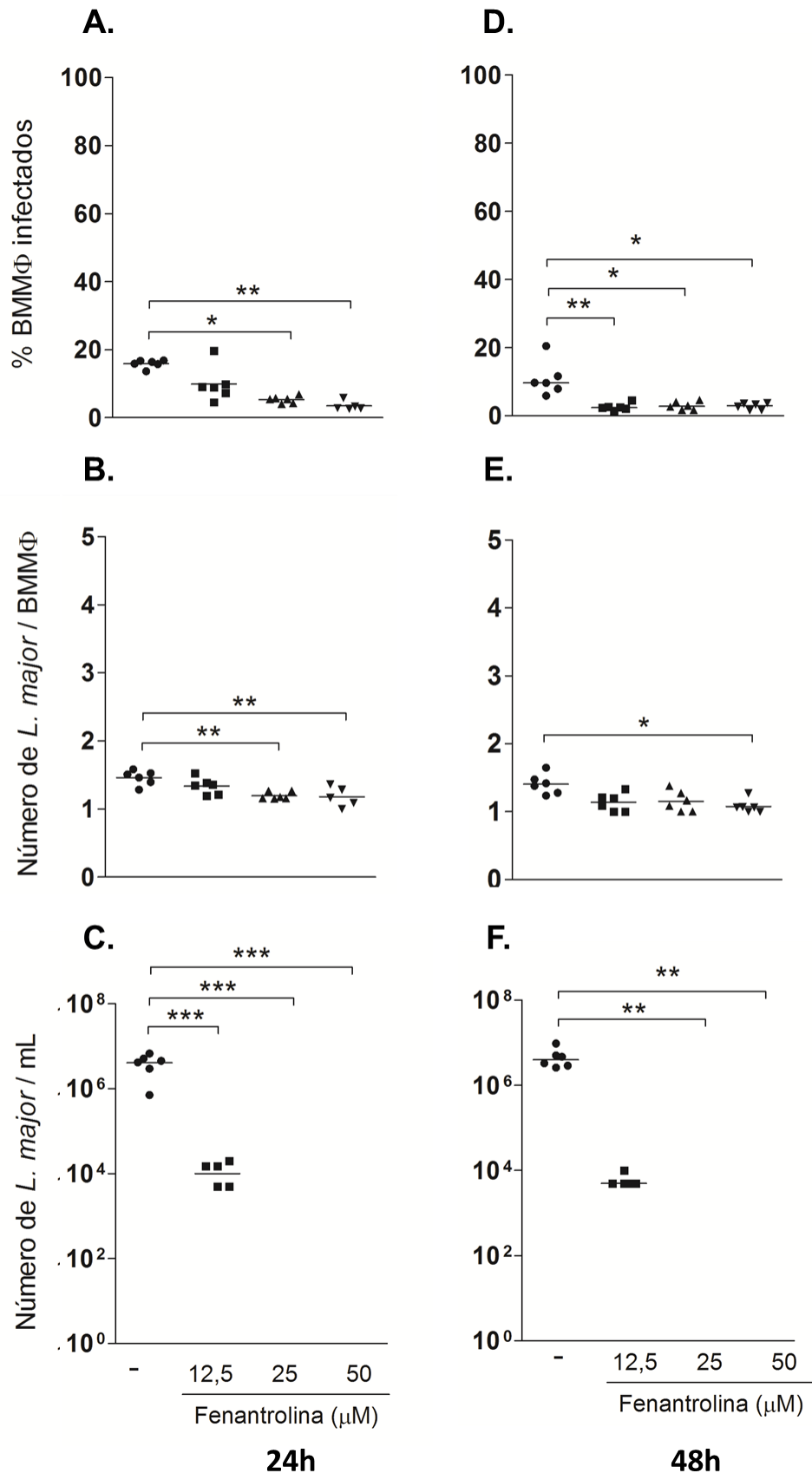


**Figura 13. Depleção de ferro sobre a infecção de *L. amazonensis*.** O efeito da incubação com fenantroline foi avaliado em BMMΦ ( $2 \times 10^5$ ) infectados com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* na proporção de 3:1. Após 6 h de infecção, as células foram lavadas com solução salina, para a retirada dos parasitos não internalizados. Seguidas 48 h, as células foram incubadas com 12,5, 25 e 50  $\mu\text{M}$  de fenantroline por 24 e 48 h e parâmetros como percentual de células infectadas (**A e D**), carga parasitária (**B e E**) e número de parasitos viáveis (**C e F**) foram avaliados. Os valores representam a mediana  $\pm$  desvio-padrão de um ensaio representativo de dois experimentos realizados em sextuplicata. ANOVA, \* $p < 0,05$

A fenantrolina também causou diminuição no percentual de BMMΦ infectados por *L. major* (Figura 14). BMMΦ infectados incubados após 24 h com 12,5, 25 e 50 μM de fenantrolina, mostram 8,997%, 5,491% e 2,824%, respectivamente, em comparação a 16,15% no grupo controle (Figura 14A). Adicionalmente, o quelante de ferro reduziu o número de parasitos por célula, de 1,485 no grupo controle em comparação a 1,352, 1,168 e 1,167 nos grupos tratados com 12,5, 25 e 50 μM de fenantrolina, respectivamente (Figura 14B, ANOVA, Linear Trend,  $p=0,0002$ ). O percentual de BMMΦ infectados por *L. major* após 48 h de tratamento com fenantrolina foi de 2,418%, 2,799% e 2,934% nas concentrações de 12,5, 25 e 50 μM, respectivamente, em comparação ao grupo controle (9,659%) (Figura 14D, ANOVA). Em relação ao número de *Leishmania* por célula os valores medianos corresponderam a 1,145, 1,125 e 1,067 nas mesmas concentrações comparado a 1,4 no grupo controle de (Figura 14E).

Semelhantemente ao que foi observada em *L. amazonensis*, a exposição da fenantrolina também causou redução significativa no número de parasitos viáveis em BMMΦ infectados por *L. major*. Após 24 e 48 h de exposição à fenantrolina, foram observadas reduções na viabilidade intracelular de *L. major* de aproximadamente 100%, nas diferentes concentrações testadas (Figura 14 C e F). O valor de IC50 48 h calculado foi 6,966 μM.

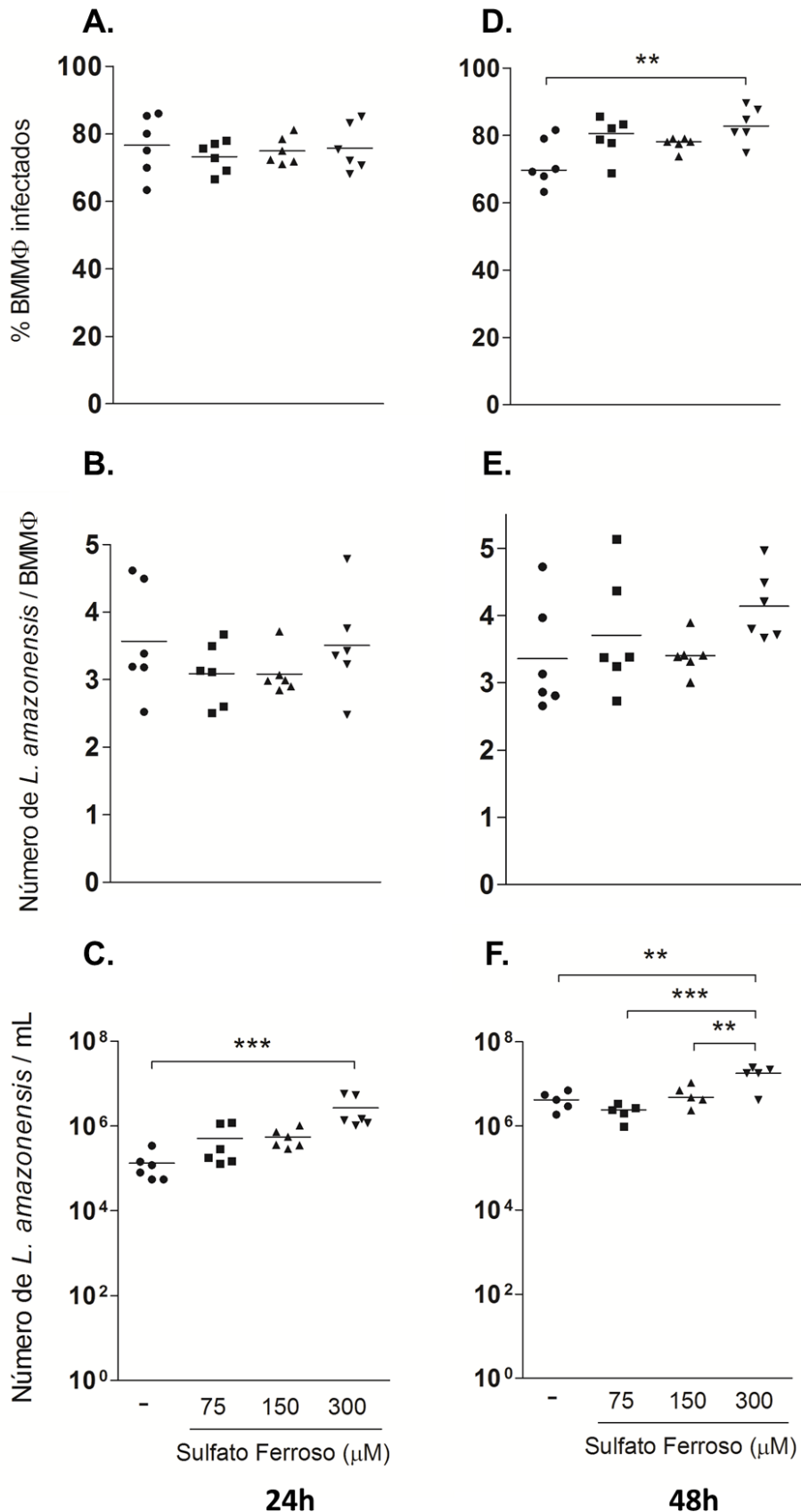
Em conjunto, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a depleção de ferro reduz a infecção por ambas as espécies de *Leishmania*, de forma tempo e concentração dependente.



**Figura 14. Depleção de ferro sobre a infecção de *L. major*.** O efeito da incubação com fenanthrolina em BMMΦ ( $2 \times 10^5$ ) infectados com promastigotas metacíclicas de *L. major* na proporção de 10:1. Após 6h de infecção, as células foram lavadas com solução salina, para a retirada dos parasitos não internalizados. Seguidas 48 h, as células foram incubadas com 12,5, 25 e  $50 \mu\text{M}$  de fenanthrolina por 24 e 48 h e parâmetros como percentual de células infectadas (**A e D**), carga parasitária (**B e E**) e número de parasitos viáveis (**C e F**) foram avaliados. Os valores representam a mediana  $\pm$  desvio-padrão de um experimento realizado em sextuplicata. ANOVA, \* $p < 0,05$ .

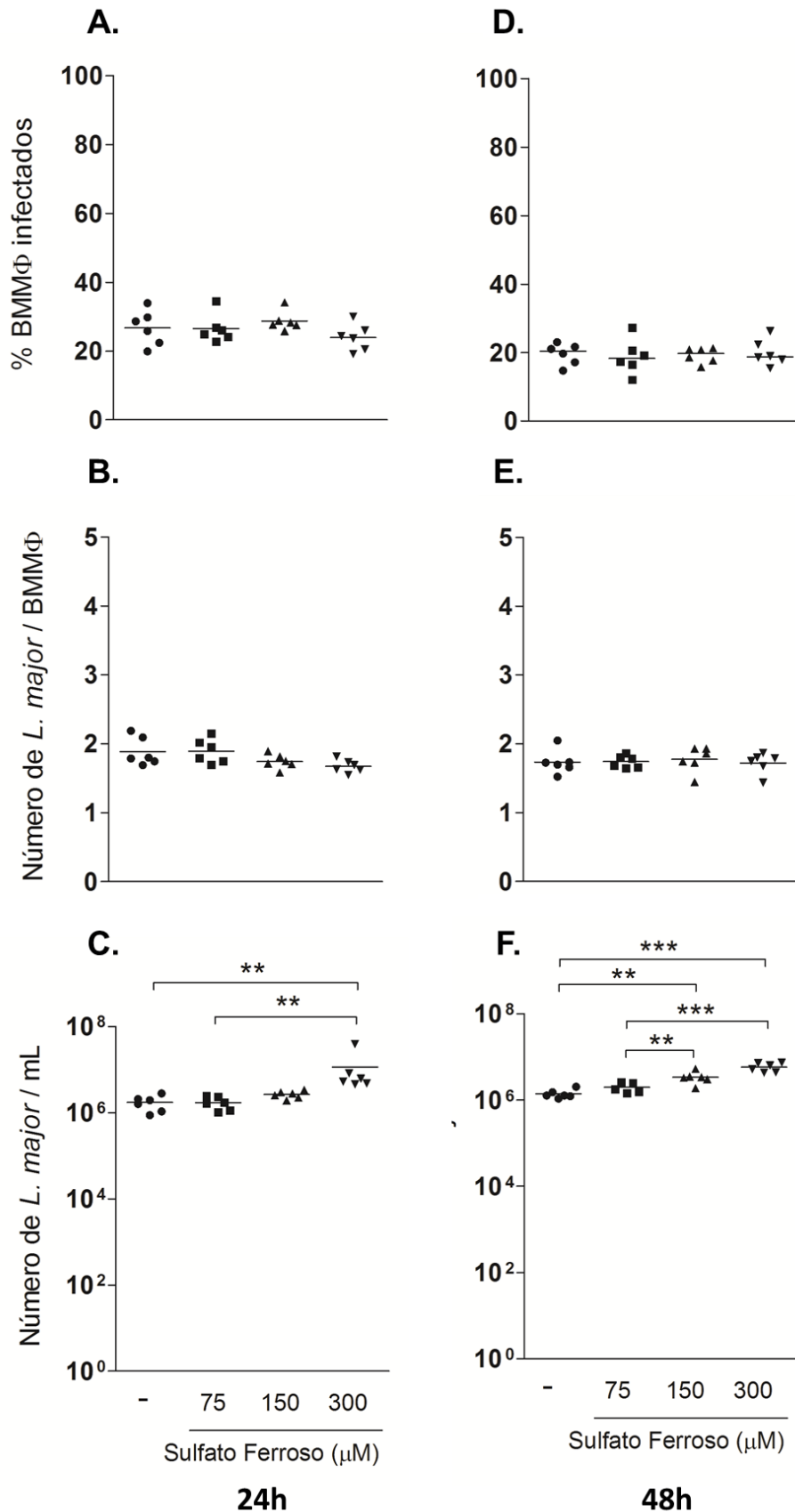


Em relação à suplementação de ferro em BMMΦ infectados por *L. amazonensis*, foi observado que a incubação com sulfato ferroso causou aumento no percentual de células infectadas no tempo de 48 h, mas não no tempo de inicial de 24 h (Figura 15). Em relação ao percentual de BMMΦ infectados, o tratamento com sulfato ferroso aumentou percentual de 69,64% no grupo controle para 80,52, 78,09 e 82,79% em BMMΦ incubados com 75, 150 e 300 μM de sulfato ferroso (Figura 15D, ANOVA, Linear Trend,  $p=0,0041$ ). A mediana do número de parasitos por célula exposta as mesmas concentrações de sulfato ferroso foi de 3,381, 3,398 e 4,001, respectivamente, em comparação ao grupo controle que foi de 2,996. (Figura 15E). Similarmente, a suplementação de ferro em células infectadas por *L. amazonensis* causou aumento na viabilidade de *Leishmania* intracelular. Assim, após 24 h, observamos que houve aumento de 2,32; 4,575 e 14,03 vezes no número de parasitos viáveis em BMMΦ infectados por *L. amazonensis* expostos a 75, 150 e 300 μM do sulfato ferroso, sendo este último estatisticamente significativo (Figura 15C). Apesar de no tempo de 48 h termos observado uma redução não significativa de aproximadamente 1,75 vezes no número de parasitos viáveis no grupo incubado com 75 μM, em comparação ao controle, observamos um aumento de 1,14 e 4,285 vezes, respectivamente, nas concentrações de 150 e 300 μM (Figura 15F, ANOVA, Linear Trend,  $p=0,0002$ ).



**Figura 15. Suplementação de ferro sobre a infecção de *L. amazonensis*.** BMMφ ( $2 \times 10^5$ ) foram infectados por promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* na proporção de 3:1. Após 6h de infecção, as células foram lavadas com solução salina, para a retirada dos parasitos não internalizados. Seguidas 48 h, as células foram incubadas com 75, 150 e  $300 \mu\text{M}$  de sulfato ferroso por 24 e 48 h e parâmetros como o percentual de células infectadas (**A e D**), carga parasitária (**B e E**) e o número de parasitos viáveis (**C e F**) foram avaliados. Os valores representam a mediana  $\pm$  desvio-padrão de um ensaio realizado em sextuplicata. ANOVA,  $*p < 0,05$ .

Em contrapartida, a suplementação de ferro não alterou parâmetros como carga parasitária e o percentual de BMMΦ infectados por *L. major*, embora tenha sido observado que a incubação com sulfato ferroso causou aumento no número de parasitos viáveis no tempo de 24 e 48 h (Figura 16). Assim, após 24 h, observamos que houve aumento de 1,49 e 3,2 vezes no número de parasitos viáveis em BMMΦ infectados por *L. major* expostos a 150 e 300μM do sulfato ferroso em relação ao controle, sendo o último estatisticamente significativo (Figura 16C). No tempo de 48 h, observamos um aumento significativo de 2,625 e 4,55 vezes nas concentrações de 150 e 300 μM, respectivamente (Figura 16F, ANOVA, Linear Trend,  $p<0,0001$ ).



**Figura 16. Suplementação de ferro sobre a infecção de *L. major*.** BMMφ ( $2 \times 10^5$ ) foram infectados por promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* na proporção de 3:1. Após 6h de infecção, as células foram lavadas com solução salina, para a retirada dos parasitos não internalizados. Seguidas 48 h, as células foram incubadas com 75, 150 e  $300 \mu\text{M}$  de sulfato ferroso por 24 e 48 h e parâmetros como o percentual de células infectadas (**A e D**), carga parasitária (**B e E**) e o número de parasitos viáveis (**C e F**) foram avaliados. Os valores representam a mediana  $\pm$  desvio-padrão de um ensaio realizado em sextuplicata. ANOVA, \* $p < 0,05$ .

## 10. DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliamos o papel do ferro em macrófagos que apresentam diferentes perfis de infecção por *Leishmania*. Inicialmente, a expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro, como o CD71 e HO-1, além de sua concentração intracelular foi avaliada em BMM $\Phi$  de camundongos da linhagem CBA, que são permissivos à infecção por *L. amazonensis*, enquanto controlam a infecção por *L. major*. Em seguida, o efeito da modulação da disponibilidade de ferro, utilizando uma abordagem de depleção ou suplementação desse elemento, foi avaliado na infecção por *Leishmania*.

O ferro é um nutriente essencial para a maioria dos organismos e tem sido descrito como um elemento central na interação parasito-hospedeiro (DOHERTY, 2007; NAIRZ et al., 2010). Embora existam alguns dados controversos (BISTI et al., 2000; BISTI et al., 2006, VALE-COSTA et al., 2013), a restrição ao fornecimento de ferro aos patógenos é apontada como uma estratégia de defesa da célula hospedeira durante a infecção (COLLINS, 2008; NAIRZ et al., 2010). Utilizamos o modelo de camundongo CBA, que tem como vantagem apresentar perfis diferentes de resposta *in vivo* e *in vitro* à infecção por espécies distintas de *Leishmania*, *L. amazonensis* e *L. major*. Esse modelo abre a possibilidade de comparar em um mesmo tipo celular a participação do ferro no desfecho da infecção, contribuindo para uma melhor compreensão do papel desse elemento na susceptibilidade e resistência à infecção por *Leishmania*.

Já é descrito na literatura que a infecção por *Leishmania* modula a expressão de diversas proteínas envolvidas no metabolismo de ferro (PHAM et al., 2005; DAS et al., 2009; LUZ et al., 2012; BEN-OTHTMAN et al., 2014). Entretanto, poucos estudos avaliam a modulação das proteínas que participam do metabolismo de ferro em diferentes perfis de resposta à infecção por *Leishmania*. No presente estudo, observamos uma maior expressão de CD71 em BMM $\Phi$  infectados por *L. amazonensis*, em comparação àqueles infectados por *L. major*, bem como células não infectadas. Das e colaboradores (2009) demonstraram um aumento na expressão de CD71 na infecção por *L. donovani*, sendo que essa modulação é dependente da virulência do parasito. Uma vez que a virulência está relacionada ao caráter patogênico do microrganismo, esses achados de Das e colaboradores corroboram aos obtidos no nosso estudo, dado que BMM $\Phi$  que são permissivos à infecção por *L. amazonensis* apresentam aumento da expressão do receptor para HoloTf em comparação aos BMM $\Phi$  que controlam a infecção por *L. major*. Adicionalmente, Rabhi e colaboradores (2013) demonstraram que *L. major* inibe a

expressão de RNAm de CD71 em BMM $\Phi$  de linhagens distintas de camundongos que apresentam diferentes perfis de resposta à infecção por *L. major*, sugerindo que independente do desfecho da infecção, esse parasito limita a captação de ferro pelo macrófago.

É esperado que o aumento na expressão de CD71 em BMM $\Phi$  infectados por *L. amazonensis* reflita também o aumento da internalização desse receptor e, conseqüentemente, na maior captação de HoloTf. Assim, foi evidenciado no presente estudo, maior ligação e captação de HoloTf em macrófagos infectados por *L. amazonensis*. Desta forma, é possível que haja maior entrega da proteína carreadora de ferro aos VPs de macrófagos infectados por *L. amazonensis*, em relação aqueles infectados com *L. major*. Assim, o complexo CD71-HoloTf carreado em endossomas seriam liberados nos VPs por fusão entre esses compartimentos (BORGES et al., 1998). Como BMM $\Phi$  são susceptíveis à *L. amazonensis*, o aumento da expressão de CD71 e captação de HoloTf nessas células pode ter relação com a permissividade de macrófagos à infecção por *L. amazonensis*. Dessa forma, o tráfego intracelular de vesículas pode favorecer a aquisição de nutrientes, como o ferro, por patógenos que vivem em compartimentos da via endocítica (HACKSTADT, 2000; BURCHMORE; BARRETT, 2001; REYES-LÓPES; PIÑA-VÁRQUEZ; SERRANO-LUNA, 2015), como descrito anteriormente para *Leishmania* (BORGES et al., 1998; BURCHMORE; BARRETT, 2001). Os achados de Borges e colaboradores (1998) indicam que a entrega do ferro mediada por HoloTf aos VPs de *L. amazonensis* ou *L. pifanoi* pela via endocítica tem um papel no curso infecção por estes parasitos. Entretanto, Borges e colaboradores (1998) apenas analisaram a captação de HoloTf por células infectadas por essas espécies de *Leishmania*, e não compararam os níveis de captação entre as células infectadas ou em relação células controle não infectadas. Diferentemente do que foi descrito para macrófagos infectados por *L. amazonensis* ou *L. pifanoi*, Russell e colaboradores (1992) não observaram entrega de HoloTf em VPs de *L. mexicana*. Esses dados sugerem que a entrega de ferro aos VPs mediada por HoloTf pela via endocítica ocorre de forma distinta a depender da espécie do parasito (BORGES et al., 1998; REYES-LÓPES; PIÑA-VÁRQUEZ; SERRANO-LUNA, 2015). Embora o receptor de Tf de macrófagos tenha sido apontado como importante na modulação da disponibilidade de ferro na infecção por *Leishmania* (REYES-LÓPES; PIÑA-VÁRQUEZ; SERRANO-LUNA, 2015), ensaios baseados em técnicas de silenciamento, como RNAi, ou a utilização de camundongos *knockout* para CD71 são necessários para melhor compreensão do seu papel.

Identificamos uma modulação positiva da concentração de HO-1 em BMM $\Phi$  infectados por *L. amazonensis*, em comparação com aqueles infectados por *L. major* ou não infectados. A indução do aumento da quantidade de HO-1 já foi evidenciada na infecção por *Leishmania* (PHAM et al., 2005; LUZ et al., 2012). Além disso, Luz e colaboradores (2012) demonstraram que a modulação farmacológica da HO-1 utilizando um indutor da expressão de HO-1, cobalto protoporfirina IX (CoPP) (SHAN et al., 2000), aumenta o percentual de infecção e a carga parasitária de macrófagos infectados por *L. chagasi*, reduzindo a resposta leishmanicida dos macrófagos. Adicionalmente, BMM $\Phi$  de camundongos *knockout* para o gene *Hmox* (HO-1<sup>-/-</sup>) infectados por *L. chagasi* apresentam um menor número de parasitos viáveis quando comparados com células de camundongos selvagens (LUZ et al., 2012). Em conjunto, esses dados sugerem uma participação da HO-1 na replicação e sobrevivência intracelular de diferentes espécies de *Leishmania*. Adicionalmente, Pham e colaboradores (2005) demonstraram que a pré-incubação com tin-mesoporfirina (Sn MP), um inibidor competitivo da atividade de HO-1, aumenta a produção de superóxido em macrófagos infectados por *L. pifanoi*. Em contrapartida, os autores demonstraram que a pré-incubação com CoPP inibe a produção de superóxido em macrófagos infectados (PHAM; MOURIZ; KIMA, 2005). Esses achados sugerem que o aumento dos níveis de HO-1 desempenha um papel importante na supressão da produção de superóxido, que tem atividade leishmanicida (TAILLÉ et al., 2004; PHAM; MOURIZ; KIMA, 2005), minimizando os mecanismos de defesa da célula hospedeira contra esse patógeno. Deste modo, é possível que o aumento da expressão de HO-1 em BMM $\Phi$  infectados por *L. amazonensis*, observada no presente estudo, possa favorecer a sobrevivência intracelular deste parasito, pelo aumento na disponibilidade de ferro intracelular e também pela modulação da produção de ROS.

Importante salientar que a confirmação do aumento da expressão e da concentração de CD71 e HO-1, respectivamente, proteínas envolvidas no metabolismo de ferro, correlacionam-se ao achado anterior no qual detectamos, em estudo de proteômica, maior expressão dessas proteínas em BMM $\Phi$  infectados por *L. amazonensis* quando comparados à BMM $\Phi$  infectados por *L. major* (MENEZES, 2010).

Apesar de ter sido observada a modulação da expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro, não foram encontradas diferenças na concentração intracelular desse íon entre células infectadas por *L. amazonensis* as infectadas por *L. major* e as não infectadas. Em contraposição aos nossos achados, BEN-OTHMAN e colaboradores (2014) demonstraram que a infecção por amastigotas de *L. amazonensis* em BMM $\Phi$  de

camundongos C57BL/6 induz acúmulo de ferro, sendo acompanhada de redução da expressão de Fpn-1 e modulação positiva de ferritina. Dessa forma, para melhor elucidar o efeito da infecção por *Leishmania* sobre a concentração intracelular de ferro torna-se necessário avaliar a expressão de outras moléculas que participam do metabolismo de ferro que não só HO-1 e CD71, mas também Nramp-1, DMT-1, ferritina, Fpn-1, hepcidina, IRPs e IREs (RICHARDSON et al., 2010). Como já é descrito na literatura, a expressão das moléculas envolvidas no metabolismo de ferro é controlada pela quantidade desse íon que é requerida pela célula para manter a homeostase. Evidências demonstraram que mecanismos regulatórios, que participam da regulação da homeostase de ferro, são acionados após a depleção do LIP na infecção por *Leishmania*, levando ao aumento da aquisição de ferro em macrófagos infectados (DAS et al., 2009; REYES-LÓPEZ et al., 2012). Adicionalmente, Das e colaboradores (2009) demonstraram ainda que *L. donovani* utiliza o LIP de células hospedeiras como fonte de ferro para sobrevivência intracelular. Além de ser uma fonte nutricional, o sequestro do ferro no LIP levaria ainda à redução da produção de ROS (KAKHLON; CABANTCHIK, 2002). Ainda que a depleção do LIP tenha sido descrita na infecção por *Leishmania*, a quantidade desse elemento presente nos VPs ainda não foi estudada. Para melhor avaliar a concentração intracelular de ferro em macrófagos infectados por *Leishmania*, a coloração de Perls ou azul da Prússia pode ser conduzida para evidenciar o depósito desse íon de forma comparativa em VPs de *L. amazonensis* ou *L. major* utilizando o microscópio eletrônico de transmissão (MEGURO et al., 2005, 2007). Além disso, para melhor entender os mecanismos envolvidos na aquisição de ferro e seu papel na infecção é importante ainda avaliar a expressão de Nramp-1 nos VPs de células infectadas que apresentam perfis distintos de infecção e a expressão da proteína LIT-1 presente na superfície de *Leishmania*, uma vez que esse transportador de ferro foi apontado como essencial para a replicação intracelular do parasito (HUYHN; SACKS; ANDREWS, 2006).

Objetivamos avaliar o papel no curso da infecção utilizando moduladores da concentração de ferro intracelular, quelantes e moléculas que complementam ferro. Para selecionar as moléculas mais relevantes ao estudo, testamos o efeito de algumas dessas moléculas sobre promastigotas axênicas. Diversos trabalhos tem apontado o papel do ferro na proliferação de promastigotas de *Leishmania* (WILSON et al., 1994; SOTERIADOU et al., 1995; MESQUITA-RODRIGUES et al., 2013). No presente estudo, inicialmente, avaliamos o efeito da incubação de diferentes quelantes de ferro sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* em cultura axênica. Demonstramos que a



depleção de ferro, com os agentes quelantes DFO, dipiridil ou fenantrolina, inibiu a proliferação desse parasito, sendo que o ultimo apresentou maior potencial leishmanicida. Corroborando os nossos achados, Soteriadou e colaboradores (1995) também observaram que agentes quelantes de ferro predominante intracelulares são mais eficientes na inibição da proliferação de *Leishmania*, em comparação a DFO. Dajem (2010) demonstrou que DFO inibiu a proliferação de formas amastigotas e promastigotas de *L. major* em cultura axênica. Adicionalmente, o uso do dipiridil causou a redução do número de promastigotas de *L. braziliensis* e, assim como os nossos dados, as concentrações de 50-180  $\mu\text{M}$  resultaram em uma inibição acentuada da proliferação do parasito (MESQUITA-RODRIGUES et al., 2013), embora o  $\text{IC}_{50}$  calculado após 48 h foi quase 4,5 vezes maior que os valores obtidos no presente trabalho com *L. amazonensis*. Fenantrolina e dipiridil são moléculas lipofílicas, sendo a primeira mais lipofílica que a segunda (MERCHJORHANN; STEVERDING, 2006), e a lipofilicidade é um fator importante na determinação da eficiência da quelação de um íon metálico (PORTER et al., 1991). Assim, decidimos utilizar no presente estudo a fenantrolina como agente quelante de ferro. Além do mais, diferentemente da DFO, a fenantrolina quela predominantemente íon ferroso, sendo que é a forma metabolicamente disponível para ser utilizado nas demandas celulares.

Apesar de serem descritos na literatura como agentes quelantes de ferro (SOTERIADOU et al., 1995; MERCHJORHANN; STEVERDING, 2006; MESQUITA-RODRIGUES et al., 2013), as moléculas utilizadas no presente estudo não são agentes quelantes seletivos, uma vez que apresentam também afinidade por outros íons metálicos divalentes, como zinco, cobre, cálcio e magnésio (SANTOS et al., 2012). Dessa forma, o efeito observado dos agentes quelantes sobre a proliferação de *Leishmania* pode não ser exclusivo da depleção de ferro.

Embora muito se saiba sobre a importância do ferro na proliferação de formas promastigotas de *Leishmania*, o papel desse nutriente na infecção ainda vem sendo investigado e sua importância ainda é controversa (BISTI et al., 2000; BISTI et al., 2006, VALE-COSTA et al., 2013). Assim, além dos mecanismos de aquisição do ferro em células infectadas e sua modulação, é importante uma melhor compreensão de como as mudanças na homeostase do ferro na célula hospedeira podem afetar o parasito intracelular e o curso da infecção (BEN-OTHMAN et al., 2014). O uso de abordagens que visam modular a disponibilidade intracelular desse elemento pode ser uma ferramenta bastante útil a fim de avaliar seu papel na sobrevivência desse parasito. Deste modo,

estudos funcionais, utilizando agentes quelantes de ferro e molécula suplementadora desse íon, foram realizados em BMM $\Phi$  infectados por *L. amazonensis* ou *L. major*. Nessa parte do estudo observamos que, em condições de privação do ferro, houve uma redução na infecção por ambas as espécies de *Leishmania*, enquanto que a suplementação desse nutriente favorece a sobrevivência intracelular desses parasitos. Diversos estudos demonstraram que a depleção de ferro, utilizando agentes quelantes, reduz a infecção por *Leishmania*, além de outros patógenos tripanossomatídeos (BORGES et al., 1998; SMITH; MEREMIKDU, 2003; ARANTES et al., 2007; FRANCISCO et al., 2008; DAS et al., 2009; DAJEM, 2010; ARANTES et al., 2011; MALAFAIA et al., 2011). Um estudo realizado com uma nova abordagem para a depleção de ferro demonstrou que camundongos BALB/c, susceptíveis à infecção por *L. major*, tratados com nanopartículas contendo sequência gênica que codifica a Fpn1 (nanopartículas-Fpn1), desenvolveram uma lesão menor em comparação ao grupo não tratado (RAFIEE et al., 2014). Adicionalmente, os autores observaram que o tratamento com nanopartículas-Fpn1 foi capaz de reduzir a carga parasitária nos linfonodos dos animais infectados com *L. major*. A redução no tamanho da lesão e a carga parasitária podem ser explicadas pelo efeito da Fpn1 de limitar o crescimento do parasito através da mudança do conteúdo intracelular de ferro, pela exportação desse metal (RAFIEE et al., 2014). Contrariamente, Murray e colaboradores (1991) demonstraram que o tratamento com diferentes concentrações de DFO antes, durante e após a infecção de macrófagos humanos por *L. donovani*, pré-ativados com IFN- $\gamma$ , não reduziu a taxa de replicação do parasito. Além disso, a taxa de replicação do parasito também não foi alterada em macrófagos pré-ativados com IFN- $\gamma$  e cultivados com HoloTf antes e após o desafio com *Leishmania* (MURRAY et al., 1991). Os autores sugerem que a limitação da disponibilidade de ferro não representa um mecanismo antimicrobiano e que a depleção de ferro parece não estar relacionada à morte de *Leishmania* em células hospedeiras (MURRAY et al., 1991). Ainda assim, Mauël e colaboradores (1991) demonstraram que o excesso de sulfato ferroso inibe a atividade leishmanicida de macrófagos murinos, fazendo com que a morte intracelular do parasito seja evitada. Assim, estudos tem apontado que a suplementação de ferro favorece sobrevivência de *Leishmania* (BORGES et al., 1998; DAS et al., 2009; DE CARVALHO, 2013). Desta forma, o aumento da proliferação de *Leishmania* com a suplementação de ferro e a diminuição da sua viabilidade causada pelo tratamento com quelantes desse íon reforçam a importância da modulação da via de aquisição de ferro da célula do hospedeiro em favor do parasito (DAS et al., 2009).

O ferro tem sido apontado como relevante na patogenicidade de *Leishmania* (HUYNH; ANDREWS, 2008). Entretanto, este elemento não apresenta apenas efeitos benéficos (WEISS, 2002). É descrito na literatura que o aumento da concentração de ferro induz aumento da produção de ROS via reação de Fenton. Assim, este elemento pode participar de mecanismo de morte do parasito, uma vez que ROS são moléculas com potencial leishmanicida. Devido a esse duplo caráter do ferro e seu papel na interação parasito-hospedeiro, a célula hospedeira pode tanto privar o patógeno da aquisição desse nutriente ou aumentar o fornecimento que resultaria em um mecanismo citotóxico (SILVA-GOMES et al., 2013).

Estudos comparativos que avaliem a expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro, assim como seu papel na resposta de macrófagos a diferentes perfis de infecção pode ser de suma importância no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Os resultados apresentados com o nosso modelo de estudo reforçam os achados encontrados como consenso na literatura quanto ao papel do ferro na infecção por *Leishmania*. Adicionalmente, nossos dados indicam que a participação do ferro independe do perfil de infecção por *Leishmania*. Nas últimas décadas, o papel do ferro nas infecções tripanossomatídeos vem sendo elucidado (TAYLOR; KELLY, 2010). Ainda assim, novos estudos são necessários para uma melhor compreensão do papel do ferro em um contexto comparativo, por exemplo, com o uso de diferentes tipos celulares que apresentam perfis distintos a infecção para uma mesma espécie de *Leishmania*. De modo geral, o aumento de absorção de ferro em células infectadas por *Leishmania* favorece a proliferação do parasito e o controle da disponibilidade de ferro pelo hospedeiro pode ser um fator determinante na evolução da doença. Desta forma, a depleção de ferro pode ser um mecanismo factível no controle de infecções causadas por *Leishmania* spp. (SOTERIADOU et al., 1995) e a modulação do metabolismo de ferro pode ser uma boa estratégia no tratamento de doenças causadas por este parasito (MERCHJORHANN; STEVERDING, 2006, TAYLOR; KELLY, 2010; SANTOS et al., 2012).

## 11. CONCLUSÕES

Proteínas envolvidas no aumento da disponibilidade de ferro são diferentemente expressas em BMM $\Phi$  de camundongos da linhagem CBA que apresentam perfis distintos de resposta à infecção por *Leishmania*, sendo moduladas positivamente na infecção por *L. amazonensis* em comparação a *L. major*.

O elemento ferro favorece *in vitro* a infecção por *Leishmania* em BMM $\Phi$  de camundongos da linhagem CBA, independente dos perfis distintos de resposta dessas células à infecção.

## REFERÊNCIAS

AGARWAL, S.; RASTOGI, R.; GUPTA, D.; PATEL, N.; RAJE, M.; MUKHOPADHYAY, A. Clathrin-mediated hemoglobin endocytosis is essential for survival of *Leishmania*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1833, n. 5, p. 1065-1077, mai. 2013.

ALEXANDER, J.; Satoskar, A. R.; RUSSELL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, v. 112, p. 2993-3002, set. 1999.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M.; WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, mai, 2012.

ANTOINE, J. C.; JOUANNE, C.; LANG, T.; PRINA, E.; DE CHASTELLIER, C.; FREHEL, C. Localization of major histocompatibility complex class II molecules in phagolysosomes of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 3, p. 764-775, mar. 1991.

ANTOINE, J. C.; PRINA, E.; LANG, T.; CURRENT, N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 392-401, out. 1998.

ARANTES, J. M.; PEDROSA, M. L.; MARTINS, H. R.; VELOSO, V. M.; DE LANA, M.; BAHIA, M. T.; TAFURI, W. L.; CARNEIRO, C. M. *Trypanosoma cruzi*: Treatment with the iron chelator desferrioxamine reduces parasitemia and mortality in experimentally infected mice. **Experimental Parasitology**, v. 117, n. 1, p. 43-50, set. 2007.

ARANTES, J. M.; FRANCISCO, A. F.; VIEIRA, P. M. de A.; SILVA, M.; ARAÚJO, M. S. S.; DE CARVALHO, A. T.; PEDROSA, M. L.; CARNEIRO, C. M.; TAFURI, W. L.; MARTINS-FILHO, O. A.; ELÓI-SANTOS, S. M. *Trypanosoma cruzi*: Desferrioxamine decrease mortality and parasitemia in infected mice through a trypanostatic effect. **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 4, ago. 2011.

AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune Response to *Leishmania* infection. **India Journal of Medical Research**, v. 119, n. 6, p. 238-258, jun. 2004.

BAILEY, M.S.; LOCKWOOD, D. N. J. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 203-211, 2007.

BARTON, C. H.; WHITEHEAD, S. H.; BLACKWELL, J. M. Nramp transfection transfers lty/Lsh/Bcg-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on oxidative burst and nitric oxide pathways. **Molecular Medicine**, v. 1, n. 3, p. 267-279, mar. 1995.

BELLAMY, R. The natural resistance-associated macrophage protein and susceptibility to intracellular pathogens. **Microbes and Infection**, V. 1, n. 1, p. 23-27, jan. 1999.

BEN-OTHTMAN, R.; FLANNERY, A. R.; MIGUEL, D. C.; WARD, D. M.; KAPLAN, J.; ANDREWS, N. W. *Leishmania*-mediated inhibition of iron export promotes parasite replication in macrophages. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 1, p. jan. 2014.

BISTI, S.; KONIDOU, G.; PAPAGEORGIOU, F.; MILON, G.; BOELAERT, J. R.; SOTERADOU, K. The outcome of *Leishmania major* experimental infection in BALB/c mice can be modulated by exogenously delivered iron. **European Journal of Immunology**, v. 30, n. 12, p. 3732-3740, dez. 2000.

BISTI, S.; KONIDOU, G.; BOELAERT, J.; LEBASTARD, M.; SOTERADOU, K. The prevention of the growth of *Leishmania major* progeny in BALB/c iron-loaded mice: a process coupled to increased oxidative burst, the amplitude and duration of which depend on initial parasite developmental stage and dose. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 6, p. 1464-1472, mai. 2006.

BORGES, V. M.; VANNIER-SANTOS, M. A.; DE SOUZA, W. Subverted transferrin trafficking in *Leishmania*-infected macrophages. **Parasitology Research**, v. 84, n. 10, out. 1998.

BORGES, V. M.; DOS REIS, G. A.; BARCINSKI, M. A. Interação *Leishmania* e células do hospedeiro. In: BARRAL, A.; COSTA, J. M. L. (Org.). ***Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas***. Salvador, 2011. p. 102-112.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. ***Analytical Biochemistry***, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, mai. 1976.

BREUER, W.; SHVARTSMAN, M.; CABANTCHIK, Z. I. Intracellular labile iron. ***The International Journal of Biochemistry & Cell Biology***, v. 40, n. 3, p. 350-354, 2008.

BRITTENHAM, G. M. Development of iron-chelating agents for clinical use. ***The Journal of The American Society of Hematology***, v. 80, n. 3, ago. 1992.

BROCK, J. H. Benefits and dangers of iron during infection. ***Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care***, v. 2, n. 6, p. 507-510, nov. 1999.

BUSCHMAN, E.; SKAMENE, E. From Bcg/Lsh/Ity to Nramp1: three decades of search and research. ***Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals***, v. 29, n. 4, pt. 2, p. 471-473, abr. 2001.

CARVALHO, S.; CRUZ, T.; SANTARÉMA, N.; CASTRO, H.; COSTA, V.; TOMÁS, A. M. Heme as a source of iron to *Leishmania infantum* amastigotes. ***Acta Tropica***, v. 109, n. 2, p. 131-135, fev. 2009.

COLLINS, H. L. Withholding iron as a cellular defence mechanism – friend or foe? ***European Journal of Immunology***, v. 38, n. 7, 1803-1806, jul. 2008.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. ***Clinical Microbiology Reviews***, v. 19, n. 1, jan. 2006.

DAJEM, S. M. B. In vitro evaluation of the efficacy of deferoxamine against *Leishmania major* life cycle stages. ***Journal of King Saud University (Science)***. v. 22, n. 2, p. 67-71, abr. 2010

DAS N. K.; BISWAS S.; SOLANKI S.; MUKHOPADHYAY C. K. *Leishmania donovani* depletes labile iron pool to exploit iron uptake capacity of macrophage for its intracellular growth. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 83-94, jan. 2009.

DE CARVALHO, G. Q. **O papel do heme na infecção de neutrófilos humanos por *Leishmania chagasi***. 2013. 61f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

DE DOMENICO, I.; VAUGHN, M. B.; LI, L.; BAGLEY, D.; MUSCI, G.; WARD, D. M.; KAPLAN, J. Ferroportin-mediated mobilization of ferritin iron precedes ferritin degradation by the proteasome. **The EMBO Journal**, v. 25, n. 22, p. 5396-5404, nov. 2006.

DE DOMENICO, I.; WARD, D. M.; KAPLAN, J. Hepcidin and ferroportin: the new players in iron metabolism. **Seminars in Live Disease**, v. 31, n. 3, p. 272-279, ago. 2011.

DESJARDINS, M; DESCOTEAUX, A. Phagocytosis of *Leishmania* interaction with the host and intracellular trafficking. In. GORDON, S. (Org.). **Advances in Cell and Molecular Biology of Membranes and Organelles**. Ed. JAI Press Inc. 1999. v. 6, p.297-316.

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. **Journal of Immunology**, v. 141, n. 7, p. 2407-2412, out. 1988.

DOHERTY, C. P. Host-Pathogen Interactions: The role of iron. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 5, p. 1341–1344, maio. 2007.

DOMÍNGUEZ, M.; TORAÑO, A. Immune adherence–mediated opsonophagocytosis: The mechanism of *Leishmania* infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 1, p. 25-35, jan. 1999.



EVANS, C. A.; HARBUZ, M. S.; OSTENFELD, T.; NORRISH, A.; BLACKWELL, J. M. Nramp1 is expressed in neurons and is associated with behavioural and immune responses to stress. **Neurogenetics**, v. 3, n. 2, p. 69-78, mar. 2001.

FLANNERY, A. R.; HUYNH, C.; MITTRA, B.; MORTARA, R. A.; ANDREWS, N. W. LFR1 ferric iron reductase of *Leishmania amazonensis* is essential for the generation of infective parasite forms. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 26, p. 23266-23279, jul. 2011.

FLANNERY, A. R.; RENBERG, R. L.; ANDREWS, N. W. Pathways of iron acquisition and utilization in *Leishmania*. **Current Opinion of Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 716-721, dez. 2013

FOOTE, S. J.; HANDMAN, E. Genetics of murine leishmaniasis. **Briefing in Functional Genomics & Proteomics**, v. 4, n. 3, p. 270-276, nov. 2005.

FORBES, J. R.; GROS, P. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host–pathogen interactions. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 397-403, ago. 2001.

FORESTIER, C. L.; MACHU, C.; LOUSSERT, C. PESCHER, P.; SPÄTH G. F. Imaging host cell-*Leishmania* interaction dynamics implicates parasite motility, lysosome recruitment, and host cell wounding in the infection process. **Cell Host & Microbe**, v. 9, n. 4, p.319-330, abr. 2011.

FRANCISCO, A. F.; VIEIRA, P. M. de A.; ARANTES, J. M.; PEDROSA, M. L.; MARTINS, H. R.; SILVA, M.; VELOSO, V. M.; DE LANA, M.; BAHIA, M. T.; TAFURI, W. L.; CARNEIRO, C. M. Trypanosoma cruzi: effect of benznidazole therapy combined with the iron chelator desferrioxamine in infected mice. **Experimental Parasitology**, v. 120, n. 4, dez. 2008.

GANZ, T. Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. **Blood**, v. 102, n. 3, p. 783-788, ago. 2003.

GANZ, T. Cellular iron: ferroportin is the only way out. **Cell Metabolism**, v. 1, n. 3, p. 155-157, mar. 2005.

GANZ, T. Iron in innate immunity: starve the invaders. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 1, p. 63-67, fev. 2009.

GOLENSER, J.; DOMB, A.; TEOMIM, D.; TSAFACK, A.; NISIM, O.; PONKA, P.; ELING, W.; CABANTCHIK, Z. I. The treatment of animal models of malaria with iron chelators by use of a novel polymeric device for slow drug release. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 281, n. 3, jun. 1997.

GOMES, I. N.; CALABRICH, A. F.; TAVARES, R. da S.; WIETZERBIN, J.; DE FREITAS, L. A.; VERAS, P. S. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 4, p. 251-260, abr. 2003.

GRIMALDI JUNIOR, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, Rio de Janeiro, v. 6, n. 3, p. 230–250, jul. 1993.

GROTTO, H. Z. W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 5, p. 390-397, set-out. 2008.

GRUENHEID, S.; PINNER, E.; DESJARDINS M.; GROS, P. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: The *Nramp1* protein is recruited to the membrane of the phagosome. **The journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 4, p. 717-730, fev. 1997.

GUPTA, S.; NISHI. Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 133. n. 1, p. 27-39, jan. 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation An update. **FEBS Letters**, v.307, n. 1, jul. 1992.

HAMZA, I.; DAILEY, H. A. One ring to rule them all: Trafficking of heme and heme synthesis intermediates in the metazoans. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1823, n. 9, set. 2012.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 229-243, abr. 2001.

HENTZE, M. W.; MUCKENTHALER, M. U.; ANDREWS, N. C. Balancing acts: molecular control of review mammalian iron metabolism. **Cell**, v. 117, n. 3, p. 285-297, abr. 2004.

HUYNH, C.; SACKS, D. L.; ANDREWS, N. W. A *Leishmania amazonensis* ZIP family iron transporter is essential for parasite replication within macrophage phagolysosomes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 10, p. 2363-2375, out. 2006.

HUYNH, C.; ANDREWS, N. W. Iron acquisition within host cells and the pathogenicity of *Leishmania*. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 293-300, fev. 2008.

HUYNH, C.; YUAN, X.; MIGUEL, D. C.; RENBERG, R. L.; ROTCHENKO, O.; PHILPOTT, C. C.; HAMZA, I.; ANDREWS, N. W. Heme uptake by *Leishmania amazonensis* is mediated by the transmembrane protein LHR1. **PloS Pathogens**, v. 8, n. 7, 2012.

JABADO, N.; LAM-YUK-TSEUNG, S.; FORBES, J. R.; GROS, P. Mouse Natural resistance associated macrophage protein 1 (Nramp1): a key player in host innate immunity against infections. In: BARITAUD, M.; GROSS, P. (ed.). **The Nramp Family**. Série Molecular Biology Intelligence Unit. Estados Unidos: Landes Bioscience, Eureka.com, Kluwer Academic, Plenum Publishers, 2004. p. 1-15.

JACQUES, I.; ANDREWS, N. W.; HUYNH, C. Functional characterization of LIT1, the *Leishmania amazonensis* ferrous iron transporter. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 170, n. 1, p. 28-36, mar. 2010.

JOHNSON, E. E.; WESSLING-RESNICK, M. Iron metabolism and the innate immune response to infection. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 3 p. 207-216, Mar. 2012.

KAKHLON, O.; CABANTCHIK, Z. I. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 8, p. 1037-1046, out. 2002.

KRISHNAMURTHY, G.; VIKRAM, R.; SINGH, S. B.; PATEL, N.; AGARWAL, S.; MUKHOPADHYAY, G.; BASU, S. K.; MUKHOPADHYAY, A. Hemoglobin receptor in *Leishmania* is a hexokinase located in the flagellar pocket. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 7, p. 5884–5891, fev. 2005.

LANG, T.; DE CHASTELLIER, C.; FREHEL, C.; HELLIO, R.; METEZEAU, P.; LEO, S. S.; ANTOINE, J. C. Distribution of MHC class I and of MHC class II molecules in macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **Journal of Cell Science**, v. 107, p. 69-82, jan. 1994.

LAPHAM, A. S.; PHILLIPS, E. S.; BARTON, C. H. Transcriptional control of Nramp1: a paradigm for the repressive action of c-Myc. **Biochemical Society Transactions**, v. 32, n. 6, p. 1084-1086, dez. 2004.

LARSEN, R.; GOUVEIA, Z.; SOARES, M. P.; GOZZELINO, R. Heme cytotoxicity and the pathogenesis of immune-mediated inflammatory diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3, n. 77, p.1-17, mai. 2012.

LEMOS DE SOUZA, V.; SOUZA, J. A.; SILVA, T. M. C.; VERAS, P. S. T.; RODRIGUES DE-FREITAS, L. A. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. **Microbes and Infection**, Salvador, v. 2, n. 15, p.1807–1815, dez. 2000.

LIU, X.; THEIL, E. C. Ferritins: dynamic management of biological iron and oxygen chemistry. **Accounts of Chemicals Research**, v. 38, n. 3, p 167–175, mar. 2005.

LIU, DONG; 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**, v. 12, n. 83, jun. 2012.

LUDWICZEK, S.; AIGNER, E.; THEURL, I.; WEISS, G. Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. **Blood**, v. 101, n. 10, p. 4148-4154, mai. 2003.

LUZ, N. F.; ANDRADE, B. B.; FEIJÓ, D. F.; ARAÚJO-SANTOS, T.; CARVALHO, G. Q.; ANDRADE, D.; ABÁNADES, D. R.; MELO, E. V.; SILVA, A. M.; BRODSKYN, C. I.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; SOARES, R. P.; ALMEIDA, R. P.; BOZZA, M. T.; BORGES, V. M. Heme oxygenase-1 promotes the persistence of *Leishmania chagasi* infection. **Journal of Immunology**, v. 188, n. 9, p. 4460-4467, mai. 2012.

MALAFAIA, G.; MARCON, L. DE N.; PEREIRA, L. DE F.; PEDROSA, M. L.; REZENDE, S. A. *Leishmania chagasi*: Effect of the iron deficiency on the infection in BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 3, p. 719-723, mar. 2011.

MAUËL, J.; RANSIJN, A.; BUCHMÜLLER-ROUILLER, Y. Killing of *Leishmania* parasites in activated murine macrophages is based on an L-arginine-dependent process that produces nitrogen derivatives. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 49, n. 1, p. 73-82, jan. 1991.

MCCOUBREY Jr, W. K.; HUANG, T. J.; MAINES, M. D. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. **European Journal of Biochemistry/FEBS**, v. 247, n. 2, p. 725-732, jul. 1997.

MEGURO, R.; ASANO, Y.; ODAGIRI, S.; LI, C.; IWATSUKI, H.; SHOUMURA, K. The presence of ferric and ferrous iron in the nonheme iron store of resident macrophages in different tissues and organs: histochemical demonstrations by the perfusion-Perls and -Turnbull methods in the rat. **Archives of Histology and Cytology**, v. 68, n. 3, p. 171-183, set. 2005.

MEGURO, R.; ASANO, Y.; ODAGIRI, S.; LI, C.; IWATSUKI, H.; SHOUMURA, K. Nonheme-iron histochemistry for light and electron microscopy: a historical, theoretical and technical review. **Archives of Histology and Cytology**, v. 70, n. 1, p. 1-19, abr. 2007.

MENEZES, J. P. B. **Abordagem proteômica para identificação de moléculas envolvidas no controle ou estabelecimento da leishmaniose cutânea**. 2010. 178 f.

Tese (Doutorado em Patologia Humana) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2010.

MENEZES, J. P. B.; ALMEIDA, T. F.; PETERSEN, A. L. O. A.; GUEDES, C. E. S.; MOTA, M. S. V.; LIMA, J. G. B.; PALMA, L. C.; BUCK, G. A.; KRIEGER, M. A.; PROBST, C. M.; VERAS, P. S. T. Proteomic analysis reveals differentially expressed proteins in macrophages infected with *Leishmania amazonensis* or *Leishmania major*. **Microbes and infection**, v. 15, n. 8-9, p. 579-591, jul-ago. 2013.

MERSCHJOHANN, K.; STEVERDING, D. In vitro growth inhibition of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma congolense* by iron chelators. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 5, n. 3, ago, 2006.

MONTALBETTI, N.; SIMONIN, A.; KOVACS, G.; HEDIGER, M. A. Mammalian iron transporters: families SLC11 and SLC40. **Molecular Aspects of Medicin**, v. 34, n. 2-3, p. 270–287, abr-jun. 2013.

MOSSER, D. M.; ROSENTHAL, L. A. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. **Seminars in Cell Biology**, v. 4, n. 5, p. 315-322, out. 1993.

MOSSER, D. M.; BRITTINGHAM, A. *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. In: DOENHOFF, L. M.; CHAPPELL, J. H. (Org.). **Parasitology: Survival of parasites, microbes and tumors: strategies for evasion, manipulation and exploitation of the immune response**. Ed. Cambridge University Press, 1997. v. 115, S9-S23.

MOSSER, D. M.; MILES, S. A. Avoidance of innate immune mechanisms by the protozoan parasite, *Leishmania* spp. In: Denkers E. Y.; Gazzinelli, R. T. (Ed.) **Protozoans in Macrophages**. Austin: Landes Bioscience, 2007, p.118-129.

MURRAY, H. W.; GRANGER, A.M.; TEITELBAUM, R. F. Gamma interferon-activated human macrophages and *Toxoplasma gondii*, *Chlamydia psittaci*, and *Leishmania*

*donovani*: antimicrobial role of limiting intracellular iron. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 12, p. 4684-4686, dez. 1991.

NAIRZ, M.; SCHROLL, A.; SONNWEBER, T.; WEISS, G. The struggle for iron – a metal at the host–pathogen interface. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 12, p. 1691-1702, dez. 2010.

NEMETH, E.; TUTTLE, M. S.; POWELSON, J.; VAUGHN, M. B.; DONOVAN, A.; WARD, D. M.; GANZ, T.; KAPLAN, J. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. **Science**, v. 306, n. 5704, p. 2090-2093, dez. 2004.

OPPENHEIMER, S.J.; GIBSON, F. D.; MACFARLANE, S. B.; MOODY, J. B.; HARRISON, C.; SPENCER, A.; BUNARI, O. Iron supplementation increases prevalence and effects of malaria: report on clinical studies in Papua New Guinea. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 4, 1986.

PETERS, N. C., EGEN, J. C., SECUNDINO N. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970–974, dgo. 2008.

PHAM, N. K.; MOURIZ, J.; KIMA, P. E. *Leishmania pifanoi* amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation. **Infection and Immunity**, v. 73, n.12, p. 8322-8333, dez. 2005.

POLATI, R.; CASTAGNA, A; BOSSI, A. M.; ALBERIO, T.; DE DOMENICO, I.; KAPLAN, J.; TIMPERIO, A. M.; ZOLLA, L.; GEVI, F.; D'ALESSANDRO, A.; BRUNCH, R.; OLIVIERI, O.; GIRELLI, D. Murine macrophages response to iron 2012. **Journal of Proteomics**, v. 76, p. 10-27, dez. 2012.

RABHI, I.; RABHI, S.; BEN-OTHMAN, R.; ANIBA, M. R.; TRENTIN, B.; PIQUEMAL, D.; REGNAULT, B.; GUIZANI-TABBANE, L. Comparative analysis of resistant and susceptible macrophage gene expression response to *Leishmania major* parasite. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, out. 2013.

RAFIEE, A.; RIAZI-RAD, F.; DARABI, H.; KHAZE, V.; JAVADIAN, S.; AJDARY, S.; BAHRAMI, F.; ALIMOHAMMADIAN, M. H. Ferroportin-encapsulated nanoparticles reduce infection and improve immunity in mice infected with *Leishmania major*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 466, n. 1-2, p. 375-381, mai. 2014.

REAL, F. MORTARA, R. A. The diverse and dynamic nature of *Leishmania* parasitophorous vacuoles studied by multidimensional imaging. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, e1518, fev. 2012.

REYES-LÓPEZ, M.; SERRANO-LUNA, J.; PIÑA-VÁZQUEZ, C.; DE LA GARZA, M. Transferrin binding proteins as a means to obtain iron in parasitic protozoa. In: ABDELMOHSEN, K. (ed.). **Binding Protein**. InTech, 2012. p. 1-34.

REYES-LÓPEZ, M.; PIÑA-VÁZQUEZ, C.; SERRANO-LUNA, J. Transferrin: endocytosis and cell signaling in parasitic protozoa. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

RICHARDSON, D. R.; LANE, D. J. R.; BECKER, E. M.; HUANG, M. L.; WHITNALL, M.; RAHMANTO, Y. S.; SHEFTEL, A. D.; PONKA, P. Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, v. 107, n. 24, p. 10775-10782, jun. 2010.

RIEMER, J.; HOEPKEN, H. H.; CZERWINSKA, H.; ROBINSON, S. R.; DRINGEN, R. Colorimetric ferrozine -based assay for the quantitation of iron in cultured cells. **Analytical Biochemistry**, v. 331, n. 2, p. 370-375, ago. 2004.

RUSSELL, D. G.; XU, S.; CHAKRABORTY, P. Intracellular trafficking and the parasitophorous vacuole of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. **Journal of Cell Science**, v. 103, p. 1193-1210, dez. 1992.

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



SANTOS, A. L. S. et al. Antimicrobial action of chelating agents: repercussions on the microorganism development, virulence and pathogenesis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 17, p. 2715-2737, 2012.

SCHAIBLE, U. E.; KAUFMANN, S. H. E. Iron and microbial infection. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 2, n. 12, p. 946-953, dez. 2004.

SECUNDINO, N. G.C.; DE FREITRAS, V. C.; PIMENTA, P. F. P. A biologia da interação dos flebotomíneos com a *Leishmania*. In: BARRAL, A.; COSTA, J. M. L. (org.). **Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas**. Salvador, 2011. p. 90-101.

SENGPUTA, S.; TRIPATHI, J.; TANDON, R.; RAJE, M.; ROY, R. P.; BASU, S. K.; MUKHOPADHYAY, A. Hemoglobin endocytosis in *Leishmania* is mediated through a 46 kDa protein located in the flagellar pocket. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 5, p. 2758–2765, jan. 1999.

SHAN, Y.; PEPE, J.; LU, T. H.; ELBIRT, K. K.; LAMBRECHT, R. W.; BONKOVSKY, H. L. Induction of the heme oxygenase-1 gene by metalloporphyrins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 380, n. 2, p. 219-227, ago, 2000.

SILVA-GOMES, S.; VALE-COSTA, S.; APPELBERG, R.; GOMES, M. Iron in intracellular infection: to provide or to deprive? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. 96, dez. 2013.

SINGH, B.; ARORA, S.; AGRAWAL, P.; GUPTA, S. K. Hepcidin: a novel peptide hormone regulating iron metabolism. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 11-12, p. 823-830, mai. 2011.

SMITH, H. J.; MEREMIKWU, M. M. Iron-chelating agents for treating malaria. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2, 2003

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, abr-jun. 2004.

SOTERIADOU, K.; PAPAVALASSILIOU, P.; VOYIATZAKI, C.; BOELAERT, J. Effect of iron chelation on the in-vitro growth of *Leishmania* promastigotes. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 35, n. 1, p. 23-29, jan. 1995.

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

STEERE, A. N.; BYRNE, S. L.; CHASTEEN, N. D.; MASON, A. B. Kinetics of iron release from transferrin bound to the transferrinreceptor at endosomal pH. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1820. n. 3, p. 326-333, mar. 2012.

TAILLE, C.; EL-BENNA, J.; LANONE, S.; DANG, M. C.; OGIER-DENIS, E.; AUBIER, M.; BOCZKOWSKI, J. Induction of heme oxygenase-1 Inhibits NAD(P)H oxidase activity by down-regulating cytochrome b558 expression via the reduction of heme availability. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 27, p. 28681- 28688, jul. 2004.

TANDARA, L.; SALAMUNIC, I. Iron metabolism: current facts and future directions. **Biochemia Medica**, v. 22, n. 3, p. 311-328, 2012

TAYLOR, M. C.; KELLY, J. M. Iron metabolism in trypanosomatids, and its crucial role in infection. **Parasitology**, v. 137, n. 6, mai. 2010.

TEIXEIRA, D. E.et al. **Atlás didático**: Ciclo de vida da *Leishmania*. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, 2013. 64 p.

THEURL, I.; FRITSCH, G.; LUDWICZEK, S.; GARIMORTH, K.; BELLMANN-WEILER, R.; WEISS, G. The macrophage: A cellular factory at the interphase between iron and immunity for the control of infections. **Biometals**, v. 18, n. 4, p. 359-367, ago. 2005.

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

VALE-COSTA, S.; GOMES-PEREIRA, S.; TEIXEIRA, C. M.; ROSA, G.; RODRIGUES, P. N.; TOMÁS, A.; APPELBERG, R.; GOMES, M. S. Iron Overload Favors the Elimination of *Leishmania infantum* from Mouse Tissues through Interaction with Reactive Oxygen and Nitrogen Species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 2, fev. 2013.

VOYIATZAKI, C. S.; SOTERIADOU, K. P. Evidence of transferrin binding sites on the surface of *Leishmania* promastigotes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 36, p. 22380-22385, dez. 1990.

VOYIATZAKI, C. S.; SOTERIADOU, K. P. Identification and isolation of the *Leishmania* transferrin receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 13, p. 9112-9117, mai. 1992.

WAGENER, F. A.; VOLK, H. D.; WILLIS, D.; ABRAHAM, N. G.; SOARES, M. P.; ADEMA, G. J.; FIGDOR, C. G. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 3, p. 551-571, set. 2003.

WANG, J.; PANTOPOULOS, K. Regulation of cellular iron metabolism. **The Biochemical Journal**, v. 434, n. 3, p. 365-381, mar. 2011.

WANG, C.; YU, X.; CAO, Q.; YANG, Y.; ZHENG, G.; TAN, T. K.; ZHAO, H.; ZHAO, Y.; WANG, Y.; HARRIS, D. C. Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. **BMC Immunology**, v. 13, n. 6, fev. 2013.

WEINBERG, E. D. Iron and infection. **Microbiological Reviews**, v. 42, n. 1, p. 45-66, mar. 1978.

WEINBERG, E. D. Iron availability and infection. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, n. 7, p. 600-605, jul. 2009.

WEISS, G. Iron and immunity: a double-edged sword. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 32, n. 1, p. 70-78, mar. 2002.

WILSON, M. E.; VORHIES, R. W.; ANDERSEN, K. A.; BROTHIGAN, B. E. Acquisition of iron from transferrin and lactoferrin by the protozoan *Leishmania chagasi*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 8, p. 3262–3269, ago. 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Control of the leishmaniasis**: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. **WHO Technical Report Series**, n. 949, p.1-186, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços. Disponível em: < <http://www.who.int/leishmaniasis/en/index.html> >. Acesso em: 29 dez. 2013.

**APÊNDICE**  
**ESBOÇO ARTIGO CIENTÍFICO**

## PAPEL DO FERRO NA INFECÇÃO POR *Leishmania*

Camila Victória Sousa Oliveira<sup>1</sup>; Amanda Lopes Lorentz<sup>1,2</sup>; Leila Andrade Bastos<sup>1,3</sup>; Carlos Eduardo Sampaio Guedes<sup>1,3</sup>; Valéria de Matos Borges<sup>1</sup>; Juliana Perrone Bezerra de Meneses Fullam<sup>1</sup>; Patrícia Sampaio Tavares Veras<sup>1\*</sup> pveras@bahia.fiocruz.br

<sup>1</sup> Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM) / Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

<sup>2</sup> Universidade do Estado da Bahia / <sup>3</sup> Universidade Federal da Bahia

**Resumo:** A leishmaniose é uma antroponose causada por protozoários do gênero *Leishmania* e é considerada uma das principais doenças negligenciadas. Modelos experimentais são amplamente utilizados para uma melhor compreensão da doença e dos mecanismos relacionados à resistência e susceptibilidade à infecção. Macrófagos de camundongos CBA controlam a infecção por *Leishmania major* ao passo que são permissivos a *Leishmania amazonensis*. Além disso, estudos baseados em abordagem proteômica demonstraram padrões distintos de expressão proteica em macrófagos derivados de medula óssea (BMMΦ) infectados por essas espécies de *Leishmania*. Dentre as proteínas diferentemente expressas, foram identificadas proteínas envolvidas no metabolismo de ferro moduladas positivamente em macrófagos infectados por *L. amazonensis*. Adicionalmente, embora ainda existam controvérsias, diversos estudos têm abordado a participação do elemento ferro na interação parasito-hospedeiro e no estabelecimento das infecções por tripanossomatídeos, incluindo *Leishmania*. Assim, para melhor compreender os mecanismos envolvidos nessa doença, o presente estudo buscou explorar o modelo comparativo de resistência e susceptibilidade do camundongo CBA para determinar o papel do ferro na infecção por *Leishmania*. Nossa hipótese é que a expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro é modulada diferentemente em macrófagos de camundongos CBA infectados por *L. amazonensis*, em comparação à *L. major*, favorecendo a sobrevivência intracelular do parasito. Nosso objetivo foi avaliar a expressão de proteínas que participam do metabolismo de ferro, como receptor de transferrina (Tf), CD71, e heme oxigenase-1, HO-1, e determinar o efeito da modulação da disponibilidade de ferro na infecção por *Leishmania*. Observamos maior expressão de HO-1 em BMMΦ infectados por *L. amazonensis* (18,34 ± SD ng/mL), quando comparados a BMMΦ infectados por *L. major* (7,07 ± SD ng/mL), utilizando ELISA. Maior expressão de CD71 também foi observada na infecção por *L. amazonensis* (MFI 2.103) em comparação à infecção por *L. major* (MFI 472), utilizando FACS, além de uma maior ligação e captação de HoloTf (Tf carregada com ferro). Embora tenha sido observado que essas proteínas encontram-se diferentemente expressas em BMMΦ infectados por essas duas espécies de *Leishmania*, não foram observadas diferenças significativas na concentração intracelular do ferro. Em seguida, ensaios funcionais a partir da modulação da disponibilidade intracelular de ferro foram realizados com o objetivo de avaliar seu papel no desfecho da infecção por *Leishmania*. Os resultados mostraram que a depleção de ferro reduz em 90% o percentual de BMMΦ infectados por *L. amazonensis* e 70% dos infectados por *L. major*. Adicionalmente, a suplementação de ferro aumenta o percentual de BMMΦ infectados por *L. amazonensis*, de 69,64 para 82,79%, e a carga parasitária, de 2,996 para 4,001 parasitos/célula, assim como a viabilidade intracelular de *L. amazonensis* e *L. major*. Em conjunto, os dados obtidos nesse estudo indicam que, apesar de *L. amazonensis* modular positivamente a expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro, esse metal apresenta um papel importante na infecção pelas duas espécies de *Leishmania*, favorecendo a sobrevivência intracelular desse parasito.

### INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma antroponose causada por protozoários do gênero *Leishmania* e é considerada uma das principais doenças negligenciadas, sendo endêmica em 98

países ou territórios e com prevalência mundial de 12 milhões de pessoas infectadas (ALVAR et al., 2012). Estima-se que 350 milhões de pessoas encontram-se sob o risco de contrair a

doença. A cada ano, aproximadamente 2 milhões de novos casos são notificados, em sua maioria, em países pobres ou em desenvolvimento (WHO, 2010). Apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, as quais estão associadas às interações multifatoriais que dependem do vetor, espécie e virulência do parasito, resposta imune do hospedeiro e ambiente (GRIMALDI JR.; TESH, 1993).

Modelos experimentais da leishmaniose são utilizados para uma melhor compreensão da doença (HANDMAN, 2001; GUPTA; NISHI, 2011). O modelo em camundongos vem sendo utilizado para estudar diversos aspectos da doença relacionados à resistência e susceptibilidade à infecção, como a interação parasito-hospedeiro, resposta imunológica e fatores que determinam o curso da infecção (HANDMAN, 2001; FOOTE; HANDMAN, 2005; GUPTA; NISHI, 2011).

No hospedeiro vertebrado, os macrófagos são as principais células fagocíticas na infecção por *Leishmania*. Dados prévios do nosso laboratório demonstraram que macrófagos de camundongos da linhagem CBA infectados por *L. amazonensis* apresentam respostas distintas à infecção quando comparados aos macrófagos infectados por *L. major*, indicando que a

natureza do parasito e sua interação com a célula hospedeira podem determinar a polarização da resposta imune (GOMES et al., 2003). Assim, macrófagos de camundongos da linhagem CBA controlam a infecção por *L. major*, enquanto são permissivos à infecção por *L. amazonensis*. Além disso, foi demonstrado que macrófagos derivados de medula óssea (BMM $\Phi$ ) e macrófagos peritoneais apresentam um perfil de expressão proteica distinto em resposta à infecção por *L. amazonensis*, em comparação à *L. major* (MENEZES, 2010; MENEZES et al., 2013). Dentre as proteínas identificadas como diferentemente expressas em BMM $\Phi$  infectados por essas duas espécies de *Leishmania*, foi observada a expressão aumentada de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro em BMM $\Phi$  infectados por *L. amazonensis*, quando comparada à infecção por *L. major* (MENEZES, 2010).

O fornecimento de ferro é essencial para sobrevivência de diversos organismos e o desenvolvimento de estratégias para a aquisição desse metal é necessário tanto para células de mamíferos, quanto para patógenos, principalmente sob condições limitadas deste nutriente (THEURL et al., 2005). Esse metal é fundamental na interação patógeno-hospedeiro (DOHERTY, 2007) e

sua aquisição pelas células hospedeiras é importante para a sobrevivência intracelular de microrganismos (SCHAIBLE; KAUFMANN, 2004).

Existem evidências que o ferro presente nas células hospedeiras tem papel central na infecção por *Leishmania* (TAYLOR; KELLY, 2010; REYES-LÓPEZ et al., 2012). Alguns estudos têm abordado a modulação de proteínas envolvidas em atividades como transporte, armazenamento e metabolismo de ferro na célula infectada por *Leishmania* (DAS et al., 2009; LUZ et al., 2012; BEN-OTHTMAN et al., 2014). Entretanto, ainda é necessária uma melhor compreensão de como a infecção por *Leishmania* modula a expressão dessas proteínas em diferentes perfis de infecção. Adicionalmente, os efeitos da infecção por este patógeno sobre a disponibilidade de ferro em células hospedeiras ainda precisam ser melhor elucidados (DAS et al., 2009). Assim, utilizamos, no presente estudo, o modelo dicotômico de infecção por *L. amazonensis* ou *L. major* em camundongos CBA visando entender melhor o metabolismo de ferro na infecção por *Leishmania* e o papel deste nutriente na sobrevivência intracelular desse parasito. Nossa hipótese é que a expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro é modulada

diferentemente em macrófagos de camundongos CBA infectados por essas duas espécies de *Leishmania*, favorecendo a sobrevivência intracelular do parasito. Assim, proteínas que participam do aumento da disponibilidade de ferro à célula, como CD71 e HO-1, estariam moduladas positivamente em células susceptíveis a infecção por *L. amazonensis*, levando a uma maior entrega desse nutriente aos parasitos em comparação a infecção por *L. major*. Desta forma, o presente trabalho buscou avaliar o metabolismo de ferro e o seu papel na infecção por *Leishmania*, utilizando modelo comparativo de BMM $\Phi$  de camundongos da linhagem CBA que controlam a infecção por *L. major* ao passo que são permissivos a infecção por *L. amazonensis*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Cultivo de células

Células precursoras de macrófagos, presentes na medula óssea, foram obtidas a partir da lavagem da cavidade óssea do fêmur e da tíbia de camundongos da linhagem CBA com meio RPMI completo [meio *Roswell Park Memorial Institute* 1640 suplementado com 25 mM de HEPES (Sigma), 2 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma), 20% de



SBF inativado (Gibco), 200 mM glutamina (Sigma) e 10 µg/mL de ciprofloxacina (Isofarma)] e centrifugadas a 300 x g por 5 min à 4°C. Em seguida, as células precursoras foram incubadas com um tampão de lise de eritrócitos (Gey's *Balanced Salt Solution*, Sigma) por 10 min em gelo e centrifugadas (2x) com RPMI completo, nas mesmas condições anteriores. Após a centrifugação, células foram mantidas em placas de Petri 90x15 mm com meio RPMI completo em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 18-24 h. Macrófagos residentes da medula foram eliminados por adesão à placa de Petri e as células precursoras de macrófagos, presentes no sobrenadante da cultura foram coletadas. O sobrenadante foi centrifugado e o sedimento ressuspensão em meio RPMI completo contendo 30% de sobrenadante de célula L929 (RMPI/SBN L929) (MENEZES, 2010). As células foram cultivadas em placas de Petri por 3 a 4 dias, quando as culturas celulares foram suplementadas com meio RMPI/SBN L929. Após sete dias, os BMMΦ aderidos foram recuperados por lavagem da placa de cultura com solução de PBS contendo 1 mM de EDTA, centrifugados 300 x g por 10 min à 4°C e ressuspensos em meio DMEM completo e contados em câmara de Neubauer para realização dos experimentos.

Macrófagos peritoneais pró-inflamatórios foram obtidos através de lavagens da cavidade peritoneal com 10 mL de solução de heparina sódica (Blausiegel) na concentração de 20 UI/mL em salina gelada após quatro dias de realizada a indução de ascite na cavidade intraperitoneal de camundongos CBA pela injeção de 2,5 mL de tioglicolato de sódio a 3% (Sigma), maturado por pelo menos 30 dias (GOMES et al., 2003). Em seguida, as células foram centrifugadas a 300 x g, por 10 min a 4°C e o sedimento ressuspensão em meio DMEM completo. A quantificação do número de células foi obtida pela contagem em câmara de Neubauer para posterior realização dos experimentos.

### **CULTURA DE *Leishmania***

Culturas axênicas de promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/Br88/Ba-125) e *L. major* (MHOM/RI/-WR-173) foram cultivadas em 5mL de meio Schneider completo [*Schneider's Insect Medium* (Sigma) contendo 10% de SBF inativado (Gibco) e antibiótico gentamicina (Sigma) na concentração de 50µg/mL] em garrafa de cultura de 25 cm<sup>2</sup> em estufa B.O.D. a 24°C. Após a cultura atingir a fase estacionária de crescimento, em torno de 10<sup>8</sup> parasitos/mL, os parasitos foram utilizados para realização dos experimentos ou foram submetidas à

purificação de formas metacíclicas infectivas utilizando gradiente de Ficoll-Paque como descrito por Spath & Berveley (2001).

### **DETERMINAÇÃO DE HO-1**

A quantidade de HO-1 foi avaliada em lisados de BMM $\Phi$  infectados por *Leishmania* utilizando o ELISA anti-HO-1, seguindo as instruções do fabricante (Takara).

### **EXPRESSÃO DE CD71**

Ensaio baseado em técnicas de imunomarcagem por citometria de fluxo (FACS) foram realizados em BMM $\Phi$  infectados por *Leishmania*. Após os tempos de infecção, as células foram fixadas e permeabilizadas (Kit Perm/Wash, BD Pharmingen™) e imunomarcadas com o anticorpo anti-CD71 (Purified Rat Anti-Mouse CD71, BD Pharmingen™) na concentração de 30  $\mu$ g/mL e o grupo controle negativo foi incubado com IgG1 de rato (Serotec) na mesma concentração. O anticorpo anti-rato produzido em coelho (Alexa flúor 568, Molecular Probes) foi utilizado como anticorpo-secundário.

### **LIGAÇÃO E CAPTAÇÃO DE HoloTf**

Macrófagos peritoneais ou BMM $\Phi$  infectados por *Leishmania* foram incubados com 300 nM de HoloTf

conjugada à Texas Red (HoloTf-Texas Red) (Ref. T2875, 5 mg, Molecular Probes), a 4°C por 30 min, em meio DMEM ou RPMI completo sem SBF, ou re-incubados por adicionais 40 min, a 35°C, para os ensaios de ligação e captação de HoloTf, respectivamente. Após os períodos de incubação, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% e avaliadas em microscopia de fluorescência.

### **CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE FERRO**

A quantificação intracelular de ferro foi realizado em BMM $\Phi$  infectados por *Leishmania* pelo ensaio colorimétrico baseado em ferrozina (RIEMER et al., 2004).

### **MODULAÇÃO DA DISPONIBILIDADE DE FERRO SOBRE A INFECÇÃO POR *Leishmania***

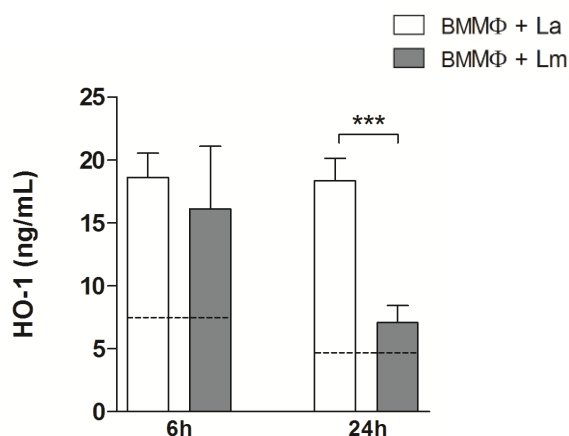
Para estudar os efeitos da modulação da disponibilidade de ferro na infecção por *Leishmania*, BMM $\Phi$  infectados por *Leishmania* após 48 h foram incubados com as moléculas quelantes de ferro, Deferroxamina (Mesilato de Desferroxamina, DFO, C<sub>25</sub>H<sub>48</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>.CH<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S, Sigma-Aldrich, D9533), 2,2'-dipiridil (C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich, D216305) e 1,10-fenantrolina (C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich, 131377), e a

molécula suplementadora de íon ferroso, sulfato ferroso heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Sigma-Aldrich, F-7002). Parâmetros como percentual de células infectadas, carga parasitária e viabilidade de *Leishmania* intracelular foram avaliados.

## RESULTADOS

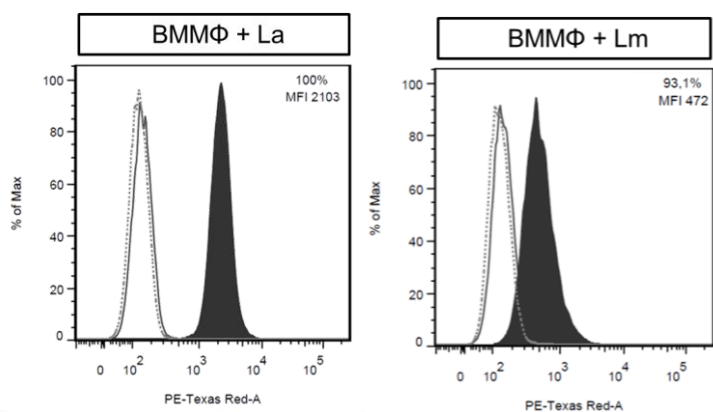
### PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DE FERRO SÃO DIFERENTEMENTE EXPRESSAS EM BMMΦ QUE APRESENTAM PERFIS DISTINTOS A INFECÇÃO POR *Leishmania*

A concentração de HO-1 em BMMΦ infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* foi avaliada por ELISA. No tempo inicial da infecção (6 h), a expressão média de HO-1 em BMMΦ infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* foi similar, respectivamente, 18,62 e 16,12 ng/mL. Esses resultados sugerem que a infecção por *Leishmania* modula positivamente a expressão de HO-1 no tempo inicial da infecção. No entanto, 24 h após a infecção observamos que o aumento na concentração de HO-1 é mantida apenas em BMMΦ infectados por *L. amazonensis* (18,34 ng/mL), enquanto houve uma redução da concentração da enzima nas células infectadas por *L. major* (7,07 ng/mL) (Figura 1).



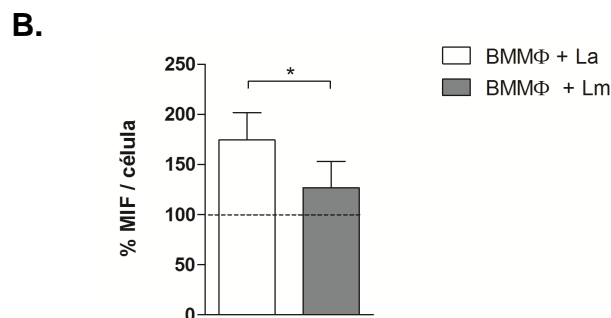
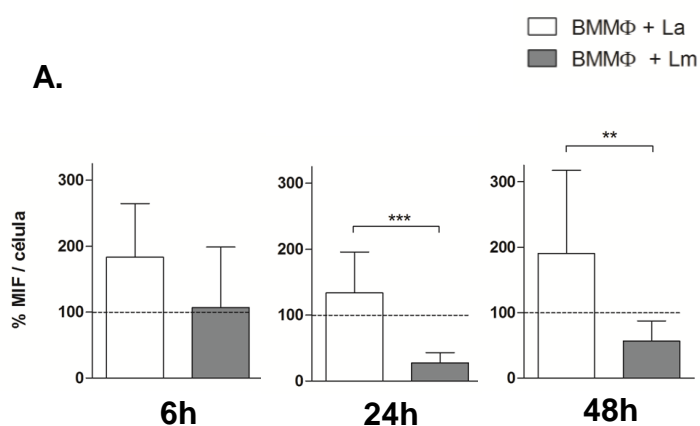
**Figura 1. Expressão de HO-1 em BMMΦ infectados por *Leishmania*.** Após 6 e 24 h de infecção, BMMΦ infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* foram lisados com tampão de lise disponibilizado pelo fornecedor do Kit e a expressão de HO-1 foi avaliada por ELISA. BMMΦ não infectados, representados pela linha tracejada, apresentaram valores médios de 7,449 ng/mL e 4,871 ng/mL nos tempos de 6 e 24 h, respectivamente. Os valores no gráfico representam a média  $\pm$  SD de um experimento representativo de dois experimentos independentes realizados em quintuplicata. Test *t* de Student \*\*\* $p < 0,0001$ .

Ao comparar a expressão de CD71, observamos que o percentual de células CD71<sup>+</sup> é maior em células infectadas por *L. amazonensis* (100%) em comparação aqueles BMMΦ infectados por *L. major* (93,1%) (Figura 2). Esse aumento também é observado nos valores de MFI de células CD71<sup>+</sup>, em que BMMΦ infectados por *L. amazonensis* apresentam um valor de 2.103, aproximadamente 4,5 vezes maior que o valor de MFI obtido para BMMΦ infectados por *L. major* (472).



**Figura 2. Expressão de CD71 em BMMΦ infectados por *Leishmania*** BMMΦ infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* foram imunomarcados com o anticorpo primário monoclonal anti-CD71, seguido do anticorpo secundário conjugado ao PE-Texas Red. A avaliação da marcação de CD71 foi realizada por FACS e o percentual de células CD71<sup>+</sup> e o MFI foram determinados por análise no FlowJo.

Como uma abordagem indireta da avaliação da expressão de CD71, ensaios de ligação e captação de HoloTf foram realizados em macrófagos infectados por *Leishmania*. A quantificação da fluorescência mostrou um maior percentual de ligação e captação de HoloTf por macrófagos infectados por *L. amazonensis*, em comparação aqueles infectados por *L. major* (Figura 3).

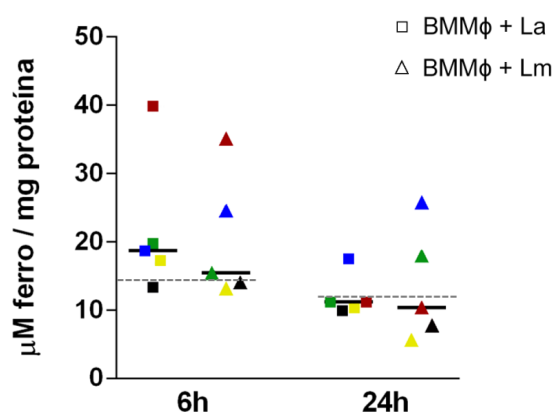


**Figura 3. Avaliação da ligação e captação de HoloTf em BMMΦ infectados por *Leishmania***

BMMΦ infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* foram incubados com 300nM de HoloTf-Texas Red e a ligação (A) e captação (B) da molécula foi avaliada por microscopia de fluorescência. A média da intensidade de fluorescência (MIF) por célula foi obtida pela razão da quantificação total da fluorescência sobre quantificação total de células por imagem. MIF de macrófagos não infectados foi determinado e utilizado como controle, sendo considerados 100%, representado pela linha tracejada..

### **NÃO HÁ DIFERENÇA NA CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE FERRO EM BMMΦ QUE APRESENTA PERFIS DISTINTOS A INFECÇÃO POR *Leishmania***

Embora tenha sido observada diferença na expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro, não observamos diferença na concentração intracelular de ferro em BMMΦ que apresentam perfis distintos a infecção por *Leishmania* após 6 e 24 h de infecção (Figura 4).



**Figura 4. Concentração intracelular de ferro em BMMΦ infectados por *Leishmania*** BMMΦ foram infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* e, posteriormente, a quantificação de ferro intracelular foi realizado por ensaio colorimétrico baseado em ferrozina. BMMΦ não infectados, representados pela linha tracejada, apresentaram um acúmulo de ferro de 14,91 e 11,91  $\mu\text{M}$  no tempo de 6 e 24 h após infecção, respectivamente.

### MODULAÇÃO DA DISPONIBILIDADE DE FERRO SOBRE A INFECÇÃO POR *Leishmania*

A depleção e a suplementação de ferro foram avaliadas quanto aos seus efeitos sobre a infecção de BMMΦ por *L. amazonensis* ou *L. major*.

Foi observado que a exposição à fenantrolina causou redução significativa na carga parasitária e no percentual de BMMΦ infectados por *L. amazonensis* ou *L. major*, além da viabilidade intracelular das duas espécies de parasitos (Figura 5).

A fenantrolina causou diminuição no percentual de BMMΦ infectados por *L. amazonensis*, no tempo de 24 h, com valores de 34,13%, 26,96% e 16,06% nas

concentrações de fenantrolina de 12,5, 25 e 50  $\mu\text{M}$ , respectivamente em comparação com 58,88% de BMMΦ infectados no grupo controle não tratado. (Figura 5A, ANOVA, Linear Trend,  $p < 0,0001$ ). O quelante de ferro também reduziu o número de parasitos por célula, de 1,53; 1,519 e 1,383 nos grupos tratados com 12,5, 25 e 50  $\mu\text{M}$  de fenantrolina, respectivamente, em comparação a 2,738 do grupo controle (Figura 5B, ANOVA, Linear Trend,  $p < 0,0001$ ).

O percentual de BMMΦ infectados por *L. amazonensis* após 48 h tratados com fenantrolina foi também reduzido para valores de 24,89%, 16,41% e 6,337% nas concentrações de 12,5, 25 e 50  $\mu\text{M}$ , respectivamente, em comparação ao grupo controle (66,52%). (Figura 5D, ANOVA, Linear Trend,  $p < 0,0001$ ). Os valores medianos do número de *Leishmania* por célula foi de 1,507, 1,304 e 1,196 nas concentrações de 12,5, 25 e 50  $\mu\text{M}$  de fenantrolina, respectivamente, em relação ao grupo controle de 4,049 (Figura 5E).

Após 24 h de exposição à fenantrolina, foram observadas reduções na viabilidade intracelular de *L. amazonensis* de 79,86%, 96,27% e 99,28% nas concentrações de 12,5, 25 e 50  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Figura 5C, ANOVA, Linear Trend,  $p < 0,0001$ ).

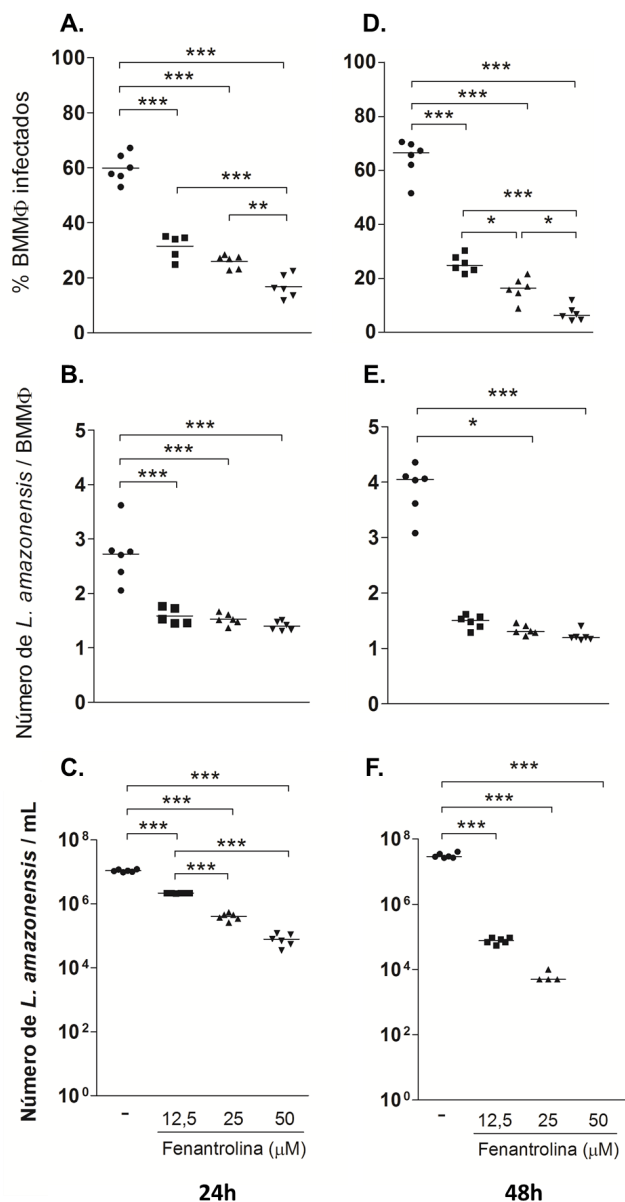
Similarmente, a exposição da fenantrolina por 48 h causou redução acentuada do número de promastigotas viáveis de 99,74%, 99,98% nos grupos tratados com 12,5 e 25  $\mu\text{M}$  e uma redução de 100% no grupo tratado com 50  $\mu\text{M}$  do quelante de ferro (Figura 5F, ANOVA, Linear Trend,  $p < 0,0001$ ), sendo que o valor de IC50 48 h calculado foi de 3,0053  $\mu\text{M}$ .

A fenantrolina também causou diminuição no percentual de BMM $\Phi$  infectados por *L. major*. BMM $\Phi$  infectados incubados após 24 h com 12,5, 25 e 50  $\mu\text{M}$  de fenantrolina, mostram 8,997%, 5,491% e 2,824%, respectivamente, em comparação a 16,15% no grupo controle (Figura 6A). Adicionalmente, o quelante de ferro reduziu o número de parasitos por célula, de 1,485 no grupo controle em comparação a 1,352, 1,168 e 1,167 nos grupos tratados com 12,5, 25 e 50  $\mu\text{M}$  de fenantrolina, respectivamente (Figura 6B, ANOVA, Linear Trend,  $p = 0,0002$ ). O percentual de BMM $\Phi$  infectados por *L. major* após 48 h de tratamento com fenantrolina foi de 2,418%, 2,799% e 2,934% nas concentrações de 12,5, 25 e 50  $\mu\text{M}$ , respectivamente, em comparação ao grupo controle (9,659%) (Figura 6D, ANOVA). Em relação ao número de *Leishmania* por célula os valores medianos corresponderam a 1,145, 1,125 e 1,067 nas mesmas concentrações

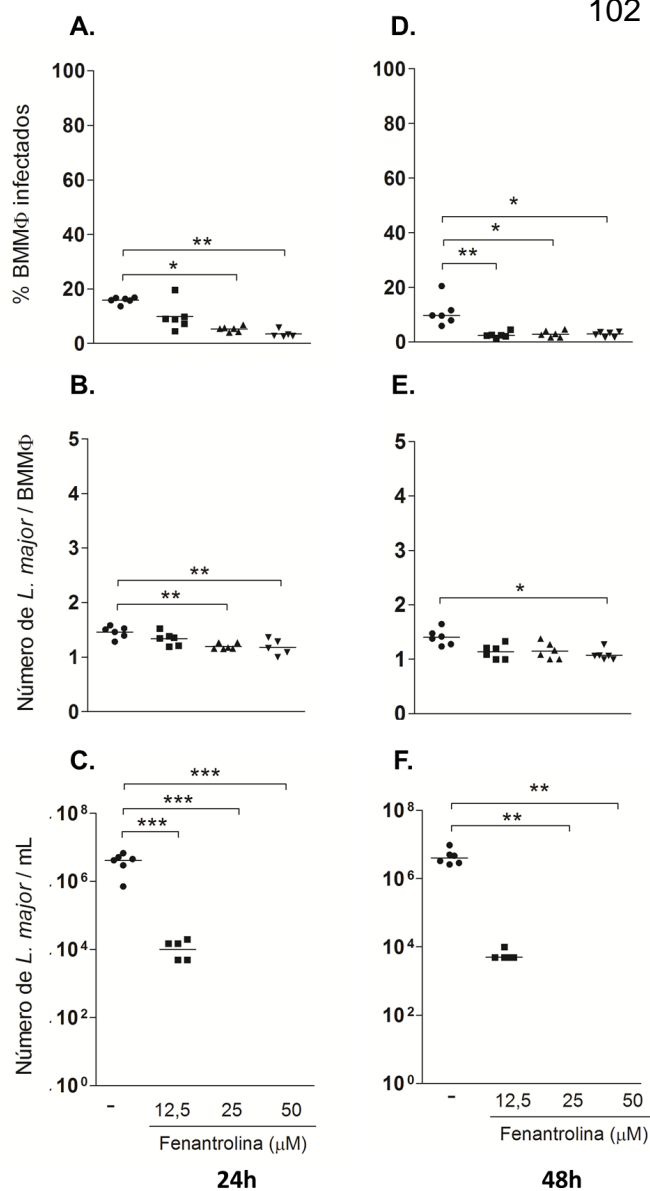
comparado a 1,4 no grupo controle de (Figura 6E).

Semelhantemente ao que foi observado em *L. amazonensis*, a exposição da fenantrolina a células infectadas também causou redução significativa no número de parasitos viáveis em BMM $\Phi$  infectados por *L. major* (Figura 6). Após 24 e 48 h de exposição à fenantrolina, foram observadas reduções na viabilidade intracelular de *L. major* de aproximadamente 100%, nas diferentes concentrações testadas (Figura 6C e F). O valor de IC50 48 h calculado foi 6,966  $\mu\text{M}$ .

Em conjunto, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a depleção de ferro reduz a infecção por ambas as espécies de *Leishmania*, de forma tempo e concentração dependente.



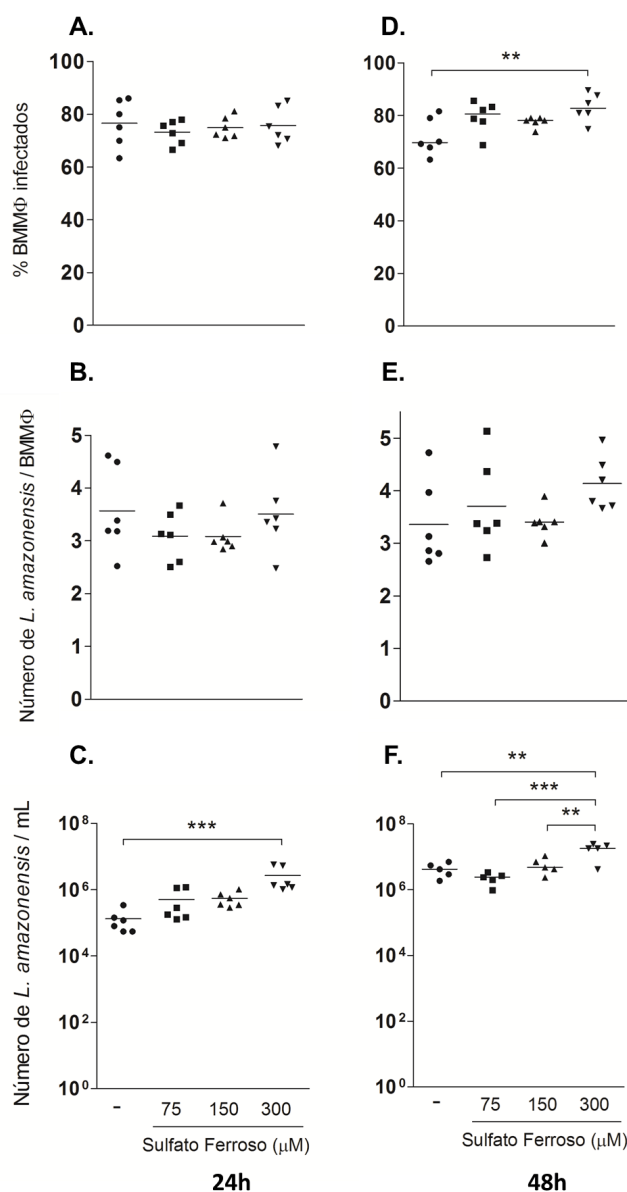
**Figura 5. Depleção de ferro sobre a infecção de *L. amazonensis*.** O efeito da incubação com fenanthrolina foi avaliado em BMM $\phi$  ( $2 \times 10^5$ ) infectados com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* na proporção de 3:1. Após 6 h de infecção, as células foram lavadas com solução salina, e seguidas 48 h, as células foram incubadas com 12,5, 25 e 50  $\mu\text{M}$  de fenanthrolina por 24 e 48 h e parâmetros como percentual de células infectadas (**A e D**), carga parasitária (**B e E**) e número de parasitos viáveis (**C e F**) foram avaliados. Os valores representam a mediana  $\pm$  desvio-padrão de um ensaio representativo de dois experimentos realizados em sextuplicata. ANOVA, \* $p < 0,05$ .



**Figura 6. Depleção de ferro sobre a infecção de *L. major*.** O efeito da incubação com fenanthrolina em BMM $\phi$  ( $2 \times 10^5$ ) infectados com promastigotas metacíclicas de *L. major* na proporção de 10:1. Após 6h de infecção, as células foram lavadas com solução salina, e seguidas 48 h, as células foram incubadas com 12,5, 25 e 50  $\mu\text{M}$  de fenanthrolina por 24 e 48 h e parâmetros como percentual de células infectadas (**A e D**), carga parasitária (**B e E**) e número de parasitos viáveis (**C e F**) foram avaliados. Os valores representam a mediana  $\pm$  desvio-padrão de um experimento realizado em sextuplicata. ANOVA, \* $p < 0,05$ .

Em relação à suplementação de ferro em BMM $\phi$  infectados por *L. amazonensis*, foi observado que a incubação com sulfato ferroso causou aumento no percentual de células

infectadas no tempo de 48 h, mas não no tempo de inicial de 24 h (Figura 7). Em relação ao percentual de BMMΦ infectados, o tratamento com sulfato ferroso aumentou percentual de 69,64% no grupo controle para 80,52, 78,09 e 82,79% em BMMΦ incubados com 75, 150 e 300 μM de sulfato ferroso (Figura 7D, ANOVA, Linear Trend,  $p=0,0041$ ). A mediana do número de parasitos por célula exposta as mesmas concentrações de sulfato ferroso foi de 3,381, 3,398 e 4,001, respectivamente, em comparação ao grupo controle que foi de 2,996. (Figura 7E). Similarmente, a suplementação de ferro em células infectadas por *L. amazonensis* causou aumento na viabilidade de *Leishmania* intracelular. Assim, após 24 h, observamos que houve aumento de 2,32; 4,575 e 14,03 vezes no número de parasitos viáveis em BMMΦ infectados por *L. amazonensis* expostos a 75, 150 e 300 μM do sulfato ferroso, sendo este último estatisticamente significativo (Figura 7C). Apesar de no tempo de 48 h termos observado uma redução não significativa de aproximadamente 1,75 vezes no número de parasitos viáveis no grupo incubado com 75 μM, em comparação ao controle, observamos um aumento de 1,14 e 4,285 vezes, respectivamente, nas concentrações de 150 e 300 μM (Figura 7F, ANOVA, Linear Trend,  $p=0,0002$ ).

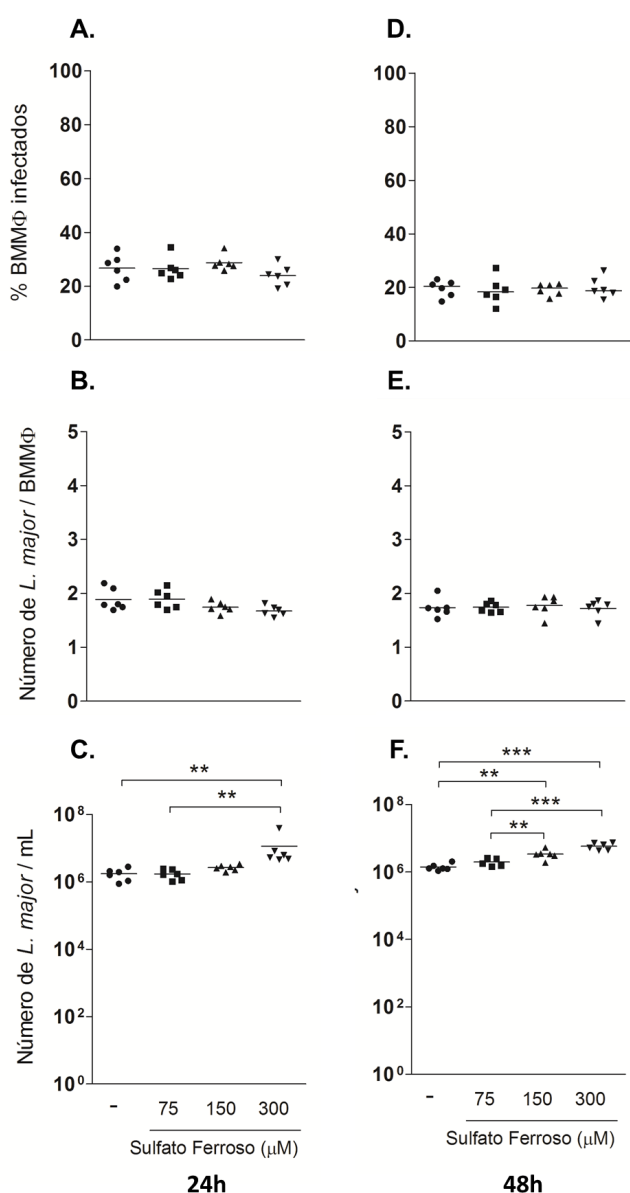


**Figura 7. Suplementação de ferro sobre a infecção de *L. amazonensis*.** BMMΦ ( $2 \times 10^5$ ) foram infectados por promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* na proporção de 3:1. Após 6h de infecção, as células foram lavadas com solução salina e seguidas 48 h, as células foram incubadas com 75, 150 e 300 μM de sulfato ferroso por 24 e 48 h e parâmetros como o percentual de células infectadas (**A e D**), carga parasitária (**B e E**) e o número de parasitos viáveis (**C e F**) foram avaliados. Os valores representam a mediana  $\pm$  desvio-padrão de um ensaio realizado em sextuplicata. ANOVA, \* $p < 0,05$ .

Em contrapartida, a suplementação de ferro não alterou parâmetros como carga parasitária e o percentual de BMMΦ infectados por *L. major*, embora tenha



sido observado que a incubação com sulfato ferroso causou aumento no número de parasitos viáveis no tempo de 24 e 48 h (Figura 8). Assim, após 24 h, observamos que houve aumento de 1,49 e 3,2 vezes no número de parasitos viáveis em BMMΦ infectados por *L. major* expostos a 150 e 300μM do sulfato ferroso em relação ao controle, sendo o último estatisticamente significativo (Figura 8C). No tempo de 48 h, observamos um aumento significativo de 2,625 e 4,55 vezes nas concentrações de 150 e 300 μM, respectivamente (Figura 8F, ANOVA, Linear Trend,  $p < 0,0001$ ).



**Figura 8. Suplementação de ferro sobre a infecção de *L. major*.** BMMΦ ( $2 \times 10^5$ ) foram infectados por promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* na proporção de 3:1. Após 6h de infecção, as células foram lavadas com solução salina, e seguidas 48 h, as células foram incubadas com 75, 150 e 300μM de sulfato ferroso por 24 e 48 h e parâmetros como o percentual de células infectadas (A e D), carga parasitária (B e E) e o número de parasitos viáveis (C e F) foram avaliados. Os valores representam a mediana  $\pm$  desvio-padrão de um ensaio realizado em sextuplicata. ANOVA, \* $p < 0,05$ .

## DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliamos o papel do ferro em macrófagos que apresentam diferentes perfis de infecção por *Leishmania*. Inicialmente, a expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro, como o CD71 e HO-1, além de sua concentração intracelular foi avaliada em BMMΦ de camundongos da linhagem CBA, que são permissivos à infecção por *L. amazonensis*, enquanto controlam a infecção por *L. major*. Em seguida, o efeito da modulação da disponibilidade de ferro, utilizando uma abordagem de depleção ou suplementação desse elemento, foi avaliado na infecção por *Leishmania*.

O ferro é um nutriente essencial para a maioria dos organismos e tem sido descrito como um elemento central na

interação parasito-hospedeiro (DOHERTY, 2007; NAIRZ et al., 2010). Embora existam alguns dados controversos (BISTI et al., 2000; BISTI et al., 2006, VALE-COSTA et al., 2013), a restrição ao fornecimento de ferro aos patógenos é apontada como uma estratégia de defesa da célula hospedeira durante a infecção (COLLINS, 2008; NAIRZ et al., 2010). Utilizamos o modelo de camundongo CBA, que tem como vantagem apresentar perfis diferentes de resposta *in vivo* e *in vitro* à infecção por espécies distintas de *Leishmania*, *L. amazonensis* e *L. major*. Esse modelo abre a possibilidade de comparar em um mesmo tipo celular a participação do ferro no desfecho da infecção, contribuindo para uma melhor compreensão do papel desse elemento na susceptibilidade e resistência à infecção por *Leishmania*.

Já é descrito na literatura que a infecção por *Leishmania* modula a expressão de diversas proteínas envolvidas no metabolismo de ferro (PHAM et al., 2005; DAS et al, 2009; LUZ et al., 2012; BEN-OTHTMAN et al., 2014). Entretanto, poucos estudos avaliam a modulação das proteínas que participam do metabolismo de ferro em diferentes perfis de resposta à infecção por *Leishmania*. No presente estudo, observamos uma maior expressão de CD71 em BMM $\Phi$  infectados por *L.*

*amazonensis*, em comparação àqueles infectados por *L. major*, bem como células não infectadas. Das e colaboradores (2009) demonstraram um aumento na expressão de CD71 na infecção por *L. donovani*, sendo que essa modulação é dependente da virulência do parasito. Uma vez que a virulência está relacionada ao caráter patogênico do microrganismo, esses achados de Das e colaboradores corroboram aos obtidos no nosso estudo, dado que BMM $\Phi$  que são permissivos à infecção por *L. amazonensis* apresentam aumento da expressão do receptor para HoloTf em comparação aos BMM $\Phi$  que controlam a infecção por *L. major*. Adicionalmente, Rabhi e colaboradores (2013) demonstraram que *L. major* inibe a expressão de RNAm de CD71 em BMM $\Phi$  de linhagens distintas de camundongos que apresentam diferentes perfis de resposta à infecção por *L. major*, sugerindo que independente do desfecho da infecção, esse parasito limita a captação de ferro pelo macrófago.

É esperado que o aumento na expressão de CD71 em BMM $\Phi$  infectados por *L. amazonensis* reflita também o aumento da internalização desse receptor e, conseqüentemente, na maior captação de HoloTf. Assim, foi evidenciado no presente estudo, maior ligação e captação de HoloTf em macrófagos infectados por *L. amazonensis*. Desta forma, é possível

que haja maior entrega da proteína carreadora de ferro aos VPs de macrófagos infectados por *L. amazonensis*, em relação aqueles infectados com *L. major*. Assim, o complexo CD71-HoloTf carreado em endossomas seriam liberados nos VPs por fusão entre esses compartimentos (BORGES et al., 1998). Como BMM $\Phi$  são susceptíveis à *L. amazonensis*, o aumento da expressão de CD71 e captação de HoloTf nessas células pode ter relação com a permissividade de macrófagos à infecção por *L. amazonensis*. Dessa forma, o tráfego intracelular de vesículas pode favorecer a aquisição de nutrientes, como o ferro, por patógenos que vivem em compartimentos da via endocítica (HACKSTADT, 2000; BURCHMORE; BARRETT, 2001; REYES-LÓPES; PIÑA-VÁRQUEZ; SERRANO-LUNA, 2015), como descrito anteriormente para *Leishmania* (BORGES et al., 1998; BURCHMORE; BARRETT, 2001). Os achados de Borges e colaboradores (1998) indicam que a entrega do ferro mediada por HoloTf aos VPs de *L. amazonensis* ou *L. pifanoi* pela via endocítica tem um papel no curso infecção por estes parasitos. Entretanto, Borges e colaboradores (1998) apenas analisaram a captação de HoloTf por células infectadas por essas espécies de *Leishmania*, e não compararam os níveis

de captação entre as células infectadas ou em relação células controle não infectadas. Diferentemente do que foi descrito para macrófagos infectados por *L. amazonensis* ou *L. pifanoi*, Russell e colaboradores (1992) não observaram entrega de HoloTf em VPs de *L. mexicana*. Esses dados sugerem que a entrega de ferro aos VPs mediada por HoloTf pela via endocítica ocorre de forma distinta a depender da espécie do parasito (BORGES et al., 1998; REYES-LÓPES; PIÑA-VÁRQUEZ; SERRANO-LUNA, 2015). Embora o receptor de Tf de macrófagos tenha sido apontado como importante na modulação da disponibilidade de ferro na infecção por *Leishmania* (REYES-LÓPES; PIÑA-VÁRQUEZ; SERRANO-LUNA, 2015), ensaios baseados em técnicas de silenciamento, como RNAi, ou a utilização de camundongos *knockout* para CD71 são necessários para melhor compreensão do seu papel.

Identificamos uma modulação positiva da concentração de HO-1 em BMM $\Phi$  infectados por *L. amazonensis*, em comparação com aqueles infectados por *L. major* ou não infectados. A indução do aumento da quantidade de HO-1 já foi evidenciada na infecção por *Leishmania* (PHAM et al., 2005; LUZ et al., 2012). Além disso, Luz e colaboradores (2012) demonstraram que a modulação

farmacológica da HO-1 utilizando um indutor da expressão de HO-1, cobalto protoporfirina IX (CoPP) (SHAN et al., 2000), aumenta o percentual de infecção e a carga parasitária de macrófagos infectados por *L. chagasi*, reduzindo a resposta leishmanicida dos macrófagos. Adicionalmente, BMMΦ de camundongos *knockout* para o gene *Hmox* (HO-1<sup>-/-</sup>) infectados por *L. chagasi* apresentam um menor número de parasitos viáveis quando comparados com células de camundongos selvagens (LUZ et al., 2012). Em conjunto, esses dados sugerem uma participação da HO-1 na replicação e sobrevivência intracelular de diferentes espécies de *Leishmania*. Adicionalmente, Pham e colaboradores (2005) demonstraram que a pré-incubação com tin-mesoporfirina (Sn MP), um inibidor competitivo da atividade de HO-1, aumenta a produção de superóxido em macrófagos infectados por *L. pifanoi*. Em contrapartida, os autores demonstraram que a pré-incubação com CoPP inibe a produção de superóxido em macrófagos infectados (PHAM; MOURIZ; KIMA, 2005). Esses achados sugerem que o aumento dos níveis de HO-1 desempenha um papel importante na supressão da produção de superóxido, que tem evidente atividade leishmanicida (TAILLÉ et al., 2004; PHAM; MOURIZ; KIMA, 2005), minimizando os

mecanismos de defesa da célula hospedeira contra esse patógeno. Deste modo, é possível que o aumento da expressão de HO-1 em BMMΦ infectados por *L. amazonensis*, observada no presente estudo, possa estar favorecendo a sobrevivência intracelular deste parasito, pelo aumento na disponibilidade de ferro intracelular e também pela modulação da produção de ROS.

Importante salientar que a confirmação do aumento da expressão e da concentração de, respectivamente, CD71 e HO-1, respectivamente, proteínas envolvidas no metabolismo de ferro, correlacionam-se ao achado anterior no qual detectamos em estudo de proteômica maior expressão dessas proteínas em BMMΦ infectados por *L. amazonensis* quando comparados à BMMΦ infectados por *L. major* (MENEZES, 2010).

Apesar de ter sido observada a modulação da expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro, não foram encontradas diferenças na concentração intracelular desse íon entre células infectadas por *L. amazonensis* as infectadas por *L. major* e as não infectadas. Em contraposição aos nossos achados, BEN-OTHTMAN e colaboradores (2014) demonstraram que a infecção por amastigotas de *L. amazonensis* em BMMΦ de camundongos C57BL/6 induz acúmulo de ferro, sendo acompanhada de

redução da expressão de Fpn-1 e modulação positiva de ferritina. Dessa forma, para melhor elucidar o efeito da infecção por *Leishmania* sobre a concentração intracelular de ferro torna-se necessário avaliar a expressão de outras moléculas que participam do metabolismo de ferro que não só HO-1 e CD71, mas também Nramp-1, DMT-1, ferritina, Fpn-1, hepcidina, IRPs e IREs (RICHARDSON et al., 2010). Como já é descrito na literatura, a expressão das moléculas envolvidas no metabolismo de ferro é controlada pela quantidade desse íon que é requerida pela célula para manter a homeostase. Evidências demonstraram que mecanismos regulatórios, que participam da regulação da homeostase de ferro, são acionados após a depleção do LIP na infecção por *Leishmania*, levando ao aumento da aquisição de ferro em macrófagos infectados (DAS et al., 2009; REYES-LÓPEZ et al., 2012). Adicionalmente, Das e colaboradores (2009) demonstraram ainda que *L. donovani* utiliza o LIP de células hospedeiras como fonte de ferro para sobrevivência intracelular. Além de ser uma fonte nutricional, o sequestro do ferro no LIP levaria ainda à redução da produção de ROS (KAKHLON; CABANTCHIK, 2002). Ainda que a depleção do LIP tenha sido descrita na infecção por *Leishmania*, a quantidade

desse elemento presente nos VPs ainda não foi estudada. Para melhor avaliar a concentração intracelular de ferro em macrófagos infectados por *Leishmania*, a coloração de Perls ou azul da Prússia pode ser conduzida para evidenciar o depósito desse íon de forma comparativa em VPs de *L. amazonensis* ou *L. major* utilizando o microscópio eletrônico de transmissão (MEGURO et al., 2005, 2007). Além disso, para melhor entender os mecanismos envolvidos na aquisição de ferro e seu papel na infecção é importante ainda avaliar a expressão de Nramp-1 nos VPs de células infectadas que apresentam perfis distintos de infecção e a expressão da proteína LIT-1 presente na superfície de *Leishmania*, uma vez que esse transportador de ferro foi apontado como essencial para a replicação intracelular do parasito (HUYHN; SACKS; ANDREWS, 2006).

Objetivamos avaliar o papel no curso da infecção utilizando moduladores da concentração de ferro intracelular, quelantes e moléculas que complementam ferro. Para selecionar as moléculas mais relevantes ao estudo, testamos o efeito de algumas dessas moléculas sobre promastigotas axênicas. Diversos trabalhos tem apontado o papel do ferro na proliferação de promastigotas de *Leishmania* (WILSON et al., 1994; SOTERIADOU et al., 1995; MESQUITA-

RODRIGUES et al., 2013). No presente estudo, inicialmente, avaliamos o efeito da incubação de diferentes quelantes de ferro sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* em cultura axênica. Demonstramos que a depleção de ferro, com os agentes quelantes DFO, dipiridil ou fenantrolina, inibiu a proliferação desse parasito, sendo que o ultimo apresentou maior potencial leishmanicida. Corroborando os nossos achados, Soteriadou e colaboradores (1995) também observaram que agentes quelantes de ferro predominante intracelulares são mais eficientes na inibição da proliferação de *Leishmania*, em comparação a DFO. Dajem (2010) demonstrou que DFO inibiu a proliferação de formas amastigotas e promastigotas de *L. major* em cultura axênica. Adicionalmente, o uso do dipiridil causou redução do número de promastigotas de *L. braziliensis* e, assim como os nossos dados, as concentrações de 50-180µM resultaram em uma inibição acentuada da proliferação do parasito (MESQUITA-RODRIGUES et al., 2013), embora o IC<sub>50</sub> calculado após 48 h foi quase 4,5 vezes maior que os valores obtidos no presente trabalho com *L. amazonensis*. Fenantrolina e dipiridil são moléculas lipofílicas, sendo a primeira mais lipofílica que a segunda (MERCHJORHANN; STEVERDING, 2006), e a lipofilicidade é

um fator importante na determinação da eficiência da quelação de um íon metálico (PORTER et al., 1991). Assim, decidimos utilizar no presente estudo a fenantrolina como agente quelante de ferro. Além do mais, diferentemente da DFO, a fenantrolina quela predominantemente íon ferroso, sendo que é a forma metabolicamente disponível para ser utilizado nas demandas celulares.

Apesar de serem descritos na literatura como agentes quelantes de ferro (SOTERIADOU et al., 1995; MERCHJORHANN; STEVERDING, 2006; MESQUITA-RODRIGUES et al., 2013), as moléculas utilizadas no presente estudo não são agentes quelantes seletivos, uma vez que apresentam também afinidade por outros íons metálicos divalentes, como zinco, cobre, cálcio e magnésio (SANTOS et al., 2012). Dessa forma, o efeito observado dos agentes quelantes sobre a proliferação de *Leishmania* pode não ser exclusivo da depleção de ferro.

Embora muito se saiba sobre a importância do ferro na proliferação de formas promastigotas de *Leishmania*, o papel desse nutriente na infecção ainda vem sendo investigado e sua importância ainda é controversa (BISTI et al., 2000; BISTI et al., 2006, VALE-COSTA et al., 2013). Assim, além dos mecanismos de aquisição do ferro em células infectadas e sua modulação, é importante uma melhor

compreensão de como as mudanças na homeostase do ferro na célula hospedeira podem afetar o parasito intracelular e o curso da infecção (BEN-OTHMAN et al., 2014). O uso de abordagens que visam modular a disponibilidade intracelular desse elemento pode ser uma ferramenta bastante útil a fim de avaliar seu papel na sobrevivência desse parasito. Deste modo, estudos funcionais, utilizando agentes quelantes de ferro e molécula suplementadora desse íon, foram realizados em BMM $\Phi$  infectados por *L. amazonensis* ou *L. major*. Nessa parte do estudo observamos que, em condições de privação do ferro, houve uma redução na infecção por ambas as espécies de *Leishmania*, enquanto que a suplementação desse nutriente favorece a sobrevivência intracelular desses parasitos. Diversos estudos demonstraram que a depleção de ferro, utilizando agentes quelantes, reduz a infecção por *Leishmania*, além de outros patógenos tripanossomatídeos (BORGES et al., 1998; SMITH; MEREMIKDU, 2003; ARANTES et al., 2007; FRANCISCO et al., 2008; DAS et al., 2009; DAJEM, 2010; ARANTES et al., 2011; MALAFAIA et al., 2011). Um estudo realizado com uma nova abordagem para a depleção de ferro demonstrou que camundongos BALB/c, susceptíveis à infecção por *L. major*, tratados com nanopartículas contendo

sequência gênica que codifica a Fpn1 (nanopartículas-Fpn1), desenvolveram uma lesão menor em comparação ao grupo não tratado (RAFIEE et al., 2014). Adicionalmente, os autores observaram que o tratamento com nanopartículas-Fpn1 foi capaz de reduzir a carga parasitária nos linfonodos dos animais infectados com *L. major*. A redução no tamanho da lesão e a carga parasitária podem ser explicadas pelo efeito da Fpn1 de limitar o crescimento do parasito através da mudança do conteúdo intracelular de ferro, pela exportação desse metal (RAFIEE et al., 2014). Contrariamente, Murray e colaboradores (1991) demonstraram que o tratamento com diferentes concentrações de DFO antes, durante e após a infecção de macrófagos humanos por *L. donovani*, pré-ativados com IFN- $\gamma$ , não reduziu a taxa de replicação do parasito. Além disso, a taxa de replicação do parasito também não foi alterada em macrófagos pré-ativados com IFN- $\gamma$  e cultivados com HoloTf antes e após o desafio com *Leishmania* (MURRAY et al., 1991). Os autores sugerem que a limitação da disponibilidade de ferro não representa um mecanismo antimicrobiano e que a depleção de ferro parece não estar relacionada à morte de *Leishmania* em células hospedeiras (MURRAY et al., 1991). Ainda assim, Mauël e

colaboradores (1991) demonstraram que o excesso de sulfato ferroso inibe a atividade leishmanicida de macrófagos murinos, fazendo com que a morte intracelular do parasito seja evitada. Assim, estudos tem apontado que a suplementação de ferro favorece sobrevivência de *Leishmania* (BORGES et al., 1998; DAS et al., 2009; DE CARVALHO, 2013). Desta forma, o aumento da proliferação de *Leishmania* com a suplementação de ferro e a diminuição da sua viabilidade causada pelo tratamento com quelantes desse íon reforçam a importância da modulação da via de aquisição de ferro da célula do hospedeiro em favor do parasito (DAS et al., 2009).

O ferro tem sido apontado como relevante na patogenicidade de *Leishmania* (HUYNH; ANDREWS, 2008). Entretanto, este elemento não apresenta apenas efeitos benéficos (WEISS, 2002). É descrito na literatura que o aumento da concentração de ferro induz aumento da produção de ROS via reação de Fenton. Assim, este elemento pode participar de mecanismo de morte do parasito, uma vez que ROS são moléculas com potencial leishmanicida. Devido a esse duplo caráter do ferro e seu papel na interação parasito-hospedeiro, a célula hospedeira pode tanto privar o patógeno da aquisição desse nutriente ou aumentar o

fornecimento que resultaria em um mecanismo citotóxico (SILVA-GOMES et al., 2013).

Estudos comparativos que avaliem a expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro, assim como seu papel na resposta de macrófagos a diferentes perfis de infecção pode ser de suma importância no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Os resultados apresentados com o nosso modelo de estudo reforçam os achados encontrados como consenso na literatura quanto ao papel do ferro na infecção por *Leishmania*. Adicionalmente, nossos dados indicam que a participação do ferro independe do perfil de infecção por *Leishmania*. Nas últimas décadas, o papel do ferro nas infecções tripanossomatídeos vem sendo elucidado (TAYLOR; KELLY, 2010). Ainda assim, novos estudos são necessários para uma melhor compreensão do papel do ferro em um contexto comparativo, por exemplo, com o uso de diferentes tipos celulares que apresentam perfis distintos a infecção para uma mesma espécie de *Leishmania*. De modo geral, o aumento de absorção de ferro em células infectadas por *Leishmania* favorece a proliferação do parasito e o controle da disponibilidade de ferro pelo hospedeiro pode ser um fator determinante na evolução da doença. Desta forma, a depleção de ferro pode ser



um mecanismo factível no controle de infecções causadas por *Leishmania* spp. (SOTERIADOU et al., 1995) e a modulação do metabolismo de ferro pode ser uma boa estratégia no tratamento de doenças causadas por este parasito (MERCHJORHANN; STEVERDING, 2006, TAYLOR; KELLY, 2010; SANTOS et al., 2012).

## CONCLUSÕES

Proteínas envolvidas no aumento da disponibilidade de ferro são diferentemente expressas em BMM $\Phi$  de camundongos da linhagem CBA que apresentam perfis distintos de resposta à infecção por *Leishmania*, sendo moduladas positivamente na infecção por *L. amazonensis* em comparação a *L. major*.

O elemento ferro favorece *in vitro* a infecção por *Leishmania* em BMM $\Phi$  de camundongos da linhagem CBA, independente dos perfis distintos de resposta dessas células à infecção.

## ANEXO



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

PROTOCOLO: 005/2014

PROJETO: "Avaliação do papel do ferro em macrófagos resistentes e susceptíveis à infecção por *Leishmania*"

COORDENADORA: Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras

| Quantitativo de Animais Aprovados |               |
|-----------------------------------|---------------|
| Espécie/Linhagem                  | Nº de Animais |
| Camundongos CBA                   | 255           |
| Camundongos C57                   | 20            |

Certificamos que na presente versão este projeto está de acordo com os princípios de ética na pesquisa com animais adotado pela Lei 11.784/2008, foi aprovado e licenciado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-CPqGM) em 13/06/2014, e tem validade até 13/06/2016.

The present version of the above referenced project agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by the Brazilian law 11.784/2008 and was approved and licensed by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of the CPqGM-FIOCRUZ at 06/13/2014, being valid until 06/13/2016.

Salvador, 17 de junho de 2014.

*M. Almeida*  
**MARIA DA CONCEIÇÃO CHAGAS DE ALMEIDA**  
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
 Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ