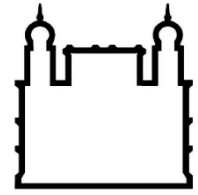




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DE *Leishmania amazonensis* e
Leishmania braziliensis NA REPROGRAMAÇÃO
METABÓLICA EM MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS**

ELAINE CARVALHO DE OLIVEIRA

Salvador-Bahia

2021

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DE *Leishmania amazonensis* e
Leishmania braziliensis NA REPROGRAMAÇÃO
METABÓLICA EM MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS**

ELAINE CARVALHO DE OLIVEIRA

Orientadora: Dra. Cláudia Ida Brodskyn

Dissertação apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em Patologia
Humana para a obtenção do grau
de Mestre.

**Salvador-Bahia
2021**

“INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DE Leishmania amazonensis e Leishmania braziliensis NA REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA EM MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS”.

ELAINE CARVALHO DE OLIVEIRA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 15 de janeiro de 2021.

COMISSÃO EXAMINADORA

Carina Carvalho dos Santos

Dra. Carina Carvalho dos Santos
Professora
UFBA

Jaime Ribeiro Filho

Dr. Jaime Ribeiro Filho
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

Cláudia Ida Brodskyn

Dra. Cláudia Ida Brodskyn
Pesquisadora
FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio do Programa INOVA-Geração de Conhecimento– Edital 2018, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB.

DEDICATÓRIA

À Deus, por me guiar e me conceder sabedoria e força para enfrentar os desafios durante minha caminhada. Aos meus pais, Jesuíta e Sebastião, pelos ensinamentos e amor incondicional. Aos meus irmãos, cunhadas e sobrinhos, pelo apoio, carinho e compreensão. À Vinícius e Bela pelo amparo e cuidado. Aos meus amigos pelo apoio, e por serem tão presentes em minha vida mesmo estando distantes.

Amo Vocês!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Cláudia Ida Brodskyn, a minha eterna gratidão por seu incentivo, suporte, e pelas oportunidades. Uma pesquisadora inspiradora, exemplo de dedicação e profissionalismo.

À Rafael Tibúrcio e a Léon Dimitri, pelos ensinamentos diários, companheirismo, amizade, amparo e pelas risadas mesmo nos momentos de desespero.

Aos meus amigos do Grupo CB, Camila, Néia, Priscila e Gabriela, pelo companheirismo e apoio e sugestões. Obrigada pelo suporte nos experimentos e nas apresentações.

Ao Grupo NT pelas contribuições e excelentes discussões, em especial à Sara, pelo acolhimento e carinho e Ícaro, pela inspiração diária.

À da Dra. Natália Tavares, pela agradável convivência e preciosas contribuições.

À Dr. Pedro Vieira por todo auxílio, discussão dos dados e valiosas sugestões.

Aos amigos do LaIPHE, pela agradável convivência e sugestões.

À Isabelle e Andrezza Kariny, pelo apoio e suporte administrativo.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Patologia.

À FAPESB, pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho. Muito Obrigada!

OLIVEIRA, Elaine Carvalho de. Investigação do papel de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis* na reprogramação metabólica em macrófagos murinos infectados. 2021. 65 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A leishmaniose é causada por protozoários de diversas espécies do gênero *Leishmania* que parasitam mamíferos, utilizando o flebotomíneo como vetor de transmissão. Evidências indicam que *Leishmania spp.* têm a capacidade de modular o metabolismo de macrófagos durante sua infecção, o que resulta na interferência em etapas importantes da respiração celular. **OBJETIVO:** Assim, o objetivo deste estudo consiste na avaliação do perfil metabólico em macrófagos murinos infectados por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. **MATERIAL E MÉTODOS:** Precusores hematopoiéticos de macrófagos foram obtidos da medula óssea de camundongos C57BL/6 e cultivados até sua diferenciação em macrófagos. Os macrófagos foram infectados com *Leishmania spp.* e as taxas de acidificação extracelular (ECAR) e consumo de oxigênio (OCR), foram mensuradas através do Seahorse. Posteriormente, foi avaliada a carga parasitária e a taxa de infecção, mediante o tratamento prévio dos BMDMs com os inibidores da via glicolítica, fosforilação oxidativa e síntese de ácidos graxos. Além disso, a funcionalidade das mitocôndrias foi avaliada através de sondas “MitoTrackers”, aferindo a massa mitocondrial e o potencial de membrana. A produção de espécies reativas de oxigênio foi mensurada através da sonda “CellroX”. Os dados obtidos foram então submetidos à análise estatística, e os valores foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$. **RESULTADOS:** Este estudo mostra que os BMDMs infectados por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* exibem um perfil glicolítico e possuem um aumento no consumo de oxigênio. BMDMs tratados com inibidores que atuam no metabolismo mitocondrial apresentaram diminuição na carga parasitária e taxa de infecção, mostrando a importância do metabolismo mitocondrial para a sobrevivência do parasito. Além disso, interferências no metabolismo dos macrófagos estão relacionadas com o aumento do estresse oxidativo, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que ajudam na eliminação do parasito. **CONCLUSÃO:** Este estudo demonstra que a infecção por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* interfere no metabolismo mitocondrial do hospedeiro, ficando evidente que na presença do parasito ocorre um aumento nas taxas de glicólise para alimentar a fosforilação oxidativa. Esse trabalho destaca o potencial do metabolismo mitocondrial dos macrófagos como alvo terapêutico para modular a infecção por *Leishmania*.

Palavras-chave: Fosforilação oxidativa; Glicólise; *Leishmania spp.*; Metabolismo Mitocondrial; Modulação metabólica.

OLIVEIRA, Elaine Carvalho de. Investigation of the role of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* in metabolic reprogramming in infected murine macrophages. 2021. 65 f. Dissertation (Master in Pathology) - Federal University of Bahia. Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, 2020.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Leishmaniasis is caused by protozoa of different species of the genus *Leishmania* that parasitize mammals, using sandflies as a transmission vector. Evidence indicates that *Leishmania spp.* have the ability to modulate macrophage metabolism during infection, which results in interference at important stages of cell respiration. **AIM:** Thus, the objective of this study is to evaluate the metabolic profile of mouse macrophages infected by *L. amazonensis* and *L. braziliensis*. **MATERIAL AND METHODS:** Macrophage hematopoietic precursors were obtained from the bone marrow of C57BL / 6 mice and cultured until their differentiation into macrophages. The macrophages were infected with *Leishmania spp.* and the rates of extracellular acidification (ECAR) and oxygen consumption (OCR) were measured using Seahorse. Subsequently, parasite loads and infection rates were evaluated through the previous treatment of BMDMs with glycolytic pathway inhibitors, oxidative phosphorylation and synthesis of fatty acids. In addition, the functionality of the mitochondria was evaluated using MitoTrackers probes, measuring the mitochondrial mass and the membrane potential. The production of reactive oxygen species was measured using the CellroX probe. The data obtained were then submitted to statistical analysis, and the values were considered significant when $p \leq 0,05$. **RESULTS:** This study showed that bone marrow-derived macrophages (BMDMs) infected by *L. amazonensis* and *L. braziliensis* exhibit a glycolytic profile and have an increase in oxygen consumption. BMDMs treated with inhibitors that act on mitochondrial metabolism showed a decrease in parasite load and infection rate, showing the importance of mitochondrial metabolism for parasite survival. In addition, interferences in the metabolism of macrophages are related to the increase of oxidative stress, increasing the production of reactive oxygen species (ROS) that contributes to the elimination of the parasite. **CONCLUSION:** This study demonstrates that infection by

L. amazonensis and *L. braziliensis* interferes with the host's mitochondrial metabolism, making evident that in the presence of the parasite there is an increase in glycolysis rates to feed oxidative phosphorylation. This study highlights the potential of mitochondrial metabolism of macrophages as a therapeutic target to modulate *Leishmania* infection.

Keywords: Oxidative phosphorylation; Glycolysis; *Leishmania spp.*; Mitochondrial Metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema das fases da glicólise	21
Figura 2 Estrutura de uma mitocôndria.....	22
Figura 3 Esquema das reações do ciclo de Krebs.....	23
Figura 4 Esquema ilustrando o transporte de elétrons durante a fosforilação oxidativa	24
Figura 5 Síntese de Ácidos Graxos.....	25
Figura 6 Imagem representativa da reprogramação metabólica.	27
Figura 7 Análise da taxa de acidificação extracelular	37
Figura 8 Análise da taxa de consumo de O ₂	39
Figura 9 Alterações no perfil energético dos BMDMs.	40
Figura 10 Taxa de infecção e carga parasitária de BMDMs tratados com inibidores metabólicos..	41
Figura 11 Taxa de infecção e carga parasitária de BMDMs tratados com inibidores metabólicos.	42
Figura 12 Viabilidade celular após tratamento com os inibidores metabólicos.....	43
Figura 13 Interferência dos complexos mitocondriais (I e III) na diminuição da carga parasitária e taxa de infecção.	45
Figura 14 Análise da produção de superóxido mitocondrial (MitoSOX).	46
Figura 15 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio.	47
Figura 16 Inibidores metabólicos interferem nas funções mitocondriais.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Inibidores metabólicos e funções.	33
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2DG:	2-desoxiglicose.
Acetil-CoA:	Acetilcoenzima A.
ADP:	Adenosina difosfato
ANT.A:	Antimicina A.
ATP:	Adenosina trifosfato.
BMDMs:	Macrófagos murinos derivados de medula óssea
C75:	Ácido 4-metileno-2-octil-5-oxotetra-hidrofurano-3-carboxílico.
ECAR:	Extracelular acidification rate (Taxa acidificação extracelular).
FADH ₂ :	Flavina adenina dinucleotídeo reduzida.
FCCP:	p-trifluorometoxifenil-hidrazona.
<i>L. amazonensis</i> :	<i>Leishmania amazonensis</i> .
<i>L. braziliensis</i> :	<i>Leishmania braziliensis</i> .
MDIVI-1:	3- (2,4-Dicloro-5-metoxifenil) -2,3-di-hidro-2-tioxo-4 (1H) -quinazolinona, 3- (2,4-Dicloro-5-metoxifenil) -2-sulfanil -4 (3H) –quinazolinona.
mtROS:	Espécies reativas de oxigênio mitocondriais.
NAD ⁺ :	Nicotinamida adenina dinucleotídeo.
NADH:	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida.
OCR:	Oxygen consumption rate (Taxa de consumo de O ₂).
OLG:	Oligomicina.
PFK15:	1- (4-Piridinil) -3- (2-quinolinil) -2-propen-1-ona.

Pi: Fosfato inorgânico

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio.

ROT: Rotenona.

SBF: Soro Bovino Fetal.

TCA: Tricarboxylic acid cycle (Ciclo de Krebs).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 LEISHMANIOSES	15
1.2 ASPECTOS CLÍNICOS DAS LEISHMANIOSES	16
1.3 RESPOSTA IMUNE CONTRA LEISHMANIA	17
1.4 METABOLISMO.....	20
1.4.1 Via Metabólica Glicolítica	20
1.4.2 Ciclo de Krebs ou Ciclo do Ácido Tricarboxílico (TCA)	21
1.4.3 Fosforilação Oxidativa	23
1.4.4 Síntese De Ácidos Graxos	24
1.4.5 β-oxidação	25
1.5 IMUNOMETABOLISMO	26
2. JUSTIFICATIVA	28
3. HIPÓTESE	29
4. OBJETIVOS	29
4.1 OBJETIVO GERAL.....	29
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
5. DESENHO EXPERIMENTAL	30
6. MATERIAIS E MÉTODOS	32
6.1 ANIMAIS	32
6.2 DIFERENCIAÇÃO IN VITRO DE MACRÓFAGOS DA MEDULA ÓSSEA	32
6.3 CULTURA DE <i>Leishmania amazonensis</i> e <i>Leishmania braziliensis</i> E INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS.....	33
6.5 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	34
6.6 ENSAIO DO MITOSOX TM RED	34
6.7 ENSAIO MITOTRACKERS	35
6.8 CELLROX	35

6.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
7.	RESULTADOS	36
7.1	A INFECÇÃO POR <i>L.amazonensis</i> E <i>L.braziliensis</i> AUMENTAM AS TAXAS DE GLICÓLISE E DE FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA	36
7.2	A UTILIZAÇÃO DOS INIBIDORES E DO DMSO NÃO INTERFEREM NA VIABILIDADE CELULAR	42
7.3	INTERFERÊNCIA DO COMPLEXO I E III DA CADEIA TRANSPORTADORA DE ELÉTRONS	43
7.4	INIBIÇÃO DA FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA COM OLIGOMICINA AUMENTA A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO MITOCONDRIAL (MTROS).	45
7.5	OLIGOMICINA INDUZ AUMENTO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO CELULAR	46
7.6	INIBIDORES METABÓLICOS TORNAM AS MITOCÔNDRIAS DISFUNCIONAIS	48
8.	DISCUSSÃO	49
9.	CONCLUSÃO	54
	PERSPECTIVAS	58
	REFERÊNCIAS	60

1. INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses são um complexo de doenças negligenciadas que figuram entre um dos principais problemas de saúde pública, pois, afetam milhões de pessoas em cerca de 88 países. A *Leishmania* é um parasito protozoário intracelular da família *Trypanosomatidae*, capaz de infectar humanos e outros mamíferos. Essa infecção leva a um espectro de doenças que variam desde lesões cutâneas até a forma visceral, que pode ser fatal, se não tratado (DAWIT.G e SIMENEW.K, 2013; VANNIER-SANTOS; MARTINY; DE SOUZA, 2002). Os principais reservatórios animais de *Leishmania spp.* são canídeos e roedores. Além do vetor flebotomíneo, a transmissão da leishmaniose também pode ocorrer pelas vias parenteral e vertical (HERWALDT, 1999). Segundo a OMS, mais de 20 espécies de *Leishmania* são patogênicas para os humanos, a doença afeta, majoritariamente pessoas vulneráveis na África, Ásia e América Latina (WHO, 2018).

Espécies do gênero *Leishmania* apresentam-se em duas formas evolutivas no seu ciclo de vida, que são as formas promastigota e amastigota. As promastigotas são caracterizadas por possuírem flagelos e apresentam motilidade, são encontradas no trato digestivo dos flebotomíneos, onde sofrem diferenciação para sua forma infectante, promastigotas metacíclicas (HANDMAN; BULLEN, 2002). As amastigotas encontram-se no ambiente intracelular de células de mamíferos infectados, essa forma evolutiva, por sua vez, é capaz de se replicar no fagolisossomo de fagócitos (DAWIT.G e SIMENEW.K, 2013).

O ciclo transmissão de *Leishmania spp.* se inicia durante o repasto sanguíneo, quando o flebotomíneo inocula promastigotas metacíclicas no hospedeiro. Células da imunidade inata fagocitam os parasitas, preferencialmente os macrófagos, e nos vacúolos parasitóforos se diferenciam em amastigotas e se replicam, culminando na ruptura das células hospedeiras, permitindo a reinfecção de outras células e a propagação do parasito. O ciclo se completa quando o flebotomíneo ingere fagócitos infectados com amastigotas, que irão se diferenciar em promastigotas procíclicas e posteriormente em promastigotas metacíclicas (forma infectante, incapaz de se replicar) no trato intestinal do inseto (revisto em KAYE; SCOTT, 2011).

1.2 ASPECTOS CLÍNICOS DAS LEISHMANIOSES

As leishmanioses apresentam amplo espectro de manifestações clínicas, podendo apresentar sintomas distintos em infecções causadas por diferentes espécies do parasita (MURRAY et al., 2005). As principais formas dessa doença são denominadas Leishmaniose tegumentar (LT) e Leishmaniose visceral (LV).

A LT é considerada endêmica na América do Sul, América Central, Norte da África, Oriente Médio e partes da Ásia, tendo um milhão de novos casos anualmente. O Brasil está entre os 10 países com maiores números de casos, representando com os demais países, Afeganistão, Argélia, Colômbia, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru, uma incidência global de 70% a 75% estimada de Leishmaniose tegumentar (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Na América Latina, destacam-se 12 espécies, entre elas, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia.) guyanensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Leishmania) mexicana* (ALVAR et al., 2012).

No Velho Mundo, os registros históricos da leishmaniose remontam ao século VII A.C, com relatos escritos sobre lesões características da doença, sendo consideradas endêmicas no hemisfério oriental: na Ásia, África e no sul da Europa. Nesta parte do mundo, estão presentes os complexos *Leishmania donovani* e *Leishmania trópica* com as espécies, *L donovani*, *L infantum* e *L tropica*, *L major*, *L aethiopica* respectivamente (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).

A leishmaniose tegumentar pode apresentar diferentes formas clínicas como: Cutânea Localizada (LCL), caracterizada por lesões ulcerativas (MARSDEN, 1986); Disseminada (LCD), apresentando múltiplas lesões papulares (DAVID; CRAFT, 2009); Mucosa (LCM), caracterizada por apresentar lesões na mucosa nasal e nasofaringe (REITHINGER et al., 2007) e por fim, a forma clínica difusa (LCD), caracterizada pelo surgimento de inúmeras lesões não-ulcerativas devido a disseminação do parasita causados pela imunossupressão celular induzida pelo parasita (SILVEIRA, 2009).

A LCD é causada principalmente por espécies de *L. mexicana* e *L. aethiopica*, (DAVID; CRAFT, 2009), sendo no Brasil, a *Leishmania amazonensis* a principal responsável pelos casos da doença (WHO 1990; SHAW 1994). É caracterizada pela presença de lesões cutâneas nodulares não ulceradas, predominância de macrófagos altamente parasitados nas lesões, ausência de respostas imunes celulares ao antígeno de *Leishmania*, resposta de hipersensibilidade tardia negativa e resistência à terapia antiparasitária (COSTA et al., 2006).

A Leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a manifestação de maior ocorrência no Brasil, a maioria dos casos de LCL é causada pelas espécies de *Leishmania braziliensis* e eventualmente, *Leishmania amazonensis* (SILVEIRA, 2009). Esta forma clínica é caracterizada por lesões ulceradas na pele com bordas elevadas e fundo necrótico (revisto em SCOTT e NOVAIS, 2016).

A leishmaniose visceral, causada por de *L. donovani*, e *L. infantum*, apresentam a forma sistêmica da doença. Acomete o sistema reticuloendotelial e, portanto, os parasitas se disseminam para órgãos internos, causando hepatoesplenomegalia, linfadenopatia e outros sintomas associados. Este tipo de infecção e doença pode levar à imunossupressão e torna o paciente mais vulnerável à infecções bacterianas. É comum a formação de granulomas no sítio da infecção como fígado e baço (MARSDEN, 1986). A *Leishmania amazonensis* é capaz de promover além da leishmaniose cutânea, a leishmaniose visceral em alguns casos. Embora a infecção por essa espécie não seja frequente, o paciente acometido quase sempre desenvolve a forma difusa da doença, com pouca perspectiva de cura (BARRAL et al., 1991; JI et al., 2002).

1.3 RESPOSTA IMUNE CONTRA *LEISHMANIA*

Os parasitas do gênero *Leishmania* são patógenos intracelulares e utilizam o macrófago como principal célula hospedeira (LIU; UZONNA, 2012). Monócitos também são recrutados para o sítio da infecção, onde se diferenciam em macrófagos ou células dendríticas (DCs) (MOSSER; EDWARDS, 2008).

Embora o macrófago seja a principal célula hospedeira da infecção por *Leishmania spp.* (revisto em SCOTT; NOVAIS, 2016), durante o estabelecimento do processo inflamatório, os neutrófilos são rapidamente recrutados para o foco da infecção (PETERS; SACKS, 2009). Os neutrófilos podem fagocitar esses parasitas, atuando como células hospedeiras intermediárias e agindo como “cavalos de Tróia”, ou seja, evitando respostas que levem a eliminação dos parasitas. Os neutrófilos possuem curto período de vida e sofrem apoptose criando um ambiente anti-inflamatório e possibilitando a infecção de macrófagos e células dendríticas (DCs) (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003). Outra função atribuída aos neutrófilos são a produção das NETs (neutrophil extracellular) que é composta por filamentos de DNA genômico contendo peptídeos antimicrobianos, o parasita *L. amazonensis* é suscetível à morte por NETs humanas, bem como os LPGs (lipofosfoglicanos) isolados

desses parasitas também levam a liberação das NETS (BORREGAARD; SØRENSEN; THEILGAARD-MÖNCH, 2007).

As células *natural killers* (NK) fazem parte da resposta imune inata, produzindo IFN- γ inicial que ativa os macrófagos, levando a sua ativação com a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas durante a explosão respiratória e óxido nítrico (NO) produto da NO sintase induzível (iNOS) sobre a arginina (BOGDAN, 2012).

A resposta imune adaptativa também desempenha um papel crucial na infecção. As células dendríticas são células apresentadoras de antígeno profissionais (APCs), carreando antígenos do parasito e ativando as células T. A ativação das células T CD4 +, principalmente pela IL-12 produzida pelas DC ou células NK, leva a sua diferenciação em células T auxiliares do tipo 1 (T H₁), com a produção de interferon- γ (IFN γ), que ativa os macrófagos, promovendo a morte do parasita. Algumas células T CD4 + podem adotar um perfil de fenótipo de célula T de memória central ou efetora (LAOUAR et al., 2005). As células T CD8 + que reconhecem os antígenos de *Leishmania* também são ativadas e produzem IFN γ ou realizam atividade citotóxica (BERTHOLET et al., 2006; BERTHOLET et al., 2005). O controle da resposta imunológica é mediado principalmente pela produção da citocina anti-inflamatória IL-10, que pode ser produzidas pelas células regulatórias T (T Reg), células Th1, células TCD8 +, células B, macrófagos e DCs (revisto em KAYE; SCOTT, 2011).

Modelos murinos mostram a importância da resposta imune adaptativa na infecção por *Leishmania sp.* A resposta Th1 caracterizada pela produção de IFN- γ e IL-2, leva ao desenvolvimento de uma lesão pequena, não ulcerada, presente em camundongos da linhagem C57BL/6, infectados por *L. major*. Por outro lado, em camundongos BALB/c, suscetíveis à infecção por *L. major*, observa-se lesões que evoluem progressivamente, ulceram e ocorre a predominância de uma resposta do tipo Th2, com a produção de citocinas, como IL4, IL-5 e IL-13 (CAMPOS-NETO, 2005).

As células T CD4+ também se diferenciam em células Th17, com a produção de Il-17, sob o estímulo de IL-6 e TGF-beta, IL-21 e IL-22 são importantes na manutenção desta diferenciação (ZHU; YAMANE; PAUL, 2010). Entretanto, no caso da infecção por *Leishmania*, a resposta mediada por células Th17 é ainda controversa, não sendo observada proteção no modelo murino (BHATTACHARYA; ALI, 2013). Assim, a resposta imune mediada por essas células podem ser prejudiciais ao tecido, induzindo a liberação de diferentes quimiocinas, que atraem neutrófilos, levando a uma inflamação crônica, com dano tecidual.

Embora a infecção por *Leishmania* tenha sido amplamente utilizada para elucidar muitos aspectos da resposta imune a patógenos intracelulares, ainda não entendemos totalmente a imunopatogênese da doença humana. É claro que LC e LM causadas por *L.braziliensis* são doenças nas quais a imunoregulação mais do que a multiplicação parasitária desempenha um papel principal (SILVEIRA, 2009).

No modelo experimental de infecção por *Leishmania braziliensis* injetadas na orelha em camundongos BALB/C, estes desenvolvem lesões ulceradas similares a aquelas que são observadas na infecção natural e curam espontaneamente (DE MOURA et al., 2005). Neste modelo, uma resposta mista de Th1/Th2 foi observada e caracterizada pela presença de IFN- γ , IL-4 e IL-10, a qual difere da resposta Th2 polarizada observada na infecção por *Leishmania major*. Não há parasitas no sítio de infecção após a cura da lesão, mas persistem nos linfonodos drenantes da lesão, sugerindo que mecanismos imunoregulatórios permitam a sobrevivência da *Leishmania*. De fato, a presença de células TCD4⁺ CD25⁺ expressando marcadores regulatórios, tais como Foxp3, GITR e CD103 têm sido descritas na infecção por *Leishmania braziliensis* (C. FALCÃO et al., 2012). Pacientes com LC e ML possuem uma resposta do tipo 1, exacerbada para o antígeno de *Leishmania* com alta produção de IFN- γ e TNF- α e eficácia diminuída de IL-10 em inibir a produção de IFN- γ (FOLLADOR et al., 2002). IFN- γ e TNF- α parecem estar envolvidos tanto no controle da multiplicação parasitária, durante as fases iniciais da infecção por *Leishmania* e também responsáveis por mediar à lesão tecidual observado na Leishmaniose Tegumentar (RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998).

Entretanto, em pacientes com Leishmaniose difusa, as citocinas anti-inflamatória são abundantes nas lesões e em células mononucleares de sangue periférico reestimuladas, enquanto citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias são ausentes ou presentes em níveis muito baixos (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). *Leishmania amazonensis* aumenta a expressão a arginase 1, TGF- β e PGE2, contribuindo para a proliferação do parasita dentro do macrófago (BARRAL-NETTO et al., 1992; GUIMARÃES et al., 2006; LACERDA et al., 2012). Altas concentrações de arginase 1, ODC (ornitina descarboxilase), PGE2 e TGF- β , foram observadas no plasma de pacientes com LCD. Análises transcriptômicas *in situ* reforçam a associação de arginase 1 e das enzimas envolvidas nas vias de biossíntese das prostaglandinas e poliaminas (FRANÇA-COSTA et al., 2015). Assim, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis* induzem respostas iniciais completamente distintas, levando a uma resposta anérgica e uma resposta inflamatória exacerbada, respectivamente.

Em suma, todos os processos relacionados à resposta imunológica envolvem a participação de diversas células e para que essas células desenvolvam suas funções, demandam energia, que é provida pelo metabolismo celular (O'NEILL; KISHTON; RATHMELL, 2016).

Diversos estudos têm focado na interferência do parasito nas vias intracelulares do hospedeiro, como forma de manter sua sobrevivência (HSU et al., 1990; RODRIGUES, 2012; RODRIGUES, 2014). Entretanto, estudos recentes mostram a necessidade de utilização de fontes de nutrientes e de energia do hospedeiro pelos parasitas. (MCCONVILLE; NADERER, 2011; MCCONVILLE et al., 2015). Há evidências que *Leishmania* spp. possui a capacidade de modular o metabolismo glicídico de macrófagos durante a infecção, o que resulta em alterações nas taxas de glicólise e fosforilação oxidativa (MOREIRA et al., 2015; WEST; SHADEL; GHOSH, 2011).

1.4 METABOLISMO

Metabolismo pode ser definido como um conjunto de processos vitais, através dos quais a homeostase energética é alcançada, por meio de diversas reações bioquímicas anabólicas (síntese de moléculas ou a polimerização em macromoléculas) e catabólicas (degradação das moléculas para geração de energia). Os organismos vivos obtêm energia a partir de variados processos metabólicos, e uma das principais fontes de energia é o metabolismo de carboidratos, que envolve a glicólise e a fosforilação oxidativa (DEBERARDINIS; THOMPSON, 2012).

Além disso, outras vias metabólicas tem mostrado grande importância para a geração de produtos essenciais para o crescimento e sobrevivência celular, como por exemplo, a β -oxidação, um processo que produz ATP a partir da oxidação de acetil-CoA (O'NEILL; KISHTON; RATHMELL, 2016).

1.4.1 Via Metabólica Glicolítica

A via metabólica glicolítica (glicólise), ocorre no citosol das células, a glicose, uma molécula contendo seis carbonos é degradada por reações enzimáticas dando origem a duas moléculas de piruvato e gerando ATP (Fig. 1. Esse processo possui dez reações, sendo as cinco iniciais chamadas de fase preparatória, onde ocorre a utilização da energia pela hidrólise do ATP e as cinco finais de fase de pagamento, ocorrendo à formação de quatro moléculas de

ATP e conseqüentemente o pagamento das moléculas gastas (LODISH et al., 2005; NELSON, COX, 2012).

O piruvato por sua vez pode ser convertido em lactato ou acetilcoenzima A (acetil-CoA). A conversão de piruvato em lactato possibilita a regeneração de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) a partir de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), em condições de hipóxia. A acetil-CoA por sua vez, segue para o ciclo de Krebs, gerando NADH e flavina adenina dinucleotídeo reduzida (FADH₂) para a cadeia respiratória (LEHNINGER,2000; O'NEILL; KISHTON; RATHMELL, 2016).

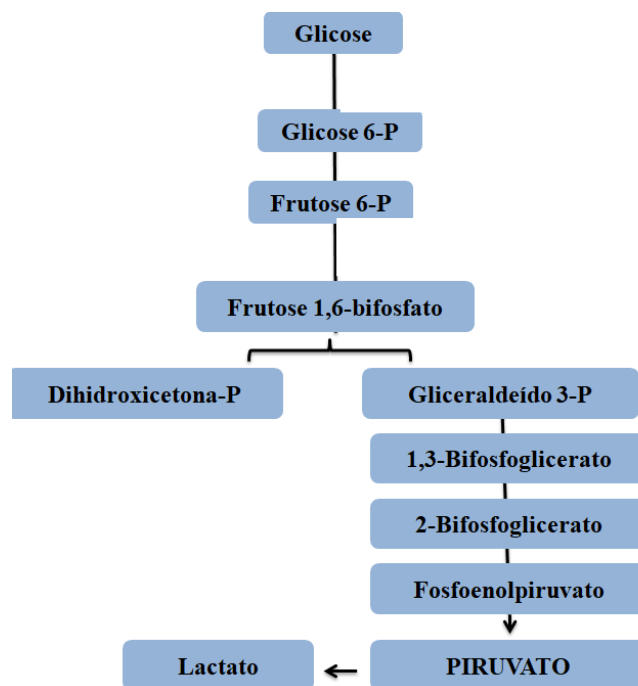


Figura 1. Esquema das fases da glicólise, processo de quebra de uma molécula de glicose levando a geração de duas moléculas de piruvato.

1.4.2 Ciclo de Krebs ou Ciclo do Ácido Tricarboxílico (TCA)

As mitocôndrias são organelas cruciais na geração de ATP, são compostas por uma membrana dupla (interna e externa) separada pelo espaço intermembranar, a membrana interna forma cristas mitocôndrias, que se desdobram para o a matriz mitocondrial da organela. Esses compartimentos desempenham funções distintas, sendo a matriz e a membrana interna os principais compartimentos de trabalho das mitocôndrias. O ciclo de Krebs ocorre na membrana interna da mitocôndria (FRIEDMAN; NUNNARI, 2014) (Fig. 2).

O acetil-CoA convertido pela glicólise reage com oxaloacetato formando citrato e liberando CoA. A partir de reações sequenciais são liberadas duas moléculas de gás carbônico, elétrons e H^+ . O oxaloacetato pode ser recuperado e o ciclo pode ter início novamente, os elétrons e os íons H^+ são transformados em NADH e $FADH_2$ pelo NAD^+ e FAD respectivamente (Fig. 3).

O ciclo de Krebs resulta em três NADH e um $FADH_2$, que atuam na cadeia transportadora de elétrons, amparando a fosforilação oxidativa na geração de ATP (LEHNINGER, 2000; O'NEILL; KISHTON; RATHMELL, 2016).

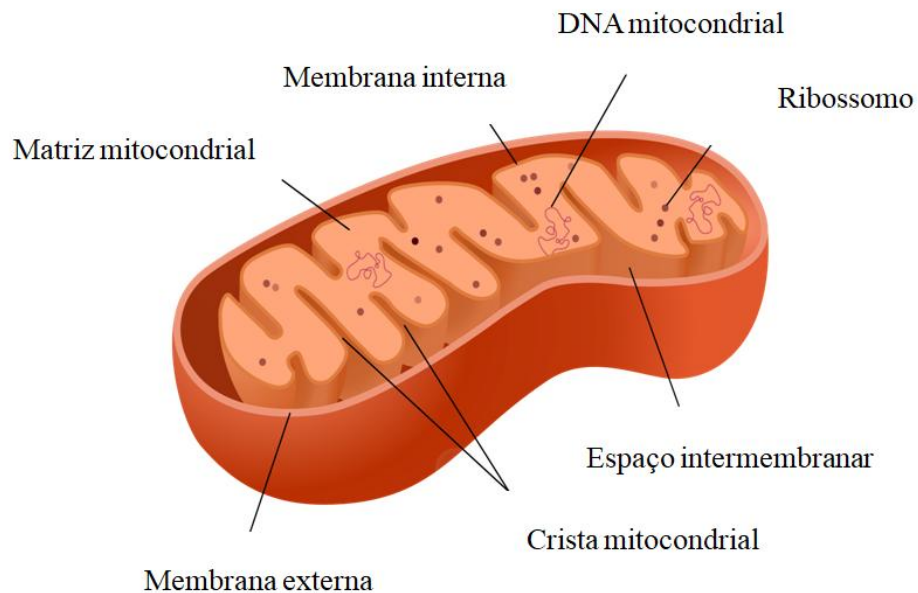


Figura 2 Estrutura de uma mitocôndria. As mitocôndrias são delimitadas por um sistema de membrana dupla, consistindo em membranas interna e externa. As dobras da membrana interna (cristas) se estendem para a matriz (adaptado de pt.khanacademy.org).

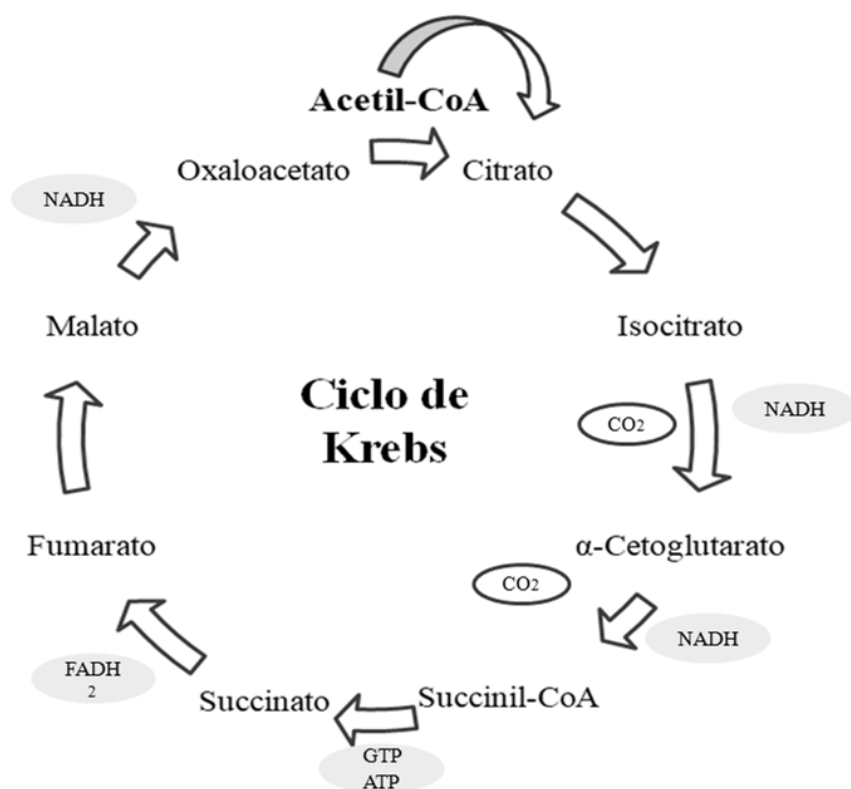


Figura 3. Esquema das reações do ciclo de Krebs para geração dos transportadores de elétrons NADH e FADH₂ e ATP (Adaptado LEHNINGER, 2000).

1.4.3 Fosforilação Oxidativa

A fosforilação oxidativa acontece na mitocôndria, mais especificamente nas cristas mitocondriais presentes na membrana interna (Fig. 3). É a etapa final do processo da cadeia respiratória, produzindo ATP através da ATP sintase e também regenerando NAD⁺. Os transportadores de elétrons, NADH e FADH₂, são os responsáveis por liberar o par de elétrons que são recebidos pelos complexo I e II, respectivamente, da cadeia transportadora de elétrons.

Os complexos mitocondriais utilizam a energia desse par de elétrons para bombear H⁺ para o espaço entre a membrana externa e interna da mitocôndria. Esses elétrons são atraídos por O₂ (aceptor final de elétrons), e por meio de proteínas, são transportados para os complexos III e IV, que por sua vez, bombeiam H⁺, para o espaço entre a membrana externa e interna da mitocôndria. Posteriormente, o par de elétrons finalmente se encontra com o O₂ formando água.

Os H^+ que foram bombeados para o espaço intermembranar são atraídos pelas cargas negativas da membrana interna da matriz mitocondrial, a passagem desses H^+ ocorre devido a ATP sintetase, que funciona como uma “bomba” unindo ADP e fosfato inorgânico para formar ATP (LEHNINGER,2000; O’NEILL; KISHTON; RATHMELL, 2016). Ao final do ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa existe uma maior produção de ATP do que ao final da glicólise (DEBERARDINIS; THOMPSON, 2012; GABER; STREHL; BUTTGEREIT, 2017).

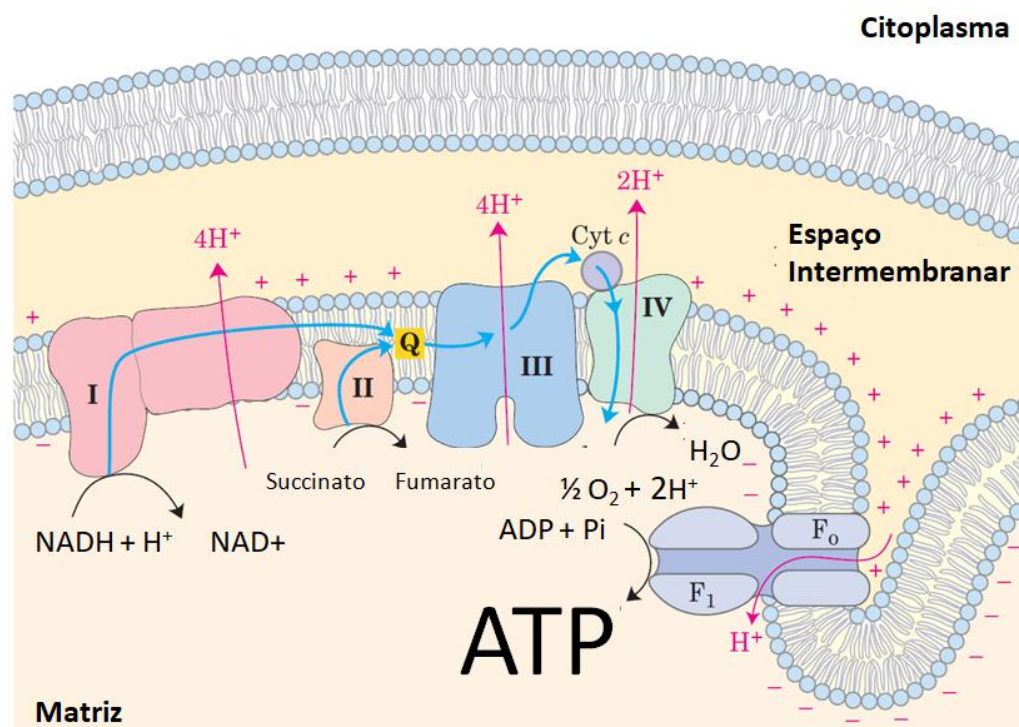


Figura 4 Esquema ilustrando o transporte de elétrons durante a fosforilação oxidativa (adaptado NELSON, COX, 2012).

1.4.4 Síntese De Ácidos Graxos

A síntese de ácidos graxos é um processo que acontece no citosol e ocorre por meio de algumas reações. Inicialmente, o acetil-CoA que foi formado na mitocôndria é transportado para o citosol, onde é condensado a oxaloacetato formando citrato por meio da citrato sintase.

Em concentrações elevadas de ATP ocorre a inibição da enzima isocitrato-desidrogenase no ciclo de Krebs, promovendo o acúmulo de citrato na mitocôndria. Esse excesso se difunde livremente do citosol para a membrana mitocondrial interna, através do

carreador do tricarboxilato. O acetil-CoA então é regenerado pelo citrato através da enzima ATP-citrato-liase.

O oxaloacetato é reduzido a malato pela desidrogenase malálica produzindo piruvato, que é retornado para a mitocôndria e NADPH. A via de síntese de ácidos graxos permite que as células produzam lipídeos que são necessários para o crescimento celular (LEHNINGER, 2000).

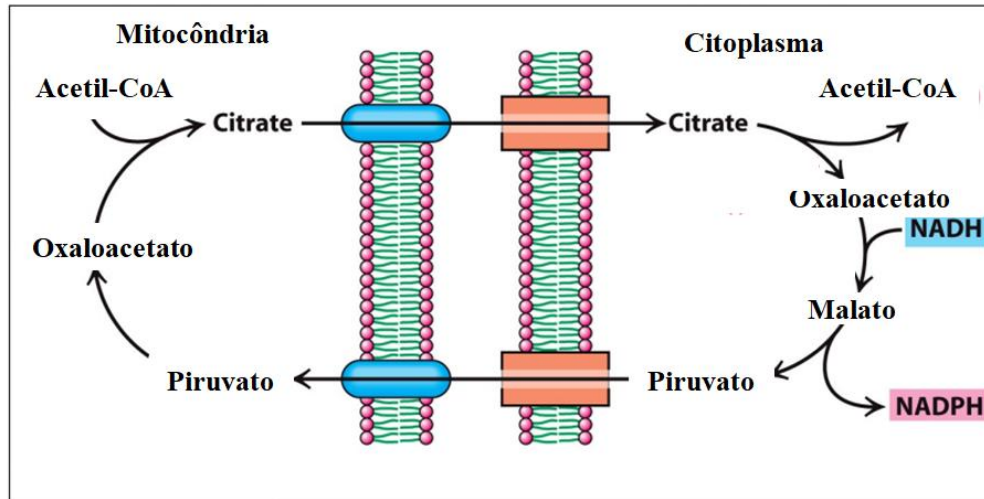


Figura 5 Síntese de Ácidos Graxos (adaptado de Biochemistry: A Short Course, 2nd Edition. 2013. W.H.Freeman and Company).

1.4.5 β -oxidação

β -Oxidação é o processo de oxidação dos ácidos graxos em moléculas de acetil-CoA, que acontece na matriz mitocondrial. A enzima acetil-CoA sintetase transformam os ácidos graxos em acetil-CoA. Para isso, os ácidos graxos passam por diversas reações que rompem a ligação C-C (carbono), até que ocorra a liberação da molécula de acetil-CoA, dois pares de elétrons e quatro prótons H^+ .

Resumidamente, β -oxidação é um processo que por meio de quatro reações sequenciais, sendo elas: oxidação, no qual o acetil-CoA é oxidado a enoil-CoA, com redução de FAD a $FADH_2$; hidratação, na qual uma dupla ligação é hidratada e ocorre a formação de 3-hidroxiacil-CoA, seguida pela oxidação de um grupo hidroxila a carbonila, tendo como resultado uma beta-cetoacil-CoA e NADH e por fim, o processo de cisão, em que o β -cetoacil-CoA reage com uma molécula de CoA formando um acetil-CoA e um acil-CoA que continua no ciclo até ser convertido a acetil-CoA.

Após esses processos, o acetil-CoA é oxidado até ser transformado em CO₂. Do ponto de vista energético, a β-oxidação é um processo rentável de energia, uma vez que, por exemplo: a oxidação completa de uma molécula de palmitato (ácido graxo) pode produzir mais de 100 moléculas de ATP (LEHNINGER,2000; O'NEILL; KISHTON; RATHMELL, 2016).

1.5 IMUNOMETABOLISMO

O imunometabolismo é uma área que vem se destacando nos últimos anos, pois estudos mostram que mudanças nas vias metabólicas podem alterar a função das células imunes (O'NEILL; KISHTON; RATHMELL, 2016). As células do sistema imunológico possuem diferentes demandas energéticas, no entanto, todas precisam manter a homeostase energética para sua sobrevivência (VAN DER ZANDE; ZAWISTOWSKA-DENIZIAK; GUIGAS, 2019; GARBER, 2017).

Otto Warburg observou que em células tumorais, mesmo na presença do oxigênio, o piruvato era preferencialmente reduzido a lactato. Ocorria uma mudança de estado metabólico da fosforilação oxidativa para a glicólise, independentemente da disponibilidade de oxigênio, esse fenômeno foi denominado efeito Warburg (WARBURG, O., GAWEHN, K. & GEISLER, A. W , 1958).

Estudos mostraram que as células em repouso, utilizam basicamente a glicose que será metabolizada e servirá como substrato no ciclo de Krebs, gerando ATP através da fosforilação oxidativa (O'NEILL; KISHTON; RATHMELL, 2016). Este processo é basicamente observado em células sem estímulos inflamatórios. Por outro lado, num contexto onde as células estão ativadas, como por exemplo, na infecção por patógenos, as células necessitam gerar energia suficiente e biomoléculas capazes de responder a demanda de ATP, portanto, ocorre uma mudança do perfil metabólico, havendo uma utilização maior da via glicolítica, culminando na formação de lactato (KRAWCZYK et al., 2010; TANNAHILL et al., 2013;(BINIECKA et al., 2016).

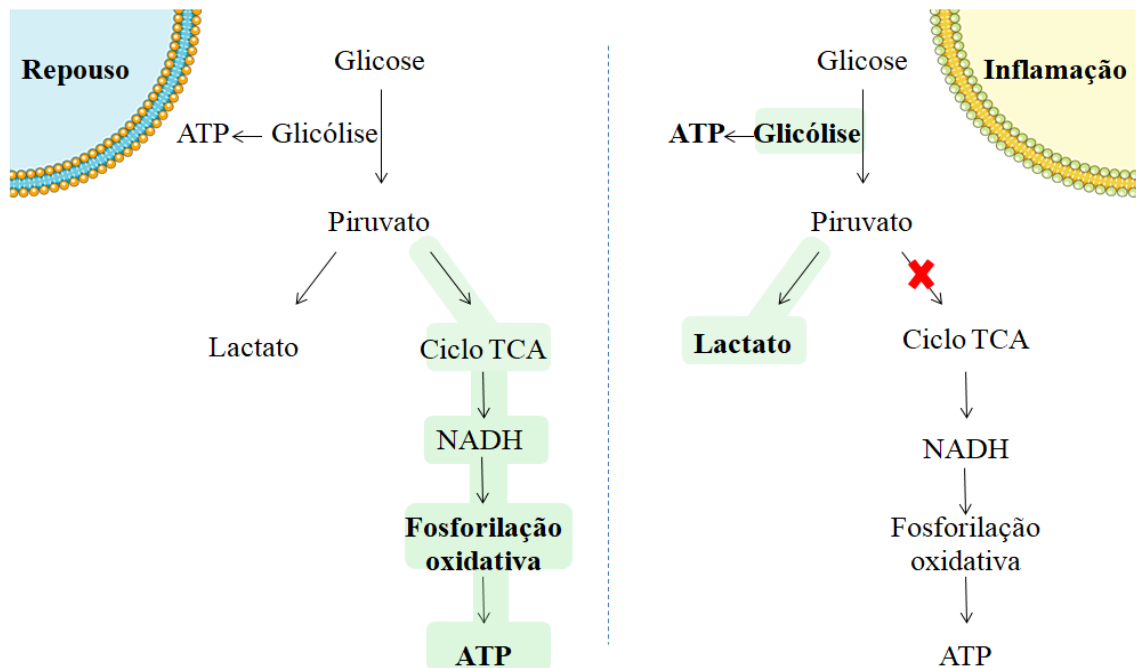


Figura 6 Imagem representativa, reprogramação metabólica (Adaptado de Kelly & O'Neill, 2015).

As células mais importantes na leishmaniose são os macrófagos, que atuam na resposta imune e, a depender da sinalização, assumem diferentes estados de ativação: M1 ou M2. Macrófagos M1 possuem um perfil inflamatório, que envolve secreção de IL-12, espécie reativa de oxigênio (ROS) e NO. Nesses macrófagos, o fator indutor de hipóxia (HIF-1 α) impulsiona a glicólise. Macrófagos do tipo M2, no entanto, possuem ação anti-inflamatória e produzem moléculas associadas ao reparo de tecidos e regulação da imunidade adaptativa. (SAUNDERS; MCCONVILLE, 2020).

Estudos indicam que macrófagos M1 possuem um perfil mais glicolítico, realizando pouca fosforilação oxidativa, enquanto macrófagos M2 demonstram um aumento na fosforilação oxidativa e diminuição da glicólise (GABER; STREHL; BUTTGEREIT, 2017; PEARCE; PEARCE, 2013). Para realizar a fagocitose de patógenos e secretar citocinas inflamatórias, macrófagos do tipo M1 precisam de ATP suficiente de forma rápida (O'NEILL; KISHTON; RATHMELL, 2016).

Embora a glicólise produza bem menos ATP a partir de uma única molécula de glicose, a biogênese mitocondrial necessária para propulsionar a fosforilação oxidativa é um processo complexo e que demanda mais tempo. Assim, altas taxas de glicólise são essenciais para rápida obtenção de ATP (O'NEILL; KISHTON; RATHMELL, 2016).

A conexão entre o metabolismo e a função dos leucócitos é regulada por diferentes fatores derivados do tecido e vias intracelulares de regulação específica do tecido e fatores de transcrição, que, ao regular a expressão de genes-chave no metabolismo e na função imunológica, atua como um elo entre esses sistemas (metabólico e imune) (WOALDER, 2017). Dentre esses fatores, moléculas derivadas de tecidos, como leptina e FAHFAs, reguladores do maquinário mitocondrial (Drp1, mitofusina 1 e 2 e OPA1), bem como sensores metabólicos (HIF-1 α , AHRs e mTOR) desempenham um papel essencial (UO et al., 2009; (SHERLEM; SEIXAS, 2017)SEO; YOON; DO, 2018). Consequentemente, alterações no metabolismo de leucócitos podem interferir diretamente na resposta imunológica (GABER; STREHL; BUTTGEREIT, 2017; KAYE; SCOTT, 2011; O'NEILL; KISHTON; RATHMELL, 2016).

Existem evidências de que *Leishmania* spp. têm a capacidade de modular o metabolismo glicídico de macrófagos, na infecção, o que resulta em interferência nas taxas de glicólise e fosforilação oxidativa (MOREIRA et al., 2015; GHOSH et al., 2015; RABHI et al., 2012). A resposta imune está intrinsecamente relacionada com a atividade metabólica, incluindo o metabolismo glicídico. Conforme discutido anteriormente, alguns patógenos interferem ou modulam a atividade leucocitária, o que inclui o metabolismo dessas células. Existem poucos relatos na literatura científica sobre a interferência que a *Leishmania* spp., exerce no metabolismo de macrófagos. Como estas células constituem o habitat para *Leishmania* spp., a compreensão das alterações no perfil metabólico induzidos pela infecção, influenciam diretamente a patogenia da doença. Este estudo tem com objetivo investigar as alterações causadas no metabolismo de macrófagos infectados por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*.

2. JUSTIFICATIVA

Muitos estudos têm focado no entendimento de como o parasito é capaz de manipular o sistema imunológico. No entanto, poucos trabalhos abordam sobre a necessidade dos parasitas utilizarem fontes de nutrientes e energia do hospedeiro para sobreviverem valendo-se da maquinaria celular do hospedeiro.

O entendimento do imunometabolismo é importante para mostrar como o estado metabólico influencia na modulação da resposta imunológica. Os patógenos intracelulares, entre eles a *Leishmania* spp, alteram ou modulam a atividade leucocitária, interferindo nas

vias metabólicas durante a infecção (MOREIRA et al., 2015; GHOSH et al., 2015; RABHI et al., 2012).

As doenças causadas por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis* são opostas considerando-se a leishmaniose cutânea e a leishmaniose difusa. Assim, hipotetizamos que as duas espécies de leishmania causariam diferentes alterações metabólicas, induzindo a diferenciação de M1 e M2 por *L.braziliensis* e *L.amazonensis*, respectivamente.

Desta maneira, os resultados do presente trabalho contribuem para o entendimento da influência e do papel das vias metabólicas para a persistência ou destruição do parasito, e assim, a patogenia da doença. Além disso, os resultados podem contribuir para detecção de possíveis alvos terapêuticos.

3. HIPÓTESE

L. amazonensis e *L. braziliensis* subvertem a reprogramação metabólica de forma antagônica, em macrófagos infectados, afetando principalmente a glicólise e fosforilação oxidativa.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

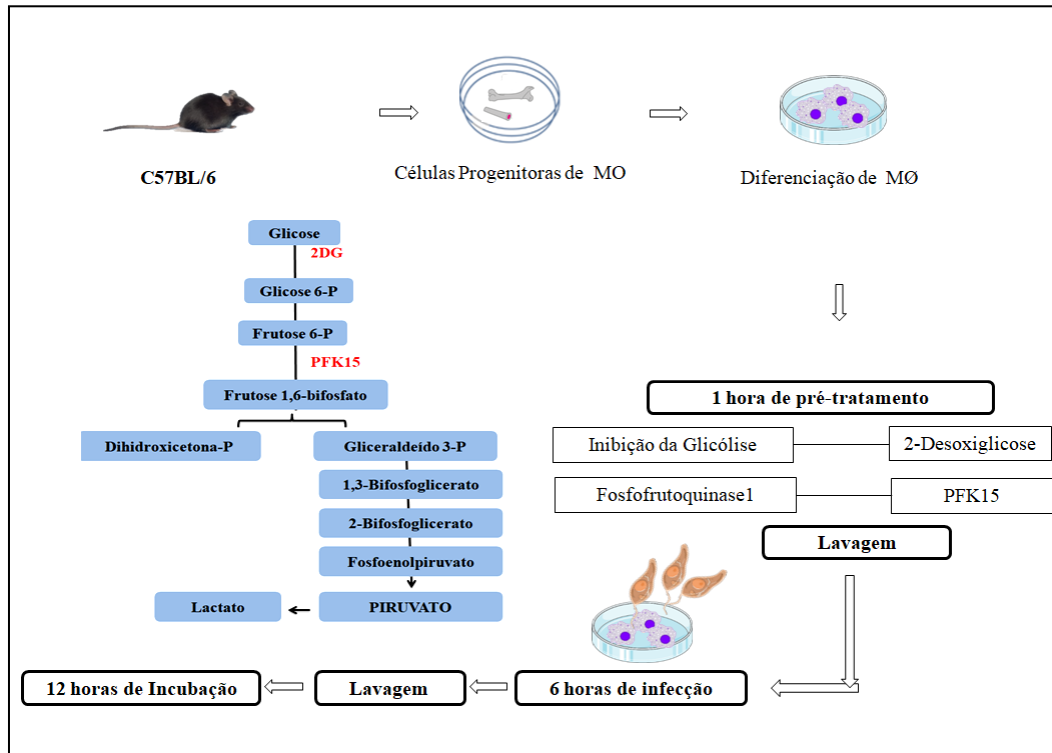
Avaliar a influência da infecção por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* no perfil metabólico dos macrófagos murinos, bem como se interferências específicas direcionadas ao metabolismo da célula infectada alteram a persistência ou eliminação do parasito.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

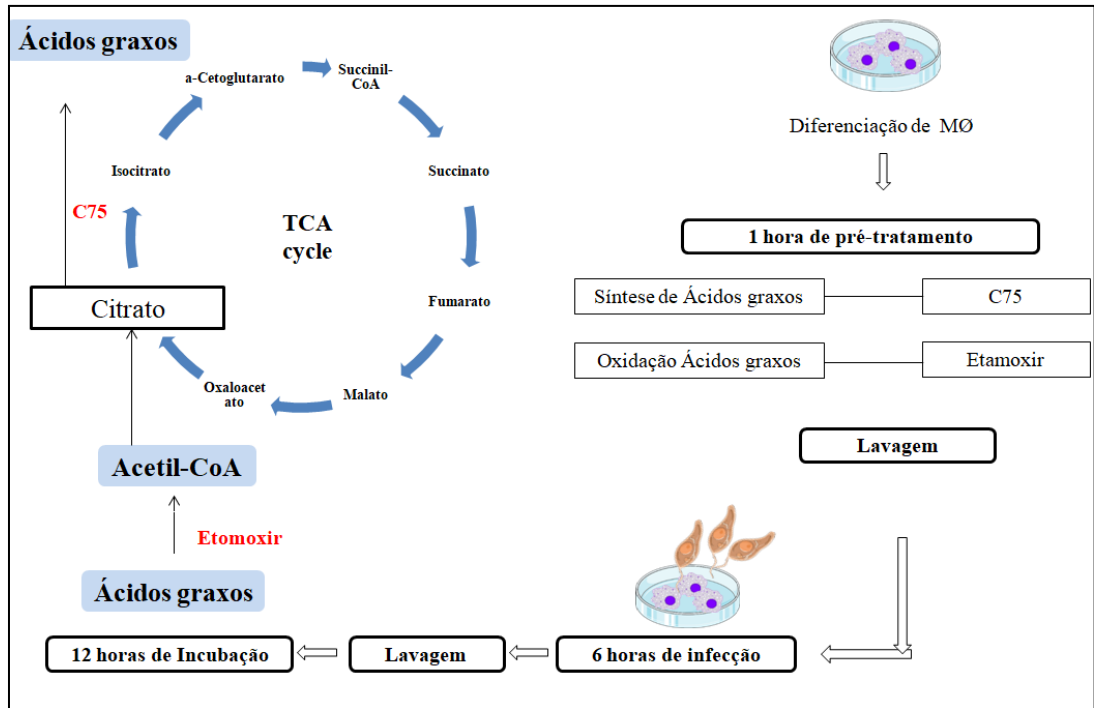
- Avaliar as taxas do metabolismo de glicólise e fosforilação oxidativa em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos infectados por *L. amazonensis* e *L.braziliensis*;
- Investigar o efeito da inibição da glicólise e da fosforilação oxidativa na suscetibilidade de macrófagos murinos à infecção por *L. amazonensis* e *L.braziliensis*;

- Avaliar se as inibições das vias metabólicas influenciam a função das mitocôndrias celulares dos macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.

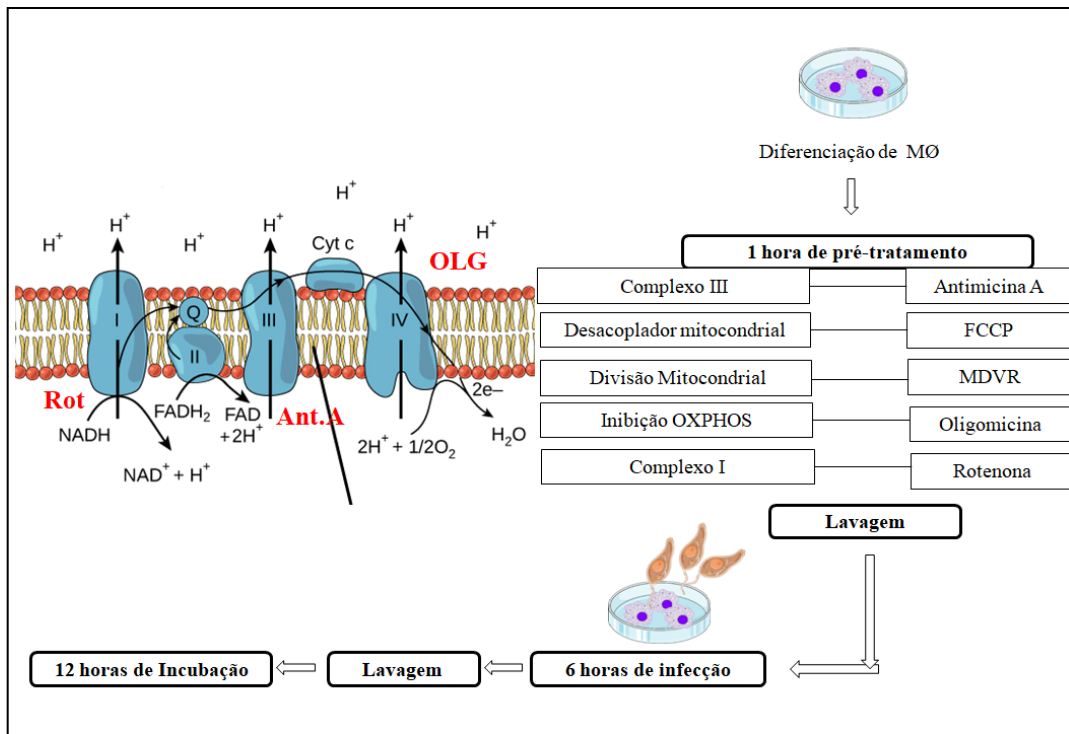
5. DESENHO EXPERIMENTAL



Inibição da via glicolítica



Inibição da síntese e oxidação de ácidos graxos



Inibição da Fosforilação oxidativa

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 (*Mus musculus*), fêmeas, com 6 a 12 semanas de idade, obtidos do biotério do IGM/FIOCRUZ-Ba, onde foram mantidos em condições controladas, em ambiente livre de patógenos. Todos os procedimentos que envolveram o uso de animais foram aprovados pelo Comitê Ético do Uso de Animais (CEUACPqGM/FIOCRUZ-Ba), sob o protocolo de número 006/2018.

6.2 DIFERENCIAÇÃO IN VITRO DE MACRÓFAGOS DA MEDULA ÓSSEA

Para obtenção dos macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs, do inglês *bone marrow derived macrophages*), foi realizada a eutanásia dos camundongos, seguida por obtenção das tíbias e dos fêmures para remoção das epífises dos ossos, uma seringa preenchida com meio de cultura RPMI (Gibco) estéril foi utilizada para extrair a medula óssea.

Após centrifugação da medula óssea, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 6 ml de meio de cultura [RPMI 1640 suplementado com 20% de soro bovino fetal inativado (Gibco), 2 mM/ml-glutamina, 100 µl/ml de penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina (Gibco) e 30% de sobrenadante de cultura de L929. As células foram plaqueadas em placas de petri e incubadas por 7 dias, à 37 °C e 5% de CO₂ para diferenciação em macrófagos. No quarto dia do cultivo, a cultura celular foi suplementada com meio RPMI contendo 30% de sobrenadante de L929. Após 7 dias de diferenciação, os BMDM's aderidos foram recuperados com o auxílio do *Cell Scraper* e lavagem da placa de cultura com solução salina, centrifugados 1500 RPM, 10 min à 4°C, ressuspenso em meio RPMI completo e contados em câmara de Neubauer para realização dos experimentos. As células foram plaqueadas em 3x10⁵ por poço em placas de 24 poço e incubadas por 24 horas para aderência dos macrófagos. Após esse período, uma hora antes da infecção, os BMDMs foram tratados com os inibidores das vias metabólicas citados abaixo, na concentração de [10 µM].

Tabela 1 Inibidores metabólicos e funções.

Inibidor	Função
2-Desoxiglicose	Inibição da glicólise
PFK15	Inibição da fosfofrutoquinase-1
C75	Inibição da síntese de ácido graxo
Antimicina A	Inibição do complexo III
FCCP	Inibição do desacoplador mitocondrial
MDVIR	Inibição da fissão mitocondrial
Oligomicina	Inibição da ATP sintetase
Rotenona	Inibição do complexo I
Etomoxir	Inibição da B-oxidação

6.3 CULTURA DE *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis* E INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS

Promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/87/BA125) e *L. braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) foram mantidas em meio Schneider (Sigma Aldrich, St Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco), 2mM/mL de L-glutamina, 100 µl/ml de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina (Gibco) a 27°C até a fase estacionária. Os macrófagos foram tratados com os inibidores uma hora antes da infecção e posteriormente foram infectados com *L. amazonensis* na proporção de 5:1 e para *L.braziliensis* 20:1 parasitas por célula em meio RPMI 1640 à 37°C, 5% CO₂ por 6 horas.

Essa diferente proporção da relação parasita/macrófago permitiu uma taxa de infecção do macrófago similar entre *L. amazonensis* e *L. braziliensis* Após esse período, as células foram lavadas com solução salina (cloreto de sódio 0,9%) para remover os parasitas extracelulares. A seguir, as células infectadas foram cultivadas por 12 horas. Este período de

tempo foi também padronizado para termos condições de infecção similares entre *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.

6.4 DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA E TAXAS DE INFECÇÃO EM MACRÓFAGOS

Doze horas após a infecção, lamínulas com macrófagos infectados foram fixadas e coradas com hematoxilina / eosina (H&E). Para determinar a taxa de infecção de macrófagos, o mínimo de 100 células foram contadas por condição experimental e analisadas em microscopia óptica. A carga parasitária dos macrófagos foi determinada pela contagem do número de amastigotas dentro de cada célula infectada encontrada na contagem total de células, nas diferentes condições testadas.

6.5 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Após o tratamento com inibidores metabólicos e com dimetilsulfóxido (DMSO), veículo aos quais os inibidores foram homogeneizados, as células foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular. Foram utilizados marcadores celulares com o conjunto reativo de 5 µL de anexina V-FITC e 10 µL de iodeto de propídio para incubar as células por 30 minutos de repouso ao abrigo da luz, posteriormente as células foram lavadas com tampão FACS , a fluorescência das células foi imediatamente determinada em citômetro de fluxo.

6.6 ENSAIO DO MITOSOX™ RED

Para analisar a produção de super óxido mitocondrial, as células que foram previamente tratadas com os inibidores das vias metabólicas e seguidas a subsequente infecção, foram incubados por 30 minutos com 5µM da sonda fluorescente MITOSOX™ RED (Invitrogen). Posteriormente, a cultura de células foi lavadas com PBS e as amostras seguidas para análise de detecção por citometria de fluxo (LRS Fortessa, BD Biosciences, San Diego, CA, USA).

6.7 ENSAIO MITOTRACKERS

Após o tratamento com os inibidores das vias metabólicas e subsequente infecção, os BMDM's foram incubados por 30 minutos com 50nM da sonda MitoTracker Green e 125 nM da sonda MitoTracker Red, para análise da massa mitocondrial e do potencial de membrana mitocondrial, respectivamente. A avaliação da função mitocondrial foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (ThermoFisher Scientific) e mitocôndrias disfuncionais caracterizadas conforme descrito anteriormente (Ip et al., 2017). Utilizando a combinação do MitoTracker Green (coloração mitocondrial independente de $\Delta\psi_m$) com MitoTracker Red (coloração mitocondrial dependente de $\Delta\psi_m$) para distinguir entre as mitocôndrias respiram e mitocôndrias disfuncionais, correlacionando com uma maior complexidade intracelular refletida pelo sinal de dispersão lateral (SSC) medido por citometria de fluxo. As amostras foram adquiridas usando o software FACSuite (BD Biosciences) e analisado usando Software FLOWJO (BD).

6.8 CELLROX

Para quantificar a produção de espécies reativas de oxigênio dos BMDM's após o tratamento com os inibidores e infecção por *Leishmania spp.* os BMDM's foram incubados por 30 minutos com 5 μ M da sonda fluorescente CellROX Green (Thermo fisher Scientific, IL, EUA). Em seguida, as células foram lavadas três vezes com 1x PBS (Gibco), fixadas e coradas com reagente antifade DAPI e ProLong Gold (Thermo fisher Scientific, IL, EUA) e seguidas para análises na microscopia eletrônica de fluorescência (Modelo DMi8, Leica), as imagens foram analisadas através do software ImageJ 1.52a (National Institutes of Health, EUA).

Foram selecionadas e analisadas aproximadamente 30 células em cada condição experimental, utilizando a mensuração de área, densidade integrada, cinza médio e mediana. Foram realizadas medidas em áreas sem fluorescência em locais adjacentes às células. Os valores obtidos foram submetidos a análises, gerando a Fluorescência celular total corrigida (CTCF), originada através do cálculo: $CTCF = \text{Densidade integrada} - (\text{área da célula selecionada} \times \text{fluorescência média das células})$.

6.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados analisados seguiram padrão de distribuição não-paramétrica. As análises foram realizadas utilizando o teste Mann-Whitney para avaliar dois grupos e o teste Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn para análise de três ou mais grupos. Os valores foram expressos como mediana com desvio do interquartil. Todos os testes foram executados utilizando o software GraphPad 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA-USA). As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$, utilizando-se um intervalo de confiança de 95%.

7. RESULTADOS

7.1 A INFECÇÃO POR *L.amazonensis* E *L.braziliensis* AUMENTAM AS TAXAS DE GLICÓLISE E DE FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

Para avaliar como a infecção por *Leishmania amazonensis* e *L.braziliensis* interfere no perfil metabólico de macrófagos e no seu estado energético, quantificamos a taxa de acidificação extracelular (ECAR; refletindo as taxas de glicólise) e o consumo de O_2 mitocondrial (OCR; refletindo as taxas de fosforilação oxidativa), utilizando análise de fluxo extracelular de células vivas no aparelho SEAHORSE XF24 (Bioscience).

A análise de ECAR mostrou que com a adição de glicose, os macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*, tornam-se mais glicolíticos, apresentando assim, uma maior taxa de glicólise (processo de conversão de glicose em piruvato) (Fig. 5A). Com a introdução da Oligomicina (inibidor da ATP sintetase) a célula é forçada a produzir ATP pela via glicolítica em sua capacidade máxima. Assim, é possível observar que a capacidade glicolítica aumenta, pois a célula realiza mais glicólise, incrementado assim, a capacidade glicolítica, sendo maior no grupo infectado por *L.amazonensis* e por *L. braziliensis* (Fig. 7C). Além disso, a reserva glicolítica, capacidade da resposta celular a uma demanda energética, é maior nos grupos infectados, significativamente nos macrófagos infectados por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (Fig. 7D). Por fim, as taxas de glicólise de ambos os grupos caem após a acidificação não glicolítica (introdução do 2DG). É notável que durante todo o processo, as taxas de ECAR de ambos os grupos infectados foram superiores ao controle não infectado.

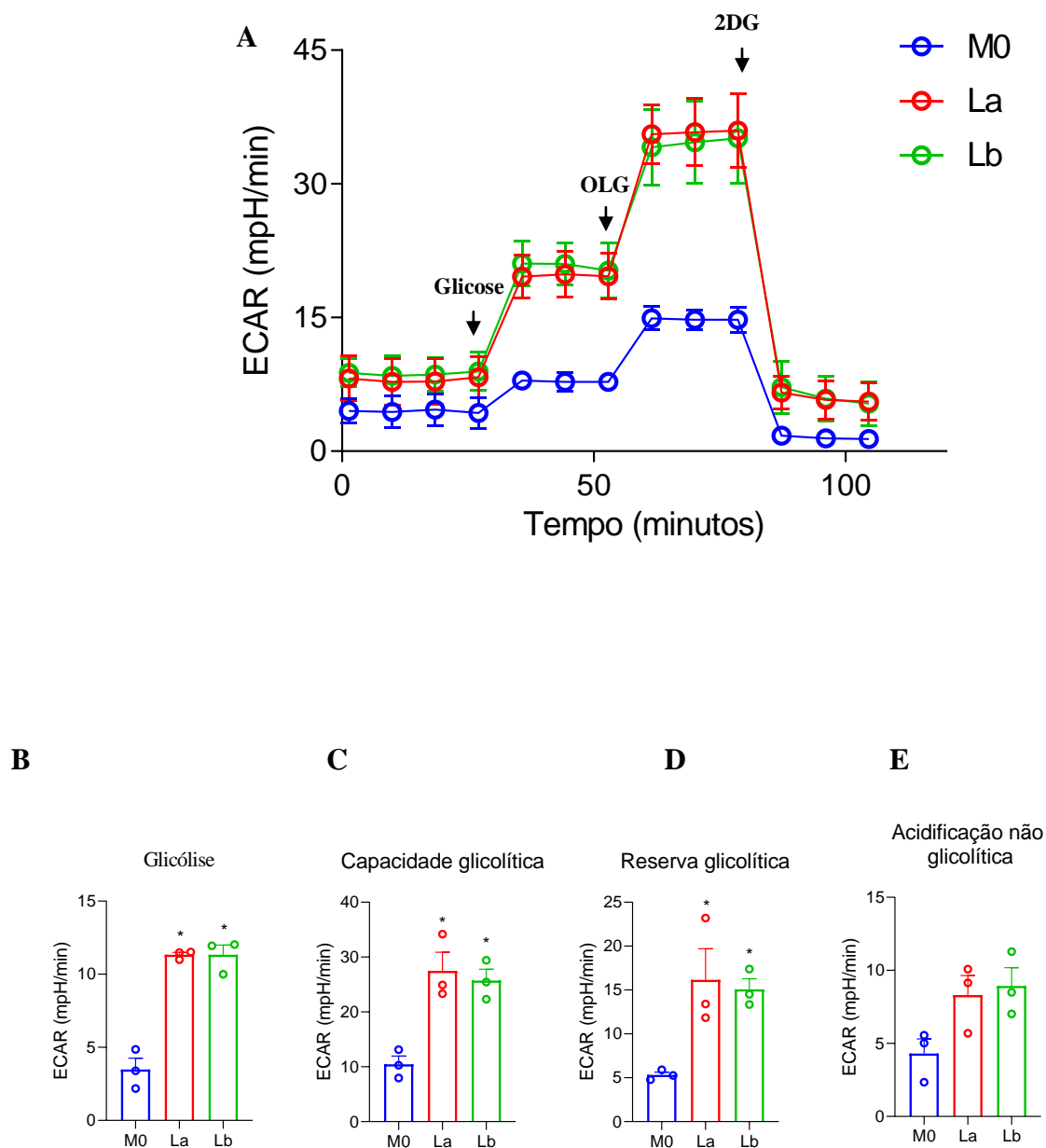
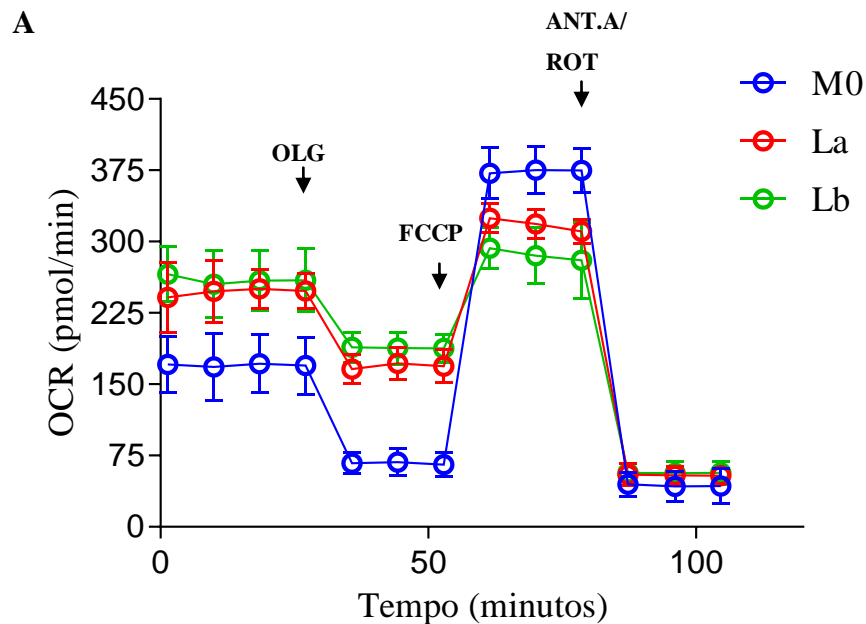


Figura 7 Análise da taxa de acidificação extracelular (ECAR). A) Alterações em tempo real no ECAR de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6 (MØ), infectados com La (*Leishmania amazonensis*) e Lb (*Leishmania braziliensis*) por 6 horas e incubados por mais 12 horas após a infecção. B) Taxa de glicólise. C) Análise da capacidade glicolítica. D) Reserva glicolítica. E) Acidificação não glicolítica, n = 3. Teste de Mann-Whitney. * p < 0,05.

Em relação ao consumo de oxigênio, níveis basais elevados de OCR foram observados nas células infectadas, sugerindo que durante a infecção, as células realizam maior respiração mitocondrial (Fig. 8A). Após adição da oligomicina (inibidor da ATP sintetase) induzimos uma diminuição da produção de ATP, no entanto, nas células infectadas essa produção é menor (OCR maior) quando comparada ao grupo controle (Fig. 8B). Ainda neste parâmetro é

possível observar, que o vazamento de prótons remanescentes da respiração basal aumenta nas células infectadas, sugerindo possível disfunção mitocondrial (Fig 8C). A Adição de FCCP (desacoplador mitocondrial) estimula a cadeia respiratória a operar em sua capacidade máxima, entretanto, as células infectadas apresentam diminuição dessa capacidade. Além disso, apresentam diminuição na capacidade de reserva sobressalente, indicando diminuição da capacidade da célula responder à demanda energética (Fig. 8D e 8E). Não foi observada diferença estatística na respiração não mitocondrial (acidificação não glicolítica) entre os grupos.



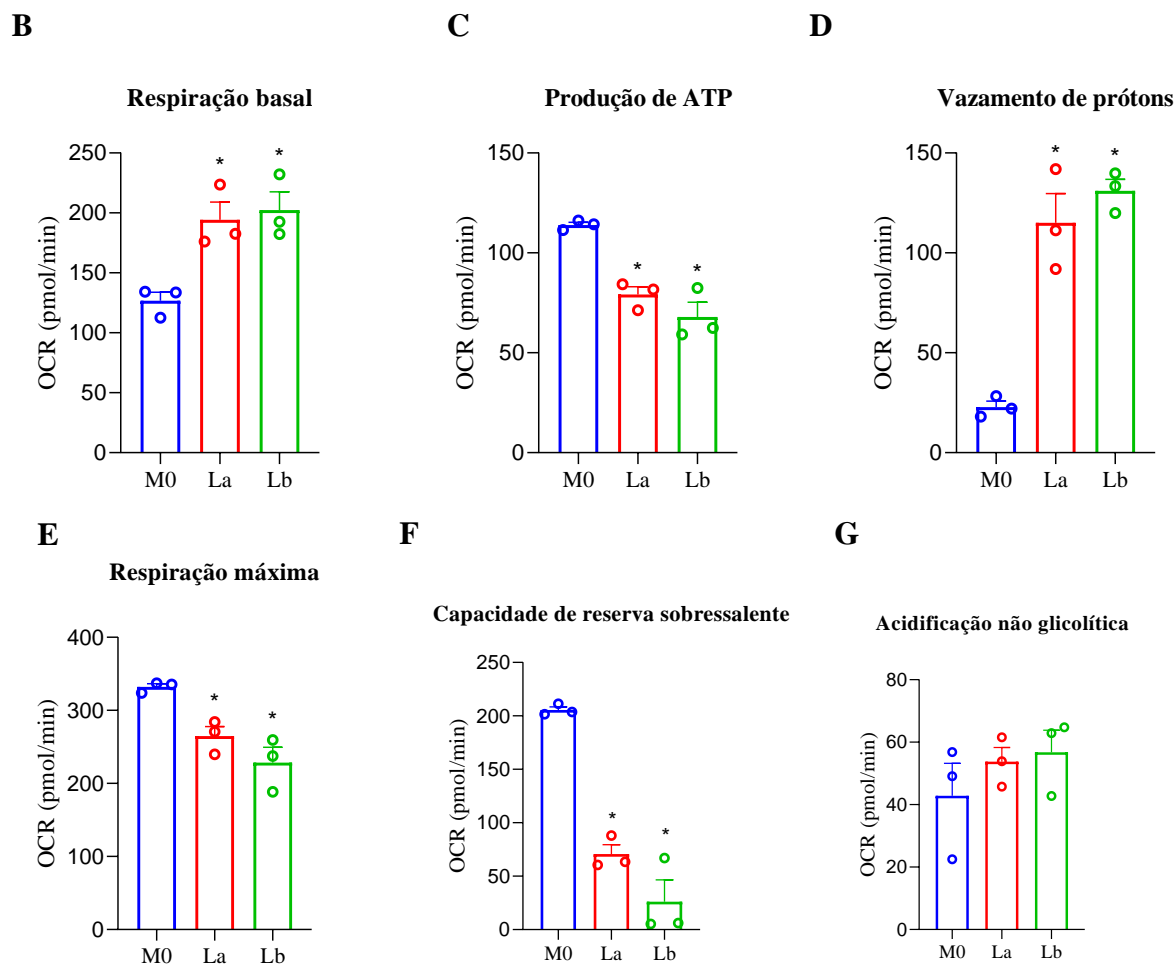


Figura 8 Análise da taxa de consumo de O₂. A) Mudanças em tempo real no OCR de macrófagos derivados da medula óssea (MØ) infectados com La (*Leishmania amazonensis*) e Lb (*Leishmania braziliensis*) por 6 horas e incubados por mais 12 horas após a infecção. Mesma observação anterior mostrar em que tempo são adicionados os produtos que alteram a curva. B) Taxa de respiração basal. C) Produção de ATP. D) Vazamento de prótons E) Capacidade respiratória máxima. F) Capacidade de reserva sobressalente. H) Acidificação não glicolítica, n = 3. Teste de Mann-Whitney. * p < 0,05.

Em resumo, a infecção por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* altera o estado energético da célula infectada quando comparada ao grupo controle. É possível observar no mapa de energia mensurado através dos valores de ECAR e OCR, que os BMDM infectados apresentam um perfil mais energético e glicolítico, enquanto o grupo controle exibe um perfil mais aeróbico e quiescente (Fig. 9).

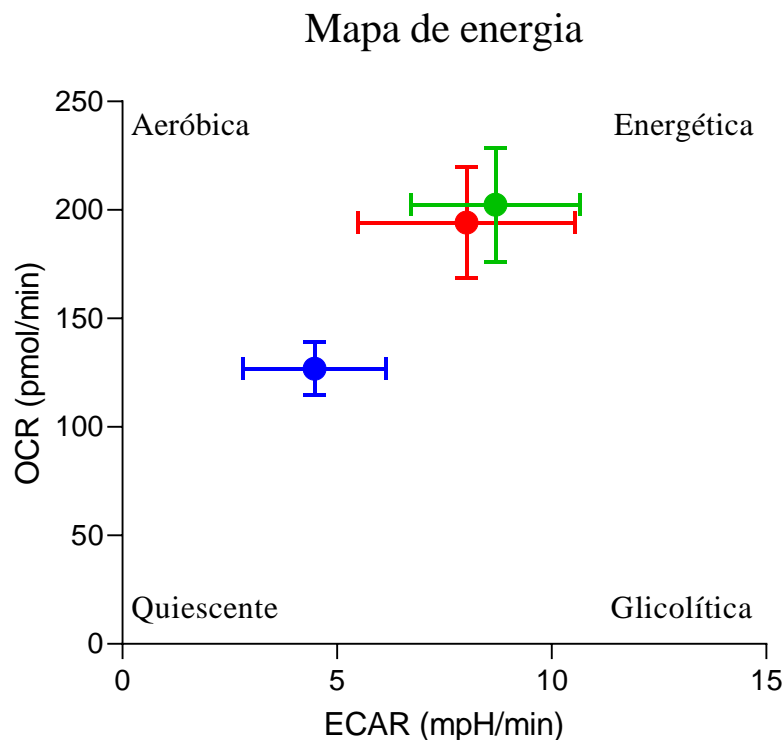


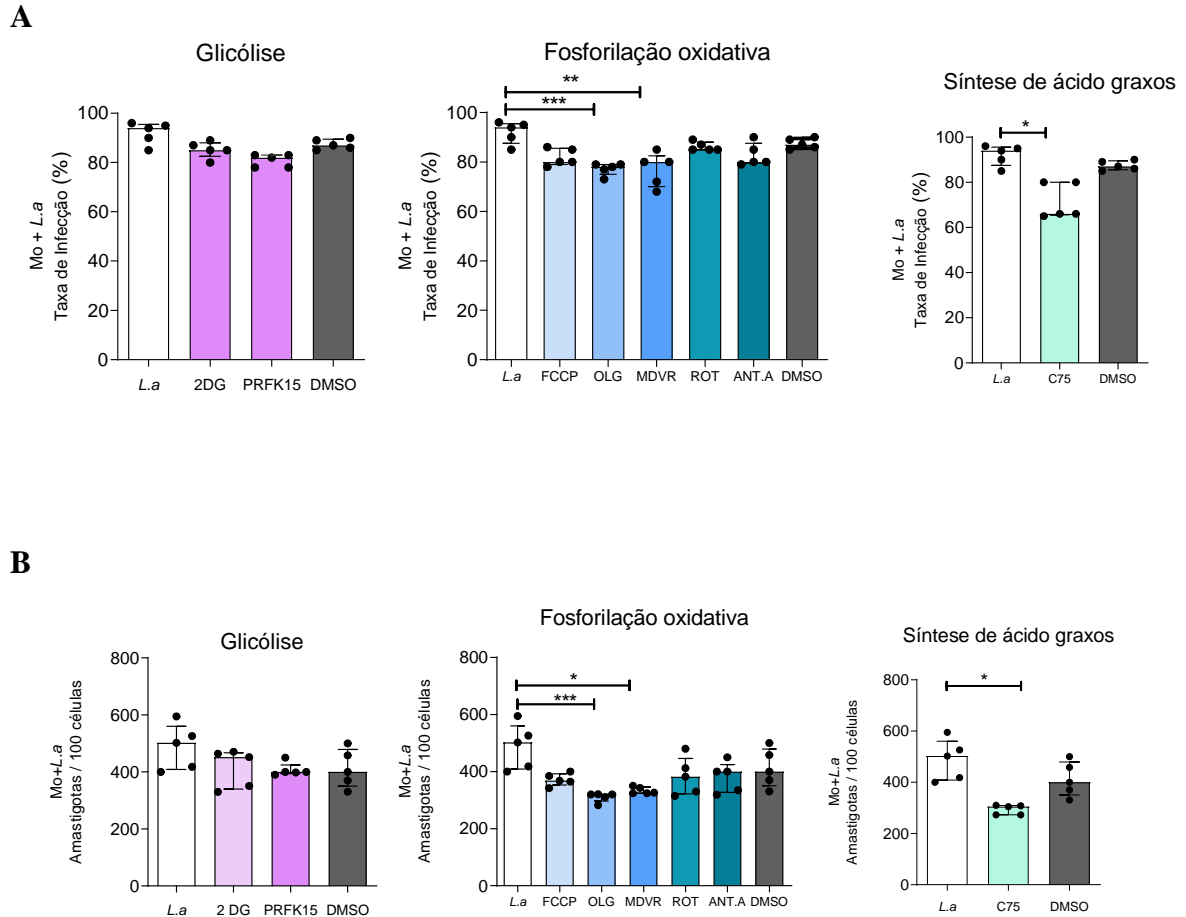
Figura 9 Alterações no perfil energético dos BMDMs. O mapa de energia mostra o estado de energia da célula, de acordo com a acidificação extracelular (ECAR) e a taxa de consumo de O₂ (OCR), permitindo que a célula infectada seja mais glicolítica e mais energética. Os índices foram determinados por meio de análise no SEAHORSE XF24.

7.2 BMDM Pré- TRATADOS COM OLIGOMICINA APRESENTAM DIMINUIÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA E DA TAXA DE INFECÇÃO

Pouco se sabe a respeito da manipulação de nutrientes e fontes de energia do hospedeiro utilizadas por parasitas do gênero *Leishmania* (MOREIRA et al., 2015). Para avaliar a influência das vias metabólicas na proliferação e eliminação dos parasitas, submetemos os macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) ao tratamento com drogas inibidoras das principais vias metabólicas (glicólise, fosforilação oxidativa e síntese de Ácidos Graxos) por 1 hora antes da infecção com *L.amazonensis* e *L.braziliensis*.

É possível observar que não houve diferenças estatisticamente significantes na taxa de infecção e na carga parasitária entre os grupos que foram tratados com os inibidores que atuaram na via glicolítica (2DG e PFK15). No entanto, a taxa de infecção e da carga parasitária dos grupos tratados com Oligomicina e MDVIR e infectados com *L.amazonensis* apresentaram diminuição significativa quando comparadas ao grupo controle. Além disso, observamos diminuição significativa da taxa de infecção e carga parasitária dos grupos tratados com C75 em comparação com o grupo controle (Fig. 10A e 10B).

Em relação à *Leishmania braziliensis*, é possível observar que o padrão da taxa de infecção e da carga parasitária, se comportam de forma semelhante à descrita para *L. amazonensis* quando utilizou-se a oligomicina, MDVIR e C75. (Fig. 11A e 11B).



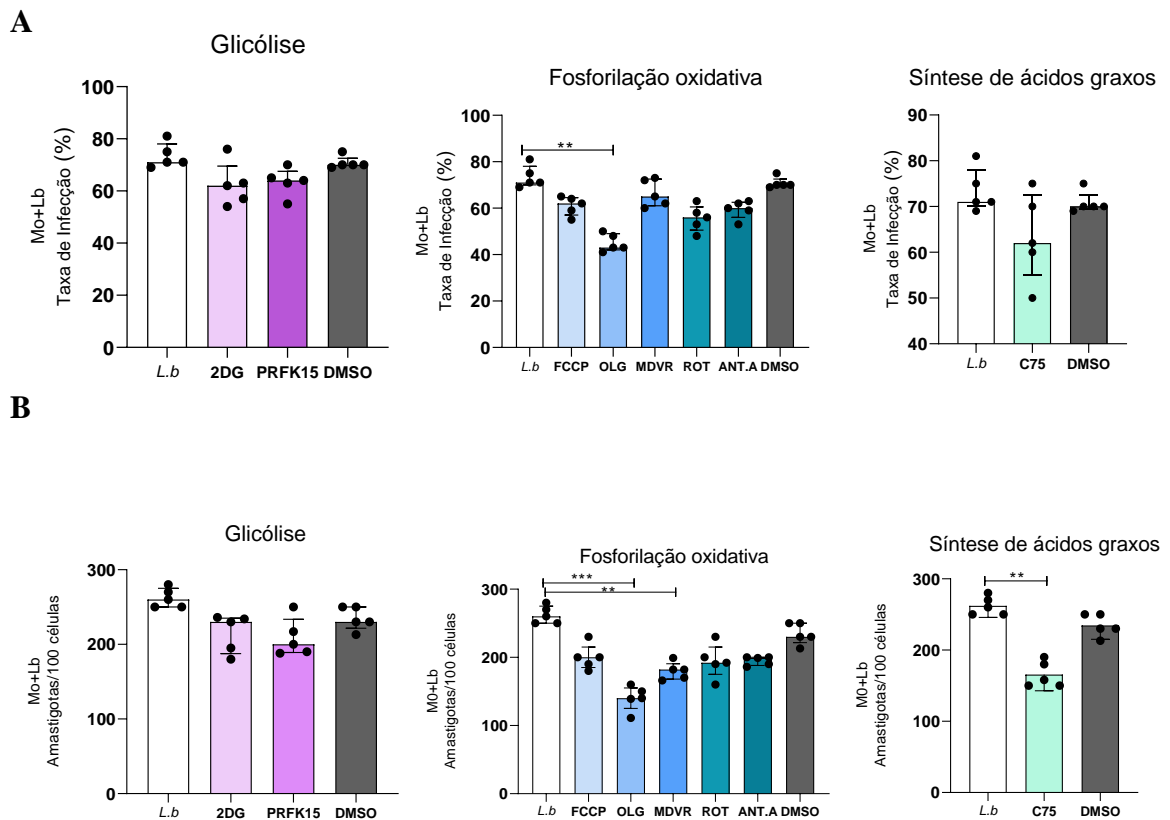


Figura 11 Taxa de infecção e carga parasitária de BMDMs tratados com inibidores metabólicos. Os BMDMs foram tratados com os inibidores, 1 hora antes da infecção, que durou 6 horas. A após esse período os BMDMs foram lavados para retirada dos parasitas não internalizados e posteriormente foram incubadas por 12 horas. A) Taxa de infecção de BMDMs por *L. braziliensis* sob influência dos inibidores de vias metabólicas. B) Carga parasitária de BMDMs infectados por *L. braziliensis* sob a influência de inibidores de vias metabólicas, representando o número de amastigotas internalizadas em 100 BMDMs. Ambos os índices foram determinados através de microscopia óptica. MØ, macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs); 2DG, 2-desoxiglicose; PRFK15, Fosfofrutoquinase; FCCP; OLG, Oligomicina; MDVR; ROT; Rotenona; Ant A, Antimicina A; C75 e DMSO, n=5. Teste de Kruskal-wallis com pós-teste de Dunn. ** p < 0,01, ***, p < 0,001.

Esses dados indicam que a metabolismo mitocondrial pode ser importante para persistência e proliferação do parasita, uma vez que ao inibir a via da fosforilação oxidativa com a oligomicina, tivemos redução tanto da carga parasitária quanto da taxa de infecção.

7.3 A UTILIZAÇÃO DOS INIBIDORES E DO DMSO NÃO INTERFEREM NA VIABILIDADE CELULAR

Para investigar se os efeitos da diminuição de carga parasitária e taxa de infecção observada em BMDMs tratados com os inibidores metabólicos, realizamos o ensaio de viabilidade celular utilizando os marcadores Anexina V e iodeto de propídio pra marcar células em estágios iniciais de apoptose e células necróticas ou inviáveis respectivamente.

Verificamos que o tratamento com os inibidores metabólicos, bem como, o veículo DMSO utilizado para homogeneizar os mesmos não causam danos às células (Fig. 12). Esse dado nos permite inferir que as observações a cerca das interferências vistas na carga parasitária e na taxa de infecção é ocasionado devida ação dos inibidores metabólicos nas células do hospedeiro.

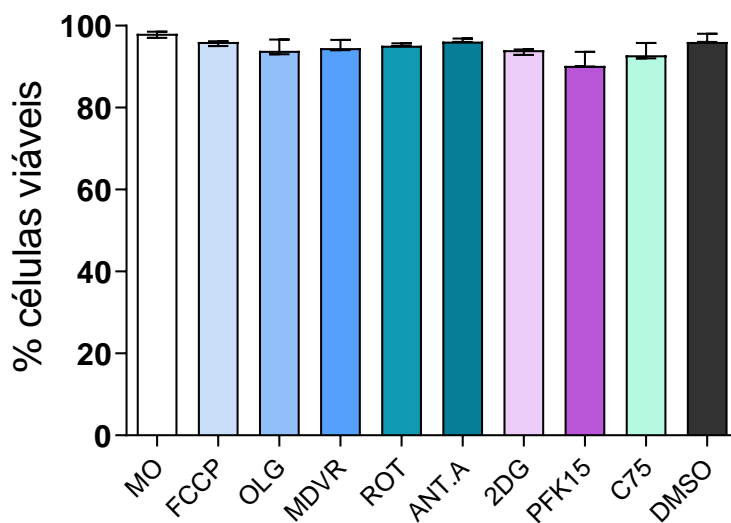


Figura 12 Viabilidade celular após tratamento com os inibidores metabólicos. Os BMDMs foram tratados com os inibidores metabólicos durante 1 hora, posteriormente foi realizada a marcação e incubação das células por 30 minutos com anexina v e iodeto de propídio ao repouso do abrigo da luz, em seguida, as células foram lavadas e seguidas para análises da fluorescência celular determinada por citometria de fluxo. MØ, macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) sem tratamento; FCCP; OLG, Oligomicina; MDVR; ROT, Rotenona; A, Antimicina A; 2DG, 2-desoxiglicose; PFK15, Fosfofrutoquinase; C75 e DMSO, n=3. Teste Kruskal- Wallis e pós-teste de Dunn.

7.4 INTERFERÊNCIA DO COMPLEXO I E III DA CADEIA TRANSPORTADORA DE ELÉTRONS

Para entender a influência do metabolismo mitocondrial nas reduções dos parâmetros discutidos acima, investigamos os complexos mitocondriais da cadeia transportadora de elétrons, utilizando inibidores que atuam diretamente nos complexos I e III.

Os BMDMs foram tratados com oligomicina, juntamente com os inibidores do complexo I (Rotenona) e do complexo III (Antimicina), para analisar se a inibição desses complexos conseguiria restaurar a carga parasitária e a taxa de infecção causada pela

utilização da oligomicina na inibição do complexo IV e conseqüentemente, inibição da produção de ATP.

Constatamos que não houve restauração da taxa de infecção e da carga parasitária na infecção de *Leishmania amazonensis*, adicionando os inibidores do complexo I e III juntamente com a oligomicina, sendo que, ao se adicionar o inibidor do complexo I percebe-se uma diminuição da carga parasitária e da taxa de infecção semelhante ao grupo tratado somente com oligomicina. Esses dados indicam que esses complexos não restauraram os parâmetros analisados (Fig. 13A e 13B). No entanto, os BMDMs tratados e infectados com *Leishmania braziliensis* tendem a ter um aumento na mediana dos grupos tratados com antimicina e rotenona, embora esses dados não possuam significância estatística, eles nos permitem questionar possíveis diferenças em restaurações de carga parasitária e taxa de infecção entre *La* e *Lb*, mais estudos deverão ser realizados com a finalidade de aumentar o tamanho da amostra e elucidarmos essas questões (Fig. 13 C e 13D).

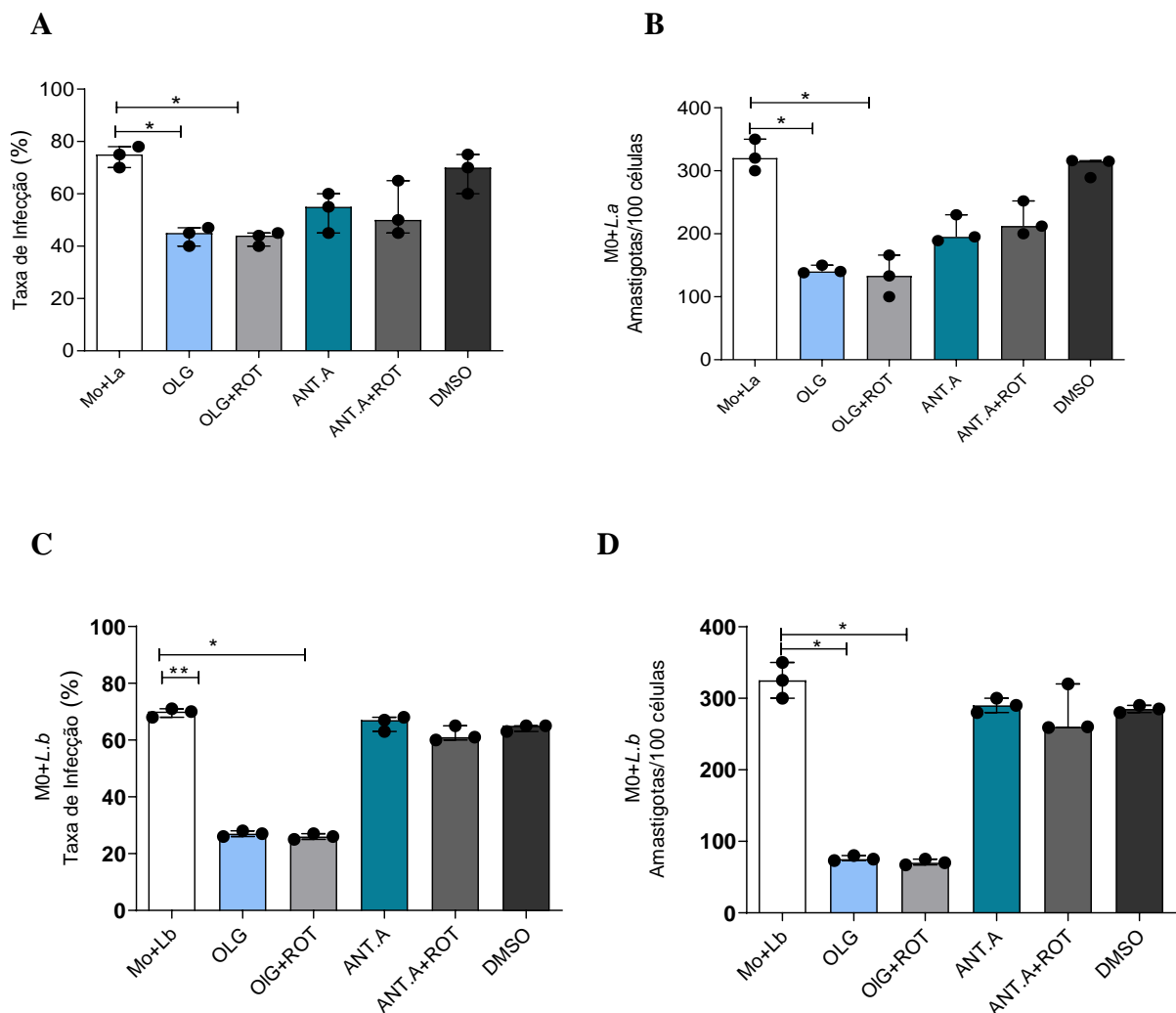


Figura 13 Interferência dos complexos mitocondriais (I e III) na diminuição da carga parasitária e taxa de infecção. A) Taxa de infecção de BMDMs por *L.amazonensis* sob influência dos inibidores do complexo I e III da cadeia transportadora de elétrons. B) Carga parasitária de BMDMs infectados por *L. amazonensis* sob a influência dos inibidores do complexo I e III da cadeia transportadora de elétrons, representando o número de amastigotas internalizadas em 100 BMDMs. C) A) Taxa de infecção de BMDMs por *L.braziliensis* sob influência dos inibidores do complexo I e III da cadeia transportadora de elétrons. D) Carga parasitária de BMDMs infectados por *Lbraziliensis* sob a influência dos inibidores do complexo I e III da cadeia transportadora de elétrons, representando o número de amastigotas internalizadas em 100 BMDMs. Ambos os índices foram determinados através de microscopia óptica. MØ, macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs); La; *Leishmania amazonensis*; OLG, Oligomicina; ROT; Rotenona; Ant A, Antimicina A; e DMSO, n= 3. Teste de Kruskal-wallis com pós-teste de Dunn. * p < 0,05, ** p < 0,01.

7.5 Inibição da Fosforilação oxidativa com Oligomicina aumenta a produção de Espécies Reativas de Oxigênio Mitocondrial (mtROS).

Para avaliar a influência das mtROS na diminuição da carga parasitária e da taxa de infecção causada pelo tratamento com oligomicina, realizamos o ensaio de Mitosox. A infecção com *Leishmania spp.* parece diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio mitocondriais (FIG. 14) fato que poderia estar relacionado aos mecanismos de evasão por esses parasitas intracelulares. O tratamento dos BMDMs com oligomicina aumenta a produção de ROS mitocondrial, sugerindo que o a diminuição da carga parasitária e taxa de infecção causada pelo tratamento com oligomicina pode estar relacionada ao aumento de mtROS. No entanto, esses dados são preliminares e não possuem significância estatística, sendo necessária a repetição desses experimentos com a finalidade de aumentar o tamanho da amostra.

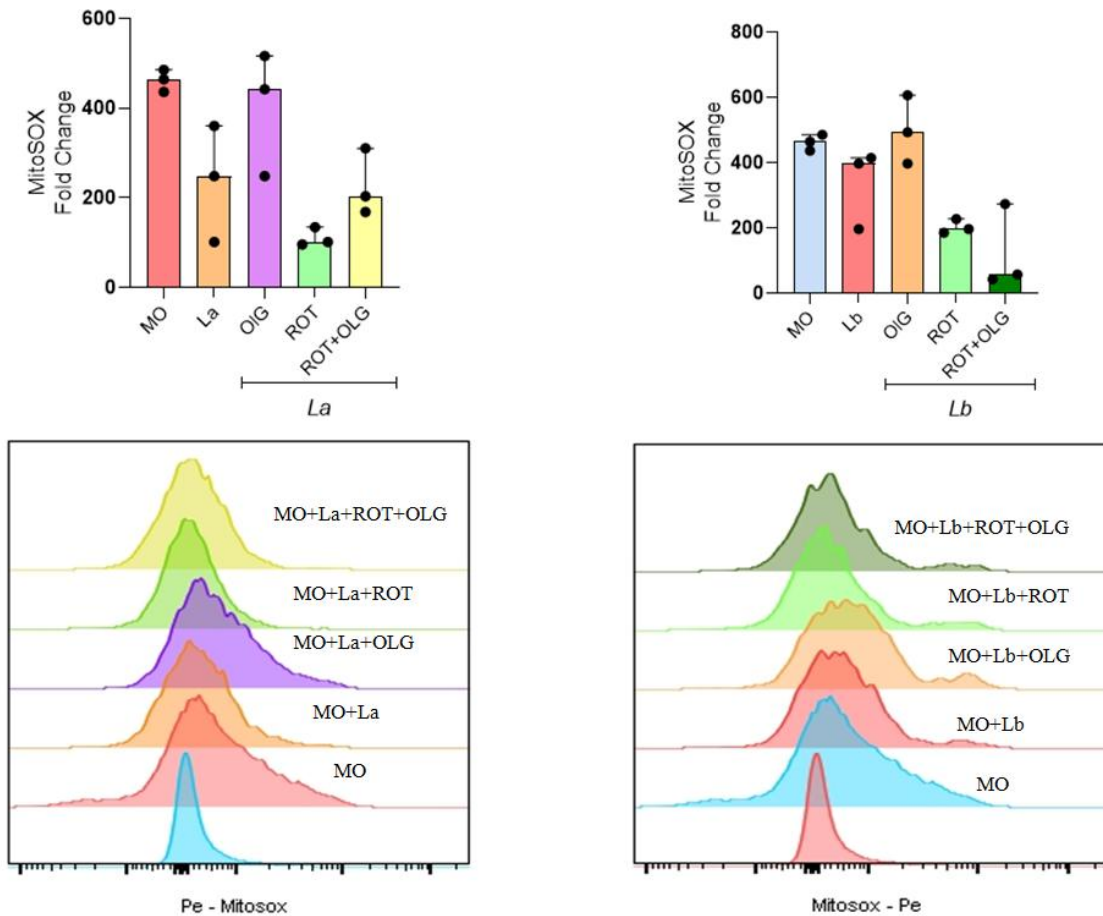


Figura 14 Análise da produção de superóxido mitocondrial (MitoSOX). A análise de (mitoSOX) foi avaliada por citometria de fluxo em BMDMs 12 horas após tratamento e infecção. MØ, macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs); La; *Leishmania amazonensis*; Lb; *Leishmania braziliensis*; OLG, Oligomicina; ROT; Rotenona; Ant A, Antimicina A; n=3 Kruskal-wallis e pós teste de Dunn.

7.6 OLIGOMICINA INDUZ AUMENTO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO CELULAR

O processo de oxidação é parte fundamental no metabolismo celular e geração de energia durante a produção de ATP, esse processo de perda de elétrons acaba produzindo radicais livres que possuem elétrons desemparelhados, denominados de espécies reativas de oxigênio (ROS) (BARREIROS et al., 2006; CELI, 2010; OLIVEIRA & SCHOFFEN, 2010).

Como a oligomicina interfere diretamente na produção de ATP, buscamos avaliar os possíveis efeitos que a inibição dessa via causaria na produção de espécies reativas de oxigênio. Nossos dados mostram que o tratamento dos BMDM com o inibidor da fosforilação oxidativa, interfere diretamente na produção de espécies reativas de oxigênio, apresentando

um aumento significativo da Fluorescência Celular Total Corrigida (CTCF) dos grupos tratados e infectados (Fig. 15A e 15B).

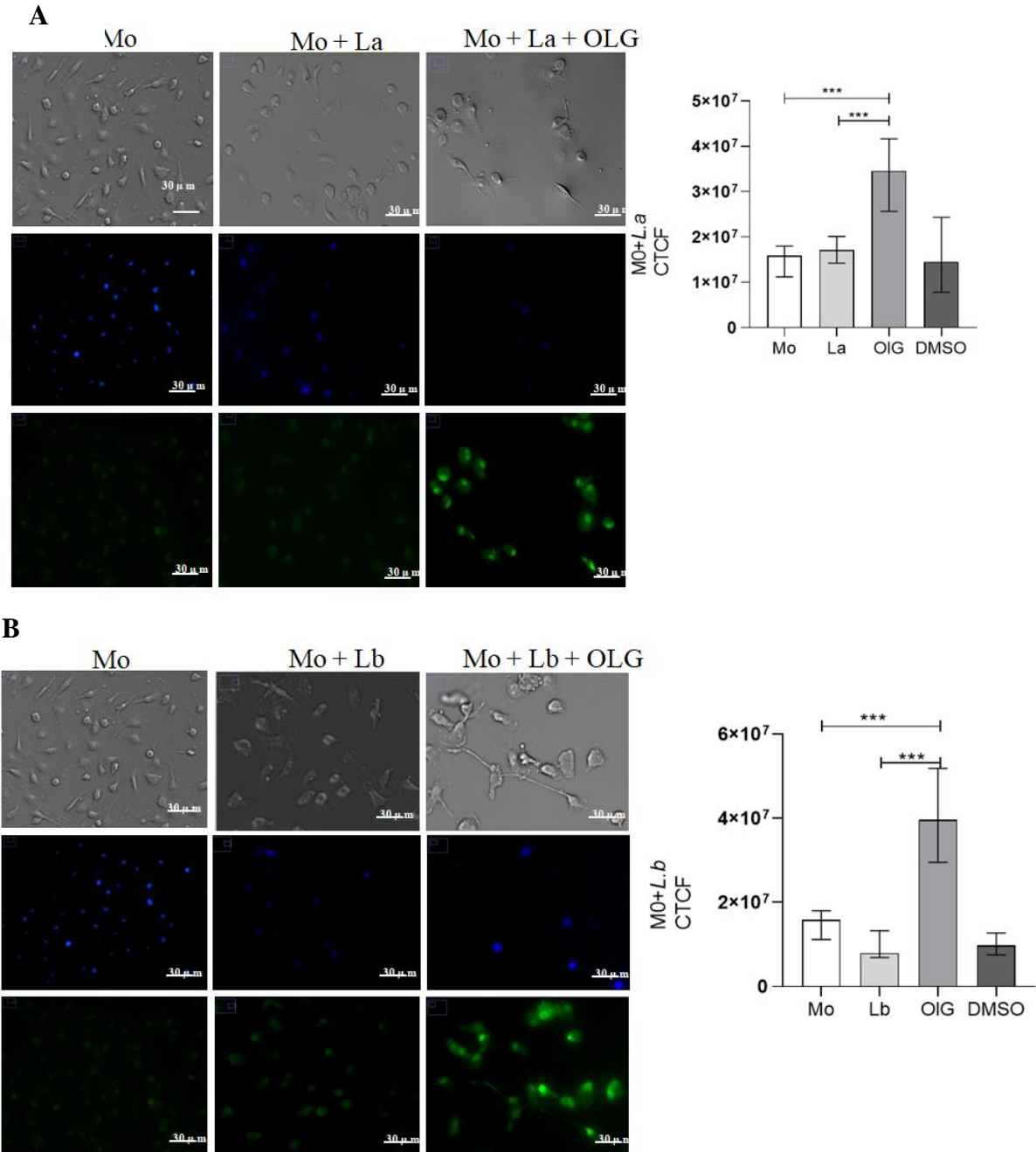
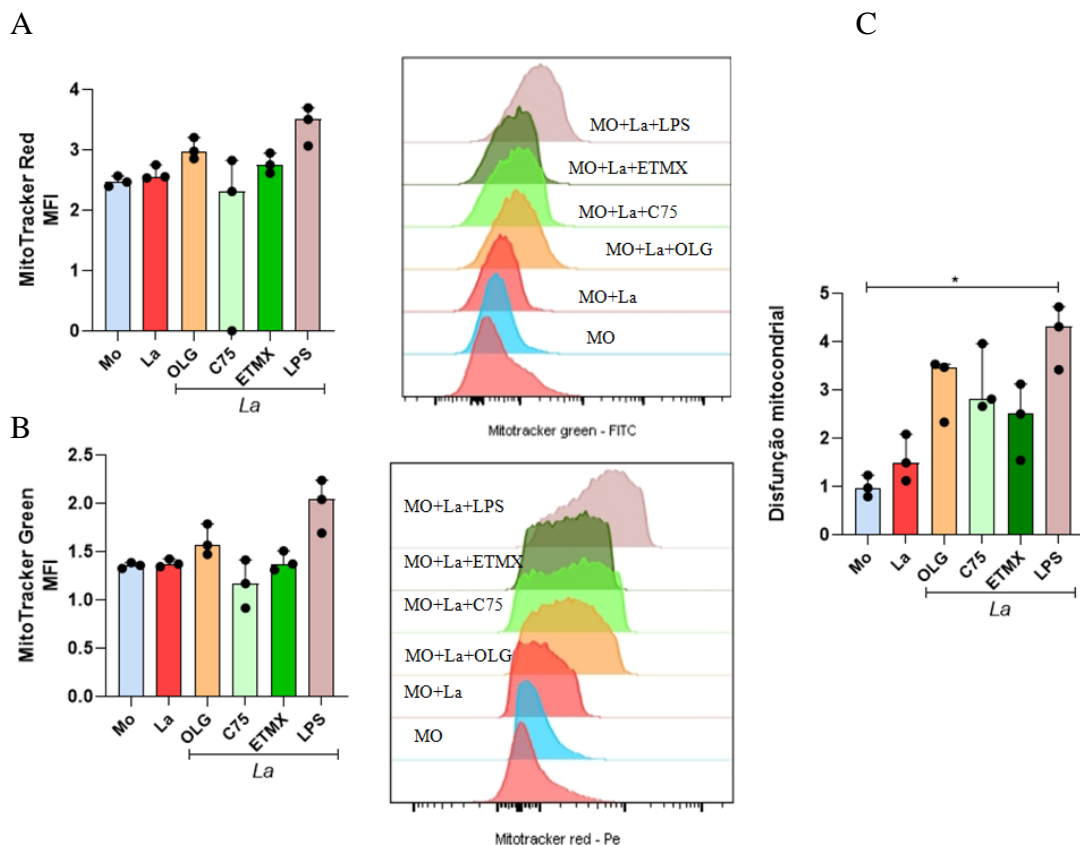


Figura 15 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio. A) Fluorescência celular total corrigida (CTCF) de BMDM tratados com oligomicina e infectados com *L.a.* B) Fluorescência celular total corrigida (CTCF) de BMDM tratados com oligomicina e infectados com *L.b.* As imagens foram geradas através do microscópio óptico invertido (Modelo DMi8, Leica). Foram analisadas e quantificadas as fluorescências celulares totais corrigidas de aproximadamente 30 células por condição experimental. MØ, macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs); La; *Leishmania amazonensis*; OLG (Oligomicina) e DMSO, n= 30 células. Teste de Kruskal-wallis com pós-teste de Dunn. ***, p<0,001.

7.7 INIBIDORES METABÓLICOS TORNAM AS MITOCÔNDRIAS DISFUNCIONAIS

Após a investigação dos complexos mitocondriais, avaliamos o conteúdo mitocondrial através da análise da massa mitocondrial, potencial de membrana e porcentagem de mitocôndrias disfuncionais dos BMDMs tratados e infectados.

A intensidade de fluorescência (MFI) dos grupos tratados com os inibidores metabólicos que atuam direta ou indiretamente no metabolismo oxidativo, apresentou aumento de massa mitocondrial e do potencial de membrana, mensurada pelas sondas de Mito Tracker Green e Mito Tracker Red respectivamente. Além disso, os BMDMs tratados com oligomicina apresentaram aumento da disfunção mitocondrial, para ambas as espécies de *Leishmania*. No entanto, esses dados não apresentaram significância estatística devido ao tamanho da amostra, sendo necessário o aumento do número de experimentos (Fig. 16A e 16B).



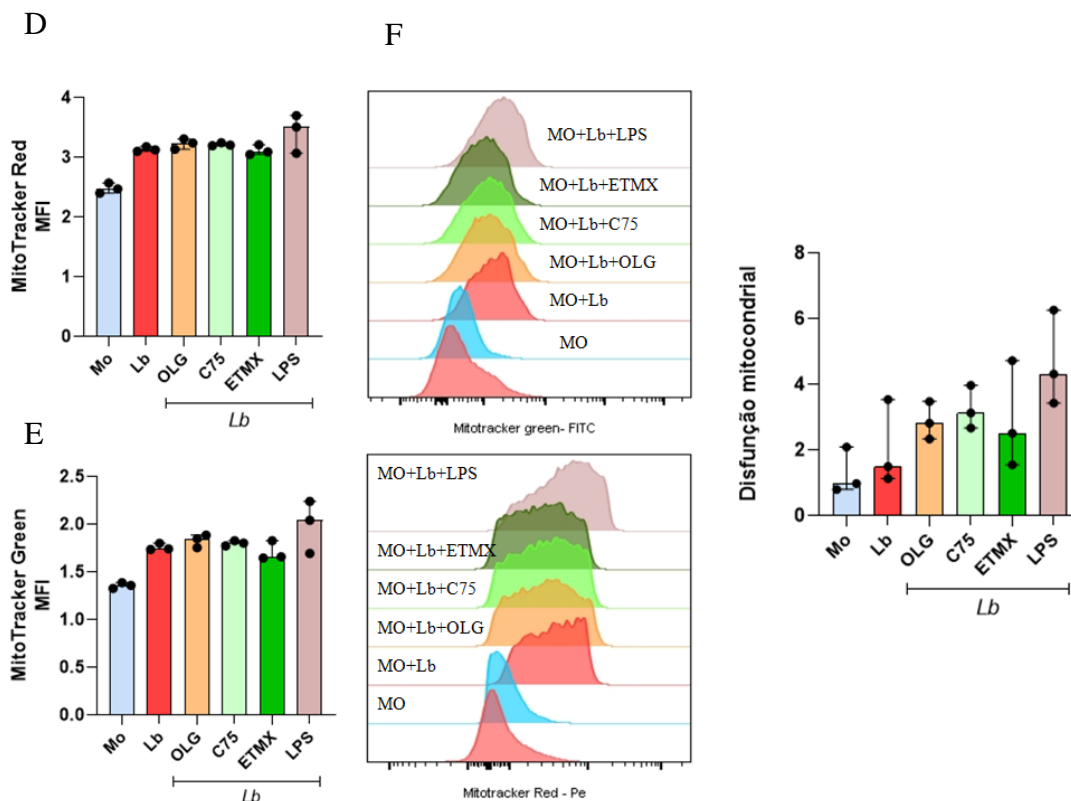


Figura 16 Inibidores metabólicos interferem nas funções mitocondriais. A) Massa mitocondrial. B) Potencial de membrana. C) Disfunção mitocondrial de BMDMs tratados e infectados com *L.amazonensis*. D) Massa mitocondrial.E) Potencial de membrana. F) Disfunção mitocondrial de BMDMs tratados e infectados com *L.braziliensis*. MØ, macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs); La; *Leishmania amazonensis*; OLG, Oligomicina; C75; ETMX, Etomoxir; LPS, Lipopolissacarídeo, n= 3. Teste de Kruskal-wallis com pós-teste de Dunn. * p < 0,05.

8. DISCUSSÃO

Estudos recentes têm mostrado a importância das vias metabólicas no direcionamento das diferentes respostas imunes (WEST; SHADEL; GHOSH, 2011; MOREIRA et al., 2015). A área de imunometabolismo é a responsável por recentes descobertas abordando como as mudanças nas vias metabólicas alteram a função celular (O'NEILL; KISHTON; RATHMELL, 2016). Alguns patógenos intracelulares são capazes de modular o metabolismo de células hospedeiras, constituindo um dos mecanismos de escape da resposta imune e assim favorecendo seu crescimento e persistência no organismo hospedeiro (CARADONNA et al., 2013; EISENREICH et al., 2017; (MCCONVILLE et al., 2007).

Os macrófagos são células versáteis do sistema imune, parasitas intracelulares como *Leishmania spp.* utilizam essa célula como habitat após o processo de fagocitose (NADERER; MCCONVILLE, 2008). São também essenciais no controle da resposta inflamatória e no reparo de lesões (SAUNDERS; MCCONVILLE, 2020).

Após ativação, se polarizam em um perfil pró-inflamatório (M1) ou anti-inflamatório (M2) (SAHA; SHALOVA; BISWAS, 2017). Macrófagos classificados como M1 possuem atividade microbicida, promovem depuração de antígenos e expressam grandes quantidades de citocinas como $IL-1\beta$, IL6 e TNF- α e estão relacionados com maior utilização da via glicolítica (NGUYEN-CHI et al., 2017; BEUTNER; ALANZALON; PORTER, 2017). No entanto, os macrófagos M2 têm predominância de reações metabólicas direcionadas ao suporte da fosforilação oxidativa, como a oxidação de ácidos graxos e o funcionamento pleno do ciclo do TCA. Esses macrófagos M2 secretam IL-10 e TGF- β (fator transformador de crescimento β) e estão envolvidos tanto na inibição de respostas inflamatórias bem como no processo de reparo tecidual (CAO et al., 2010). Estudos tem mostrado que a polarização de macrófagos é modulada pela reprogramação metabólica, caracterizada pela utilização da via glicolítica (IP et al., 2017; MOREIRA et al., 2015). Alguns patógenos intracelulares como *Leishmania* modulam o metabolismo das células hospedeiras, de tal forma que para sua sobrevivência observa-se a utilização da fosforilação oxidativa e exibem um perfil M2 (MOREIRA et al., 2015).

Em nossos achados, conforme a análise de acidificação extracelular (Fig. 7A) é possível observar que a infecção por ambas as espécies de *Leishmania* tornaram os macrófagos mais glicolíticos, aumentando a glicólise, capacidade glicolítica e a reserva energética. É possível que o aumento da glicólise nos grupos infectados tenha ocorrido para alimentar a cadeia respiratória, pois, conforme observado na análise de consumo de oxigênio (Fig. 8B), as taxas de consumo de oxigênio basal (antes da adição de inibidores) também aumentaram nos macrófagos infectados. Esses dados são similares aos encontrados por Ty e seus colaboradores, que mostraram que ao infectar macrófagos derivados de monócitos humanos com *Leishmania spp*, ocorreu maior utilização do metabolismo mitocondrial e aumento de glicólise para alimentar a fosforilação oxidativa (TY et al., 2019).

Mesmo após a utilização de oligomicina, inibidor da fosforilação oxidativa, os macrófagos infectados continuaram a apresentar maior OCR quando comparados ao grupo controle (Fig. 8B), sugerindo que na presença do parasito, o metabolismo mitocondrial pode ser importante para a sobrevivência do parasita uma vez que este encontra-se aumentado. Estudos da literatura mostram que a *Leishmania donovani* também aumentou as vias metabólicas mitocondriais durante a infecção (ROSENZWEIG et al., 2008). Moreira e colaboradores mostraram que a infecção por *Leishmania infantum* em BMDM induziu uma mudança do perfil metabólico de glicólise para a fosforilação oxidativa, para favorecer seu crescimento (MOREIRA et al., 2015). Além disso, estudos realizados em macrófagos

humanos também corroboram com nossos achados, mostrando que a infecção com *Leishmania amazonensis* e *Leishmania donovani* resultou em aumento da fosforilação oxidativa, com aumento da capacidade respiratória basal e máxima (TY et al., 2019).

Para estabelecer um ambiente ideal para sua sobrevivência, os parasitas precisam ajustar o metabolismo da célula hospedeira. Dentre essas alterações temos a indução da glicólise, via anabólicas e catabólicas dos lipídeos, produção de ácido nucleicos e síntese de proteínas. Esses processos são executados por sensores metabólicos que sinalizam a mitocôndria para promover um estado energético favorável (MENDES et al., 2018). Em nossos dados foi observado que a inibição do metabolismo mitocondrial favoreceu a eliminação do parasita. A diminuição da taxa de infecção e carga parasitária dos macrófagos tratados com oligomicina e C75 evidencia a importância da fosforilação oxidativa para a sobrevivência dos parasitas de ambas as espécies de *Leishmania* (Fig. 10 e 11). Embora não tenham sido observadas diferenças nos grupos tratados com inibidores da via glicolítica, o fato da infecção ter sido realizada durante 18 horas pode ter interferido nesse resultado. De fato, Moreira e colaboradores observaram que após 6 horas de infecção de macrófagos murinos por *L. infantum*, essas células exibiam um perfil glicolítico e após 18 horas, a infecção era modulada a um perfil favorecendo a utilização da fosforilação oxidativa (MOREIRA et al., 2015).

Um estudo realizado por Caradonna e seus colaboradores, mostrou que a infecção por protozoários do gênero *Trypanosoma cruzi*, depende principalmente do metabolismo de nucleotídeos e da oxidação de ácidos graxos do hospedeiro (CARADONNA et al., 2013). Acreditamos que no caso da *Leishmania spp* também haja uma dependência da energia gerada pela utilização de ácidos graxos. Além disso, ácidos graxos derivados de lipídeos do hospedeiro podem ser utilizados por patógenos intracelulares como fonte alternativa de carbono (EISENREICH et al., 2010). O aumento da utilização de ácidos graxos por amastigotas de *Leishmania mexicana*, já havia sido relatada mesmo antes dos estudos de imunometabolismo terem sido realizados (HART; COOMBS, 1982; MCCONVILLE et al., 2007).

A demanda energética da *Leishmania* muda de acordo com a sua forma evolutiva, enquanto a forma promastigota utiliza glicose como fonte de energia, a amastigota emprega o uso de aminoácidos e ácidos graxos (MCCONVILLE et al., 2007). Além disso, estudos mostram que a utilização do metabolismo mitocondrial pode desempenhar um papel importante na sobrevivência de amastigotas nas células do hospedeiro por meio da subversão

do metabolismo energético (NADERER e MCCONVILLE, 2008; MCCONVILLE e HANDMAN, 2007).

A mitocôndria é uma organela que desempenha um papel central para a regulação das reações metabólicas e o principal fornecedor de ATP e vias metabólicas usadas para a biossíntese de macromoléculas. Além disso, estão envolvidas nas principais vias de morte celular regulada e mutações que estão ligadas ao aumento de espécies reativas de oxigênio de origem mitocondrial (mtROS) (CORREA-DA-SILVA et al., 2018). As mitocôndrias oxidam metabólitos do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) do piruvato derivado da glicólise, mas também ácidos graxos e aminoácidos, o que gera equivalentes reduzidos de NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e FADH₂ (flavina adenina dinucleotídeo) para alimentar elétrons na cadeia transportadora de elétrons (TCE). Essa transferência de elétrons resulta no bombeamento de prótons para o interior da membrana mitocondrial, o que resulta na produção de uma força motriz de próton necessária para a produção de ATP pela ATP sintase (SCHREPFER; SCORRANO, 2016).

Estudos anteriores mostraram que a respiração celular é importante para a sobrevivência da *Leishmania* no hospedeiro, fornecendo substratos que são utilizados como fonte de energia (VAN DER ZANDE; ZAWISTOWSKA-DENIZIAK; GUIGAS, 2019). Nossos dados mostram que a proliferação dos parasitas de *Leishmania spp.* se mostra dependente do metabolismo mitocondrial, bem como utilização dos metabólitos e fonte de energia para o seu desenvolvimento.

Da mesma forma que o metabolismo mitocondrial é utilizado para a sobrevivência dos parasitas, ele pode ser utilizado como alvo terapêutico para eliminação do mesmo. Em condições de estresse metabólico, mais elétrons podem sair da cadeia respiratória e aumentar ainda mais a geração de superóxido mitocondrial (LEADSHAM et al., 2013). Esse vazamento pode ocorrer principalmente nos complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons, dentro das mitocôndrias. O super óxido é desmutado em peróxido de hidrogênio pela SOD2 na matriz mitocondrial e SOD1 no espaço intermembranar mitocondrial. O super óxido e o peróxido de hidrogênio são considerados como espécies reativas de oxigênio mitocondrial (mtROS) (KOOPTMAN et al., 2010; WEST; SHADEL; GHOSH, 2011).

As vias metabólicas podem ser inibidas farmacologicamente e apresentam alto potencial para serem estratégias terapêuticas bem-sucedidas. Dados da literatura sugerem que a utilização de inibidores de complexos mitocondriais podem aumentar a produção de mtROS (WEST; SHADEL; GHOSH, 2011). Acreditamos que a indução de mtROS pode estar relacionada com a diminuição da carga parasitária e taxa de infecção observada nos BMDMs

tratados com oligomicina. Estudos tem mostrado a importância do mtROS como componentes antimicrobianos na defesa inata contra a infecções bacterianas, eliminando patógenos intracelulares como *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (SILWAL et al., 2020; SONODA et al., 2007; YU; CHEN; TOOZE, 2018). Basu e colaboradores, mostraram que os parasitas de *Leishmania* interferem na geração de ROS, bem como na produção de mtROS. Em um estudo realizado com *Leishmania donovani* demonstraram que a infecção está relacionada com a suprarregulação da proteína desacopladora 2 (UCP2), regulador negativo da geração de mtROS (BASU BALL et al., 2011). Em nossos achados, observamos que a infecção por *Leishmania spp* altera a produção de mtROs uma vez que o tratamento com oligomicina aumenta a produção desse composto, o que pode levar a destruição do parasita (Fig. 14). Além disso, observamos também um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio celular na utilização da oligomicina em células infectadas por *Leishmania* (Fig. 15A e 15B). A oligomicina é um inibidor da ATP sintase e assim espera-se que o potencial de prótons transmembrana aumente, uma vez que esta enzima não estará funcional e assim não ocorrerá a fosforilação de ADP em ATP e esse gradiente de prótons não será utilizada (NICHOLLS, BUDD, 2000; NELSON, COX, 2012). Recentemente, foi descrito o efeito de várias drogas que interferem na fisiologia mitocondrial do parasita. Foi demonstrado por FONSECA-SILVA e colaboradores que a quercitina, um pró-oxidante, exerce efeito antileishmanicida em promastigotas de *L. amazonensis* devido a produção de ROS e interrupção da função mitocondrial (FONSECA-SILVA et al., 2011).

Dados da literatura mostram que a estimulação de BMDMs a partir de camundongos deficientes IL-10 $-/-$ por LPS aumenta a massa mitocondrial, e diminui o potencial de membrana, sugerindo que o acúmulo de mitocôndrias disfuncionais esteja relacionado com o aumento da massa mitocondrial (IP et al., 2017). Nossos dados mostram que a utilização dos inibidores de fosforilação oxidativa (Oligomicina), síntese de ácidos graxos (C75) e β -oxidação (Etomoxir), apresentam aumento da massa mitocôndrial, e do potencial de membrana, com consequente aumento da disfunção mitocondrial (Fig. 16). A ocorrência de mitocôndrias disfuncionais está relacionada com atividades prejudicadas da cadeia transportadora de elétrons, transporte ou atividade de poro que seja necessária para a fosforilação oxidativa (TRETTER; ADAM-VIZI, 2000). Como mostrado na análise de consumo de oxigênio pelo Seahorse, durante a infecção por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* ocorre o vazamento de prótons remanescentes da respiração basal, sugerindo presença de mitocôndrias disfuncionais (Fig. 8C). No entanto, esses dados são preliminares e não

apresentam significância estatística, sendo necessária a repetição do experimento e aumento do n amostral.

A compreensão da bioenergética mitocondrial na patogênese da Leishmaniose é algo que precisa ser elucidado no contexto das interações parasito-hospedeiro. A utilização de inibidores metabólicos tem sido utilizada em diversas áreas. Além disso, devido à dependência da *Leishmania* do metabolismo da célula hospedeira, existe potencial de manipulação do metabolismo mitocondrial para desenvolvimentos de estratégias terapêuticas.

9. CONCLUSÃO

A infecção por *L.amazonensis* e *L.braziliensis* alteram o metabolismo mitocondrial das células do hospedeiro, fazendo com que a célula alcance um estado energético mais elevado. No entanto, não houve subversão da reprogramação metabólica de forma antagônica em macrófagos murinos infectados, uma vez que as diferentes espécies utilizaram os mesmos mecanismos do metabolismo mitocondrial das células do hospedeiro para sua sobrevivência. Nosso trabalho destaca o potencial da utilização do metabolismo mitocondrial dos macrófagos como alvo terapêutico para modular a infecção por *Leishmani spp.*

PERSPECTIVAS

- Aumentar o n amostral e repetições de experimentos;
- Mensurar a captação de glicose em macrófagos infectados;
- Avaliar a morfologia das mitocôndrias através da microscopia eletrônica de transmissão.
- Investigar a cinética da infecção com o tratamento com 2DG com 6 horas de infecção;
- Avaliar o perfil de citocinas produzidas pelos macrófagos murinos infectados.

REFERENCIAS

- ALVAR, J. *et al*. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- BARRAL, A. *et al* Leishmaniasis in Bahia, Brazil: Evidence that *Leishmania amazonensis* Produces a Wide Spectrum of Clinical Disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 5, p. 536–546, 1991.
- BARRAL-NETTO, M. *et al* Transforming growth factor- β in leishmanial infection: A parasite escape mechanism. **Science**, v. 257, n. 5069, p. 545–548, 1992.
- BASU BALL, W. *et al* Uncoupling Protein 2 Negatively Regulates Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation and Induces Phosphatase-Mediated Anti-Inflammatory Response in Experimental Visceral Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 3, p. 1322–1332, 2011.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. [s.l: s.n.].
- BERTHOLET, S. *et al* Antigen requirements for efficient priming of CD8⁺ T cells by *Leishmania major*-infected dendritic cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 6620–6628, 2005.
- BERTHOLET, S. *et al* *Leishmania* Antigens Are Presented to CD8 + T Cells by a Transporter Associated with Antigen Processing-Independent Pathway In Vitro and In Vivo . **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 6, p. 3525–3533, 2006.
- BEUTNER, G.; ALANZALON, R. E.; PORTER, G. A. Cyclophilin D regulates the dynamic assembly of mitochondrial ATP synthase into synthasomes. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.
- BHATTACHARYA, P.; ALI, N. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 2, p. 128–134, 2013.
- BINIECKA, M. *et al* Dysregulated bioenergetics: A key regulator of joint inflammation. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 75, n. 12, p. 2192–2200, 2016.
- BOGDAN, C. Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, n. May, p. 69, 2012.
- BORREGAARD, N.; SØRENSEN, O. E.; THEILGAARD-MÖNCH, K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 8, p. 340–345, 2007.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. [s.l: s.n.].
- C. FALCÃO, S. *et al* The presence of Tregs does not preclude immunity to reinfection with *Leishmania braziliensis*. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 8, p. 771–780, 2012.

CAMPOS-NETO, A. What about Th1/Th2 in cutaneous leishmaniasis vaccine discovery? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p. 979–984, 2005.

CAO, Q. *et al* IL-10/TGF- β -modified macrophages induce regulatory T cells and protect against adriamycin nephrosis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 21, n. 6, p. 933–942, 2010.

CARADONNA, K. L. *et al* Host metabolism regulates intracellular growth of trypanosoma cruzi. **Cell Host and Microbe**, v. 13, n. 1, p. 108–117, 2013.

COSTA, A. A. U. M. *et al*. Experimental model of chronic osteomyelitis caused by *Leishmania (L) amazonensis*. **Acta Tropica**, v. 98, n. 2, p. 125–129, 2006.

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic Therapy**, v. 22, n. 6, p. 491–502, 2009.

DAWIT.G.; SIMENEW.K. A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. **Journal of Bacteriology & Parasitology**, v. 04, n. 02, 2013.

DE MOURA, T. R. *et al* Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 9, p. 5827–5834, 2005.

DEBERARDINIS, R. J.; THOMPSON, C. B. Cellular metabolism and disease: What do metabolic outliers teach us? **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1132–1144, 2012.

EISENREICH, W. *et al* To Eat and to Be Eaten: Mutual metabolic adaptations of immune cells and intracellular bacterial pathogens upon infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. JUL, p. 1–26, 2017.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 14, p. 1317–1327, 2003.

FOLLADOR, I. *et al* Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 11, p. 54–58, 2002.

FONSECA-SILVA, F. *et al* Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

FRANÇA-COSTA, J. *et al* Arginase I, polyamine, and prostaglandin E2 pathways suppress the inflammatory response and contribute to diffuse cutaneous leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 3, p. 426–435, 2015.

FRIEDMAN, J. R.; NUNNARI, J. Mitochondrial form and function. **Nature**, v. 505, n. 7483, p. 335–343, 2014.

GABER, T.; STREHL, C.; BUTTGEREIT, F. Metabolic regulation of inflammation. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 5, p. 267–279, 2017.

GUIMARÃES, E. T. *et al* Role of interleukin-4 and prostaglandin E2 in *Leishmania amazonensis* infection of BALB/c mice. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 5, p. 1219–1226,

2006.

HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 332–334, 2002.

HART, D. T.; COOMBS, G. H. *Leishmania mexicana*: Energy metabolism of amastigotes and promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 54, n. 3, p. 397–409, 1982.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, out. 1999.

IP, W. K. E. *et al* Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. **Science**, v. 356, n. 6337, p. 513–519, 2017.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015.

KOOPMAN, W. J. H. *et al* Mammalian Mitochondrial Complex I : **Antioxidants & redox signaling**, v. 12, n. 12, 2010.

KRAWCZYK, C. M. *et al* Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. **Blood**, v. 115, n. 23, p. 4742–4749, 2010.

LACERDA, D. I. *et al* Kinetoplastid membrane protein-11 exacerbates infection with *leishmania amazonensis* in murine macrophages. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 2, p. 238–245, 2012.

LAOUAR, A. *et al* CD70+ antigen-presenting cells control the proliferation and differentiation of T cells in the intestinal mucosa. **Nature Immunology**, v. 6, n. 7, p. 698–706, 2005.

LEADSHAM, J. E. *et al* Loss of cytochrome c oxidase promotes ras-dependent ros production from the er resident nadph oxidase, yno1p, in yeast. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 2, p. 279–286, 2013.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 839p.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, n. June, p. 83, 2012.

LODISH, H. *et al*. **Biologia Celular e Molecular**. 5ª ed. Local: Porto Alegre. Editora Artmed.

MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis (“espundia” escomel, 1911). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 6, p. 859–876, 1986.

MCCONVILLE, M. J. *et al* Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 8, p. 368–375, 2007.

MCCONVILLE, M. J. *et al* *Leishmania* carbon metabolism in the macrophage phagolysosome- feast or famine? **F1000Research**, v. 4, p. 1–11, 2015.

MCCONVILLE, M. J.; NADERER, T. Metabolic pathways required for the intracellular survival of *Leishmania*. **Annual Review of Microbiology**, v. 65, p. 543–561, 2011.

MENDES, N. F. *et al* Hypothalamic microglial activation in obesity: A mini-review. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, n. NOV, 2018.

MOREIRA, D. *et al* *Leishmania infantum* Modulates Host Macrophage Mitochondrial Metabolism by Hijacking the SIRT1-AMPK Axis. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 3, p. 1–24, 2015.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Publishing Group**, v. 8, n. 12, p. 958–969, 2008.

MURRAY, H. W. *et al* Advances in leishmaniasis. [Review] [199 refs]. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561–1577, 2005.

NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. The *Leishmania*-macrophage interaction: A metabolic perspective. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 301–308, 2008.

Nelson, D. L.; Cox, M. M. Lehninger **Princípios de Bioquímica**. 2008.

NGUYEN-CHI, M. *et al* TNF signaling and macrophages govern fin regeneration in zebrafish larvae. **Cell death & disease**, v. 8, n. 8, p. e2979, 2017.

O'NEILL, L. A. J.; KISHTON, R. J.; RATHMELL, J. A guide to immunometabolism for immunologists. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 553–565, 2016.

PEARCE, E. L.; PEARCE, E. J. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. **Immunity**, v. 38, n. 4, p. 633–643, 2013.

PERNAS, L. *et al* Mitochondria Restrict Growth of the Intracellular Parasite *Toxoplasma gondii* by Limiting Its Uptake of Fatty Acids. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 4, p. 886– 897.e4, 2018.

PETERS, N. C.; SACKS, D. L. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 1290–1296, 2009.

RIBEIRO-DE-JESUS, A. *et al* Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 143–148, 1998.

REINHART, B. J. *et al* The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 901–906, 2000.

ROSENZWEIG, D. *et al* Retooling Leishmania metabolism: from sand fly gut to human macrophage. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 2, p. 590–602, 2008.

SAHA, S.; SHALOVA, I. N.; BISWAS, S. K. Metabolic regulation of macrophage phenotype and function. **Immunological Reviews**, v. 280, n. 1, p. 102–111, 2017.

SAUNDERS, E. C.; MCCONVILLE, M. J. Immunometabolism of Leishmania granulomas. **Immunology and Cell Biology**, p. 1–13, 2020.

SCHRANER, C. *et al*. Successful treatment with miltefosine of disseminated cutaneous leishmaniasis in a severely immunocompromised patient infected with HIV-1. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n. 12, p. e120-4, 2005.

SCHREPFER, E.; SCORRANO, L. Mitofusins, from mitochondria to metabolism. **Molecular Cell**, v. 61, n. 5, p. 683–694, 2016.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Publishing Group**, 2016.

SEO, B. J.; YOON, S. H.; DO, J. T. Mitochondrial dynamics in stem cells and differentiation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, p. 1–17, 2018.

SHERLEM, D.; SEIXAS, P. D. E. Portal do Discente Tipo : REGULAR. n. 91, p. 764068, 2017.

SILVEIRA, F. T. Maniose Cutânea Difusa (Lcd) Na Amazônia, Brasil: Leishmaniose Cutânea Difusa (Lcd) Na Amazônia, Brasil: Aspectos Clínicos E Epidemiológico. **LCD na Amazônia Gazeta Médica da Bahia**, v. 7979, n. 3, p. 25–2925, 2009.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239–251, 2004.

SILWAL, P. *et al*. Mitochondrial Reactive Oxygen Species: Double-Edged Weapon in Host Defense and Pathological Inflammation During Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. August, 2020.

SONODA, J. *et al*. Nuclear receptor $ERR\alpha$ and coactivator $PGC-1\beta$ are effectors of $IFN-\gamma$ -induced host defense. **Genes and Development**, v. 21, n. 15, p. 1909–1920, 2007.

TANNAHILL, G. M. *et al*. Succinate is an inflammatory signal that induces $IL-1\beta$ through $HIF-1\alpha$. **Nature**, v. 496, n. 7444, p. 238–242, 2013.

TRETTETTER, L.; ADAM-VIZI, V. Inhibition of krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: A key role of α -ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 24, p. 8972–8979, 2000.

TY, M. C. *et al*. Immuno-metabolic profile of human macrophages after Leishmania and Trypanosoma cruzi infection. **PLoS ONE**, v. 14, n. 12, p. 1–12, 2019.

UO, T. *et al.* Drp1 levels constitutively regulate mitochondrial dynamics and cell survival in cortical neurons. **Experimental Neurology**, v. 218, n. 2, p. 274–285, 2009.

VAN DER ZANDE, H. J. P.; ZAWISTOWSKA-DENIZIAK, A.; GUIGAS, B. Immune Regulation of Metabolic Homeostasis by Helminths and Their Molecules. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 10, p. 795–808, 2019.

VANNIER-SANTOS, M. A.; MARTINY, A.; DE SOUZA, W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 4, p. 297–318, 2002.

WEST, A. P.; SHADEL, G. S.; GHOSH, S. Mitochondria in innate immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 6, p. 389–402, 2011.

WHO, W. H. O. **GHO_CL_2018.pdf**, 2018.

WOALDER. Immunometabolism: an emerging frontier Diane. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2017.

YU, L.; CHEN, Y.; TOOZE, S. A. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. **Autophagy**, v. 14, n. 2, p. 207–215, 2018.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. Differentiation of effector CD4⁺ T cell populations. **Annual Review of Immunology**, v. 28, p. 445–489, 2010.