

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

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

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO RECEPTOR MARCO NA  
INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS POR  
*LEISHMANIA MAJOR***

**NIARA DE JESUS ALMEIDA**

**Salvador – Brasil**

**2014**

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

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

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO RECEPTOR MARCO NA  
INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS POR  
*LEISHMANIA MAJOR***

**NIARA DE JESUS ALMEIDA**

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras  
Co-orientador: Dr. Carlos Eduardo Sampaio Guedes

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

**Salvador – Brasil**

**2014**

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

Almeida, Niara de Jesus  
A447a Avaliação do papel do receptor marco na infecção de macrófagos murinos  
por *Leishmania major*/ Niara de Jesus Almeida. - 2014.

109f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras, Laboratório de  
Patologia e Biointervenção.

Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas  
Gonçalo Moniz, 2014.

1. Macrófagos. 2. *Leishmania major*. 3. Camundongos. I. Título.

CDU 576:616.993.161

“AVALIAÇÃO DO PAPEL DO RECEPTOR MARCO NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS POR LEISHMANIA MAJOR”.

**NIARA DE JESUS ALMEIDA**

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



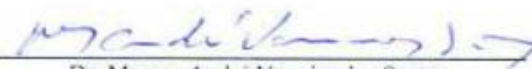
---

Dr.ª Maria Olívia Amado Ramos Bacellar  
Profesora Permanente  
UFBA



---

Dr.ª Camila Indiani de Oliveira  
Pesquisadora  
CPqGM/FIOCRUZ



---

Dr. Marcos André Vannier dos Santos  
Pesquisador Titular  
CPqGM/FIOCRUZ

## **DEDICATÓRIA**

**Aos meus pais, Sônia e Edson, por  
me ensinarem o que a vida tem de  
mais valioso- amor incondicional.**

## AGRADECIMENTOS

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

À Dra. Patrícia Veras pela orientação dedicada, pelos ensinamentos e pela amizade.

Ao Dr. Carlos Eduardo Guedes pela co-orientação, paciência, atenção e dedicação desde o início, que permitiram o surgimento de uma bela amizade ao longo desses seis anos.

Ao mestre José Geraldo Bomfim Lima pelas discussões científicas, colaboração, amizade e momentos de descontração durante o desenvolvimento do projeto.

À Beatriz Rocha Simões Dias pela amizade e colaboração insubstituível em todos os experimentos, por estar ao meu lado sempre, tanto na obtenção de resultados entusiasmantes como nos momentos de frustrações.

A Marcos Farias de Sousa pelo amor, cumplicidade e carinho. Por estar ao meu lado sempre me prestigiando, incentivando ou me acalmando nos diversos momentos de minha vida. Pela companhia nos horários mais inusitados de experimentos, como fins de semanas e madrugadas. O seu apoio foi indispensável.

À Luana Carneiro Palma pelos ensinamentos sobre boas práticas de laboratório, por servir de exemplo como profissional e me prestigiar com sua amizade.

À Camila Victória Sousa de Oliveira pela vontade de ajudar e por compartilhar comigo um ombro amigo em nossos momentos de desesperos.

Aos amigos conquistados no LPBI: Christiana Vinhas, Rodrigo Araújo, Mateus Mota, Manuela Solcà, Isaac Oliveira, Juliana Perrone, Carolina Versoza, Lairton Borja, Antônio Petersen, Kercia Cruz, Leila Bastos, Luciano Vasconcellos, Júnior Guedes, Bruna Macedo e Deborah Fraga. Agradeço por estarem presentes na minha rotina nesses últimos cinco anos e pelos inúmeros momentos de confraternização fora do laboratório.

A Flávia Paixão e Nathalie Santana pela amizade, solicitude e eficiência em me ajudar com os mais diversos problemas burocráticos.

A Biblioteca do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador – Bahia, pela solicitude e auxílio durante o período do mestrado e na formatação do manuscrito

Ao meu pai, Edson Almeida por todo o amor e carinho, pela dedicação e por não medir esforços em me fazer feliz. Por ser o maior incentivador em todas as minhas conquistas pessoais e profissionais. Por ser o meu maior exemplo de vida. Obrigada.

A minha mãe, Sônia Maria Almeida, minha eterna amiga, por todo o amor e carinho de mãe, incondicionais, pela dedicação e preocupação. Por acreditar em todos os meus sonhos e por sempre estar ao meu lado em todos os momentos de minha vida. Sou muito abençoada por ser sua filha.

A minha irmã, Adriele pelo amor, amizade e companherismo ao longo desses vinte e seis anos.

ALMEIDA, Niara de Jesus. Avaliação do papel do receptor marco na infecção de macrófagos murinos por *Leishmania major*. 91 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

## RESUMO

Camundongos CBA são resistentes à infecção por *Leishmania major* e permissivos à infecção por *L. amazonensis*. Adicionalmente, macrófagos de camundongos CBA controlam a infecção por *L. major*, mas não por *L. amazonensis in vitro*. Em estudo comparativo realizado por nosso grupo foi demonstrado que o receptor *scavenger* MARCO teve expressão aumentada em resposta à infecção por *L. major*, mas não na infecção por *L. amazonensis*. Ainda, o bloqueio do receptor com o anticorpo específico reduziu a infecção por *L. major* em 30%, indicando que esta proteína tem participação no reconhecimento de promastigotas de *L. major* em macrófagos de CBA. Assim, nossa hipótese é que o receptor MARCO participa do reconhecimento e fagocitose de *L. major* por macrófagos, direcionando o curso da infecção. O objetivo do presente estudo consistiu em evidenciar o papel do receptor MARCO na infecção de macrófagos por *L. major*. Inicialmente, células J774 foram transfectadas com os vetores pcDNA3.1-MARCO (J774-MARCO) ou pcDNA3.1 (J774-MOCK). Foi observado que a expressão do gene do MARCO foi cinco vezes maior nas células J774-MARCO em comparação às células J774-MOCK. Ao avaliarmos o efeito da superexpressão sobre o metabolismo de células J774-MARCO foi observado que a atividade metabólica mitocondrial foi maior nos clones J774-MARCO e J774-MOCK, 14% e 39% respectivamente, em comparação com as células J774 controle não transfectadas. Entretanto, a diferença no metabolismo não alterou a viabilidade celular dos clones transfectados. A superexpressão de MARCO não aumentou a ligação de *L. major* em células J774, mas favoreceu tanto o aumento no percentual de infecção de *L. major* como o número de parasitos/célula nos tempos iniciais até 24 h após a infecção ( $p \leq 0,05$ ). Adicionalmente, foi investigado se MARCO estaria induzindo modificações na membrana celular que favorecessem a entrada de *L. major*. Foi demonstrado que as células superexpressando MARCO (67%) apresentaram um maior espriamento da membrana celular, com a formação de lamelipódios e estruturas semelhantes a filopódios, eventos observados em um número reduzido de células J774-MOCK (24%). Ao avaliarmos o efeito da superexpressão de MARCO na produção de quimiocinas e citocinas durante a infecção por *L. major* foi observado que a adição de *L. major* induziu níveis significativamente maiores de MCP-1 e TNF- $\alpha$  nos tempos de 24 e 48 h após a infecção em comparação com as células J774-MOCK ( $p < 0,01$ ). Níveis maiores de IL-6 foram observados após 48 h de infecção por *L. major* nas células J774-MARCO em comparação às células controle ( $p < 0,05$ ). Similarmente, em resposta à infecção por *L. major*, células J774-MARCO produziram maior quantidade de NO nos tempos de 24 ( $p < 0,001$ ) e 48 h ( $p < 0,01$ ) após a infecção. Todavia, a superexpressão de MARCO não teve efeito sobre a sobrevivência intracelular do parasito. Em suma, nossos achados sugerem que a superexpressão do receptor *scavenger* MARCO favorece a entrada de *L. major* em células J774, além de desencadear uma resposta imune efetora direcionando o curso da infecção por *Leishmania*.

**Palavras-chave:** Macrófago, *Leishmania major*, MARCO



ALMEIDA, Niara de Jesus. The role of MARCO receptor in the murine macrophages infection by *Leishmania major*. 91 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

## ABSTRACT

CBA mice are resistant to *Leishmania major* yet permissive to *L. amazonensis* infection. In addition, CBA macrophages control *L. major*, but not *L. amazonensis* infection *in vitro*. In a comparative study performed by our group increase in expression of the scavenger receptor MARCO has been detected in response to *L. major*, but not to *L. amazonensis* infection. Moreover, ED31 monoclonal antibody against MARCO reduced by 30% *L. major* infection in CBA macrophages. These findings indicate that MARCO plays a role in *L. major* recognition by CBA macrophages. We hypothesized that MARCO receptor participates in the recognition and phagocytosis of *L. major* by macrophages, directing the outcome of infection. In the present study, we aimed to further disclose the role MARCO plays in *L. major* infection of murine macrophages. First J774 cells were transfected with pcDNA3.1-MARCO vector (MARCO-J774) or pcDNA3.1 vector (MOCK-J774). Expression of MARCO gene shown to be five times higher in MARCO-J774 cells compared to MOCK-J774 cells. Overexpression of MARCO enhanced mitochondrial metabolic activity in 14% and 39% of both MARCO-J774 and MOCK-J774, respectively, when compared to the control non-transfected J774 cells. However, enhancement in mitochondrial metabolic activity did not alter the cell viability of transfected clones. MARCO overexpression did not increase the binding of *L. major* in J774 cells, but increased both the percentage of infection of *L. major* and the number of parasites / cell until 24 h after infection ( $p \leq 0,05$ ). Additionally, we investigated whether MARCO be inducing changes in cell membrane that would favor *L. major* uptake by macrophages. We observed that MARCO-J774 cells (67%) showed a pronounced spread of cell membranes, with short microvilli and lamellipodia, events observed in a reduced number of MOCK-J774 (24%). Then, we evaluated production of pro-inflammatory chemokine and cytokine induced by *L. major* in MARCO-J774 cells. *L. major* addition to MARCO-J774 cells induced higher significantly levels of MCP-1 and TNF- $\alpha$  compared to MOCK-J774 cells at 24 and 48 h post infection ( $p < 0,01$ ). Higher levels of IL-6 were also observed at 48 h of *L. major* infection in MARCO-J774 cells compared to control ( $p < 0,05$ ). Similarly, NO production induced by *L. major* was much more higher in MARCO-J774 cells compared to MOCK-J774 at 24 and 48 h post infection ( $p \leq 0,01$ ). Although in MARCO-overexpressing cells, enhancement in pro-inflammatory chemokines and cytokines in response to *L. major* has been observed, no effect on parasite intracellular survival has been detected. In summary, our findings suggest that the scavenger receptor MARCO overexpression favors the entry of *L. major* in J774 cells, and trigger an effector immune response that directs outcome of *Leishmania* infection.

**Key words:** Macrophage, *Leishmania major*, MARCO

## LISTA DE ABREVIATURAS

B.O.D.	Demanda Bioquímica de Oxigênio ( <i>Biochemical Oxygen Demand</i> )
cDNA	DNA complementar ( <i>Complementary DNA</i> )
CHO	Ovário de Hamster chinês ( <i>Chinese Hamster Ovary</i> )
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono ( <i>Carbon Dioxide</i> )
CR	Receptor do Complemento ( <i>Complement receptor</i> )
DMEM	Meio Essencial de Água Modificado por Dulbecco ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
DNA	Ácido Desoxirribonucleico ( <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
dNTP	Desoxinucleotídeo ( <i>Deoxynucleotide</i> )
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético ( <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i> )
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio ( <i>Hydrogen peroxide</i> )
HEPES	Ácido Piperazinoetanossulfônico Hydroxyethyl ( <i>Hydroxyethyl Piperazineethanesulfonic Acid</i> )
IFN	Interferon ( <i>Interferon</i> )
igG	Immunoglobulina G ( <i>Immunoglobulin G</i> )
IL	Interleucina ( <i>Interleukin</i> )
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzida ( <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> )
LPG	Lipofosfoglicano ( <i>Lipophosphoglycan</i> )
LPS	Lipopolissacarídeo ( <i>Lipopolysaccharide</i> )
Mφ	Macrófago ( <i>Macrophage</i> )
MARCO	Receptor de Macrófago com Estrutura de Colágeno ( <i>Macrophage Receptor with Collagenous Structure</i> )
MCP	Proteína Quimioatrativa de Monócito ( <i>Monocyte chemoattractant protein</i> )
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio ( <i>Magnesium chloride</i> )
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de Magnésio ( <i>Magnesium Sulfate</i> )
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
NaCl	Cloreto de Sódio ( <i>Sodium chloride</i> )
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato ( <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> )

NaNO <sub>2</sub>	Nitrito de Sódio ( <i>Sodium nitrite</i> )
NH <sub>4</sub> Cl	Cloreto de Amônio ( <i>Ammonium chloride</i> )
NO	Óxido Nítrico ( <i>Nitric oxide</i> )
O <sub>2</sub>	Oxigênio ( <i>Oxygen</i> )
PBS	Tampão Fosfato Salino ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PBST	Tampão Fosfato Salino com Tween 20 ( <i>Phosphate Buffered Saline with Tween 20</i> )
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
RNA	Ácido Ribonucléico ( <i>Ribonucleic Acid</i> )
RPMI	Instituto Roswell Park Memorial ( <i>Roswell Park Memorial Institute</i> )
RT-PCR	Transcriptase Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase ( <i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i> )
SBF	Soro Bovino Fetal ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
TGF	Factor de Crescimento Transformante ( <i>Transforming growth factor</i> )
Th	T auxiliares ( <i>T helper</i> )
TLR	Receptor Toll-Like ( <i>Toll-Like Receptor</i> )
TNF	Factor de Necrose Tumoral ( <i>Tumor necrosis factor</i> )

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	15
2.1	A LEISHMANIOSE .....	15
2.2	O PARASITO .....	16
2.3	RESPOSTA IMUNE .....	18
2.3.1	Resposta imune inata a <i>Leishmania</i> .....	19
2.3.2	Resposta imune adaptativa a <i>Leishmania</i> .....	20
2.3.3	Determinação da susceptibilidade ou resistência à infecção por <i>leishmania</i> ....	23
2.4	INTERAÇÃO MACRÓFAGO E <i>LEISHMANIA</i> .....	24
2.4.1	Internalização e vida intracelular .....	27
2.4.2	O modelo experimental.....	29
2.5	O RECEPTOR MARCO .....	31
2.6	HIPÓTESE .....	33
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	34
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	35
4.1	PARASITOS.....	35
4.2	CULTIVO DE CÉLULAS.....	35
4.2.1	<i>Leishmania</i> .....	35
4.2.2	Células J774 .....	35
4.3	TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS J774 COM O PLASMÍDEO PCDNA3.1- MARCO .....	36
4.4	RT-PCR PARA VALIDAÇÃO DA SUPEREXPRESSION DE MARCO EM CÉLULAS J774.....	36
4.4.1	Obtenção do rna total de células J774 .....	36
4.4.2	Obtenção da sequência codificante para o marco .....	37
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA DOS CLONES TRANSFECTADOS .....	37
4.6	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DOS CLONES TRANSFECTADOS .....	38
4.7	SEPARAÇÃO DE PROMASTIGOTAS METACÍCLICAS DE L. MAJOR....	38
4.8	CO-LOCALIZAÇÃO DE L. MAJOR COM CÉLULAS J774- MARCO.....	39
4.8.1	Imunomarcação.....	39
4.9	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE CÉLULAS J774- MARCO .....	40
4.10	CINÉTICA DE INFECÇÃO POR L. MAJOR EM CÉLULAS J774-MARCO .....	40
4.11	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MEDIADORES .....	41
4.11.1	Avaliação da produção de Citocinas .....	41
4.11.2	Avaliação da produção de Óxido nítrico (NO).....	41
4.12	AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA INTRACELULAR DE L. MAJOR EM CÉLULAS J774-MARCO .....	42
4.13	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	42
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	43
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS J774 COM SUPEREXPRESSION DO RECEPTOR MARCO .....	43
5.1.1	Confirmação da superexpressão do MARCO em células J774 .....	43

5.1.2	Avaliação da atividade metabólica e viabilidade de células J774 superexpressando MARCO.....	44
5.2	INTERAÇÃO DE <i>L. MAJOR</i> COM CÉLULAS J774- MARCO.....	46
5.3	CINÉTICA DE INFECÇÃO POR <i>L. MAJOR</i> EM CÉLULAS J774 SUPEREXPRESSANDO O RECEPTOR MARCO.....	49
5.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE CÉLULAS SUPEREXPRESSANDO MARCO.....	51
5.5	AVALIAÇÃO DE MEDIADORES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA IMUNE PRÓ-INFLAMATÓRIA .....	53
5.5.1	Avaliação da produção de citocinas.....	53
5.5.2	Avaliação da produção de óxido nítrico (NO).....	55
5.6	Avaliação do papel do receptor MARCO na sobrevivência intracelular de <i>L. major</i> em células J774.....	56
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	57
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	63
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	64
	APÊNDICE I- ESBOÇO DO ARTIGO CIENTÍFICO.....	79
	APÊNDICE II- PRODUÇÃO DE IL-12 E IL-10 EM CÉLULAS J774-MARCO INFECTADAS POR <i>L. MAJOR</i> .....	90

# 1 INTRODUÇÃO

Os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam um ciclo de vida heteróxico. Formas promastigotas flageladas são encontradas no intestino do inseto vetor e parasitos amastigotas aflagelados se desenvolvem intracelularmente no hospedeiro vertebrado após serem internalizados por fagócitos, como os macrófagos (CHANG *et al.*, 1986; LASKAY *et al.*, 2003; RITTER *et al.*, 2009). Nesta etapa, os parasitos encontram-se no interior dos fagolisossomos e após sucessivas mutiplicações da *Leishmania* dentro desse ambiente ácido a célula pode se romper, liberando formas amastigotas que irão infectar novas células, perpetuando a infecção (ANTOINE *et al.*, 1990; ANTOINE *et al.*, 1998; BATES; ROGERS, 2004; BANULS *et al.*, 2007).

Macrófagos apresentam uma variedade de receptores envolvidos no reconhecimento, fagocitose e destruição de patógenos (VAN DER LAAN *et al.*, 1999), incluindo receptores do complemento CR1 e CR3 (MOSSER; EDELSON, 1985; BLACKWELL *et al.*, 1985) e receptores de reconhecimento padrão tais como CD14, receptores manose, *toll-like* e *scavenger* (GOUGH; GORDON, 2000). Na interação macrófago-*Leishmania*, os receptores macrofágicos são responsáveis pelo reconhecimento e ligação a padrões moleculares conservados presentes na superfície do patógeno, como moléculas de lipofosfoglicana e gp63 (BLACKWELL *et al.*, 1985; RUSSELL; WILHELM, 1986; WANDERLEY *et al.*, 2005). Diferentes modelos experimentais são utilizados para investigar a interação parasito-hospedeiro, assim como a resposta imune induzida após a infecção por *Leishmania*.

Em nosso laboratório, foi demonstrado que camundongos CBA desenvolvem distintos padrões histopatológicos em resposta à infecção por *L. major* e *L. amazonensis* (LE MOS DE SOUSA *et al.*, 2000). Estudos *in vitro* foram utilizados para investigar o papel do macrófago de camundongos CBA na determinação da resposta à infecção por promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. major*. Foi evidenciado que, em contraste à *L. major*, *L. amazonensis* é resistente aos mecanismos leishmanicidas inatos do macrófago (GOMES *et al.*, 2003). Behin e colaboradores (1979) demonstraram que o curso da infecção por *L. major* é dependente da linhagem do camundongo. Algumas linhagens como BALB/c são incapazes de controlar a infecção, levando à disseminação e morte dos animais. Entretanto, a infecção em camundongos das linhagens CBA e C3H resulta em lesão localizada que cura-se espontaneamente após algumas semanas (BEHIN *et al.*,

1979). Esses dados indicam a importância dos fatores relacionados com o parasito e o hospedeiro na determinação da resposta imune na infecção por *Leishmania*. Além disso, esses dados sugerem que, a partir do primeiro contato do parasito com o macrófago, a célula hospedeira produz, de forma diferenciada, fatores que teriam papel no curso da infecção, como TNF- $\alpha$  e Óxido nítrico.

Como a infecção por *Leishmania* pode afetar o padrão de expressão gênica no macrófago (RACOOSIN; BEVERLEY, 1997), foi conduzido um estudo com o objetivo de identificar, em larga escala, genes expressos diferentemente em macrófagos de CBA, na resposta à infecção por *L. amazonensis* ou *L. major*. Entre os genes modulados, foi observado que o gene para o receptor tipo *scavenger* MARCO (*macrophage receptor with collagenous structure*) teve sua expressão aumentada em resposta à infecção por *L. major*, mas não na infecção por *L. amazonensis*.

MARCO, receptor *scavenger* classe A, é uma proteína transmembrana que apresenta em sua estrutura um longo domínio colagenoso, um domínio SRCR (*Scavenger Receptor with Cysteine-Rich Domain*) e se distribui principalmente em macrófagos da zona marginal do baço, em macrófagos do cordão medular dos linfonodos e macrófagos peritoneais (ELOMAA *et al.*, 1998; KRAAL *et al.*, 2000). No entanto, em macrófagos do fígado, pulmão e outros órgãos pode ocorrer uma expressão rápida e transitória dessa proteína durante infecção bacteriana ou sob administração de produtos derivados de bactérias (van der Laan *et al.*, 1997; van der Laan *et al.*, 1999). Diferentes estudos mostram que MARCO se liga a bactérias gram-positivas e gram-negativas (ELOMAA *et al.*, 1995; KRAAL *et al.*, 2000), partículas não opsonizadas (PALECANDA *et al.*, 1999; ARREDOUANI *et al.*, 2005), além de moléculas como LPS (SANKALA *et al.*, 2002). Ito e colaboradores (1999) demonstraram uma possível relação entre a expressão de MARCO em macrófagos na zona marginal de baços murinos com a fagocitose de BCG por estas células. Esses dados sugerem um papel importante do MARCO na resposta imune inata contra patógenos.

Em trabalho anteriormente publicado pelo nosso grupo, foi demonstrado que o receptor MARCO apresenta maior expressão em macrófagos murinos peritoneais infectados por *L. major* em relação à infecção por *L. amazonensis*. O bloqueio do receptor com o anticorpo específico reduziu a infecção por *L. major* em 30%, indicando que esta proteína tem participação na entrada de promastigotas de *L. major* em macrófagos de CBA. Como o bloqueio do MARCO interfere parcialmente na infecção,

foi sugerido que a interação MARCO- *L. major* seria dependente de outros receptores fagocíticos que reconheceriam *Leishmania* simultaneamente ao MARCO (GOMES *et al.*, 2009).

Adicionalmente, a interação de promastigotas de *L. major* com o receptor MARCO pode levar à produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e, como consequência, ativação dos macrófagos e morte intracelular do parasito. Embora os dados obtidos indiquem um provável papel deste receptor na fagocitose de promastigotas de *L. major*, estudos adicionais precisam ser realizados para investigar o papel do receptor MARCO na entrada de *L. major* e na resposta imune contra a infecção.

Diante disso, o presente estudo teve como hipótese que o receptor MARCO participa do reconhecimento e fagocitose de *L. major* por células murinas influenciando o curso da infecção *in vitro*. Para testar tal hipótese, o objetivo do estudo consistiu em avaliar o papel do receptor MARCO na infecção de macrófagos de linhagem J774 por *L. major*.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 A LEISHMANIOSE

As leishmanioses representam um complexo de doenças endêmicas com amplo espectro clínico. Essas doenças demandam investimento de saúde pública, sendo considerada uma das seis mais importantes doenças infecciosas devido a grande incidência, ampla distribuição, gravidade da doença e alta taxa de ocorrência em regiões pobres, vitimando principalmente pessoas socioeconomicamente desfavorecidas e com baixo nível de escolaridade (WHO, 2011).

Esta zoonose, transmitida ao homem por protozoários do gênero *Leishmania*, apresenta altos níveis de morbidade e mortalidade nos trópicos e subtropicais com notificações de endemia em 98 países (ALVAR *et al.*, 2012) e afeta meio milhão de pessoas (BASANO; CAMARGO, 2004; WANDERLEY *et al.*, 2005). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 350 milhões de pessoas encontram-se expostas ao risco, com notificações de 2 milhões de novos casos a cada ano no mundo e noventa por cento destes ocorrem no Afeganistão, Argélia, Irã, Iraque, Arábia Saudita e Síria, no Velho Mundo, e no Brasil e Peru no Novo Mundo (HEPBURN *et al.*, 2000; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; WHO, 2011). Todavia, a Leishmaniose ocorre em uma distribuição focal e em locais remotos sendo difícil extrapolar os dados a partir dos registros oficiais da doença ao redor do mundo, o que resulta em estimativas aquém da realidade (BERN *et al.*, 2008; WHO, 2011).

A infecção por *Leishmania* pode resultar na forma cutânea, mucocutânea e visceral da doença, ou ainda quadros clínicos assintomáticos (PEARSON *et al.*, 1983). A leishmaniose cutânea tem ampla distribuição mundial, e no Velho Mundo é causada principalmente por *L. (Leishmania) major* (GRIMALDI; TESH, 1993). Os dez países com maior estimativa de casos são Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru, juntos apresentam 70 a 75% da incidência global estimada de Leishmaniose cutânea (ALVAR *et al.*, 2012). Nas Américas há registro de casos desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai. No Brasil, esta enfermidade apresenta alta incidência, com notificações em vários municípios de todas as unidades federais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007) e pode ser transmitida por seis espécies de parasitas divididas em 2

subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (LAINSON *et al.*, 1979). As principais espécies causadoras dessa doença no Brasil são *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *L. (Viannia) braziliensis*.

O amplo espectro clínico da leishmaniose cutânea reflete complexos determinantes socioambientais e ecológicos da doença, como a biologia das diferentes espécies do parasito, o tipo de ciclo zoonótico, a resposta imunológica e a variabilidade genética dos pacientes (BOGDAN *et al.*, 1996; WHO, 2011). Esta doença é caracterizada por apresentar lesões exclusivamente na pele, que geralmente surgem no sítio de inoculação das promastigostas infectantes. O número de lesões cutâneas primárias é variável, podendo ser única ou múltiplas (GRIMALDI, 1982), e a infecção pode progredir de forma assintomática e, após um período de latência, aparecerem as lesões cutâneas e/ou mucosas em decorrência da disseminação do parasito no organismo (DELUNE, 1979). Em geral, as lesões cutâneas se apresentam como ulcerações com bordas elevadas, endurecidas e fundo com tecido de granulação grosseira, denominadas lesões com borda em moldura (Gontijo; Carvalho, 2003). Nódulos subcutâneos podem estar associados a estas lesões, indicando progressão da infecção através do sistema linfático. (GRIMALDI, 1982).

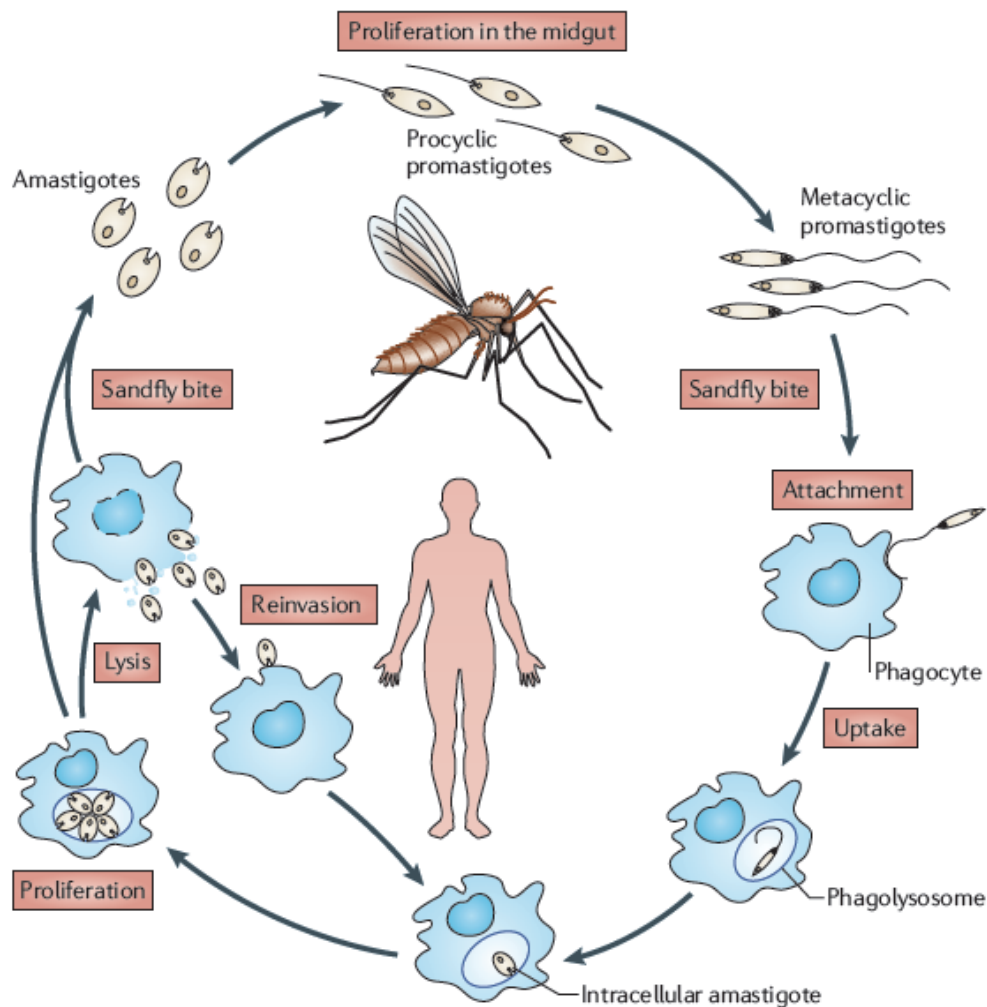
## 2.2 O PARASITO

Protozoários do gênero *Leishmania* (ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae) são subdivididos em mais de 20 espécies e subespécies responsáveis por infectar humanos (PETERS; SACKS, 2006). Apesar das diferentes espécies serem morfológicamente similares, fatores epidemiológicos e geográficos aliados à diversidade biológica e espectro de manifestações clínicas atuam como aspectos de distinção entre as espécies (GRIMALDI; TESH, 1993).

As espécies do gênero *Leishmania* são zoonóticas, sendo encontrados alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores. Os seres humanos são considerados hospedeiros acidentais, uma vez que não são essenciais para a manutenção destes parasitas e usualmente atuam como hospedeiros definitivos (GRIMALDI; TESH, 1993). As diferentes espécies do parasito são transmitidas pela picada de fêmeas infectadas de dípteros pertencentes ao gênero *Phlebotomus* na Europa, e *Lutzomyia* nas Américas. O gênero *Lutzomyia* apresenta 350 espécies catalogadas, distribuídas desde o sul do Canadá até o norte da Argentina (REBÊLO, 1999).

O ciclo de vida da *Leishmania* é heteroxeno, com alternância entre as formas amastigotas aflageladas e formas promastigotas móveis com flagelos (Figura 1). As formas promastigotas, diferentes das amastigotas, expressam em sua superfície quantidades abundantes de lipofosfoglicano (LPG) e da metaloprotease gp63 (Russell; Wilhelm 1986; Pimenta *et al.*, 1991). As fases de desenvolvimento deste parasito com base em critérios ultraestruturais, bioquímicos e genéticos são distintamente complexas, com heterogeneidade nas populações promastigotas de uma determinada espécie (SACKS *et al.*, 1985; SILVA; SACKS, 1987; Sacks, 1989).

Durante o repasto sanguíneo, flebotomíneos fêmeas sugam junto com o sangue as formas amastigotas do parasito de um animal infectado. Vinte e quatro horas após a ingestão, estas células se diferenciam na luz do trato digestivo do inseto em formas promastigotas procíclicas flageladas. Essas formas se multiplicam rapidamente e passam por um processo de metaciclogênese, originando formas promastigotas metacíclicas infectivas, as quais migram para a probóscide do inseto, após aproximadamente 4 ou 5 dias. Em um novo repasto sanguíneo, ao picar um hospedeiro vertebrado mamífero, o flebotomíneo infectado regurgita parasitos promastigotas metacíclicas que podem ser internalizados por fagócitos (SACKS *et al.*, 1985; CHANG *et al.*, 1986; LASKAY *et al.*, 2003; RITTER *et al.*, 2009). Nestas células, os parasitos encontram-se internalizados nos fagolisossomos e se transformam em amastigotas, as quais conseguem sobreviver nesse ambiente da célula hospedeira (ANTOINE *et al.*, 1990; ANTOINE *et al.*, 1998; BANULS *et al.*, 2007). Após multiplicações destes parasitos dentro dos fagolisossomos a célula pode se romper, liberando formas amastigotas que irão infectar novas células, perpetuando a infecção. Quando os flebotomos ingerem os macrófagos infectados, ao realizarem o repasto sanguíneo no mamífero infectado, o ciclo se reinicia (CHANG *et al.*, 1986; BATES; ROGERS, 2004; BANULS *et al.*, 2007). No processo de metaciclogênese das espécies de *Leishmania* são observadas mudanças morfológicas como o encurtamento e estreitamento do corpo do protozoário acompanhado de um longo flagelo, duas vezes maior que o tamanho do corpo (ZAKAI *et al.*, 1998). Essas mudanças estruturais no LPG são essenciais na interação entre parasito e o intestino do hospedeiro invertebrado (SACKS, 1989; MCCONVILLE *et al.*, 1992; TURCO; DESCOTEAUX, 1992).



**FIGURA 1. Diagrama esquemático do ciclo de vida da *Leishmania*.**  
(KAYE; SCOTT, 2011)

### 2.3 RESPOSTA IMUNE

A imunidade a microorganismos divide-se em dois sistemas gerais: imunidade inata e imunidade adaptativa. A diferença essencial destes dois tipos de resposta consiste no modo como cada um reconhece os microorganismos. O sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra patógenos, definida como uma resposta não específica, porém seletiva, que é caracterizada pela capacidade inerente de reconhecimento de antígenos potencialmente nocivos, recrutamento e ativação de células inflamatórias e liberação de mediadores e moléculas microbicidas efetoras (FEARON; LOCKSLEY, 1996). Já o sistema imune adaptativo é caracterizado por especificidade e memória, sendo mediado por linfócitos T e linfócitos B (FEARON; LOCKSLEY, 1996).

### 2.3.1 Resposta imune inata a *Leishmania*

No desenvolvimento da resposta imune contra diferentes organismos, o principal desafio para o hospedeiro consiste na detecção do patógeno e coordenação de uma resposta rápida. A resposta imune inata é amplamente mediada por neutrófilos, células dendríticas e macrófagos, células responsáveis pela fagocitose e morte do agente infeccioso, além de sintetizarem grande variedade de citocinas e mediadores inflamatórios (ADEREM; ULEVITCH, 2000).

Um dos eventos cruciais no desenvolvimento da resposta imune inata é a fagocitose. As células fagocíticas do sistema imune apresentam receptores de superfícies conhecidos como PRRs, *Pattern Recognition Receptors*, tais como CD14, receptores manose, *toll-like* e *scavenger* (GOUGH; GORDON, 2000). Estas moléculas apresentam a capacidade de reconhecer e se ligar a padrões moleculares conservados, presentes em agentes infecciosos, e que não são encontrados em outros eucariotos, resultando na ativação da resposta pró-inflamatória dos fagócitos, na produção de fatores microbicidas e moléculas co-estimulatórias (MEDZHITOV; JANEWAY, 1997; ADEREM; ULEVITCH, 2000).

Macrófagos desempenham um papel de grande importância no controle da infecção por *Leishmania*, pois além de constituírem as principais células hospedeiras do patógeno, são responsáveis pela síntese inicial de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- $\alpha$ , responsáveis pela indução de uma resposta aguda caracterizada pela ativação das funções microbicidas dos macrófagos e outros fagócitos. Essas citocinas participam também da ativação de linfócitos T específicos (WANG *et al.*, 1994; FEARON; LOCKSLEY, 1996). Por outro lado, células macrofágicas estão adicionalmente envolvidas na produção de citocinas como IL-10 e TGF- $\beta$ , responsáveis pela inibição da resposta imune do hospedeiro (WANG *et al.*, 1994; ABBAS, 2008), pois inativam o próprio macrófago, quanto linfócitos T. Tais observações evidenciam que o macrófago é uma célula importante, podendo participar tanto na progressão como no controle da infecção por *Leishmania*.

Na infecção por *Leishmania*, é amplamente descrito na literatura que os eventos iniciais da infecção são cruciais para o desenvolvimento de um perfil de resistência ou susceptibilidade e parecem envolver elementos da imunidade inata nos primeiros dias de infecção que precedem o desenvolvimento de células T auxiliares específicas

(CHATELAIN *et al.*, 1992; BOGDAN *et al.*, 1998; SCHARTON-KERSTEN; SCOTT, 1995).

Diferentes estudos demonstraram que manipulações com o objetivo de reverter a resposta imune inata foram eficazes somente se realizados durante a primeira semana de infecção. Sypek e colaboradores (1993) observaram que a administração de IL-12 na primeira semana de infecção em camundongos BALB/c infectados por *L. major* permitiu que esta linhagem susceptível revertisse à infecção. Adicionalmente, o tratamento com anticorpo anti-IL-4 no início da infecção foi capaz de atenuar a doença nestes camundongos susceptíveis à infecção por *L. major* (SADICK *et al.*, 1990).

Além de possuírem papel essencial na resposta inicial contra patógenos, macrófagos e células dendríticas infectadas, ao migrarem para o linfonodo drenante, têm grande colaboração no desenvolvimento da resposta específica, participando da cascata de ativação de células T ao apresentarem antígenos para estes linfócitos, via complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe I e classe II e moléculas coestimulatórias, a exemplo de CD40, CD54, CD80 e CD86 (PETERS; SACKS, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2006). Todavia ainda não está bem descrito na literatura como os macrófagos e células dendríticas infectadas são capazes de transportar o parasito do sítio inicial de infecção para o linfonodo drenante onde a resposta imune adquirida é inicializada (KAYE; SCOTT, 2011).

### 2.3.2 Resposta imune adaptativa a *Leishmania*

A influência da resposta imune inata no desenvolvimento da resposta imune adaptativa tem sido amplamente discutida na literatura em diversos modelos infecção, inclusive na infecção por *Leishmania* (KAUFMANN,1993; BANCROFT, 1993; SCHARTON-KERSTEN; SCOTT, 1995; MEDZHITOV; JANEWAY, 1997).

Os linfócitos T possuem papel essencial na resposta imune adaptativa, pois são responsáveis pela produção de citocinas secundária ao reconhecimento antigênico. Diferentes tipos de microorganismos e exposições antigênicas podem induzir linfócitos T CD4<sup>+</sup> a se diferenciarem em células T auxiliares. Essas células T são responsáveis por coordenar a resposta imune tardia, podendo levar o organismo invasor à morte pelo

macrófago, induzir a produção de anticorpos pelos linfócitos B, além de promover a expansão clonal de células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> (FEARON; LOCKSLEY, 1996).

As células T auxiliares (CD4<sup>+</sup>) são diferenciadas de forma clássica em células Th1 ou Th2, com base no perfil de citocinas produzidas após estimulação antigênica (MOSMANN *et al.*, 1986). As células Th1 são definidas classicamente como responsáveis pela produção de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ , são capazes de ativar células macrofágicas e linfócitos T citotóxicos. Linfócitos do tipo Th1 são importantes mediadores da resposta imune celular a patógenos intracelulares. Por outro lado, linfócitos do tipo Th2 são responsáveis pela produção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, que estão associadas com a estimulação e diferenciação de linfócitos B, além de inibirem a ativação macrofágica. Essas células contribuem significativamente para a resposta imune humoral (MOSMANN *et al.*, 1986; COFFMAN, 1991). Adicionalmente, novas populações de células T CD4<sup>+</sup>, como linfócitos Th9, Th17 e T regulatório, foram descritas na literatura, como células com grande importância no desenvolvimento ou controle das infecções (BELKAID *et al.*, 2002; MENDEZ *et al.*, 2004; KORN *et al.*, 2009; ALEXANDER *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de células Th1 ou Th2 ocorre diretamente em resposta a sinais derivados do sistema imune inato, como citado anteriormente (MEDZHITOV; JANEWAY, 1997). A ativação de macrófagos pode ocorrer através da interação de receptores de superfície do tipo PRRs com padrões conservados na superfície da *Leishmania*. Essa ligação entre ligante presente na superfície da *Leishmania* e receptores de macrófagos pode induzir a liberação de IL-12 e TNF- $\alpha$ . Tais citocinas em sinergismo com IL-2 ou IL-15 induzem a produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T *natural killer* (NK), células com papel crítico na resposta imune (SCHARTON; SCOTT, 1993; FEARON; LOCKSLEY, 1996). Adicionalmente, IL-12 induz a diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> para o fenótipo Th1 ao promover a síntese de IFN- $\gamma$  e reduzir a produção de IL-4 por estas células. Então, a síntese de IFN- $\gamma$  aumenta a produção e atividade de IL-12, constituindo um importante sistema de autoregulação positiva autócrina que mantém os níveis de IFN- $\gamma$  e IL-12 amplificados para a ativação do macrófago e proliferação de células Th1 e NK, respectivamente (FEARON; LOCKSLEY, 1996).

Os macrófagos ativados por IL-12 e TNF- $\alpha$  passam então, a induzir a expressão da enzima NO sintetase induzida (iNOS) (LIEW *et al.*, 1990a; PETERS; SACKS, 2006). Esta enzima catalisa a oxidação de um nitrogênio terminal no grupo guanidino da L-

arginina, resultando na produção de óxido nítrico (NO) e citrulina. A síntese de NO constitui um dos principais mecanismos de atividade microbicida (FANG, 2001), além de atuar como molécula sinalizadora ao promover a ativação de células NK por IL-12 e IFN- $\alpha/\beta$  (Diefenbach *et al.*, 1998). A ativação precoce de célula NK pode influenciar na cinética da resposta Th1, devido à produção de IFN- $\gamma$  (TEIXEIRA *et al.*, 2006).

Em estudo sobre a infecção de macrófagos por *L. major*, foi descrito que em consequência ao tratamento com anticorpo monoclonal anti-TNF- $\alpha$  ocorreu inibição da produção de NO *in vitro*, que resultou na sobrevivência do parasito e persistência do quadro infeccioso (GREEN *et al.*, 1990). Outro estudo mostrou que camundongos *knockout* para a enzima iNOS se tornaram altamente susceptíveis à infecção (WEI *et al.*, 1995) e macrófagos destes animais foram incapazes de serem ativados por IFN- $\gamma$  e desenvolverem uma resposta leishmanicida eficiente (WEI *et al.*, 1999). Estes dados, em adição a outros estudos que analisam a função do NO na infecção por *Leishmania* (DIEFENBACH *et al.*, 1998; GANTT *et al.*, 2001; KAVOOSI *et al.*, 2006; HORTA *et al.*, 2012), evidenciam o papel crucial do NO no controle da infecção por *Leishmania*.

Na elucidação do desenvolvimento da resposta Th2, diferentes estudos mostraram que em diversas linhagens de camundongos, IL-4 e IL-13 são citocinas que estão envolvidas na persistência da leishmaniose (LAUNOIS *et al.*, 1995; MATTHEWS *et al.*, 2000). Tais citocinas têm papel fundamental no desenvolvimento de uma resposta de susceptibilidade, pois levam à inibição da produção de IL-12 e da expressão de seu respectivo receptor IL-12R $\beta$ 2, presente em linfócitos T CD4<sup>+</sup> (LAUNOIS *et al.*, 1995; ALEXANDER *et al.*, 2002). Em consequência à inibição de IL-12 ocorre restrição da expansão de linfócitos Th1 e da ativação dos mecanismos leishmanicidas, que levam à resolução da infecção. Adicionalmente, IL-4, IL-10 e IL-13 induzem os macrófagos ativados a produzirem arginase, a qual compete com a enzima iNOS pelo mesmo substrato, levando à redução da produção de NO (LIEW *et al.*, 1990c; CORRALIZA *et al.*, 1995).

Em adição ao papel de IL-4 e IL-13, a produção de IL-10 é de suma importância na modulação dos mecanismos envolvidos no controle da infecção. IL-10 atua como a principal citocina moduladora na leishmaniose visceral (ALEXANDER *et al.*, 2012), entretanto a fonte majoritária desta citocina não são os linfócitos Th2 auxiliares, e sim uma população de células T regulatórias (ALEXANDER *et al.*, 2012), a qual será discutida posteriormente.



### 2.3.3 Determinação da susceptibilidade ou resistência à infecção por *Leishmania*

Estudos mostraram que a resposta imune adaptativa à infecção por *Leishmania* é polarizada, ou seja, o desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1 conduz à resistência, enquanto a diferenciação de células CD4<sup>+</sup> do tipo Th2 confere um perfil de susceptibilidade (HEINZEL *et al.*, 1989; LOCKSLEY; SCOTT, 1991). Entretanto, estudos mais recentes mostraram que essa resposta básica polarizada não ocorre em todos os modelos de infecção por *Leishmania* spp. (AFONSO; SCOTT, 1993; NOBENTRAUTH *et al.*, 1996; SACKS *et al.*, 2002; MURRAY *et al.*, 2006). A depender da espécie do parasito e do modelo do hospedeiro, os perfis de respostas Th1 e Th2 podem promover a infecção ou serem irrelevantes na progressão ou controle da doença. Além disso, foram identificadas novas populações de células T CD4<sup>+</sup> que influenciam significativamente no desenvolvimento ou controle da doença.

Em um estudo pioneiro, Belkaid e colaboradores demonstraram que a população endógena de células T regulatórias CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> foi essencial para o desenvolvimento e manutenção da persistência da infecção cutânea de *L. major*, após cura da lesão na derme, em camundongos C57 resistentes (BELKAID *et al.*, 2002). Inicialmente, essas células foram descritas como a única população de células T CD4<sup>+</sup> capazes de prevenir doenças auto-imunes ao suprimir a ativação e proliferação de linfócitos auto-reativos, além de controlar respostas imune excessivas contra patógenos ou auto-antígenos (SHEVACH *et al.*, 2002; MENDEZ *et al.*, 2004). O desenvolvimento de células T regulatórias é dependente de TGF- $\beta$  secretado pelo macrófago além da baixa expressão de CD40 pelas células dendríticas (MOUGNEAU *et al.*, 2011). Estes linfócitos T regulatórios constituem 5-10% dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> periféricos em roedores e humanos, expressam FoxP3, TGF- $\beta$  e IL-10, além de suprimirem diversas respostas microbidas *in vivo* como a proliferação de IL-12 e produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> efetores (BELKAID *et al.*, 2002; XU *et al.*, 2003; MOUGNEAU *et al.*, 2011).

Durante a infecção por *L. major*, linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> se acumulam na derme, suprimindo a capacidade dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> efetores eliminarem o parasito em um mecanismo dependente e independente de IL-10. Adicionalmente, foi demonstrado que a transferência desses linfócitos para o sítio da infecção é acompanhada por um aumento na produção de IL-4, IL-5 ou IFN- $\gamma$ , embora essas células não sejam fontes

significantes de produção dessas citocinas em resposta a antígeno de *Leishmania* (BELKAID *et al.*, 2002). Foi observado que a maioria das células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> é específica para antígeno de *L. major*, e a persistência do parasito no sítio de infecção influencia de forma decisiva na sobrevivência dessas células (SUFFIA *et al.*, 2006). Esses dados sugerem que o recrutamento e expansão de células T regulatórias para o sítio da lesão que, em equilíbrio com as células T CD4<sup>+</sup> efectoras, induzem uma resposta crônica ou reativação da doença (MENDEZ *et al.*, 2004). Essas células regulatórias podem permitir a persistência de um pequeno número de parasitos no sítio da infecção, que, no entanto, é benéfica para o hospedeiro, pois mantém o indivíduo imune à reinfeção ao longo da vida (MENDEZ *et al.*, 2004). Dessa forma, as células T regulatórias podem apresentar um efeito paradoxal no curso da infecção por *Leishmania*, mediando um benefício tanto para o hospedeiro como para o parasito.

Recentemente, o envolvimento de células T auxiliares 17 (Th17) tem sido avaliado no contexto da infecção por *Leishmania*. A ativação dessas células ocorre principalmente sob indução de TGF- $\beta$ , IL-6 e IL-21, e está associado a doenças auto-imunes, alergias, proteção de superfícies mucosas e patologias excessivas (KORN *et al.*, 2009). Além de produzirem IL-21 e IL-22, as células Th17 são caracterizadas pela produção de IL-17, citocina que apresenta papel crucial na migração, recrutamento e ativação de neutrófilos (ALEXANDER *et al.*, 2012), que podem desempenhar um papel importante no curso da infecção por *Leishmania*. Todavia, o papel destas células ainda não está totalmente compreendido, necessitando de estudos adicionais para elucidar a importância desta população de células T auxiliares na infecção por *Leishmania*.

#### 2.4 Interação macrófago e *Leishmania*

Ao se encontrar na derme do hospedeiro vertebrado, a *Leishmania* pode liberar o fator quimiotático de *Leishmania* (LCF) que induz a migração de neutrófilos para o sítio de infecção (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2002; LASKAY *et al.*, 2003). Tais células contribuem para a eliminação do patógeno com a liberação de NETs (*neutrophil extracellular traps*), redes constituídas de DNA, proteínas granulares e histonas que são liberadas quando os neutrófilos morrem (GUIMARÃES-COSTA *et al.*, 2009). Todavia, alguns parasitos são fagocitados por macrófagos ou quando internalizados por

neutrófilos conseguem sobreviver no ambiente adverso e se beneficiar deste mecanismo de resposta celular.

Neutrófilos infectados podem liberar interleucina-8 (IL-8), que resulta no recrutamento de neutrófilos adicionais para o sítio de infecção (LAUFS *et al.*, 2002). Como estas células têm um tempo de vida curto, dois a três dias após a infecção, eles sofrem apoptose e podem ser internalizados por células macrofágicas, células hospedeiras definitivas do parasito. Este mecanismo de entrada silencioso da *Leishmania* nos macrófagos, conhecido como “cavalo de tróia”, é vantajoso para o protozoário, uma vez que os patógenos internalizados nos neutrófilos apoptóticos não têm contato direto com os receptores de superfície do macrófago, evitando assim a ativação destas células. (LASKAY *et al.*, 2003; LASKAY *et al.*, 2008; JOCHIM *et al.*, 2009).

Apesar de células dendríticas, neutrófilos e fibroblastos serem capazes de internalizar a *Leishmania*, não há evidências que as formas amastigotas possam se replicar em outras células além do macrófago, o que indica o papel crucial dos macrófagos como hospedeiro definitivo (ALEXANDER; RUSSELL, 1992; PETERS; SACKS, 2006). Logo após o repasto sanguíneo, a maioria dos parasitos promastigotas está localizada extracelularmente, os quais podem ser fagocitados diretamente pelas células macrofágicas (PETERS *et al.*, 2008). Na interação macrófago-*Leishmania*, formas promastigotas induzem o macrófago a secretar MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant protein-1*) e CXCL2, quimiocinas com função quimioatrativa de monócitos e neutrófilos, respectivamente, para o sítio da infecção (RACOOSIN *et al.*, 1997).

O caminho clássico e bem descrito na literatura para a entrada do patógeno nos macrófagos consiste na opsonização eficiente do parasito por componentes do soro e internalização direta pela célula hospedeira com a interação de receptores de superfície com moléculas presentes na superfície da *Leishmania* (MOSSER; ROSENTHAL, 1993). Diversas proteínas do soro, opsoninas, e receptores celulares para estas proteínas têm sido descritos na adesão do parasito às células fagocíticas, porém a mais bem caracterizada destas interações consiste na ligação de promastigotas opsonizados pelo complemento a receptores do complemento presentes na superfície dos macrófagos (MOSSER; EDELSON, 1985; BLACKWELL *et al.*, 1985; MOSSER; ROSENTHAL,

1993). Entretanto, é importante ressaltar que algumas espécies de *Leishmania* possuem a capacidade inerente de se ligar diretamente ao macrófago na ausência de opsonização por soro (BLACKWELL *et al.* 1985; WILSON; PEARSON, 1986).

Os macrófagos apresentam uma variedade de receptores envolvidos no reconhecimento, fagocitose e destruição de patógenos (MOSSER; EDELSON, 1985; BLACKWELL *et al.*, 1985; DA SILVA *et al.*, 1989; VAN DER LAAN *et al.*, 1999; UENO; WILSON, 2012) e receptores de reconhecimento padrão tais como CD14, receptores manose, *toll-like* e *scavenger* (WILSON; PEARSON, 1986; GOUGH; GORDON, 2000; UENO; WILSON, 2012). Estes receptores macrofágicos são responsáveis pelo reconhecimento e ligação a padrões moleculares presentes na superfície do parasito, como moléculas de LPG e a glicoproteína de 63kDa (gp63) (BLACKWELL *et al.*, 1985; RUSSELL; WILHELM, 1986; WANDERLEY *et al.*, 2005).

A depender da fase de desenvolvimento, o parasito interage de forma distinta com a célula hospedeira. Formas promastigotas procíclicas são sensíveis ao sistema complemento do soro, o que determina a consequente lise do patógeno ou destruição por fagocitose. Entretanto, as formas promastigotas metacíclicas são relativamente resistentes a lise mediada pelo complemento e exploram as propriedades de opsonização por este sistema para aumentar a interação com a célula fagocítica (BRITTINGHAM; MOSSER, 1996; BOGDAN *et al.*, 1998).

Nas formas metacíclicas, o alongamento das moléculas glicolípídicas de LPG aliado ao aumento de expressão de gp63 e proteínas cinases que fosforilam várias proteínas do sistema complemento, como C3, C5 e C9, resultam na inibição da via do complemento e na fagocitose passiva do patógeno (BOGDAN *et al.*, 1998). A metaloprotease gp63 é responsável por clivar o componente C3b do complemento na forma inativa iC3b, a qual pode opsonizar o parasito, que é então fagocitado por meio da ligação com receptores do complemento CR1 e CR3, respectivamente (BLACKWELL *et al.*, 1985; WILSON *et al.*, 1989; UENO; WILSON, 2012).

O caminho de internalização de formas amastigotas pelo macrófago ainda não está claramente elucidado, com poucas evidências da existência de fatores de virulência intrínsecos nestas formas (WANDERLEY *et al.*, 2005). Foi observado que formas amastigotas expõem fosfatidilserina (PS) em sua superfície e que este fosfolípídeo tem

um importante papel na internalização e sobrevivência do parasito dentro do macrófago (DE FREITAS BALANCO *et al.*, 2001). A ligação de formas amastigotas de *L. amazonensis* ao macrófago é independente de soro e não é inibida com o bloqueio de receptores fagocíticos como CR1, CR3 e receptor manose (MOSSER; ROSENTHAL, 1993). Guy e colaboradores (1993) relataram que a fagocitose de formas amastigotas de *L. major* parece ocorrer primariamente via receptor Fc (FcR) e CR3. Estas observações indicam que a adesão de formas amastigotas à célula hospedeira pode envolver receptores macrofágicos diferentes dos observados na internalização de formas promastigotas. Todavia receptores adicionais que podem participar deste processo ainda precisam ser descritos (GUY *et al.*, 1993; AWASTHI *et al.*, 2004).

#### 2.4.1 Internalização e vida intracelular

Após a interação de moléculas específicas do parasito com receptores na superfície do macrófago, promastigotas de *Leishmania* são internalizados em fagossomos. Estes compartimentos transitórios passam por uma série de modificações via maturação e fusão com lisossomos e endossomos tardios, originando o vacúolo parasitóforo (VP). Durante este processo, com duração de dois a cinco dias a depender da espécie de *Leishmania*, formas promastigotas passam por diversas modificações e transformam-se nas formas amastigotas (ANTOINE *et al.*, 1998).

VP é um compartimento com lúmen ácido, constituído por várias hidrolases ácidas ativas, pela bomba vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase inserida na membrana do VP e marcadores de endossomos e lisossomos como o receptor manose-6-fosfato, LAMP-1, LAMP-2, a glicoproteína-1 de membrana lisossomal e a proteína G monomérica rab 7 (ANTOINE *et al.*, 1990; DEJARDINS; DESCOTEAUX, 1997, ANTOINE *et al.*, 1998). Diferente das formas promastigotas adaptadas ao pH fisiológico, parasitos amastigotas são organismos acidófilos com um metabolismo ótimo no pH ≤ 5 encontrado no VP (ANTOINE *et al.*, 1998).

Foi demonstrado que durante o processo de formação do VP, unidades repetidas de LPG na superfície de promastigotas metacíclicas de *Leishmania* são capazes de inibir por um tempo a maturação do fagossomo (DEJARDINS; DESCOTEAUX, 1997; DUCLOS *et al.*, 2000). Este atraso é de fundamental importância para a sobrevivência da *Leishmania*, ao proporcionar tempo suficiente para a diferenciação destes parasitos

em formas amastigotas adaptadas ao pH ácido (SACKS; SHER, 2002). Estas formas sobrevivem e replicam-se dentro do VP, eventualmente resultando na lise da célula infectada e liberação destes parasitos para infectar células adjacentes (LEWIS; PETERS, 1977; BERMAN *et al.*, 1979).

O processo de internalização de patógenos é acompanhado por um aumento no consumo de oxigênio por fagócitos. Estas células apresentam mecanismos primários de defesa induzidos pela interação e engolfamento de agentes microbicidas, como a ativação do metabolismo oxidativo, além de síntese e liberação de metabólitos de ácido aracônico (PETERS; SACKS, 2006). Stafford e colaboradores (2002) demonstraram uma correlação entre explosão respiratória e formação de importantes moléculas microbicidas, os radicais intermediários de oxigênio (ROI). A principal fonte de ROIs no macrófago é o complexo enzimático conhecido como NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) oxidase. Este complexo multimérico encontra-se associado à superfície interna da membrana plasmática, sendo constituído por duas proteínas que compõem o citocromo da membrana: a gp91 phox e a p22 phox, além de no mínimo quatro proteínas citosólicas: p47 phox, p67 phox, p40 phox e rac1/rac2 (BABIOR, 2004; PETERS; SACKS, 2006). As proteínas citosólicas são translocadas para a membrana plasmática, onde se encontra o citocromo, após fagocitose ou estímulo apropriado (LODGE *et al.*, 2006). Após a formação do complexo NADPH oxidase, cinases conhecidas como ativadoras da explosão respiratória são responsáveis pela fosforilação de resíduos específicos e consequente ativação do complexo. Tais moléculas incluem várias isoformas de PKC (*protein kinase C*), PKA (*protein kinase A*) e MAPK (*mitogen-activated protein kinases*).

Com o complexo oxidase formado e ativo, este atua como doador de elétron para o oxigênio molecular, produzindo o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o qual pode resultar na geração de ROI, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (PETERS; SACKS, 2006). Dados da literatura demonstram que os ROI são componentes essenciais na resposta imune inata, e em mamíferos, a NADPH oxidase tem participação na produção de ROI pelas células fagocíticas ativadas, e, consequentemente, na morte de microorganismos (BOGDAN 2000; BOGDAN, 2007). Em macrófagos ativados por  $IFN-\gamma$ ,  $O_2^-$  e NO são produzidos em quantidades equimolares e geram peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), um radical livre altamente tóxico para diversos patógenos (RADI *et al.*, 2001).

Na infecção por *Leishmania*, a ativação de macrófagos por citocinas leva a produção de ROI e reativos intermediários de nitrogênio (RNI), moléculas com atividade leishmanicida com grande importância no controle da infecção (MURRAY *et al.*, 1981; JAMES *et al.*, 1995, MURRAY *et al.*, 1999). Foi observado que parasitos de *Leishmania* evitam a explosão respiratória ao inibirem a ativação da proteína cinase C em macrófagos (OLIVER *et al.*, 1992). Ainda, em macrófagos de camundongos *knockout* para PKC- $\alpha$ , ocorreu um aumento significativo na sobrevivência intracelular de promastigotas de *L. donovani* (ST. DENIS *et al.*, 1999). Tais observações sugerem que a cascata de sinalização por PKC é crucial para a ativação do macrófago e morte do parasito. Como a produção de ROI tem papel fundamental na destruição do parasito, a inibição ou desvio da rota de ativação da NADPH pela *Leishmania* favorece o estabelecimento da infecção (PETERS; SACKS, 2006).

#### 2.4.2 O modelo experimental

A interação parasito-hospedeiro é considerada um sistema complexo, uma vez que esta é multifatorial e dinâmica. Diferentes modelos experimentais são utilizados para investigar esta interação, assim como a resposta imune induzida após a infecção. Devido a fatores éticos, similaridades na fisiologia e fácil manipulação, animais são considerados o melhor modelo para a caracterização da doença e estudo do impacto no hospedeiro (AWASTHI *et al.*, 2004). O modelo de leishmaniose murina é amplamente utilizado no estudo das primeiras fases e do curso da infecção por *Leishmania* (ANDRADE *et al.*, 1984; HANDMAM, 2001). Existem modelos experimentais murinos para leishmanioses cutânea e visceral que se assemelham as respostas de indivíduos tanto com perfis de resistência como de susceptibilidade (PEREZ *et al.*, 1979; HOWARD *et al.*, 1980; FORTIER *et al.*, 1990). Esses modelos de estudo representam exemplares interessantes para o estudo de padrões histológicos e resposta imune da infecção por *Leishmania* e do desenvolvimento da doença (ANDRADE *et al.*, 1984).

Estudos de padrões histológicos dos diferentes modelos de leishmaniose murina mostraram que camundongos resistentes a determinadas espécies de *Leishmania* apresentam uma lesão pequena e localizada, caracterizada por granuloma composto por um infiltrado proeminente de linfócitos, células epiteliais e escasso parasitismo (ANDRADE *et al.*, 1984; HANDMAM *et al.*, 2001). No entanto, em animais

susceptíveis são observadas inúmeras lesões com intenso parasitismo. Tais lesões apresentam infiltrado contendo um amplo número de macrófagos parasitados e uma quantidade reduzida de linfócitos e de células plasmáticas. Nas linhagens de camundongos susceptíveis ocorre a disseminação dos parasitos para órgãos internos, resultando em alterações funcionais destes, e eventualmente em morte do animal (ANDRADE *et al.*, 1984; HANDMAM *et al.*, 2001).

A predisposição genética para o desenvolvimento de um perfil de susceptibilidade ou resistência à infecção por *Leishmania* nas diferentes linhagens de camundongos, aliado às características intrínsecas da espécie do patógeno resulta na expressão de uma resposta Th1, com alta produção de IL-12, IFN- $\gamma$  e IL-18, tendo por consequência a cura e eliminação do parasito ou Th2, com alta produção de citocinas como IL-4 e IL-10, que contribuem para a progressão da doença (SADICK, *et al.*, 1986; HEINZEL *et al.*, 1989; COFFMAN *et al.*, 1991). Entretanto, como descrito anteriormente, diferentes estudos têm demonstrado que a regulação de citocinas para a ocorrência de uma resposta polarizada é complexa e refinada, e nem sempre condiz com o predomínio de resposta Th1 ou Th2 esperada (AFONSO; SCOTT, 1993; NOBEN-TRAUTH *et al.*, 1996; SACKS *et al.*, 2002).

A infecção por *L. major* em camundongos de diferentes linhagens isogênicas resulta em quadros distintos e opostos da doença. Behin e colaboradores (1979) demonstraram que o curso da infecção por esta espécie de *Leishmania* é dependente da linhagem do camundongo. Algumas linhagens como BALB/c são incapazes de controlar a infecção, levando à disseminação e morte dos animais. Entretanto, a infecção em camundongos das linhagens CBA e C3H resulta em lesão localizada que cura espontaneamente após algumas semanas (BEHIN *et al.*, 1979).

Em nosso laboratório, foi demonstrado que camundongos CBA desenvolvem distintos padrões histopatológicos em resposta à infecção por *Leishmania major* e *L. amazonensis* (LEMOS DE SOUSA *et al.*, 2000). Camundongos CBA são resistentes à infecção por *L. major*, porém são susceptíveis por *L. amazonensis* (BEHIN *et al.*, 1979; CHAMPSI *et al.*, 1988). Estudos *in vitro* foram utilizados para investigar o papel do macrófago de camundongos CBA na determinação da resposta à infecção por promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. major*. Foi evidenciado que, em contraste a *L. major*, *L. amazonensis* é resistente aos mecanismos leishmanicidas inatos do macrófago (GOMES *et al.*, 2003). Esses dados indicam a importância dos fatores relacionados com



o parasito e com o hospedeiro na determinação da resposta imune na infecção por *Leishmania*. Além disso, esses dados sugerem que, a partir do primeiro contato do parasito com o macrófago, a célula hospedeira produz, de forma diferenciada, fatores que teriam papel no curso da infecção.

Como a infecção por *Leishmania* pode afetar o padrão de expressão gênica no macrófago (RACOOSIN; BEVERLEY, 1997), foi conduzido um estudo com o objetivo de identificar, em larga escala, genes expressos diferentemente em macrófagos de CBA, na resposta à infecção por *L. amazonensis* ou *L. major*. Entre os genes modulados, foi observado que o gene para o receptor tipo *scavenger* MARCO (*macrophage receptor with collagenous structure*) teve sua expressão aumentada em resposta à infecção por *L. major*, mas não na infecção por *L. amazonensis*.

## 2.5 O receptor MARCO

MARCO consiste numa proteína transmembrana composta por três subunidades de aproximadamente 52KDa que apresenta em sua estrutura um longo domínio colagenoso, e um domínio SRCR (*Scavenger Receptor with Cysteine-Rich Domain*), sendo classificado como receptor *scavenger* classe A (KRAAL *et al.*, 2000).

Os receptores *scavenger* classe A são definidos como uma família de receptores de superfície capazes de se ligar a lipoproteínas modificadas, como lipoproteínas acetiladas e oxidadas (ELOMAA *et al.*, 1995) e podem estar envolvidos no processo de adesão celular em macrófagos. Este grupo de glicoproteínas é composto por receptores *scavenger* classe A tipo I e tipo II (SR-AI e SR-AII) e pelo receptor de macrófago com estrutura de colágeno, MARCO. As proteínas SR-AI e SR-AII são codificadas pelo mesmo gene e apresentam diferenças sutis em função do *splicing* alternativo, no entanto o MARCO é codificado por um gene diferente, que apresenta motivos estruturais similares aos SR-A com características semelhantes ao SR-AI (ELOMAA *et al.*, 1998; PEISER *et al.*, 2001).

Elomaa e colaboradores (1998) demonstraram que o receptor MARCO humano é altamente similar à molécula murina e relataram que macrófagos da zona marginal do baço, os do cordão medular dos linfonodos e os peritoneais são as células que principalmente expressam esse receptor (ELOMAA *et al.*, 1998; KRAAL *et al.*, 2000). No entanto, em macrófagos do fígado, pulmão e outros órgãos, pode ocorrer uma

expressão rápida e transitória dessa proteína durante a infecção bacteriana ou sob administração de produtos derivados de bactérias (VAN DER LAAN *et al.*, 1997; VAN DER LAAN *et al.*, 1999). O padrão de expressão deste receptor indica um provável papel especializado de MARCO na resposta antimicrobica.

Pikkarainen e colaboradores (1999) observaram que a expressão de MARCO em diferentes tipos celulares resulta na formação de estruturas denominadas lamelipódios e longos processos na membrana plasmática. Neste estudo, utilizando células expressando formas truncadas da proteína, observou-se que a formação de lamelipódios é dependente do domínio rico em cisteína da molécula. A presença de domínios SRCR em receptores de superfície que estão envolvidos em respostas imunológicas indica que este domínio pode ser crucial para as interações celulares envolvendo a interação com esses receptores (KRAAL *et al.*, 2000). Estes dados sugerem que o receptor MARCO por participar nos processos de adesão e mobilidade da membrana, tem papel importante na fagocitose de partículas pelo macrófago.

Diferentes estudos mostraram que MARCO se liga a bactérias gram-positivas e gram-negativas (ELOMAA *et al.*, 1995; KRAAL *et al.*, 2000), partículas não opsonizadas (PALECANDA *et al.*, 1999; ARREDOUANI *et al.*, 2005), e também a moléculas como LPS (SANKALA *et al.*, 2002). Experimentos *in vivo* sugerem que o receptor *scavenger* MARCO exerce um papel no reconhecimento e fagocitose de patógenos. Ito e colaboradores (1999) demonstraram uma possível relação entre a expressão de MARCO em macrófagos na zona marginal de baços murinos com a fagocitose de BCG por estas células. No mesmo ano, Van der Laan e colaboradores confirmaram o papel *in vivo* de MARCO como um receptor para fagocitose de bactérias (VAN DER LAAN *et al.*, 1999). Com a utilização de camundongos com deleção genética do gene do MARCO, foi observado que esta glicoproteína tem uma função importante na defesa do hospedeiro contra infecção por *Streptococcus pneumoniae* (ARREDOUANI *et al.*, 2004). Esses dados sugerem um papel importante do MARCO na resposta imune inata contra patógenos.

Em trabalho recentemente publicado pelo nosso grupo, foi demonstrado que o receptor MARCO apresenta maior expressão em macrófagos murinos peritoneais inflamatórios infectados por *L. major* em relação à infecção por *L. amazonensis*. O bloqueio do receptor com o anticorpo monoclonal ED31 reduziu a infecção por *L. major* em 30%, indicando que esta proteína tem participação na entrada de

promastigotas de *L. major* em macrófagos de CBA. Como o bloqueio do MARCO interfere parcialmente na infecção, foi sugerido que a interação macrófagos de CBA com *L. major* teria a participação de MARCO e de outros receptores fagocíticos (GOMES *et al.*, 2009). A participação de diferentes receptores contribuindo em conjunto para o reconhecimento e fagocitose de *Leishmania* foi anteriormente descrita (WILSON; PEARSON, 1986; ROSENTHAL *et al.*, 1996; DE VEER *et al.*, 2003; UENO; WILSON, 2012). No entanto, o conjunto desses receptores ainda não foi identificado.

Apesar da importância do MARCO na defesa contra patógenos, poucos estudos relatam o papel do receptor na produção de citocinas envolvidas com o desenvolvimento de perfis Th1/Th2 da resposta imune. Jozefowski e colaboradores (2005) demonstraram que a expressão de MARCO e SR-AI em macrófagos estimulados por LPS foi regulada de modo oposto, por fatores de polarização de resposta Th1 ou Th2, respectivamente. Ainda, macrófagos de camundongos MARCO *knockout* tiveram a produção de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  significativamente reduzida em resposta a *Mycobacterium tuberculosis* (BOWDISH *et al.*, 2009).

Alternativamente, a interação de promastigotas de *L. major* com o receptor MARCO pode levar à produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e, como consequência, ativação dos macrófagos e morte intracelular do parasito. Embora os dados obtidos indiquem um provável papel deste receptor na fagocitose de promastigotas de *L. major*, estudos adicionais precisam ser realizados para aprofundar o papel do receptor MARCO na infecção de *L. major*.

## 2.6 Hipótese

Diante do exposto, o presente estudo teve como hipótese que o receptor MARCO participa do reconhecimento e fagocitose de *L. major* por células murinas influenciando o curso da infecção *in vitro*.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Avaliar a interação de *L. major* com macrófagos de linhagem J774 superexpressando MARCO

#### 3.2 ESPECÍFICOS

1. Determinar o efeito da superexpressão do gene do receptor MARCO na infecção de macrófagos de linhagem J774 por promastigotas de *L. major*.
2. Determinar o efeito da superexpressão do gene do MARCO na produção de citocinas em macrófagos de linhagem J774 infectados por promastigotas de *L. major*
3. Avaliar a participação do receptor MARCO na sobrevivência intracelular de *L. major* em macrófagos de linhagem J774

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 PARASITOS

A cepa de *Leishmania major* (MHOM/RI-/WR-173) utilizada no presente estudo, gentilmente cedida por Dra. Aldina Barral, foi obtida do estoque do Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - Fiocruz/BA.

### 4.2 Cultivo de Células

#### 4.2.1 *Leishmania*

As formas promastigotas de *L. major* foram cultivadas em meio Schneider (Sigma) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado (Gibco) e 50 µg/mL do antibiótico gentamicina (Sigma). Os parasitos foram cultivados em estufa B.O.D. a 24°C e o crescimento foi acompanhado diariamente, por contagem em câmara de Neubauer. Para realização do experimento, as formas promastigotas foram cultivadas por três a cinco dias até atingirem a fase estacionária.

#### 4.2.2 Células J774

A escolha dessas células de linhagem macrofágica murina J774 nos ensaios foi baseada na premissa que tais células apresentam expressão constitutiva do receptor MARCO (VAN DER LAAN *et al.*, 1999; JÓZEFOWSKI *et al.*, 2005), além de apresentarem a vantagem de serem mais permissíveis à transfecção que outros tipos celulares como macrófagos primários. Células de linhagem J774A.1 (Sigma) oriundas de tumor em camundongos fêmeas BALB/C foram cultivadas em meio RPMI (Sigma) suplementado com 25 mM de HEPES pH 7,4, 2 mM de glutamina, 2 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma), 10% de soro bovino fetal inativado (GIBCO), 0,02 mg/ml do antibiótico ciprofloxacina (Isofarma) (RPMI completo) ao qual foi adicionado 2 mM de 2-Amino-6-mercaptapurina (Sigma). As células J774 foram mantidas em cultura a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 97% de umidade por até nove passagens. Quando a cultura atingiu 80 a 90% de confluência, as células foram retiradas das garrafas de cultura com leves batidas, em seguida, foram centrifugadas a 300Xg, por 10 min a 20°C e ressuspensas em meio RPMI completo.

### 4.3 TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS J774 COM O PLASMÍDEO PCDNA3.1-MARCO

Para obtenção de células superexpressando o gene do receptor MARCO, células J774 foram transfectadas pelo método Lipofectamine 2000™ (Invitrogen) com o plasmídeo pcDNA3.1-MARCO (J774-MARCO) ou o plasmídeo pcDNA3.1 sem o inserto do gene do MARCO (J774-MOCK), como controle da transfecção. Os plasmídeos utilizados no estudo foram gentilmente cedidos por Dr. Timo Pikkarainen. As células foram plaqueadas na concentração de  $2 \times 10^5$  células por poço com meio RPMI sem antibiótico. Após 24 h, os meios de cultura foram substituídos por meios sem antibiótico e sem soro bovino fetal (SBF) e, em seguida, a mistura da transfecção foi adicionada na proporção de 1:1 de DNA ( $\mu\text{g}$ ): Lipossomo ( $\mu\text{L}$ ). Após 5 h de incubação, foram adicionados à mistura 400 $\mu\text{L}$  de meio RPMI completo sem antibiótico. Para geração das linhagens estáveis foi adicionado ao RPMI completo o antibiótico geneticina (Sigma) na concentração de 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A seleção dos clones viáveis foi realizada em um período de oito semanas, com troca diária do meio de cultura contendo geneticina. A confirmação da superexpressão do MARCO foi realizada por PCR em tempo real.

### 4.4 RT-PCR PARA VALIDAÇÃO DA SUPEREXPRESSÃO DE MARCO EM CÉLULAS J774

#### 4.4.1 Obtenção do RNA total de células J774

Células J774-MARCO e J774-MOCK foram cultivadas em duplicata na concentração de  $5 \times 10^6$  células por poço em placas de 6 poços. Como controle positivo da expressão de MARCO, macrófagos peritoneais inflamatório foram estimulados. Para isso, macrófagos peritoneais foram previamente incubados com LPS (Sigma) por 24 h. No final do tempo de incubação, todos os grupos celulares, J774-MARCO, J774-MOCK e macrófagos peritoneais estimulados com LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) foram lavados duas vezes com solução salina a 0,9% e o RNA total foi extraído utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante. O RNA total obtido foi quantificado utilizando NanoDropND-1000 (ThermoScientific). Após a quantificação, as amostras de RNA total foram alíquotadas e armazenadas em um freezer a  $-80^\circ\text{C}$ .

#### 4.4.2 Obtenção da sequência codificante para o MARCO

Para obtenção da sequência codificante do receptor MARCO, foi realizada uma RT-qPCR (do inglês, *Reverse Transcriptase - quantitative Polymerase Chain Reaction*). Inicialmente 1 µg do RNA total foi linearizado numa solução contendo 0,5 µg/ml de oligodT (Invitrogen) e água deionizada, totalizando 13,8 µL, a reação foi realizada no termociclador Mastercycler® gradient 53331 (Eppendorf) a 70°C por 10 min. Para a síntese do cDNA, foram adicionados à solução RNA-oligodT: 1 mM de cada dNTP (Fermentas), 2 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), tampão de PCR 1x (Invitrogen), 2 U/µL de RNase OUT (Invitrogen) e 4 U/µL da SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen), totalizando 20 µL. A reação ocorreu a 42°C por 2 h no termociclador Mastercycler® gradient 53331 (Eppendorf) e, posteriormente, o cDNA produzido foi aliquoteado e estocado a -80°C. Para obtenção do cDNA para a curva de concentração foi utilizada uma mistura contendo amostras de RNA extraído de células J774-MOCK (3,75 µg) e J774-MARCO (3,75 µg) nas mesmas condições descritas acima. Então, o cDNA foi diluído nas concentrações de 100, 40, 16, 6,4, 2,56 e 1,052 ng. Após a obtenção do cDNA, foi realizada uma PCR a fim de adquirir a sequência codificante do MARCO. Os iniciadores *forward* GGCACCAAGGGAGACAAA e *reverse* TCCCTTCATGCCCATGTC, utilizados na reação foram desenhados com base na sequência do MARCO de *Mus musculus* disponível no *GenBank*. Iniciadores para a sequência do GAPDH foram utilizados como controle da amplificação. O cDNA sintetizado (≈10 ng em 5µL) foi adicionado a 4 pmol/µL de cada iniciador e 10 µL de Sybr® GreenMaster Mix (Applied Biosystems) em água deionizada livre de DNase e RNase, totalizando 20 µL da solução. A mistura foi submetida à PCR no aparelho 7500 Fast Real- Time PCR (Applied Biosystems), sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 50°C por 2 min; ciclos a 95°C por 10 min, 95°C por 15 s seguidos de anelamento e extensão a 60 °C por 1 min.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA DOS CLONES TRANSFECTADOS

A fim de avaliar o efeito da superexpressão sobre o metabolismo celular J774-MARCO foram semeadas na concentração de 10<sup>5</sup> células/poço em placa de 96 poços em 200 µL de meio RPMI completo e acondicionadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 97% de

umidade. Como controle utilizamos células J774 não transfectadas e J774-MOCK. Decorridas 24 h, foi adicionado meio de cultura sem vermelho de fenol com 10% de Alamar blue® (Invitrogen). O método do Alamar blue consiste na utilização de um indicador de oxi-redução que exibe mudanças colorimétricas e de fluorescência com a redução química do meio em resposta ao crescimento celular. As mudanças de oxi-redução do meio de cultura são verificadas com a medida da absorbância e ou fluorescência e os dados obtidos são utilizados para calcular o percentual de redução do meio. Após 5h da incubação com Alamar blue®, a leitura foi realizada em espectrofotômetro Spectra Max 340PC na absorbância de 570 e 600nm e analisada no programa SOFTmax PRO 5.2. A oxirredução do meio com Alamar blue foi verificada com a medida da absorbância e os dados obtidos foram utilizados para calcular o percentual de redução do meio, de acordo com o cálculo recomendado pelo fabricante. Foram realizados quatro experimentos independentes em sextuplicata.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DOS CLONES TRANSFECTADOS

Com o intuito de avaliar a proliferação celular dos clones transfectados,  $10^6$  células J774-MARCO e J774-MOCK foram cultivadas em tubos de polipropileno contendo 3 mL de RPMI completo e acondicionadas em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. Após 24, 48 e 72 h, as culturas foram centrifugadas a 720 x g por 10 min a 4°C e o sedimento ressuspense em 500 µL de RPMI. Por fim, uma alíquota de 10 µL desta suspensão foi retirada, diluída com azul de tripan e as células foram contadas em câmara de Neubauer. Células J774 não transfectadas foram utilizadas no ensaio como controle da viabilidade celular. Foram realizados dois experimentos independentes em sextuplicata.

#### 4.7 SEPARAÇÃO DE PROMASTIGOTAS METACÍCLICAS DE *L. MAJOR*

Com o objetivo de separar promastigotas metacíclicas de *L. major* da cultura em fase estacionária, foi empregado o protocolo adaptado descrito por Späth ; Beverley (2001). Inicialmente, promastigotas de *L. major* em fase estacionária foram recolhidas e lavadas em meio DMEM (Gibco) a 1.781xg por 10 min à 25°C. Após a centrifugação, o sedimento foi ressuspense em DMEM e os parasitos foram contados em câmara de Neubauer. Em seguida, para a separação das metacíclicas, para primeira camada  $2 \times 10^8$



parasitos foram suspensos em 2 mL de DMEM e sob esta camada foram adicionados 2 mL de Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences) a 10% diluído em Meio 199 (Gibco), além de uma terceira camada de 2 mL de Ficoll a 40% diluído em PBS. O gradiente foi submetido à centrifugação a 365xg a 25°C por 10 min com a desaceleração ajustada para zero. As metacíclicas acumuladas na fase do Ficoll 10% foram recolhidas e lavadas duas vezes com solução de NaCl 0,9% a 1.781xg por 10 min a 25°C. A contagem dos parasitos foi realizada em câmara de Neubauer para posterior realização dos experimentos.

#### 4.8 CO-LOCALIZAÇÃO DE *L. MAJOR* COM CÉLULAS J774- MARCO

Com a finalidade de avaliar a co-localização de *L. major* com células superexpressando o MARCO,  $2 \times 10^5$  células J774-MARCO foram plaqueadas e, após 24 h, foram expostas a promastigotas metacíclicas de *L. major* na proporção 10:1, por 30 min a 4°C. Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (8% de paraformaldeído em PBS 2X) por 15 min a 25°C e armazenadas a 4°C até a realização de imunomarcação. As mesmas observações foram realizadas com as células controle J774-MOCK.

##### 4.8.1 Imunomarcação

As células fixadas com paraformaldeído 4% foram lavadas 3 vezes com PBS 1X (pH 7,4) e incubadas com  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50mM durante 15min. Em seguida, as células foram permeabilizadas com PBST 2% (2% de Tween 20 em PBS 1X) durante 30 min. Após a permeabilização da membrana celular, foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas com PBST 0,1% contendo 10% de soro de camundongo inativado e 0,1% de gelatina de teleósteos (Sigma) por 40 min. Decorrido esse intervalo, as células foram imunomarcadas com o anticorpo monoclonal anti-MARCO ED31 (0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e os parasitos com anticorpo anti-*Leishmania* (1:1000), ambos diluídos em PBST-gelatina 0,1%, por 16 h a 4°C. Como controle negativo da reação, um grupo de células foi incubado com IgG1 de rato (0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e soro de coelho (1:1000) em substituição aos anticorpos primários. Posteriormente, as células foram lavadas três vezes com PBST 0,1% e expostas aos anticorpos secundários anti-IgG de rato conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 594 (0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) (Molecular Probes) e anti-IgG de coelho conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) (Molecular Probes) por 45 min. Por fim, as células foram lavadas três vezes com PBST 0,1% seguidas de três lavagens com PBS

1X e as lâminas foram então montadas utilizando o *kit* Vectashield com DAPI (VECTOR). As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência Olympus-BX51 (Olympus) no aumento de 400x. Todos os passos, em que a temperatura não foi mencionada, foram realizados à temperatura ambiente.

#### 4.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE CÉLULAS J774-MARCO

Para a avaliação ultraestrutural das células superexpressando MARCO,  $2 \times 10^5$  células J774-MARCO foram plaqueadas em meio RPMI completo e acondicionadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 97% de umidade. Decorridas 24 h, as células foram fixadas com glutaraldeído 2% por 1 h a 25°C. Em seguida, as amostras foram incubadas com tetróxido de ósmio 1% por 30 minutos. Por fim, foi realizada a desidratação das amostras com soluções de concentrações crescentes de álcool etílico (30%, 50%, 70%, 90%, 100%) seguida de secagem por ponto crítico e metalização com ouro. O mesmo procedimento foi realizado com as células controle J774-MOCK. Após o processamento, as amostras foram observadas no microscópio eletrônico de varredura JSM 6390LV (JEOL) e as imagens de campos aleatórios foram adquiridas no aumento de 900x. Foi quantificada a presença de células com padrão de maior dimensão e espalhamento e maior número de lamelipódios e estruturas semelhantes a filopódios em cinco imagens de cada tipo celular com aproximadamente 20 células por imagem.

#### 4.10 CINÉTICA DE INFECÇÃO POR *L. MAJOR* EM CÉLULAS J774-MARCO

Com o objetivo de avaliar o efeito da expressão do receptor MARCO sobre a infecção por *L. major*, células J774-MARCO foram infectadas com promastigotas metacíclicas de *L. major* na proporção de 10:1 a uma temperatura de 37°C por 6 h. Em seguida, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com solução salina a 0,9%, para remoção dos parasitas não fagocitados, e reincubadas por adicionais 6, 12, 24 e 48 h. Então, as células foram fixadas nos referidos tempos de infecção com álcool absoluto por 15 min e coradas com hematoxilina e eosina (H; E). As mesmas observações foram realizadas com as células controle J774-MOCK. O padrão de infecção foi avaliado pela determinação do percentual de aumento da infecção em J774-MARCO em relação às células controle J774-MOCK, além da carga parasitária. No mínimo, 400 células J774 por lamínula foram contadas em microscópio

óptico, no aumento de 1000x. Para o cálculo de aumento da infecção em J774-MARCO em relação às células controle J774-MOCK, os valores absolutos de células controle J774-MOCK infectadas foram considerados como 100%. Foram realizados três experimentos independentes em quintuplicata.

#### 4.11 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MEDIADORES

Para avaliar o efeito na produção de citocinas pelas células J774-MARCO,  $2 \times 10^5$  células foram previamente estimuladas com IFN- $\gamma$  (100 U.I) e infectadas com promastigotas metacíclicas de *L. major*, como descrito no item 10. Após 6 h, o meio de cultura foi aspirado e as células foram lavadas duas vezes com solução salina 0,9% para remoção dos parasitas não internalizados e, em seguida, reincubadas em meio contendo IFN-  $\gamma$  (100 U.I) por adicionais 24 e 48 h. As mesmas observações foram realizadas com as células controle J774-MOCK. Os sobrenadantes das culturas foram, então, coletados para mensuração quantitativa de mediadores liberados no meio de cultura. Foi realizado um experimento em sextuplicata.

##### 4.11.1 Avaliação da produção de Citocinas

O *kitBD™ CBA Mouse Inflammation* (BD Biosciences) foi utilizado para quantificar citocinas conhecidas por estarem envolvidas na resposta próinflamatória como Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10), Proteína-1 quimioatrativa de monócito (MCP-1), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e Interleucina-12p70 (IL-12p70). O procedimento foi realizado de acordo com as especificações do fabricante e as amostras obtidas foram analisadas por citometria de fluxo.

##### 4.11.2 Avaliação da produção de Óxido nítrico (NO)

A produção de NO foi determinada com o método de Griess, a partir da quantificação de nitrito nos sobrenadantes das culturas, como descrito por Ding e colaboradores (1988). Volumes iguais dos sobrenadantes das culturas foram distribuídos em placas de 96 poços e, posteriormente, incubados na proporção 1:2 com reagente de Griess composto de 1% sulfanilamida, 1% N-1 naftiletlenodiamina (NEED). Para construção da curva padrão de leitura foi utilizada uma solução de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) como referência, com concentrações de 1 a 200  $\mu\text{M}$ , distribuídas em triplicata na placa de 96 poços. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Spectra

Max 340PC na DO<sub>490</sub> e analisada no programa SOFTmax PRO 5.2. Os resultados foram expressos em concentração de nitrito ( $\mu\text{M}$ ).

#### 4.12 AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA INTRACELULAR DE *L. MAJOR* EM CÉLULAS J774-MARCO

Com o intuito de avaliar o efeito da superexpressão de MARCO na sobrevivência intracelular do parasito,  $2 \times 10^5$  células J774-MARCO foram infectadas com promastigotas metacíclicas de *L. major*, como descrito no item 10. Após 6 h de infecção, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas duas vezes com solução salina a 0,9% para remoção dos parasitas não fagocitados e reincubadas por adicionais 24, 48 e 72 h em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. Decorridos esses intervalos, os poços foram lavados duas vezes com solução salina e, em seguida, foi adicionado 1 mL de meio Schneider completo. Então, as placas foram realocadas em estufa B.O.D e incubadas a 24°C por 5 dias. No quinto dia, foram retiradas alíquotas das culturas para avaliação direta dos parasitos em câmara de Neubauer. Foram realizados quatro experimentos independentes em sextuplicata.

#### 4.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

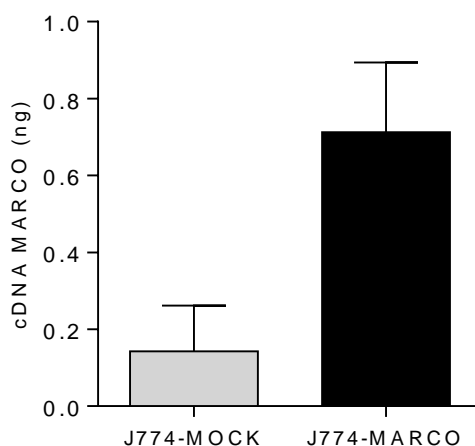
Todos os resultados gerados nos experimentos acima descritos foram plotados em gráficos e analisados estatisticamente com o auxílio do programa GraphPad Prism 6<sup>®</sup>. Para comparação entre 3 ou mais grupos que apresentaram distribuição normal, baseados no teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, foi utilizado o teste estatístico One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey. Já a comparação entre 3 ou mais grupos que não apresentaram distribuição normal foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn's. Quando foram comparados somente dois grupos entre si, com distribuição normal, foi utilizado o teste *t* de *Student* não pareado. Adicionalmente, a comparação entre dois grupos com distribuição não-paramétrica foi realizada com o teste de Mann-Whitney. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando o valor de  $p \leq 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS J774 COM SUPEREXPRESSION DO RECEPTOR MARCO

#### 5.1.1 Confirmação da superexpressão do MARCO em células J774

Com a quantificação do cDNA de MARCO nas amostras foi possível inferir que como esperado, a expressão do gene do MARCO é 5 vezes maior nas células J774-MARCO (0,71 ng  $\pm$  0,18 ng) em comparação com células J774-MOCK (0,14 ng  $\pm$  0,12 ng) (Figura 2). Já nos macrófagos estimulados com LPS (0,5 ng), controle positivo da expressão do receptor (van der Laan *et al.*, 1999), a expressão de MARCO foi 1,5 vezes menor em comparação às células J774-MARCO (dado não mostrado). Esse resultado confirma a superexpressão do MARCO nas células J774 após transfecção e seleção dos clones.

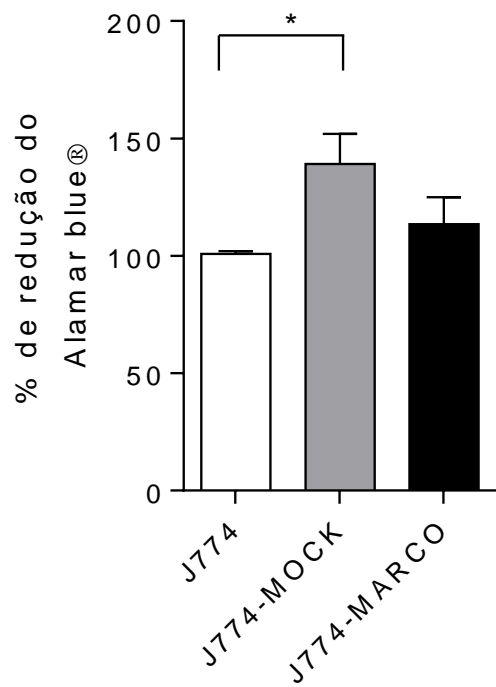


**Figura 2. Quantificação de cDNA de MARCO em células J774-MARCO.** O RNA total de células J774-MARCO foi extraído e, após síntese do cDNA, a amostra foi submetida a qPCR para amplificação da sequência codificante de receptor MARCO conforme descrito na seção Material e Métodos. A quantificação do cDNA de MARCO nas amostras foi calculada pela razão entre a quantidade de cDNA do gene alvo da amostra e o cDNA do gene normalizador (GAPDH). O gráfico representa as médias  $\pm$  DP de um experimento em triplicata. Teste Mann-Whitney.

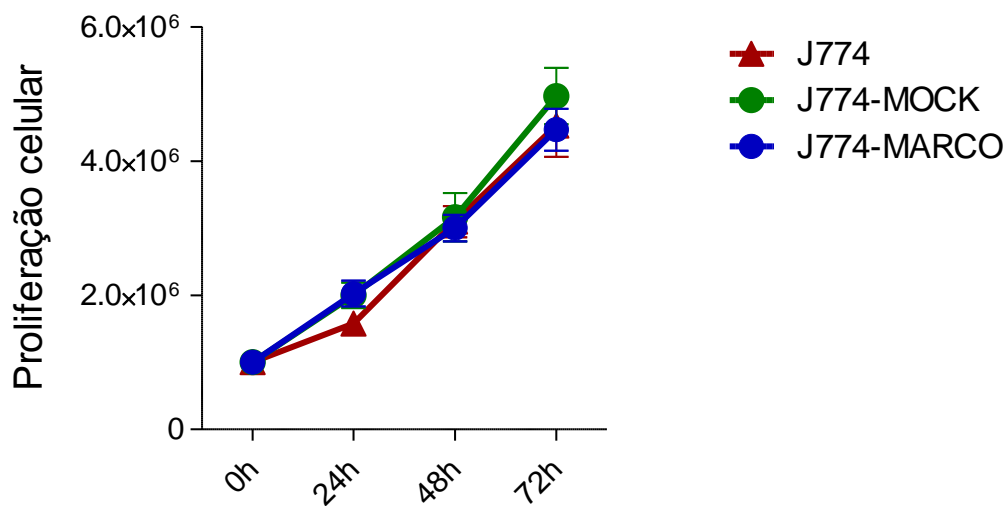
### 5.1.2 Avaliação da atividade metabólica e viabilidade de células J774 superexpressando MARCO

A atividade metabólica mitocondrial medida pela redução do meio de cultura contendo Alamar Blue® foi de  $114\% \pm 23,15\%$  para as células J774-MARCO, e  $139\% \pm 25,88\%$  pelas células J774-MOCK, este último grupo significativamente maior que a taxa metabólica das células J774 controle não transfectadas consideradas como 100% ( $p < 0,05$ ) (Figura 3A). Não houve diferença significativa quando as células J774-MARCO foram comparadas com os grupos J774 e J774-MOCK ( $p > 0,05$ ). A fim de investigar se esse aumento na taxa metabólica dos clones transfectados teve efeito sobre a viabilidade das culturas, a viabilidade celular foi avaliada pela medida indireta da proliferação. Foi observado que após 24, 48 e 72 h a viabilidade entre os três grupos analisados foi similar, não sendo observada diferença na proliferação das células (Figura 3B). A observação de células azul de Tripán positivas foi próxima a zero em todos os grupos celulares. Dessa forma, como a viabilidade foi similar entre os grupos, para os experimentos seguintes optou-se por avaliar os diferentes parâmetros estudados em células J774-MARCO comparando-os com o grupo controle J774-MOCK, pois são células submetidas aos mesmos procedimentos em cultura, incluindo transfecção e seleção contínua com antibiótico.

A



B

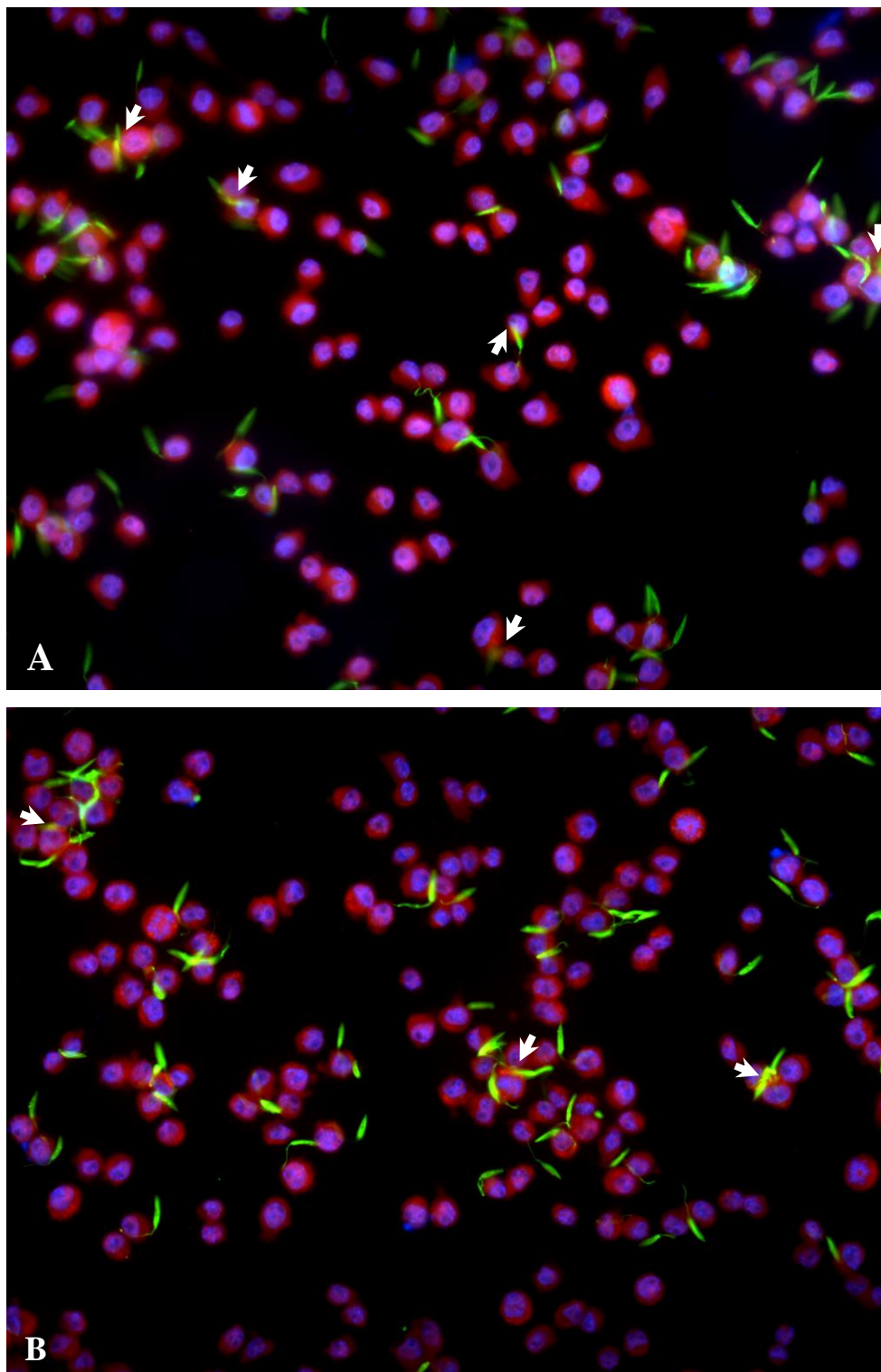


**Figura 3. Avaliação da atividade metabólica e viabilidade dos clones de células J774 com superexpressão estável.** Células J774-MARCO foram plaqueadas em meio RPMI completo e acondicionadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 97% de umidade. Decorridas 24 h, foram incubadas com os indicadores de viabilidade: (A) Alamar Blue® indicador de atividade mitocondrial e (B) indicador de perda de integridade da membrana celular utilizando o azul de Tripán e contagem direta em câmara de Neubauer. O gráfico (A) representa as médias  $\pm$  SEM de 4 experimentos independentes. O gráfico (B) representa as médias  $\pm$  DP de um experimento representativo de dois realizados em sextuplicata. One-Way ANOVA e pós-teste de Dunn's \* $p < 0,05$ .

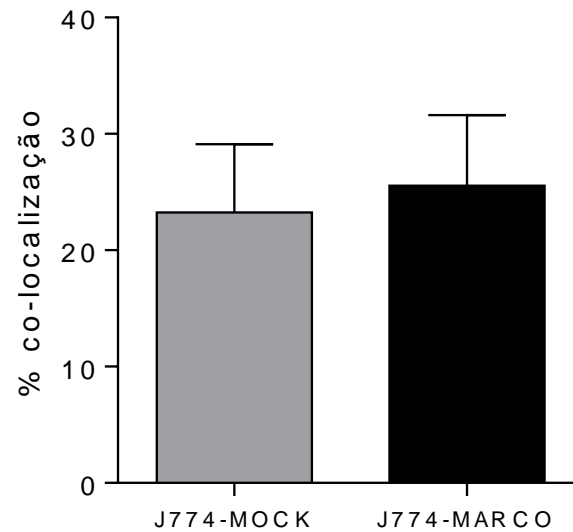
## 5.2 INTERAÇÃO DE *L. MAJOR* COM CÉLULAS J774- MARCO

Células J774-MARCO e J774-MOCK mostraram marcação do receptor MARCO na superfície, refletindo a expressão constitutiva dessa proteína em células macrofágicas (Figura 4). A figura 4 ilustra imagens de promastigotas de *L. major* que co-localizaram com células J774-MARCO (A) e J774-MOCK (B). Observa-se que não houve diferença no percentual de células J774-MARCO que co-localizam com as promastigotas metacíclicas de *L. major* (Figura 5).





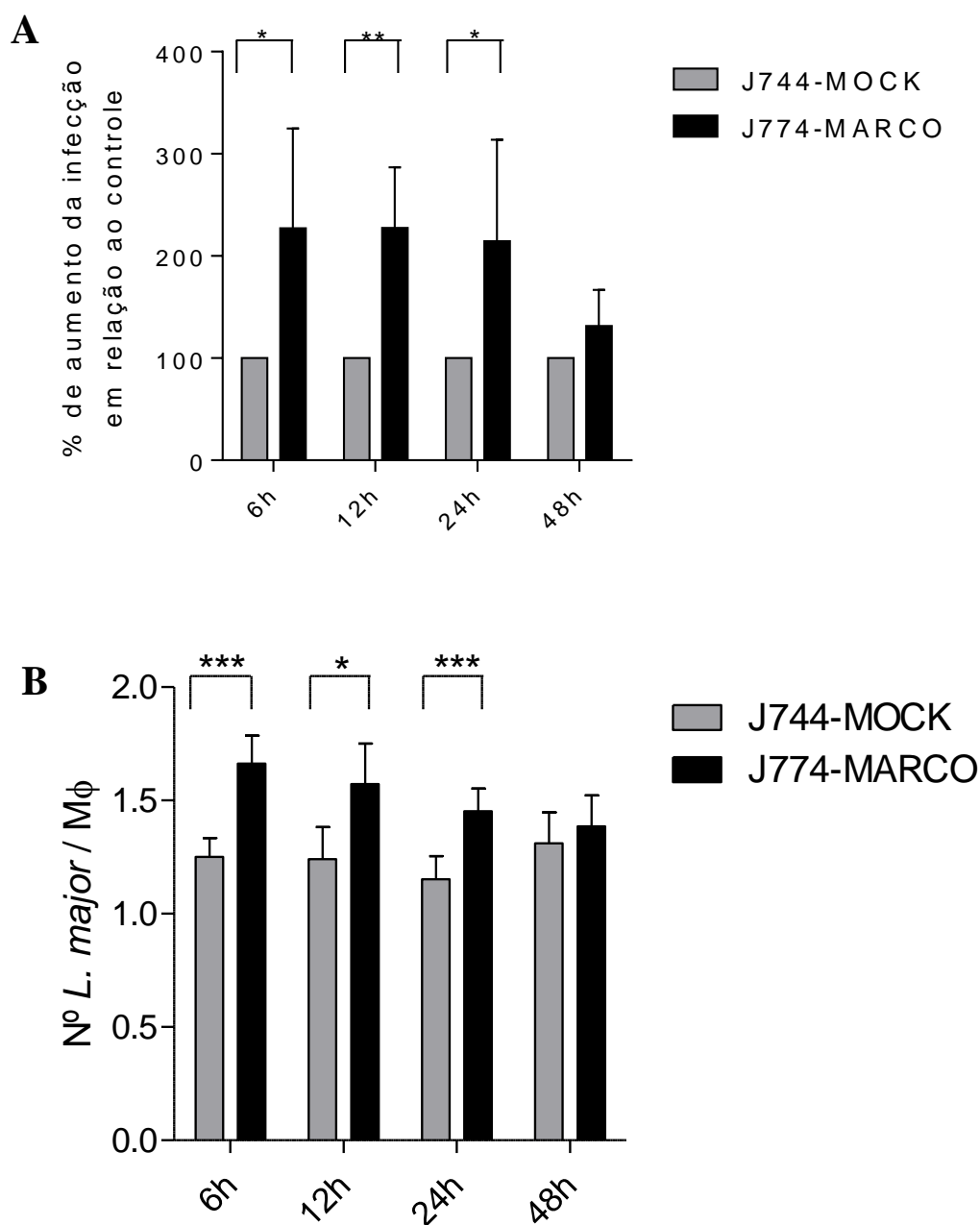
**Figura 4. Microscopia de fluorescência da interação de *L. major* com células J774-MARCO.** Células J774-MARCO (A) foram plaqueadas e após 24 h foram expostas a promastigotas metacíclicas de *L. major* na proporção 10:1, por 30min a 4°C. Em seguida, as células foram fixadas e imunomarcadas com o anticorpo monoclonal anti-MARCO ED31 e os parasitos com anticorpo anti-*Leishmania*, seguidos dos anticorpos secundários fluorescentes vermelho e verde, respectivamente. Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As mesmas observações foram realizadas com as células controle J774-MOCK (B). As setas brancas correspondem à co-localização (em amarelo) de *L. major* com a expressão de MARCO. As imagens foram obtidas com o aumento de 400x.



**Figura 5. Quantificação da co-localização de *L. major* com células J774-MARCO.** Células J774-MARCO foram expostas a promastigotas metacíclicas de *L. major*, seguido de fixação e imunomarcção conforme descrito na Figura 4. Em seguida, as imagens foram adquiridas, montadas e a quantificação randomizada do percentual de co-localização de *L. major* com as células J774-MARCO (barra preta) foi realizada. As mesmas observações foram realizadas com as células controle J774-MOCK (barra cinza). O gráfico representa as médias  $\pm$  DP de um experimento representativo de dois realizados em sextuplicata. Teste *t* de Student,  $p = 0,506$ .

### 5.3 CINÉTICA DE INFECÇÃO POR *L. MAJOR* EM CÉLULAS J774 SUPEREXPRESSANDO O RECEPTOR MARCO

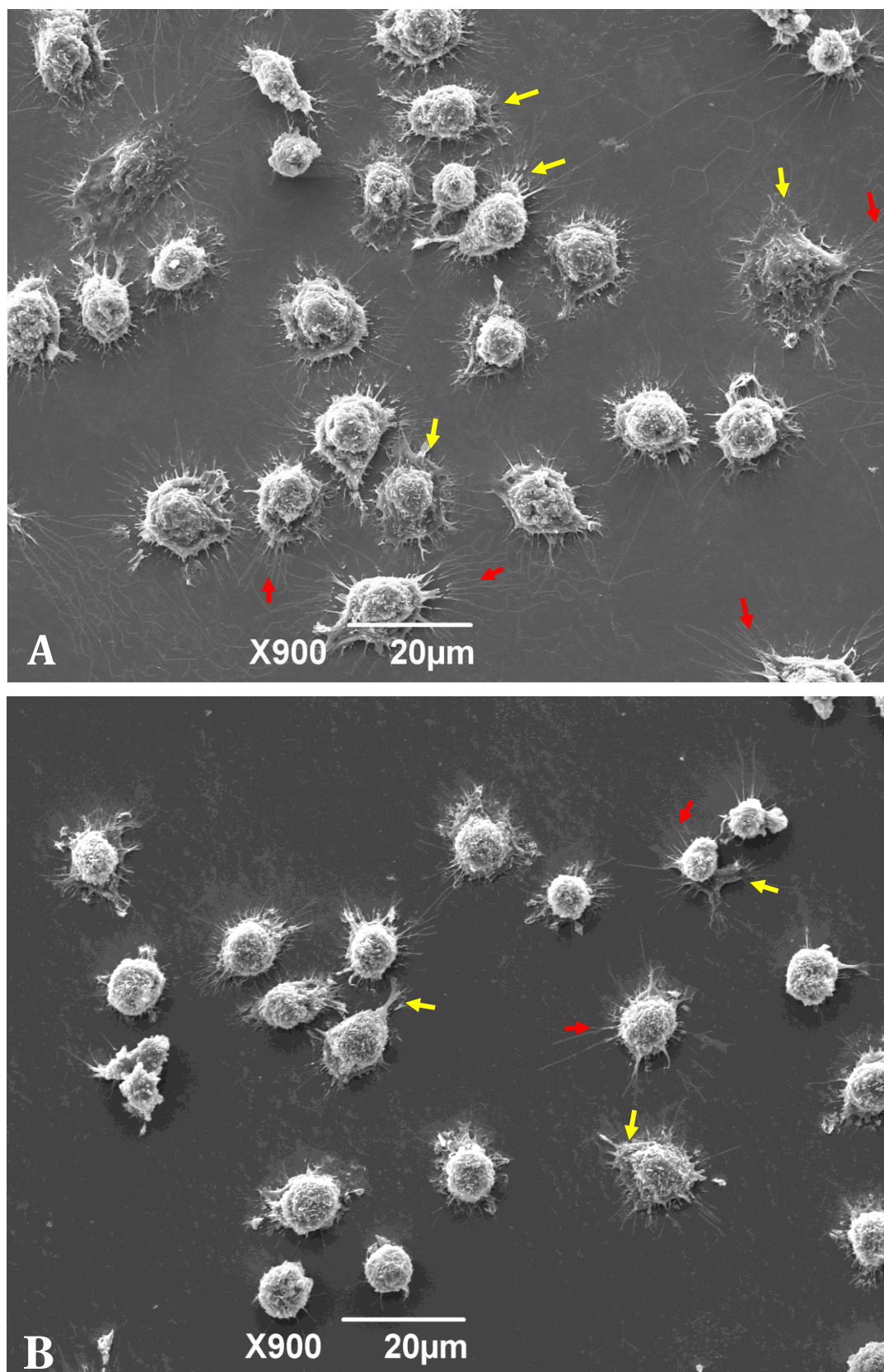
A avaliação do efeito da superexpressão de MARCO na infecção por *L. major* mostrou que após o tempo inicial de 6 h de infecção, houve um aumento significativo, em torno de 70% ( $p < 0,001$ ), no percentual de infecção nas células superexpressando MARCO em relação às células controle J774-MOCK (dado não mostrado). Similarmente, nos períodos adicionais de 6 h, 12 h e 24 h após a lavagem de parasitos não internalizados, houve aumento de  $130\% \pm 97,64\%$  ( $p < 0,05$ ),  $130\% \pm 59,16\%$  ( $p < 0,01$ ), e  $115\% \pm 99,25\%$  ( $p < 0,05$ ), respectivamente, do percentual de infecção nas células J774-MARCO em relação às células controle (Figura 6A). Em relação, a avaliação da carga parasitária, observa-se que o número de *Leishmania*/célula foi significativamente maior nas células superexpressando MARCO em relação às células J774-MOCK nos tempos de 6 h ( $1,62 \pm 0,12$   $p < 0,001$ ), 12 h ( $1,57 \pm 0,18$   $p < 0,05$ ) e 24 h ( $1,45 \pm 0,1$   $p < 0,01$ ) após a lavagem de parasitos não internalizados (Figura 6B). Interessantemente, no tempo de 48 h após a infecção não foi observado aumento da infecção nem na carga parasitária nas células J774-MARCO em relação às células controle.



**Figura 6. Cinética de infecção de células J774-MARCO por *L. major*.** Células J774-MARCO foram infectadas por promastigotas metacíclicas de *L. major* por 6 h a 37°C. Após esse intervalo, as células foram lavadas e reincubadas por adicionais 6, 12, 24 e 48 h. **A)** Percentual de aumento da infecção de células J774-MARCO por *L. major* em relação às células controle. O valor absoluto do percentual de células controle J774-MOCK infectadas foi de: 10% para 6 h, 12% para 12 h, 8% para 24 h e 9% para 48 h. **B)** Número de *L. major* por célula. O gráfico representa as médias  $\pm$  DP de um experimento representativo de três realizados em quintuplicata. No mínimo 400 macrófagos por lamínula foram contados. Teste *t* de Student \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE CÉLULAS SUPEREXPRESSANDO MARCO

Para avaliar se a superexpressão de MARCO estava relacionado com modificações na membrana celular que favoreceriam a entrada do patógeno na célula, J774-MOCK e J774-MARCO foram observadas utilizando microscopia eletrônica de varredura. A presença de projeções membranosas denominadas lamelipódios e estruturas semelhantes a filopódios (Figura 7) foi observada nos dois tipos celulares estudados. No entanto, após semi-quantificação das imagens obtidas, foi observado que 67% das células superexpressando MARCO (Figura 7A) estavam mais espalhadas, com maiores dimensões e maior número de lamelipódios e estruturas semelhantes a filopódios. Tais características foram observadas somente em 24% das células J774-MOCK (Figura 7B).

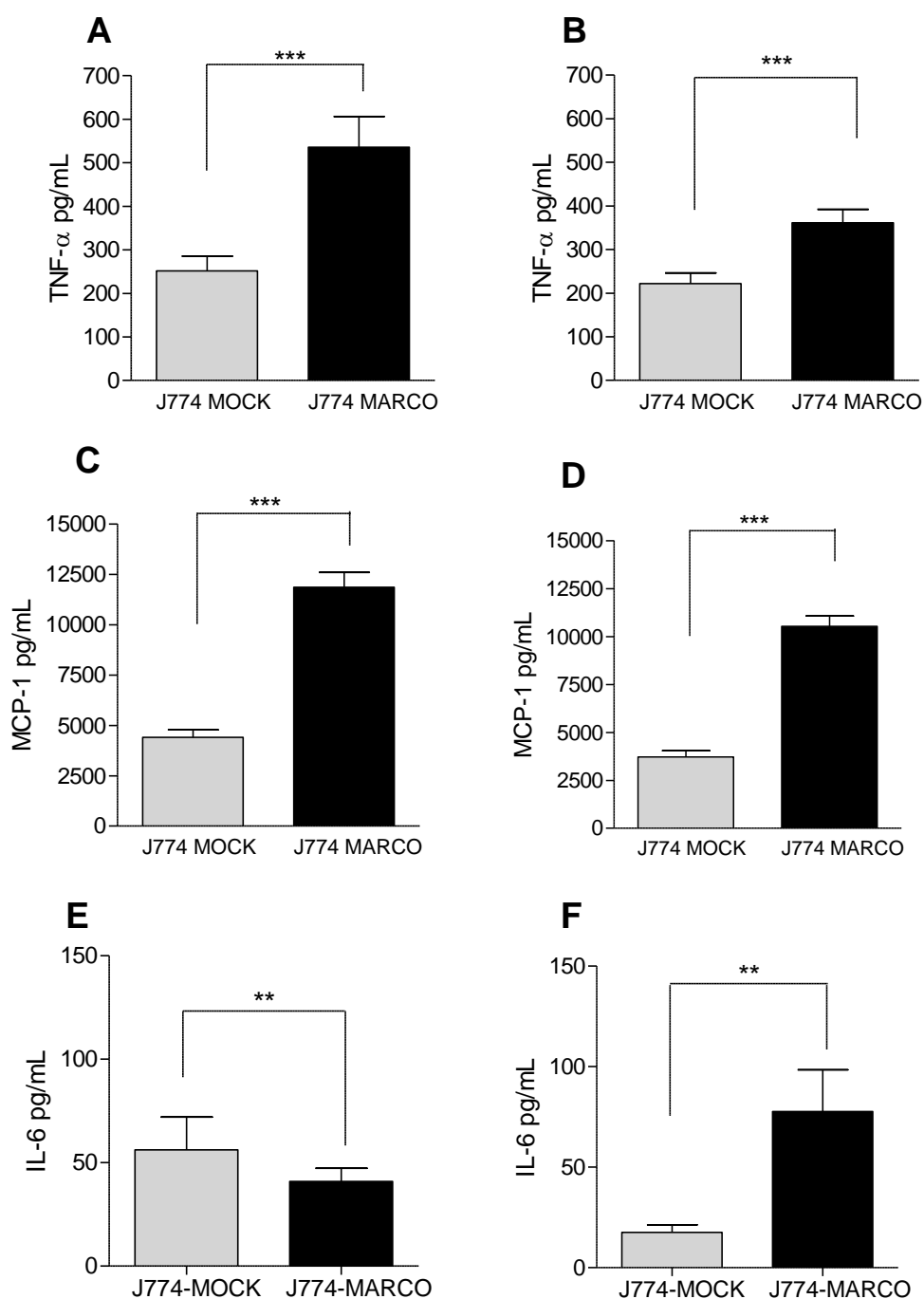


**Figura 7. Avaliação ultraestrutural de células J774-MARCO.** Células J774-MARCO e células controle J774-MOCK foram plaqueadas em meio RPMI completo e acondicionadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 97% de umidade. Decorridas 24 h, as células foram fixadas e as amostras foram processadas para observação no microscópio eletrônico de varredura JSM 6390LV (JEOL). **A-** Células J774-MARCO; **B-** J774-MOCK. As setas amarelas apontam para lamelipódios e as setas vermelhas para estruturas semelhantes a filopódios. As imagens foram obtidas com o aumento de 900x.

## 5.5 AVALIAÇÃO DE MEDIADORES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA IMUNE PRÓ-INFLAMATÓRIA

### 5.5.1 Avaliação da produção de citocinas

A expressão de MARCO foi capaz de induzir em células J774 não infectadas o aumento na produção de TNF- $\alpha$  (24 h = 251 pg/mL, 48 h = 202 pg/mL), MCP-1 (24 h = 6323 pg/mL, 48 h = 6389 pg/mL) e IL-6 (24 h = 4,5 pg/mL, 48 h = 6,5 pg/mL) em relação às células J774-MOCK, que apresentaram produção de TNF- $\alpha$  (24 h = 117 pg/mL, 48 h = 90 pg/mL) ( $p < 0,001$ ), MCP-1 (24 h = 584 pg/mL, 48 h = 385 pg/mL) ( $p < 0,01$ ) e IL-6 (24 h = 2 pg/mL,  $p < 0,05$ ; 48 h = 1,3 pg/mL,  $p < 0,001$ ) respectivamente. Interessantemente, a infecção por *L. major* induziu maior produção de TNF- $\alpha$  nos tempos de 24 h e 48 h, nas células J774-MARCO ( $536 \pm 70,9$  e  $361 \pm 31$  pg/mL, respectivamente) em comparação com as células J774-MOCK ( $252 \pm 33,9$  e  $222 \pm 24$  pg/mL, respectivamente) (Figura 8A e B,  $p < 0,001$ ). Similarmente, nos tempos de 24 h e 48 h, houve maior produção de MCP-1 em células J774-MARCO ( $11860 \pm 730$  e  $10529 \pm 542$  pg/mL, respectivamente) em comparação com as células J774-MOCK ( $4406 \pm 375$  e  $3716 \pm 371$  pg/mL, respectivamente) (Figura 8C e D,  $p < 0,001$ ). Após 24 h de infecção por *L. major* a produção de IL-6 foi maior em células J774-MOCK ( $57 \pm 16$  pg/mL) em comparação com as células J774-MARCO ( $41 \pm 6,5$  pg/mL) (Figura 8E,  $p < 0,05$ ). Já no tempo de 48 h, houve maior produção de IL-6 em células J774-MARCO ( $78 \pm 20,8$  pg/mL) em comparação com as células J774-MOCK ( $18 \pm 3,8$  pg/mL) (Figura 8F,  $p < 0,05$ ). Todavia, não foram observadas diferenças na produção de IL-10 e IL-12 entre os grupos analisados (dados na sessão Apêndices).

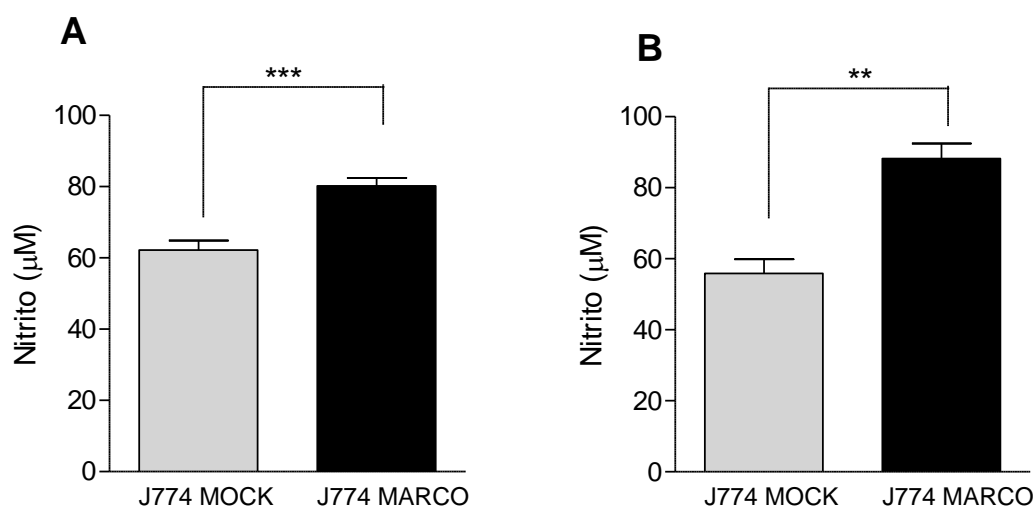


**Figura 8. Avaliação da produção de TNF- $\alpha$ , MCP-1 e IL-6 em células J774-MARCO infectadas por *L. major*.** Células J774-MARCO previamente estimuladas com IFN- $\gamma$  (100 U.I.) foram infectadas com promastigotas de *L. major* como descrito na sessão Materiais e Métodos. Os sobrenadantes das culturas foram, então, coletados para mensuração quantitativa de citocinas liberadas no meio de cultura com o kit CBA. **A e B:** Produção de TNF- $\alpha$  24 e 48 h, respectivamente, após infecção por *L. major*. **C e D:** Produção de MCP-1 24 e 48 h, respectivamente após infecção por *L. major*. **E e F:** Produção de IL-6 24 e 48 h, respectivamente após infecção por *L. major*. Os gráficos representam as médias  $\pm$  DP de um experimento realizado em sextuplicata. Teste *t* de Student \*\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .



### 5.5.2 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO)

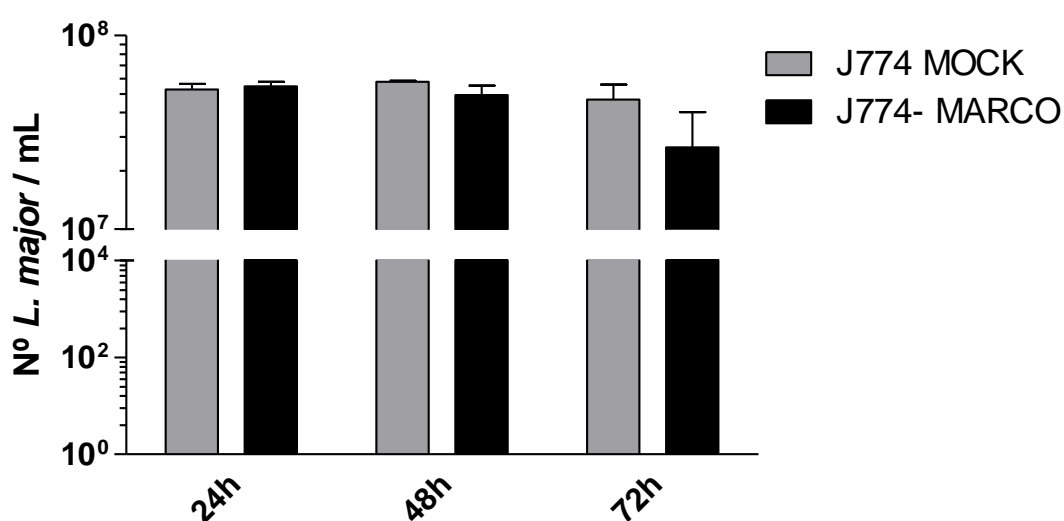
A avaliação da produção de NO foi realizada pela quantificação do nitrito presente no meio de cultura por células previamente estimuladas com 100 U.I. de IFN- $\gamma$ . Células J774-MARCO não infectadas previamente estimuladas com IFN- $\gamma$  liberaram maior quantidade de NO no meio de cultura (24 h = 53  $\mu$ M, 48 h = 55  $\mu$ M) em comparação com as células J774-MOCK (24 h = 49  $\mu$ M, 48 h = 49  $\mu$ M) ( $p < 0,01$ ) (dado não mostrado). Similarmente, em resposta à infecção por *L. major*, células J774-MARCO liberaram maior quantidade desse mediador em comparação às células controle em ambos os tempos estudados, respectivamente:  $80 \pm 2,27 \mu\text{M}$  e  $62 \pm 2,73 \mu\text{M}$  nos tempos de 24 ( $p < 0,001$ ) e  $88 \pm 4,27 \mu\text{M}$  e  $56 \pm 3,97 \mu\text{M}$  48 h ( $p < 0,01$ ) (Figura 9).



**Figura 9. Determinação da produção de NO em células J774-MARCO infectadas por *L. major*.** Células J774-MARCO previamente estimuladas com IFN- $\gamma$  (100 U.I.) foram infectadas por promastigotas metacíclicas de *L. major* na proporção 10:1 por 6 h a 37°C. Após esse intervalo, as células foram lavadas com e reincubadas por adicionais 24 e 48 h. Liberação de NO no meio de cultura foi determinado pela reação de Griess. **A)** Produção de nitrito 24 h após infecção por *L. major*. **B)** Produção de nitrito 48 h após infecção por *L. major*. Os gráficos representam as médias  $\pm$  DP de um experimento realizado em sextuplicata. Teste *t* de Student \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

## 5.6 AVALIAÇÃO DO PAPEL DO RECEPTOR MARCO NA SOBREVIVÊNCIA INTRACELULAR DE *L. MAJOR* EM CÉLULAS J774

O efeito da superexpressão do receptor MARCO sobre a sobrevivência intracelular do parasito foi avaliada. Nos três períodos de tempos de 24 h, 48 h e 72 h, não foi observada diferença significativa no número de promastigotas liberadas, após incubação das células em meio de cultura Schneider por 5 dias (Figura 10).



**Figura 10.** Avaliação da sobrevivência intracelular de *L. major* em macrófagos de linhagem J774-MARCO. Células J774-MARCO (barra cinza) foram infectadas por promastigotas de *L. major* na proporção 10:1 por 6 h a 37°C. Após esse intervalo, as células foram lavadas e reincubadas por adicionais 24, 48 e 72h. O número de promastigotas de *L. major* liberadas após incubação com meio Schneider completo foi determinado por contagem direta em câmara de Neubauer. O gráfico representa as médias  $\pm$  SEM de 4 experimentos independentes em sextuplicata. Teste *t* de Student não pareado.

## 6 DISCUSSÃO

Para investigar o papel o receptor *scavenger* MARCO na infecção por *L. major* foi realizada a superexpressão do receptor em células J774-MARCO. A maioria dos estudos que investigaram o papel da superexpressão de MARCO em diferentes modelos experimentais utilizou a expressão transitória do receptor (ARREDOUANI *et al.*, 2005; KVELL *et al.*, 2006; JÓZEFOWSKI *et al.*, 2006; HAMILTON *et al.*, 2006; KANNO *et al.*, 2007). Hirano e colaboradores (2012) obtiveram linhagens estáveis de células CHO expressando MARCO após seleção com geneticina, no entanto nenhum ensaio para avaliar viabilidade celular ou atividade metabólica foi realizado nesse estudo. Yallop; Svendsen (2001) transfectaram células de linhagem CHO e BHK com o vetor pcDNA3.1, contendo o gene Neo que codifica a *aminoglycoside phosphotransferase*, proteína de resistência à geneticina, e posteriormente avaliaram o efeito do antibiótico de seleção nos clones transfectados. Esses autores observaram que a geneticina alterou a viabilidade e o metabolismo de ambos tipos celulares. Adicionalmente, foi demonstrado nesse estudo que a incubação das células com o antibiótico induziu elevação da expressão da proteína de resistência à geneticina, resultando numa maior atividade metabólica e numa consequente redução da viabilidade celular (YALLOP; SVENDSEN, 2001; YALLOP *et al.*, 2003). No nosso estudo, apesar de ter sido observada uma maior atividade metabólica nos clones transfectados não foram observadas diferenças na proliferação entre os três grupos de células. Possivelmente a incubação contínua com a geneticina gerou um *stress* celular que resultou no aumento do metabolismo, mas não afetou a viabilidade dos clones.

Estudos apontam o receptor MARCO como uma glicoproteína de superfície com capacidade de reconhecer vários ligantes de microorganismos (VAN DER LAAN *et al.*, 1997; VAN DER LANN *et al.*, 1999; KRAAL *et al.*, 2000). No nosso estudo observamos que a superexpressão de MARCO não alterou a co-localização de *L. major* com as células J774 (Figura 5). A presença de múltiplos receptores envolvidos no reconhecimento de *Leishmania* dificulta a avaliação exclusiva do papel do MARCO. MARCO atua provavelmente como um co-receptor no complexo fagocítico para promastigotas de *L. major* (GOMES *et al.*, 2009). Desse modo, a superexpressão de MARCO pode não ser suficiente para aumentar a interação inicial com o patógeno, uma vez que o aumento da expressão de MARCO provavelmente não alterou a expressão

dos demais receptores fagocíticos clássicos, como CR3 e receptor manose (DA SILVA *et al.*, 1989), e nem a cooperação dinâmica entre eles, não interferindo assim na ligação com o parasito. Gomes e colaboradores (2009) observaram co-localização similar entre as células CHO superexpressando MARCO com promastigotas de *L. major* e *L. amazonensis*. No entanto, os autores observaram um maior número de promastigotas de *L. major* em comparação com *L. amazonensis* co-localizando com essas células transfectadas. No presente estudo, não foi realizada a comparação do número de parasito co-localizando com a célula superexpressando MARCO e a célula controle.

A avaliação do papel de MARCO na fagocitose de *L. major* por células J774 mostrou que superexpressão de MARCO favoreceu tanto o percentual de infecção de *L. major* como o número de parasitos/célula nos tempos iniciais até 24 h após a infecção. A participação de MARCO na infecção por *L. major* já foi demonstrada por Gomes e colaboradores (2009). Foi observado que o bloqueio de MARCO com anticorpo específico reduziu a infecção por *L. major* em 30% nos tempos iniciais de 1,5 h até 24 h após a infecção, indicando que esta proteína tem participação na entrada de promastigotas de *L. major* em macrófagos de CBA (GOMES *et al.*, 2009). Estudos anteriores apontam MARCO como uma proteína importante na fagocitose de bactérias patogênicas, como *Klebsiella pneumoniae* (VAN DER LAAN *et al.*, 1997), *Escherichia coli* (VAN DER LAAN *et al.*, 1999), *Listeria monocytogenes* (ITO *et al.*, 1999) *Streptococcus pneumoniae* (ARREDOUANI *et al.*, 2004), *Neisseria meningitidis* (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2006; BRAUN *et al.*, 2011), *Clostridium sordellii* (THELEN *et al.*, 2010) e *Streptococcus mutans* (MUKOUHARA *et al.*, 2011). Entretanto, a literatura é escassa em trabalhos que demonstrem a participação de MARCO na fagocitose de protozoários.

De modo geral, os receptores *scavenger* têm sido identificados como os principais receptores envolvidos na fagocitose independente de opsonina por macrófagos (ELOMAA *et al.*, 1995; PALECANDA *et al.*, 1999; MUKHOPADHYAY; GORDON, 2004; ARESCHOUG; GORDON, 2009). Como citado anteriormente, em nosso estudo a superexpressão de MARCO não alterou a co-localização de *L. major* com as células J774. Em estudos aparentemente conflitantes ao nosso, foi demonstrado o papel do MARCO como um importante receptor de interação a outros patógenos e a partículas inertes ambientais não opsonizadas (ELOMAA *et al.*, 1995; PALECANDA *et al.*, 1999; ARREDOUANI *et al.*, 2005; HAMILTON *et al.*, 2006; MUKHOPADHYAY *et al.*,

2006). Entretanto, Bowdish e colaboradores (2009) demonstraram que MARCO sozinho não é suficiente para a ligação de *Mycobacterium tuberculosis*, indicando que outros receptores presentes na superfície do macrófago devem cooperar com o MARCO para que ocorra uma ligação efetiva com o patógeno. Nossos achados reforçam os dados publicados anteriormente pelos autores, que MARCO parece ser um co-receptor fagocítico na infecção por *L. major*. Nesse ensaio de infecção, os parasitos foram expostos às células J774-MARCO por um período longo de 6 h a 37°C de infecção, enquanto que no ensaio de ligação foram expostos às células por 30 min a 4°C. Esse maior tempo de exposição do parasito às células superexpressando MARCO promove uma maior chance à entrada de *L. major*. Finalmente, o aumento no número de patógenos internalizados pode ser uma consequência indireta do aumento de projeções membranosas, lamelipódios e filopódios, modificações essas anteriormente descritas por Pikkarainen e colaboradores (1999) em células CHO, HeLa, NIH3T3, e 293 superexpressando MARCO. Nossa hipótese é que o aumento de projeções membranosas induzidas pela superexpressão de MARCO favoreceria a fagocitose de *L. major*.

A análise qualitativa das imagens obtidas por microscopia de varredura mostrou a presença de lamelipódios e filopódios, nos dois tipos celulares estudados. Foi observado que as células superexpressando MARCO estavam mais espalhadas, com maiores dimensões e maior número de lamelipódios e estruturas semelhantes a filopódios na membrana plasmática, características raramente visualizadas nas células J774-MOCK. Na literatura, a presença dessas projeções membranosas também foram associadas com a expressão de MARCO. Pikkarainen e colaboradores (1999) demonstraram que o segmento C-terminal, rico em cisteína, de MARCO é crucial para formação desses processos. Adicionalmente, a formação de lamelipódios foi associada a rearranjos do citoesqueleto de actina, no entanto as projeções membranosas semelhantes a filopódios parecem ser imóveis com ausência de fibras de estresse e F-actina (PIKKARAINEN *et al.*, 1999; GRANUCCI *et al.*, 2003; HIRANO *et al.*, 2012). Como essas projeções eram frequentemente muito ramificadas, o exame do padrão de ramificação revelado nestes processos foram considerados similares a filopódios protusivos (PIKKARAINEN *et al.*, 1999). Ensaio adicionais são necessários para classificarmos tais estruturas no nosso modelo de estudo. Segundo Hirano e colaboradores (2012) a presença característica de MARCO entre os componentes da membrana plasmática, em adição à ausência de F-actina nas estruturas semelhantes a filopódios indicam que MARCO pode funcionar como um “caçador” de partículas não opsonizadas.

Alguns estudos mostram que não somente o MARCO, mas também outros receptores *scavenger* classe A estão envolvidos na adesão celular associados à resposta do hospedeiro contra infecções e processos inflamatórios (KRIEGER; HERZ, 1994; YOKOTA *et al.*, 1998; SANTIAGO-GARCIA *et al.*, 2003). Granucci e colaboradores observaram que a expressão de MARCO medeia rearranjos do citoesqueleto em células dendríticas e microglia. Adicionalmente, foi demonstrado que macrófagos de camundongos *knockout* para MARCO apresentavam deficiência de adesão e espraiamento sobre a superfície (CHEN *et al.*, 2005). Em contraste a esses estudos, Józefowski e colaboradores (2006) observaram que a adesão de macrófagos de camundongos *knockout* para MARCO não foi reduzida sob as condições do ensaio realizado. Em suma, nossos dados juntamente com os da literatura, sugerem que MARCO ao induzir a formação de lamelipódios e filopódios, aumenta a área de contato da célula com promastigotas de *L. major*, o que pode facilitar a internalização de um maior número de parasitos. Como perspectiva iremos realizar a contagem de parasitos co-localizando com a célula superexpressando o receptor para tentar confirmar o nosso achado.

Apesar de haver evidências da participação de receptores *scavenger* na interação com partículas inertes e microorganismos (KRIEGER *et al.*, 1994; SHIMAOKA *et al.*, 2001; MUKHOPADHYAY; GORDON, 2004; ARESCHOUG; GORDON, 2009), pouco é conhecido sobre as vias de sinalização envolvidas nessa interação mediada por esses receptores (SULAHIAN *et al.*, 2008). Em diferentes modelos de infecção, o início da resposta de liberação de citocinas pró-inflamatórias parece ser mediado por *toll-like receptors* (TLR), além de outros receptores de sinalização (BRIGHTBILL *et al.*, 1999; CEZÁRIO *et al.*, 2011; LIESE *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2014). Alguns SR foram relatados como co-receptores para TLR, em particular o TLR2, na resposta a citocinas pró-inflamatórias para vários padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) (HOEBE *et al.*, 2005; JEANNIN *et al.*, 2005). Mukhopadhyay e colaboradores (2004) demonstraram uma estreita relação entre TLR e MARCO ao observar que membros da família dos TLR são responsáveis pela regulação positiva de MARCO induzida por bactérias, mas não pela expressão constitutiva do receptor. Pinheiro e colaboradores (2007) demonstraram que CD16 exerce um importante papel na regulação da expressão de MARCO em resposta à infecção por bactéria. Ainda, foi demonstrado que o receptor *scavenger* MARCO atua como um co-receptor na infecção por *Mycobacterium tuberculosis* ao apresentar moléculas presentes na superfície do patógeno para TLR2,

reforçando a resposta de controle da infecção (BOWDISH *et al.*, 2009). Estudos adicionais precisam ser realizados para esclarecer como o receptor MARCO interage com outros receptores envolvidos na fagocitose e sinalização celular na infecção por *Leishmania*.

No nosso modelo, MARCO pode estar participando, não apenas na fagocitose, como poderia estar influenciando a liberação de mediadores em células J774 infectadas por *L. major*. No presente estudo, foi demonstrado que a expressão de MARCO promove o aumento da liberação de TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-6 e NO tanto em células não infectadas como durante a infecção por *L. major*. Tais mediadores têm sido reportados como moléculas envolvidas no controle da infecção por *Leishmania* (LIEW *et al.*, 1990b; BADOLATO *et al.*, 1996; FONSECA *et al.*, 2003; ALLENBACH *et al.*, 2008). TNF- $\alpha$  é descrita como uma citocina pró-inflamatória que induz a migração de células mononucleares e neutrófilos (FACCIOLI *et al.*, 1990). Na literatura já foi demonstrado que essa citocina está envolvida na indução da produção de NO e eliminação intracelular de *L. major*, exercendo um importante papel na resposta do hospedeiro (LIEW *et al.*, 1990a; LIEW *et al.*, 1990b; LIEW *et al.*, 1990c; FONSECA *et al.*, 2003). Similarmente, MCP-1 está envolvida no recrutamento de macrófagos para o sítio da infecção e na indução de mecanismos microbicidas, como a produção de NO, em células infectadas por *L. major* (RITTER; MOLL, 2000; BISWAS *et al.*, 2001). A produção de óxido nítrico consiste em um dos principais mecanismos microbicidas utilizados por macrófagos, inclusive na infecção por *Leishmania* (VOULDOUKIS *et al.*, 1995; LEIW *et al.*, 1997; FANG, 2001; BALARAMAN *et al.*, 2004; KAVOOSI *et al.*, 2006). Assim, a indução da liberação de tais moduladores nas células superexpressando MARCO indica um papel desse receptor na resposta imune celular contra a infecção por *L. major*. Apesar de ter sido demonstrado que MARCO tem um importante papel na resposta imune inata atuando como um receptor de reconhecimento padrão (MUKHOPADHYAY; GORDON, 2004), poucos dados na literatura relatam o papel desse receptor na produção de citocinas envolvidas na resposta imune. Estudos anteriores demonstraram a participação do receptor MARCO na produção de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (BOWDISH *et al.*, 2009) e na produção de NO e IL-12 em resposta a sequências de CpG-ODN presentes no DNA de vírus e bactérias (JÓZEFOWSKI *et al.*, 2006). Entretanto, na infecção *in vitro* por *Neisseria meningitidis* foi observado que MARCO não é requerido para liberação de TNF- $\alpha$  e NO (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2006). Adicionalmente, a interação de LPS e

patógenos, como *Staphylococcus aureus*, com o MARCO induz uma resposta imune efetora diferente a sua interação com os receptores SR-AI/A-II (ARREDOUANI *et al.*, 2005; JOZEFOWSKI *et al.*, 2005). Em suma, os resultados obtidos indicam que MARCO além de contribuir para a entrada de *L. major*, possivelmente atua no desenvolvimento de uma resposta efetora. No entanto, os mecanismos envolvidos na participação do receptor MARCO no desenvolvimento de uma resposta imune contra a infecção por *Leishmania* ainda necessitam de esclarecimento.

Pressupomos que MARCO, ao provavelmente induzir a liberação de mediadores envolvidos na resposta celular contra à infecção por *L. major*, pode favorecer a morte intracelular do parasito. Todavia, nos três períodos de tempo avaliados após a infecção das células superexpressando MARCO não foram observadas diminuições significativas no número absoluto de parasitos viáveis no meio de cultura. Entretanto, é perceptível uma discreta redução de aproximadamente 43% no número de parasitos viáveis nessas células 72 h após a infecção. Dessa forma, é possível que MARCO, ao interagir com receptores envolvidos nas vias de sinalização, participe da ativação de mecanismos leishmanicidas do fagócito, o que pode contribuir para a morte do patógeno. No entanto, a ausência de um efeito notável de MARCO na morte intracelular do parasito pode refletir a redundância nas vias de sinalização e participação de diferentes moléculas envolvidas na ativação dos mecanismos de resposta celular. Todavia estudos adicionais são necessários para esclarecer se o receptor MARCO contribui para a morte do parasito. Em estudo anterior, demonstramos que a infecção por *L. major* provavelmente induz um aumento na expressão de MARCO em células do linfonodo e do baço de camundongos CBA, modelo de resistência à infecção por esse patógeno, o que sugere que MARCO pode ter participação na resposta imune adaptativa e controle da infecção por *L. major* (GOMES *et al.*, 2009).

Novos ensaios com o silenciamento de MARCO serão necessários para a compreensão do papel dessa proteína como possível receptor envolvido na infecção por *L. major*, além de investigar a participação do receptor na ativação de mecanismos leishmanicidas e morte do parasito.



## 7 CONCLUSÃO

A superexpressão do receptor *scavenger* MARCO favorece a entrada de *L. major* em células J774, além de desencadear uma resposta inicial classicamente protetora.

## 8 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K. Cells and tissues of the immune system. In: ABBAS, A. K. **Cellular and molecular immunology**, Philadelphia: Elsevier Saunders, 2008. p. 367-370.

ADEREM, A.; ULEVITCH, R.J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 782-787, 2000.

AFONSO, L. C. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 2952–2959, 1993.

ALEXANDER, J.; BROMBACHER F. Thelper1/Thelper2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: is this paradigm still relevant? **Front. Immunol.**, v. 3, n. 80, 2012.

ALEXANDER, J.; BROMBACHER, F.; MCGACHY, et al. An essential role for IL-13 in maintaining a non-healing response following *Leishmania mexicana* infection. **Eur. J. Immunol.**, v. 32, p. 2923–2933, 2002.

ALEXANDER, J.; RUSSELL, D. G. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. **Adv. Parasitol.**, v. 31, p. 175-254, 1992.

ALLENBACH, C.; LAUNOIS, P.; MUELLER, C. et al. An essential role for transmembrane TNF in the resolution of the inflammatory lesion induced by *Leishmania major* infection. **Eur. J. Immunol.**, v. 38, p. 720–731, 2008.

ALVAR, J.; VÉLEZ, D. I. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **Plos One**, v. 7, n. 5, 2012.

ANDRADE, Z. A.; REED, S. G. et al. Immunopathology of Experimental Cutaneous Leishmaniasis. **Am. J. Pathol.**, v. 114, p. 137–148, 1984.

ANTOINE, J. C.; PRINA, E.; JOUANNE, C. et al. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. **Infect. Immun.**, v. 58, n. 31, p. 779-787, 1990.

ANTOINE, J. C.; PRINA, E.; LANG, T. et al. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbor *Leishmania* in murine macrophages. **Trends Microbiol.**, v. 7, n. 10, p. 392-401, 1998.

ARESCHOUG, T; GORDON, S. Scavenger receptors: role in innate immunity and microbial pathogenesis. **Cell Microbiol.**, v. 11, n. 8, p. 1160–1169, 2009.

ARREDOUANI, M. S.; FRANCO, F.; IMRICH, A. et al. Scavenger receptors SR-AI/II and MARCO limit pulmonary dendritic cell migration and allergic airway inflammation. **J. Immunol.**, v. 178, p. 5912-5920, 2007.

ARREDOUANI, M. S.; PALECANDA, A.; KOZIEL, H. et al. MARCO is the major binding receptor for alveolar unopsonized particles and bacteria on human alveolar macrophages. **J. Immunol.**, v. 175, p. 6058-6064, 2005.

ARREDOUANI, M.; YANG, Z.; NING, Y. et al. The Scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles **J. Exp. Med.**, v. 200, n. 2, p. 267-272, 2004.

AWASTHI, A.; MATHUR, A. K.; SAH, B. Immune response to Leishmania infection. **Indian. J. Med. Res.**, v. 119, p. 238-258, 2004.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 16, n. 1, p. 42-47, 2004.

BADOLATO, R.; SACKS, D. L. et al. Leishmania major: Infection of Human Monocytes Induces Expression of IL-8 and MCAF1,2. **Exp. Parasitol.**, v. 82, p. 21-26, 1996.

BALARAMAN, S.; TEWARY, P.; SINGH, V. K.; MADHUBALA, R.. Leishmania donovani induces interferon regulatory factor in murine macrophages: a host defense **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 317, n. 2, p. 639-647, 2004.

BANCROFT, G. The role of natural killer cells in innate resistance to infection. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 5, p. 503-510, 1993.

BANULS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. Leishmania and the Leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Adv. Parasitol.**, v. 64, p. 1-109, 2007.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.

BATES, P. A.; ROGERS, M. E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of Leishmania. **Curr. Mol. Med.**, v. 4, n. 6, p. 601-609, 2004.

BEHIN R.; MAUEL J.; SORDAT B. Leishmania tropica: pathogenicity and in vitro macrophage function in strains of inbred mice. **Exp. Parasitol.**, v. 48, p. 81-91, 1979.

BELKAID Y.; PICCIRILLO C.A.; MENDEZ S.; et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. **Nature**, v. 420, p. 502-507, 2002.

- BERMAN, J. D. et al. Multiplication of Leishmania in human macrophages in vitro. **Infect. Immun.**, v. 26, n.1, p. 375-379, 1979.
- BERN, C.; MAGUIRE, J.H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 2, n. 10, 2008.
- BISWAS, S. K.; SODHI, A.; SAKI, P. Regulation of Nitric Oxide Production by Murine Peritoneal Macrophages Treated in Vitro with Chemokine Monocyte Chemoattractant Protein 1 **Nitric Oxide**, v.5, n. 6, p. 566–579, 2001.
- BLACKWELL, J. M.; EZEKOWITZ, R. A. et al. Macrophage complement and lectin-like receptors bind Leishmania in the absence of serum. **J. Exp. Med.**, v. 162, p. 324-331, 1985.
- BOGDAN, C. Oxidative burst without phagocytes: the role of respiratory proteins. **Nat. Immunol.**, v. 8, n. 10, p. 1029-1031, 2007.
- BOGDAN, C.; GESSNER, A.; et al. Invasion, control and persistence of Leishmania parasites. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 8, p. 517–525, 1996.
- BOGDAN, C.; M. ROLLINGHOFF. et al. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 12, n. 1, p. 64-76, 2000.
- BOGDAN, C.; RILLINGHOFF, M. The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. **Int. J. Parasitol.**, v. 28, p. 121-134, 1998.
- BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. **Int. J. Parasitol.**, v. 28, n. 1, p. 121-134, 1998.
- BOWDISH, D. M. E.; SAKAMOTO, K.; KIM, M. et al. MARCO, TLR2, and CD14 Are Required for Macrophage Cytokine Responses to Mycobacterial Trehalose Dimycolate and Mycobacterium tuberculosis. **PLoS Pathog.**, v. 5, n. 6, p. 1-14, 2009.
- BRAUN; B. J; SLOWIK, A; LEIB, S. L. et al. The formyl peptide receptor like-1 and scavenger receptor MARCO are involved in glial cell activation in bacterial meningitis **J. Neuroinflammation**, v. 8, n. 11, 2011.
- BRIGHTBILL, H. D.; LIBRATY, D. H.; KRUTZIK, S. R. et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science**, v. 285, p. 732–736, 1999.
- BRITTINGHAM. A.; MOSSER, D.M. Exploitation of the complement system by Leishmania promastigotes. **Parasitol Today**, v. 12, n. 11, p. 444-447, 1996.

CEZÁRIO, G. A.; DE OLIVEIRA, L. R.; PERESI, E. et al. Analysis of the expression of toll-like receptors 2 and 4 and cytokine production during experimental *Leishmania chagasi* infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 5, p. 573-583, 2011.

CHAMPSI, J.; MCMAHON-PRATT, D. Membrane glycoprotein M-2 protects against *Leishmania amazonensis* infection. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 3272–3279, 1988.

CHANG, C. S.; CHANG, K. P. Monoclonal antibody affinity purification of a *Leishmania* membrane glycoprotein and its inhibition of *Leishmania*-macrophage binding. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.83, p. 100-104, 1986.

CHATELAIN, R.; VARKILA, K. et al. IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania* major-infected mice. **J. Immunol.**, v. 148, p. 1182-1187, 1992.

CHEN, Y.; PIKKARAINEN, T.; ELOMAA, O. et al. Defective Microarchitecture of the Spleen Marginal Zone and Impaired Response to a Thymus-Independent Type 2 Antigen in Mice Lacking Scavenger Receptors MARCO and SR-A. **J. Immunol.**, v.175, p. 8173-8180, 2005.

COFFMAN, R.L.; CHATELAIN, R.; LEAL, L.M. et al. *Leishmania* major infection in mice: a model system for the study of CD4<sub>1</sub> T-cell subset differentiation. **Res. Immunol.**, v. 142, p. 36-40, 1991.

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

DA SILVA, R. P.; HALL, B. F.; JOINER, K. A.; SACKS, D. L. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania* major metacyclic promastigotes to human macrophages. **J. Immunol.**, v. 143, p. 617-622, 1989.

DE FREITAS BALANCO, J.M.; MOREIRA M.E.; BONOMO A.; et al.A. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. **Current. Biology.**, v. 11, p. 1870-1873, 2001.

DE VEER, M. J.; CURTIS, J.; BALDWIN, T. M. et al. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania* major: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. **Eur. J. Immunol.**, v. 33, p. 2822–2831, 2003.

DELUNE, M. *Leishmaniose cutané*e. **Dermatologica.**, v. 158, p. 178-180, 1979.

DESJARDINS, M.; DESCOTEAUX, A. Inhibition of Phagolysosomal Biogenesis by the *Leishmania* Lipophosphoglycan. **J. Exp. Med.**, v. 185, n. 12, p. 2061–2068, 1997.

DIEFENBACH, A. et al. Type 1 interferon (IFN- $\alpha/\beta$ ) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. **Immunity**, v. 8, p. 77–87, 1998.

DUCLOS, S.; DESJARDINS, M. Subversion of a young phagosome: the survival strategies of intracellular pathogens. **Cell Microbiol**, v. 2, p. 365–377, 2000.

ELOMAA, O.; KANGAS, M.; SAHLBERG, C. et al. Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages, **Cell**, v. 80, p. 603-609, 1995.

ELOMAA, O.; SANKALA, M.; PIKKARAINEN, T. et al. Structure of the Human Macrophage MARCO Receptor and Characterization of Its Bacteria-binding Region. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 4530-4538, 1998.

FACCIOLI, L.H.; SOUZA, G.E.; CUNHA, F.Q. et al. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms. **Agents Actions**, v. 30, n. 3-4, p. 344-349, 1990.

FANG, F. C. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. **J. Clin. Invest.**, v. 19, p. 163-196, 2001.

FEARON, D. T.; LOCKSLEY, R. M. The Instructive Role of Innate Immunity in the Acquired Immune Response. **Science**, v. 272, p. 50-54, 1996.

FONSECA, S. G.; ROMÃO, P. R.T.; FIGUEIREDO, F. et al. TNF-  $\alpha$  mediates the induction of nitric oxide synthase in macrophages but not in neutrophils in experimental cutaneous Leishmaniasis. **Eur. J. Immunol.**, v. 33, p. 2297–2306, 2003.

FORTIER, A. H.; TONG, A.; NACY, C.A. Susceptibility of inbred mice to Leishmania major infection: genetic analysis of macrophage activation and innate resistance to disease in individual progeny of p/j (susceptible) and c3h/hen (resistant) mice. **Infect. Immun.**, v. 58, n. 12, p. 4149-4152, 1990.

GANTT K. R. et al. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of Leishmania chagasi. **J. Immunol.**, v. 167, p. 893–901, 2001.

GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Exp. Hematol.**, v. 30, n. 6, p. 503-512, 2002.

GOMES, I. N.; CALABRICH, A. F.; TAVARES R.D.A, S. et al. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of Leishmania. **Microbes Infect.**, v.5, p. 251-260, 2003.

GOMES, I. N.; PALMA L. C.; CAMPOS, G. O. et al. The scavenger receptor MARCO is involved in Leishmania major infection by CBA/J macrophages. **Parasite Immunol.**, v. 31, p. 188–198, 2009.

- GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. American cutaneous Leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n.1, p. 71-80, 2003.
- GOUGH, P. J.; GORDON, S. The role of scavenger receptors in the innate immune system. **Microbes Infect.**, v.2, p. 305-311, 2000.
- GRANUCCI, F.; PETRALIA, F.; URBANO, M. et al. The scavenger receptor MARCO mediates cytoskeleton rearrangements in dendritic cells and microglia. **Blood.**, v. 102, n.8, p. 2940-2947, 2003.
- GREEN, S. J.; MELTZER, M. S.; HIBBS, J. B. et al. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. **J. Immunol.**, v.144, n.1, p. 278–283, 1990.
- GRIMALDI, G. JR. Leishmanioses tegumentares: aspectos clínicos e imunopatológicos. **Mem. Inst. Osw. Cruz.**, v. 77, n.2, p. 195-215, 1982.
- GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol.**, v.6, n. 3, p. 230–250, 1993.
- GUIMARAES-COSTA, A.B. et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 106, p. 6748–6753, 2009.
- GUY, R.A.; BELOSEVIC M. Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 1553-1558, 1993.
- HAMILTON, R. F; THAKUR S. A. et al. MARCO Mediates Silica Uptake and Toxicity in Alveolar Macrophages from C57BL/6 Mice. **J. Biol. Chem.** v. 281, n. 45, p. 34218–34226, 2006.
- HANDMAN E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.14, n.2, p. 229-243, 2001.
- HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J. et al. Reciprocal expression of interferon- $\gamma$  or interleukin-4 during the resolution or progression of murine Leishmaniasis. Evidence for expression of distinct helper T cell subsets. **J. Exp. Med.**, v. 169, n. 59, 1989.
- HEPBURN, N. C. Cutaneous Leishmaniasis. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 25, p. 363- 370, 2000.
- HIRANO, S.; FUJITANI, Y.; FURUYAMA, A. et al. Macrophage receptor with collagenous structure (MARCO) is a dynamic adhesive molecule that enhances uptake of carbon nanotubes by CHO-K1 cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 259, p. 96–103, 2012

HOEBE, K.; GEORGEL, P.; DU RUTSCHMANN, S. X.; MUDD, S. et al. CD36 is a sensor of diacylglycerides. **Nature**, v. 433, p. 523–527, 2005.

HORTA, M. F.; MENDES, B.F.; ROMAS, E.H. et al. I Cutaneous Leishmaniasis. **J. Parasitol. Res.**, v. 2012, p. 1-11, 2012.

HOWARD, J. G.; C. HALE; W. LIEW. Immunological regulation of cutaneous Leishmaniasis. I. Immunogenetic aspects of susceptibility to *Leishmania tropica* in mice. **Parasite Immunol.**, v. 2, p. 303-314, 1980.

ITO, S.; NAITO, M.; KOBAYASHI, Y.; et al. Roles of a macrophage receptor with collagenous structure (MARCO) in host defense and heterogeneity of splenic marginal zone macrophages. **Arch. Histol. Cytol.**, v.62, p. 83- 95, 1999.

JAMES, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiol. Rev.**, v. 59, n. 4, 533-547, 1995.

JEANNIN, P.; BOTTAZZI, B.; SIRONI, M. et al. Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors. **Immunity**, v. 22, p. 551– 560, 2005.

JOCHIM, R. C.; TEIXEIRA, C. *Leishmania* commandeers the host inflammatory response through neutrophils. **Trends in Parasitol.**, v. 25, n. 4, p. 145-147, 2009.

JÓZEFOWSKI, S.; ARREDOUANI, M.; SULAHIAN,T.; KOBZIK, L. Disparate Regulation and Function of the Class A Scavenger Receptors SR-AI/II and MARCO **J. Immunol.**, v. 175, p. 8032-8041, 2005.

JÓZEFOWSKI, S; SULAHIAN, T; ARREDOUANI, M. et al. Role of scavenger receptor MARCO in macrophage responses to CpG oligodeoxynucleotides. **J. Leukoc. Biol.**, v.80, 2006.

KANNO, S.; FURUYAMA, A.; HIRANO, S.; Murine Scavenger Receptor MARCO Recognizes Polystyrene Nanoparticles. **Toxicol. Sciences**, v. 97, n. 2, p. 398–406, 2007.

KAUFMANN, S. H. E. Immunity to intracellular bacteria. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 11, p. 129-163, 1993.

KAVELL, K.; CZÖMPÖLY, T.; PIKKARAINEN, T. et al. Species- specific restriction of cell surface expression of mouse MARCO glycoprotein in murine cell lines. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 341, n.4, p. 1193-202, 2006.

KAVOOSI, G.; ARDESTANI, S. K. et al. Production of nitric oxide by murine macrophages induced by lipophosphoglycan of *Leishmania major*. **Korean J. Parasitol.**, v. 44, n.1, p. 35–41, 2006.



- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Rev.**, v. 9, p. 605-615, 2011.
- KIM, T.S.; KIM, Y.S. et al. Mycobacterium massiliense Induces Inflammatory Responses in Macrophages through Toll-Like Receptor 2 and c-Jun N-Terminal Kinase. **J. Clin. Immunol.**, v. 34, n.2, p. 212-223, 2014.
- KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M. et al. IL-17 and Th17 Cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 27, p. 485–517, 2009.
- KRAAL, G.; VAN DER LAAN, L. J.; ELOMAA, O. The macrophage receptor MARCO. **Microbes Infect.**, v. 3, p. 313– 316, 2000.
- KRIEGER, M.; HERZ, J. Structures And Functions Of Multiligand Lipoprotein Receptors: Macrophage Scavenger Receptors And Ldl Receptor-Related Protein (LRP) **Annu. Rev. Biochem.**, v.63, p.601-637, 1994.
- LAINSON, R.; READY P.D.; SHAW J.J. Leishmania in phlebotomid sandflies. VII. On the taxonomic status of Leishmania peruviana, causative agent of Peruvian “uta”, as indicated by its development in the sandfly, Lutzomyia longipalpis. **Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 206, n.1164, p. 307-318, 1979.
- LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes–Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes? **Trends in Microbiol.**, v.11, p. 210-214, 2003.
- LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. **Immunobiology**, v. 213, n.3-4, p.183-191, 2008
- LAUFS, H. et al. Intracellular survival of Leishmania major in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infect. Immun.**, v.70, p. 826–835, 2002.
- LAUNOIS, P.; OHTEKI, T.; SWIHART, K. et al. In susceptible mice, Leishmania major induce very rapid interleukin- 4 production by CD4+ T cells which are NK1. **Eur. J. Immunol.**, v. 25, p. 3298–3307, 1995.
- LEMOS DE SOUZA V.; ASCENÇÃO S.J.; CORREIA S. T.M. et al. Different Leishmania species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. **Microbes Infect.**, v. 2, p. 1807–1815, 2000.
- LEWIS D. H; PETERS W. The resistance of intracellular Leishmania parasites to digestion by lysosomal enzymes. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 71, p. 295-312, 1977.

LIESE, J.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. TLR9 signalling is essential for the innate NK cell response in murine cutaneous Leishmaniasis. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, p. 3424–3434, 2007.

LIEW, F. Y.; LI, Y. ; MILLOTT, S. Tumour necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) in Leishmaniasis II. TNF- $\alpha$  -induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from l-arginine. **Immunology**, v. 71, p. 556-559, 1990b.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOT, S. Tumor necrosis factor-  $\alpha$  synergizes with IFN- $\gamma$  in mediating killing of Leishmania major through the induction of nitric oxide. **J Immunol**, v. 145, p. 4305–4310, 1990a.

LIEW, F. Y.; MILLOTT, S.; PARKINSON, C. et al. S. Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine, **J. Immunol.**, v. 144, n. 12, p. 4794–4797, 1990c.

LIEW, F.Y.; WEI, X.Q.; PROUDFOOT, L. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.** v. 352, p. 1311-1315, 1997.

LOCKSLEY, R.M; SCORTT, P. Helper T-cell Subsets in Mouse Leishmaniasis: Induction, Expansion and Effector Function. **Immunol. Today**, v.12, p. A58-A61, 1991.

LODGE, R.; T. O. DIALLO, et al. Leishmania donovani lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. **Cell Microbiol.**, v. 8, n. 12, p. 1922-1931, 2006.

MATTHEWS, D. J.; EMSON, C. L.; MCKEN- ZIE, G. J. et al. IL-13 is a susceptibility factor for Leishmania major infection. **J. Immunol.**, p. 164, p. 1458–1462, 2000.

MCCONVILLE, M. J.; TURCO, S. J.; FERGUSON, M. A.; SACKS, D. L. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of Leishmania major promastigotes to an infectious stage. **EMBO Journal**, v. 11, p. 3593–3600, 1992.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. JR. Innate immunity: impact on the adaptive immune response **Curr. Opin. Immunol.**, v. 9, p. 4-9, 1997.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C.A. JR. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. **Cell**, v. 91, p. 295–298, 1997.

MENDEZ, S.; RECKLING, S. K.; PICCIRILLO, C. A. et al. Role for CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells in Reactivation of Persistent Leishmaniasis and Control of Concomitant Immunity. **J. Exp. Med.**, v. 200, n.2, p. 201-210, 2004.

MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W. et al. Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, v.136, p. 2348-2357, 1986.

MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. The mouse macrophage receptor for c3bi (cr3) is a major mechanism in the phagocytosis of Leishmania promastigotas. **J. Immunol.**, v. 135, p. 2785-2789, 1985.

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

MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of Leishmania. **Immunol. Rev.**, v. 240, p. 286–296, 2011.

MUKHOPADHYAY, S.; CHEN, Y.; SANKALA, M. et al. MARCO, an innate activation marker of macrophages, is a class A scavenger receptor for Neisseria meningitidis. **Eur. J. Immunol.** v. 36, p. 940–949, 2006.

MUKHOPADHYAY, S.; GORDON, S. The role of scavenger receptors in pathogen recognition and innate immunity. **Immunobiology**, v. 209, p. 39–49, 2004.

MUKHOPADHYAY, S.; PEISER, L. et al. Activation of murine macrophages by Neisseria meningitidis and IFN-gamma in vitro: distinct roles of class A scavenger and Toll-like pattern recognition receptors in selective modulation of surface phenotype. **J. Leukoc. Biol.** v. 76, n. 3, p. 577-584, 2004.

MUKOUHARA, T.; ARIMOTO, T; CHO, K. et al. Surface Lipoprotein PpiA of Streptococcus mutans Suppresses Scavenger Receptor MARCO-Dependent Phagocytosis by Macrophages . **Infect. Immun.**, v. 79, n. 12, p. 4933–4940, 2011.

MURRAY H.W. Susceptibility of Leishmania to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. **J. Exp. Med.**, v. 53, p. 1302-1315, 1981.

MURRAY H.W.; NATHAN C.F. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral Leishmania donovani. **J. Exp. Med.**, v. 189, p. 741–746, 1999.

MURRAY,H.; TSAI; C. W. et al. Visceral Leishmania donovani infection ininterleukin-13-/- mice. **Infect. Immun.** v. 74, p. 2487–2490, 2006.

NOBEN-TRAUTH, N.; KROPF, P.; MULLERT, I. Susceptibility to Leishmania major Infection in Interleukin-4-Deficient Mice. **Science**, v. 271, p. 987-990, 1996.

OLIVER, M.; BROWNSEY, R.W.; REINER, N.E. Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase C. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 89, p. 7481–7485, 1992.

PALECANDA, A.; PAULAUSKIS, J.; AL-MUTAIRI, E. et al. Role of the Scavenger Receptor MARCO in Alveolar Macrophage Binding of Unopsonized Environmental Particles. **J. Exp. Med.**, v. 189, p. 1497-1506, 1999.

PEARSON, A.M. Scavenger receptors in innate immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 8, p. 20–28, 1996.

PEARSON, R.D.; WHEELER, D. A.; HARRISON, L.H.; KAY, H.D. The immunobiology of Leishmaniasis. **Infect**, v. 5, n. 5, p. 907- 927, 1983.

PEISER, L.; GORDON, S. The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. **Microbes Infect.**, v. 3, p. 149–159, 2001.

PEREZ, H.; LABRADOR, F.; TORREALBA, J.W. Variations in the response of five strains of mice to *Leishmania mexicana*. **Int. J. Parasitol.** v. 9, p. 27-32, 1979.

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

PETERS, N.; SACKS, D. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. **Immunol. Rev.**, v. 213, p. 159-179, 2006.

PIKKARAINEN, T.; BRÄNNSTRÖM, A.; TRYGGVASON, K. expression of macrophage MARCO receptor induces formation of dendritic plasma membrane processes. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 16, p. 10975-10982, 1999.

PIMENTA, P. F. P.; SARAIVA, E. M. B.; SACKS, D. L. The fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. **Exp. Parasitol.** v. 72, p. 191-204, 1991.

PINHEIRO DA S. F; ALOULOU, M; SKURNIK D. et al. CD16 promotes *Escherichia coli* sepsis through an FcR gamma inhibitory pathway that prevents phagocytosis and facilitates inflammation. **Nat. Med.**, v. 13, n. 11, p. 1368-1374, 2007.

RACOOSIN, E. L.; BEVERLEY, S. M. *Leishmania major*: Promastigotes Induce Expression of a Subset of Chemokine Genes in Murine Macrophages. **Exp. Parasitol.**, v. 85, p. 283- 295, 1997.

RADI, R.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M. N. et al. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 30, n. 5, p. 463–488, 2001.

REBÊLO J.M.M . **Flebótomos vetores das leishmanioses.** Manual para técnicos e profissionais de Saúde. São Luis: Universidade Federal do Maranhão/ Ministério da Saúde, 1999.

RITTER U; MOLL H. Monocyte chemotactic protein-1 stimulates the killing of *Leishmania major* by human monocytes, acts synergistically with IFN-gamma and is antagonized by IL-4. **Eur. J. Immunol.** v. 30, n. 11, p. 3111-3120, 2000.

RITTER, U.; FRISCHKNECHT, F.; VAN ZANDBERGEN, G. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? **Trends in Parasitol.**, v. 125, p. 505-510, 2009.

ROSENTHAL, L. A.; SUTTERWALA, F.; KEHRLI, M. E.; MOSSER, D. M. *Leishmania major*-Human Macrophage Interactions: Cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and Complement Receptor Type 1 (CD35) in Promastigote Adhesion. **Infect. Immun.**, v.64, p. 2206- 2215, 1996.

RUSSELL, D. G.; WILHELM, H. The involvement of the major *Leishmania* promastigotes in surface glycoprotein (gp63) of attachment to macrophages. **J. Immunol.**, v. 136, p. 2613- 2620, 1986.

SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. **Exp. Parasitol.**, v. 69, p. 100-103, 1989.

SACKS, D. L.; S. HIENY.; A. SHER. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. **J. Immunol.** v. 135, p. 564-569, 1985.

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

SACKS,D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nat. Immunol.**, v. 3, n. 11, p. 1041-1047, 2002.

SADICK, M.D.; F.P. HEINZEL; B.J. HOLADA. et al. Cure of murine Leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon 7-independent mechanism. **J. Exp. Med.** v. 171, n. 115, 1990.

SADICK, M.D.; LOCKSLEY, R. M.; TUBBS, C.; RAFF, H.V. Murine cutaneous Leishmaniasis: resistance correlates with the Scharton-Kersten and Scott Role of NK cells in Leishmaniasis capacity to generate interferon--y in response to *Leishmania* antigens in vitro. **J. Immunol.**, v. 136, p. 655-661, 1986.

SANKALA, M.; BRANNSTROM, A.; SCHULTHESS, T. et al. Characterization of recombinant soluble macrophage scavenger receptor MARCO. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 33378–33385, 2002.

SANTIAGO-GARCIA, J.; KODAMA, T.; PITAS, R. E. The class A scavenger receptor binds to proteoglycans and mediates adhesion of macrophages to the extracellular matrix. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 6942–6946, 2003.

SCHARTON, T. M. AND SCOTT, P. Natural killer cells are a source of interferon  $\gamma$  that drives differentiation of CD4<sup>+</sup> T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. **J. Exp. Med.**, v. 178, n. 2, p. 567–577, 1993.

SCHARTON-KERSTEN, T.; SCOTT, P. The role of the innate immune response in Th1 cell development following *Leishmania* infection. **J. Leukoc. Biol.** v. 57, p. 515–522, 1995.

SHEVACH, E. M. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suppressor T cells: more questions than answers. **Nat. Rev. Immunol.** v. 2, p. 389–400, 2002.

SHIMAOKA, T.; KUME, N. et al. LOX-1 supports adhesion of Gram-positive and Gram-negative bacteria. **J. Immunol.**, v. 166, n. 8, p. 5108–5114, 2001.

SILVA, R.; SACKS, D. L. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. **Infect. Immun.**, v. 55, n. 11, p. 2802–2806, 1987.

SPÄTH, G. F.; BEVERLEY, S. M. A Lipophosphoglycan-Independent Method for Isolation of Infective *Leishmania* Metacyclic Promastigotes by Density Gradient Centrifugation. **Exp. Parasitol.**, v. 99, p. 97–103, 2001.

ST. DENIS, A.; CAOURAS, V.; GERVAIS, F.; DESCOTEAUX, A. Role of protein kinase C- $\alpha$  in the control of infection by intracellular pathogens in macrophages. **J. Immunol.**, v. 163, p. 5505–5511, 1999.

STAFFORD, J. L.; NEUMANN, N.F. et al., Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 28, n. 3, p. 187–248, 2002.

SUFFIA I. J.; RECKLING S. K.; PICCIRILLO C. A. et al. Infected site-restricted Foxp3<sup>+</sup> natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. **J. Exp. Med.**, v. 203, p. 777–788, 2006.

SULAHIAN TH; IMRICH A; DELOID G. et al. Signaling pathways required for macrophage scavenger receptor-mediated phagocytosis: analysis by scanning cytometry. **Respir. Res.**, v. 9, n. 59, 2008.

SYPEK, J.P.; CHUNG, C.L.; MAYOR, S. E. et al. Resolution of Cutaneous Leishmaniasis: Interleukin 12 Initiates a Protective T Helper Type 1 Immune Response **J. Exp. Med.**, v. 177, p. 1797–1802, 1993.

TEIXEIRA, M. J.; TEIXEIRA, C. R.; ANDRADE, B. B. et al. Chemokines in host–parasite interactions in Leishmaniasis. **Trends Parasitol.**, v. 22, n. 1, 2006.

THELEN, T.; HAO, Y.; MEDEIROS, A. I. et al. The class A scavenger receptor, macrophage receptor with collagenous structure, is the major phagocytic receptor for *Clostridium Sordellii* expressed by human decidual macrophages. **J. Immunol.**, v.185, p. 4328-4335, 2010.

TURCO, S. J.; DESCOTEAUX, A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 46, p. 65-94, 1992.

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

VAN DER LAAN, L. J. W.; DÖPP, E. A.; HAWORTH, R. et al. Regulation and functional involvement of macrophage scavenger receptor MARCO in clearance of bacteria in vivo. **J. Immunol.**, v. 162, p. 939-947, 1999.

VAN DER LAAN, L. J. W.; KANGAS, M.; DOPP, E. A. et al. Macrophage scavenger receptor MARCO: In vitro and in vivo regulation and involvement in the anti-bacterial host defense. **Immunol Letters.**, v. 57, p. 203-208, 1997.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 4177-4184, 2002.

VOULDOUKIS, I.; RIVEROS-MORENO, V.; DUGAS, B. et al. The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the FcγR2/CD23 surface antigen. **Immunol.**, v. 92, p. 7804-7808, 1995.

WANDERLEY, J.L.; BENJAMIN, A.; REAL, F. et al. Apoptotic mimicry: an altruistic behavior in host/*Leishmania* interplay. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, p. 807-812, 2005.

WANDERLEY, J.L.M.; BENJAMIN A.; REAL, F. et al. Apoptotic mimicry: an altruistic behavior in host/*Leishmania* interplay. **Braz. J. Med. and Biol. Research.**, v. 38, p. 807- 812, 2005.

WANG, Z. E.; REINER, S. L.; ZHENG, S. et al. CD4<sup>+</sup> effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania major*. **J. Exp. Med.**, v.179, p. 1367-1371, 1994.

WEI, X. Q.; CHARLES, I. G., SMITH, A., et al., Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Nature**, v. 375, n.6530, p. 408-411, 1995.

WEI, X.Q.; LEUNG, B.P.; NIEDEBALA, W. et al., Altered immune responses and Susceptibility to *Leishmania major* and *Staphylococcus aureus* infection in IL-18-deficient mice. **J. Immunol.**, v. 163, n. 5, p. 2821-2828, 1999.

WHO. Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços. **World Health Organization**. Disponível em: <<http://www.who.int/Leishmaniasis/en>>. Acesso em 20 de maio de 2011.

WHO. Technical Report Series. Control of Leishmaniasis. **World Health Organization**, Geneva, Switzerland, 2010.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tropical disease research: progress 2003–2004. **World Health Organization**, Geneva, Switzerland, 2005.

WILSON, M. E.; PEARSON, R. D. Evidence that *Leishmania donovani* utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism. **J. Immunol.**, v. 136, p. 4681- 4688, 1986.

WILSON, M.E.; HARDIN, K.K.; DONELSON, J.E. Expression of the major surface glycoprotein of *Leishmania donovani* chagasi in virulent and attenuated promastigotes. **J. Immunol.**, v. 143, p. 678-684, 1989.

XU, D. L. H.; KOMAI-KOMA, M; CAMPBELL, C. et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 cells, *Leishmania* major infection, and colitis in mice. **J. Immunol.**, v. 170, p. 394–399, 2003.

YALLOP, C. A.; SVENDSEN, I. The effects of G418 on the growth and metabolism of recombinant mammalian cell lines. **Cytotechnology**, v. 35, p. 101–114, 2001

YALLOP, C.A.; NØRBY, P.L.; JENSEN, R. et al. Characterisation of G418-induced metabolic load in recombinant CHO and BHK cells: effect on the activity and expression of central metabolic enzymes **Cytotechnology**, v. 42, p. 87–99, 2003.

YOKOTA, T. EHLIN-HENRIKSSON, B. HANSSON, G.K. Scavenger receptors mediate adhesion of activated B lymphocytes. **Exp. Cell Res.**, v. 239, p. 16–22, 1998.

ZAKAI, H. A.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. In vitro stimulation of metacyclogenesis in *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. major* and *L. mexicana*. **Parasitology**, v. 116, p. 305–309, 1998.



## **APÊNDICE I- ESBOÇO DO ARTIGO CIENTÍFICO**

## A INTERAÇÃO DO RECEPTOR SCAVENGER MARCO COM A *LEISHMANIA MAJOR* INDUZ A PRODUÇÃO DE MODULADORES IMUNES ENVOLVIDOS NO CONTROLE DA INFECÇÃO EM MACRÓFAGOS

Niara de Jesus Almeida, Carlos Eduardo Sampaio Guedes, Beatriz Rocha Simões Dias, José Geraldo Bomfim Lima, Patrícia Sampaio Tavares Veras  
Laboratório de Patologia e Biointervenção do CPqGM, FIOCRUZ, Bahia, Brasil

**Resumo:** Macrófagos de camundongos CBA são resistentes a *L. major* e permissivos a *L. amazonensis*. Adicionalmente, macrófagos de CBA controlam a infecção *in vitro* por *L. major*, mas não por *L. amazonensis*. Em estudo anterior foi demonstrado que o receptor *scavenger* MARCO teve sua expressão aumentada em resposta à infecção por *L. major*, mas não na infecção por *L. amazonensis*. Ainda, o bloqueio do receptor com o anticorpo específico reduziu a infecção por *L. major* em 30%, indicando que esta proteína tem participação na entrada de promastigotas de *L. major* em macrófagos de CBA. No presente estudo foi demonstrado que a superexpressão de MARCO favoreceu a infecção por *L. major* em células J774. Similarmente, a expressão de MARCO promoveu o aumento da liberação de moduladores imunes como TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-6 e NO durante a infecção por *L. major*. Esses resultados sugerem que a superexpressão do receptor *scavenger* MARCO favorece a entrada de *L. major* em células J774, além de desencadear uma resposta imune efetora direcionando o curso da infecção.

## INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença endêmica de grande preocupação para a saúde pública (WHO, 2011). Essa zoonose é transmitida ao homem por protozoários do gênero *Leishmania*, parasitas intracelulares obrigatórios responsáveis por diferentes quadros clínicos da doença como a leishmaniose cutânea, mucocutânea ou visceral. No hospedeiro vertebrado, os macrófagos são as principais células fagocíticas na infecção por *Leishmania*. Essas células apresentam uma variedade de receptores envolvidos no reconhecimento, fagocitose e destruição de patógenos incluindo receptores do complemento e receptores de reconhecimento padrão tais como CD14, receptores manose, *toll-like* e *scavenger* (Mosser; Edelson, 1985; Blackwell *et al.*, 1985; Gough; Gordon, 2000). Em estudo prévio no nosso laboratório foi demonstrado que

macrófagos de camundongos CBA são resistentes a *L. major* e permissivos a *L. amazonensis*. Em estudo comparativo realizado por nosso grupo foi demonstrado que o receptor *scavenger* MARCO apresentou expressão aumentada em resposta à infecção por *L. major*, mas não na infecção por *L. amazonensis* (Gomes *et al.*, 2003). Ainda, o bloqueio do receptor com o anticorpo específico reduziu a infecção por *L. major* em 30%, indicando que esta proteína tem participação na entrada de promastigotas de *L. major* em macrófagos de CBA (Gomes *et al.*, 2009). Assim, nossa hipótese é que o receptor MARCO participa do reconhecimento e fagocitose de *L. major* por células murinas influenciando o curso da infecção *in vitro*. No presente estudo nós avaliamos o papel do receptor MARCO na infecção de macrófagos por *L. major* ao

demonstrarmos que a superexpressão do receptor favorece a entrada de *L. major* em células J774, além de desencadear uma resposta inicial classicamente protetora.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Parasitas

A cepa de *Leishmania major* (MHOM/RI-/-/WR-173) utilizada no presente estudo foi obtida do estoque do Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - Fiocruz/BA. As formas promastigotas foram cultivadas em meio Schneider (Sigma) por até seis passagens. Para a realização dos experimentos foram utilizadas formas promastigotas metacíclicas do parasito, separadas de acordo com o protocolo descrito por Späth ; Beverley (2001).

### Cultivo de células J774

Células J774 foram cultivadas em meio RPMI (Sigma) completo. As células J774 foram mantidas em cultura a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 97% de umidade por até nove passagens. Quando a cultura atingiu 80 a 90% de confluência, as células foram retiradas das garrafas de cultura com leves batidas, em seguida, foram centrifugadas a 300Xg, por 10 min a 20°C e ressuspensas em meio RPMI completo.

### Transfecção de células J774

Células J774 foram transfectadas pelo método Lipofectamine 2000™ (Invitrogen) com o plasmídeo pcDNA3.1-MARCO (J774-MARCO) ou o plasmídeo pcDNA3.1 sem o inserto do gene do MARCO (J774-MOCK), como controle da transfecção. Para geração das linhagens estáveis foi adicionado ao RPMI completo o antibiótico geneticina (Sigma) na concentração de 400 µg/mL.

### RT-PCR

O RNA total de 5x10<sup>6</sup> células J774-MARCO e J774-MOCK foi extraído utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante. O RNA total de macrófagos peritoneais inflamatórios estimulados com LPS (Sigma) foi extraído como controle positivo da expressão de MARCO. O RNA total obtido foi quantificado utilizando NanoDropND-1000 (ThermoScientific). Com o RNA total foi possível obter o cDNA das amostras. Para obtenção do cDNA para a curva de concentração foi utilizada uma mistura contendo amostras de RNA extraído de células J774-MOCK (3,75 µg) e J774-MARCO (3,75 µg). Então, o cDNA foi diluído nas concentrações de 100, 40, 16, 6,4, 2,56 e 1,052 ng. Após a obtenção do cDNA, foi realizada uma PCR a fim de adquirir a sequência codificante do MARCO. Os iniciadores *forward* GGCACCAAGGGAGACAAA e *reverse* TCCCTTCATGCCCATGTC, utilizados na

reação foram desenhados com base na sequência do MARCO de *Mus musculus* disponível no *GenBank*. Iniciadores para a sequência do GAPDH foram utilizados como controle da amplificação. A PCR foi realizada no aparelho 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems), sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 50°C por 2 min; ciclos a 95°C por 10 min, 95°C por 15 s seguidos de anelamento e extensão a 60 °C por 1 min.

### **Co-localização de *L. major* com células J774- MARCO**

Células J774-MARCO ( $2 \times 10^5$ ) foram plaqueadas e, após 24 h, foram expostas a promastigotas metacíclicas de *L. major* na proporção 10:1, por 30 min a 4°C. Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e imunomarcadas com o anticorpo monoclonal anti-MARCO ED31 (0,25µg/µL) e os parasitos com anticorpo anti-*Leishmania* (1:1000), seguidos dos anticorpos secundários fluorescentes vermelho e verde, respectivamente. As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência Olympus-BX51 (Olympus) no aumento de 400x.

### **Cinética de infecção por *L. major* em células J774-MARCO**

Células J774-MARCO foram infectadas com promastigotas metacíclicas de *L. major* na proporção de 10:1 a uma

temperatura de 37°C por 6 h. Após 6, 12, 24 e 48 h da infecção as células foram fixadas e coradas com hematoxilina e eosina (H;E). O padrão de infecção foi avaliado pela determinação do percentual de aumento da infecção em J774-MARCO em relação às células controle J774-MOCK, além da carga parasitária. No mínimo, 400 células J774 por lamínula foram contadas em microscópio óptico, no aumento de 1000x. Para o cálculo de aumento da infecção em J774-MARCO em relação às células controle J774-MOCK, os valores absolutos de células controle J774-MOCK infectadas foram considerados como 100%.

### **Microscopia eletrônica de varredura**

Células J774-MARCO ( $2 \times 10^5$ ) foram plaqueadas em meio RPMI completo e acondicionadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 97% de umidade. Decorridas 24 h, as células foram fixadas com gluteraldeído 2% por 1 h a 25°C. Em seguida, as amostras foram incubadas com tetróxido de ósmio 1% por 30 minutos. Por fim, foi realizada a desidratação das amostras com soluções de concentrações crescentes de álcool etílico (30%, 50%, 70%, 90%, 100%) seguida de secagem por ponto crítico e metalização com ouro. Após o processamento, as amostras foram observadas no microscópio eletrônico de varredura JSM 6390LV (JEOL) e as imagens obtidas foram semi-quantificadas.

## Avaliação da produção de mediadores

Células J774-MARCO ( $2 \times 10^5$ ), previamente estimuladas com IFN- $\gamma$  (100 U.I) foram infectadas com promastigotas metacíclicas de *L. major* por 6 h. Após 24 e 48 h da infecção, os sobrenadantes das culturas foram, então, coletados para mensuração quantitativa de mediadores liberados no meio de cultura. O *kitBD<sup>TM</sup> CBA Mouse Inflammation* (BD Biosciences) foi utilizado para quantificar IL-6, IL-10, MCP-1, TNF- $\alpha$  e IL-12p70. O procedimento foi realizado de acordo com as especificações do fabricante e as amostras obtidas foram analisadas por citometria de fluxo. A produção de NO foi determinada com o método de Griess, a partir da quantificação de nitrito nos sobrenadantes das culturas, como descrito por Ding e colaboradores (1988).

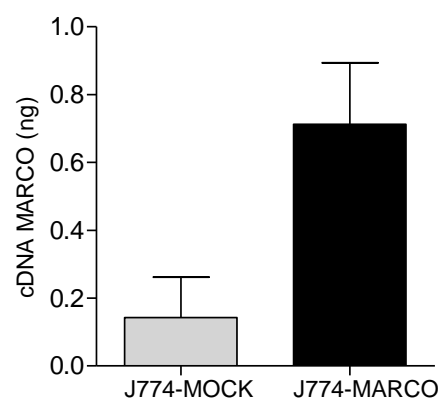
## Análises de resultados e estatísticas

Para comparação entre dois grupos com distribuição normal, foi utilizado o teste *t* de Student não pareado. Adicionalmente, a comparação entre dois grupos com distribuição não-paramétrica foi realizada com o teste de Mann-Whitney. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando o valor de  $p \leq 0,05$ .

## RESULTADOS

### Confirmação da superexpressão do MARCO em células J774

Com a quantificação do cDNA de MARCO nas amostras foi possível inferir que como esperado, a expressão do gene do MARCO é 5 vezes maior nas células J774-MARCO (0,71 ng) em comparação com células J774-MOCK (0,14 ng) (Figura 1).



**Figura 1. Quantificação de cDNA de MARCO em células J774-MARCO.** O RNA total de células J774-MARCO foi extraído e, após síntese do cDNA, a amostra foi submetida a qPCR para amplificação da sequência codificante de receptor MARCO conforme descrito na seção Material e Métodos. A quantificação do cDNA de MARCO nas amostras foi calculada pela razão entre a quantidade de cDNA do gene alvo da amostra e o cDNA do gene normalizador (GAPDH). O gráfico representa as médias  $\pm$  DP de um experimento em triplicata. Teste Mann-Whitney.

### Interação de *L. major* com células J774-MARCO

Células J774-MARCO e J774-MOCK mostraram marcação do receptor MARCO na superfície, refletindo a expressão constitutiva dessa proteína em células macrófágicas (Figura 2). Observa-se que

não houve diferença no percentual de células J774-MARCO que co-localizam com as promastigotas metacíclicas de *L. major* (Figura 3).

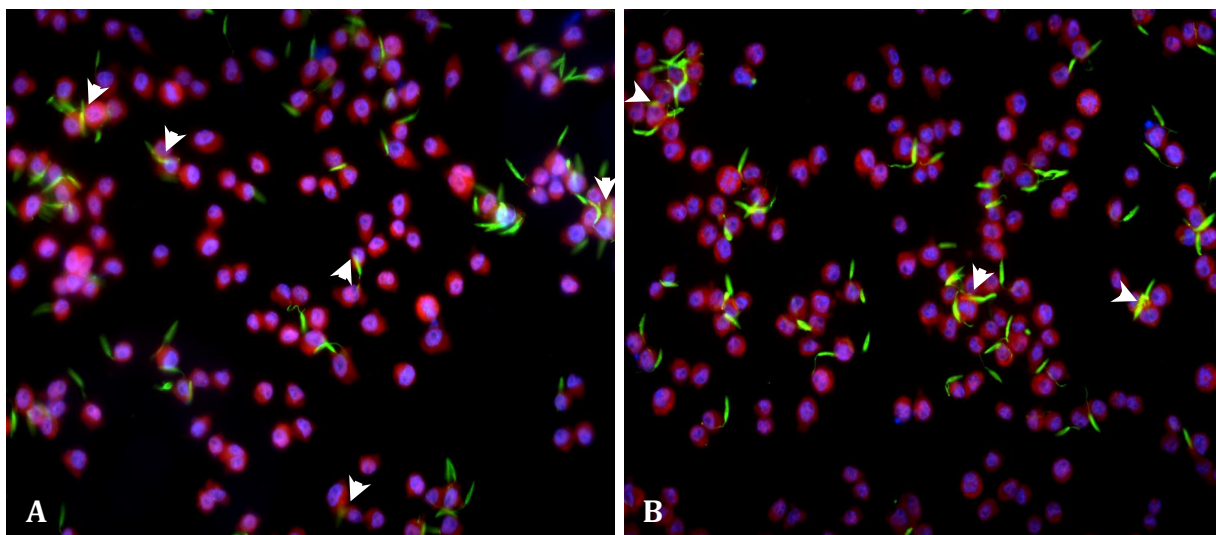
### Cinética de infecção por *L. major* em células J774-MARCO

A avaliação do efeito da superexpressão de MARCO na infecção por *L. major* mostrou que nos períodos adicionais de 6 h, 12 h e 24 h após a lavagem de parasitos não internalizados, houve aumento de 130% ( $p < 0,05$ ), 130% ( $p < 0,01$ ), e 115 % ( $p < 0,05$ ), respectivamente, do percentual de infecção nas células J774-MARCO em relação às células controle (Figura 4A). Em relação, a avaliação da carga parasitária, observa-se que o número de *Leishmania*/célula foi maior nas células superexpressando MARCO em relação às

células J774-MOCK nos tempos de 6 h ( $p < 0,001$ ), 12 h ( $p < 0,05$ ) e 24 h ( $p < 0,01$ ) após a lavagem de parasitos não internalizados (Figura 4B).

### Microscopia eletrônica de varredura de células superexpressando MARCO

Para avaliar se a superexpressão de MARCO estava relacionado com modificações na membrana celular que favoreceriam a entrada do parasito na célula, J774-MOCK e J774-MARCO foram observadas utilizando microscopia eletrônica de varredura. A presença de projeções membranosas denominadas lamelipódios e filopódios (Figura 5) foi observada nos dois tipos celulares estudados.

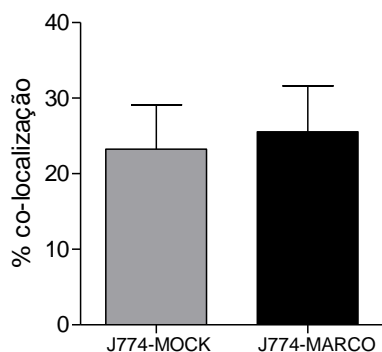


**Figura 2. Microscopia de fluorescência da interação de *L. major* com células J774-MARCO.** Células J774-MARCO (A) foram plaqueadas e após 24 h foram expostas a promastigotas metacíclicas de *L. major* na proporção 10:1, por 30min a 4°C. Em seguida, as células foram fixadas e imunomarcadas como descrito na sessão Materiais e Métodos. As mesmas observações foram realizadas com as células controle J774-MOCK (B). As setas brancas correspondem à co-localização (em amarelo) de *L. major* com a expressão de MARCO. As imagens foram obtidas com o aumento de 400x.

Após semi-quantificação das imagens obtidas, foi observado que 67% das células

superexpressando MARCO (Figura 5A) estavam mais espalhadas, com maiores

dimensões e maior número de lamelipódios e filopódios. Tais características foram observadas somente em 24% das células J774-MOCK (Figura 5B).

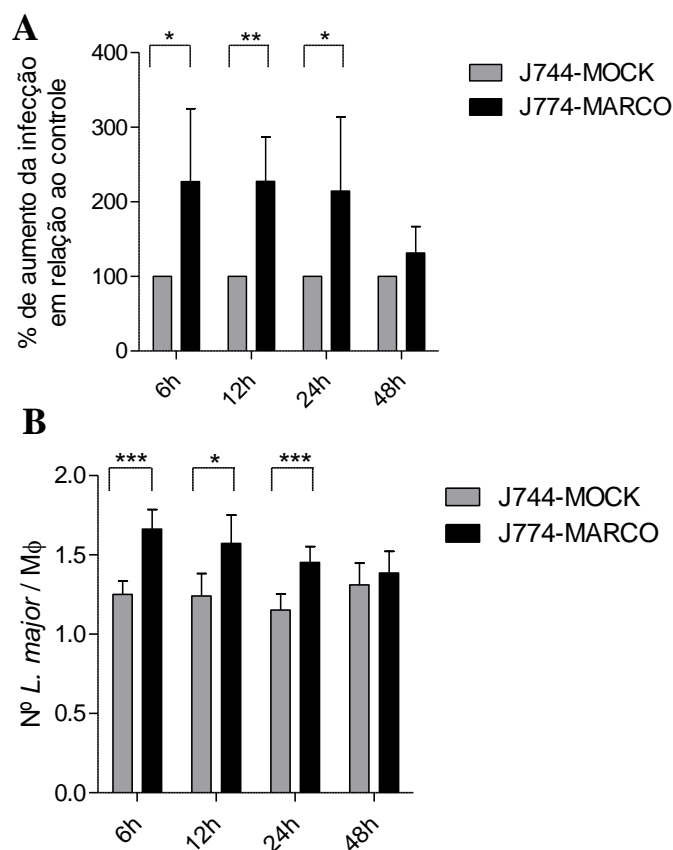


**Figura 3. Quantificação da co-localização de *L. major* com células J774-MARCO.** As imagens obtidas no ensaio descrito na Figura 2 foram quantificadas em relação ao percentual de co-localização de *L. major* com as células J774-MARCO (barra preta) e células controle J774-MOCK (barra cinza). Gráfico de um experimento representativo de 2 realizados em sextuplicata. Teste *t* de Student.

### Avaliação da produção de citocinas

A infecção por *L. major* induziu maior produção de TNF- $\alpha$  nos tempos de 24 h e 48 h, nas células J774-MARCO (536 e 361 pg/mL, respectivamente) em comparação com as células J774-MOCK (252 e 222 pg/mL, respectivamente) (Figura 6A e B,  $p < 0,001$ ). Similarmente, nos tempos de 24 h e 48 h, houve maior produção de MCP-1 em células J774-MARCO (11860 e 10529 pg/mL, respectivamente) em comparação com as células J774-MOCK (4406 e 3716 pg/mL, respectivamente) (Figura 6C e D,  $p < 0,001$ ). Após 24 h de infecção por *L. major* a produção de IL-6 foi maior em células J774-MOCK (57 pg/mL) em comparação com as células J774-MARCO (41 pg/mL) (Figura 6E,  $p < 0,05$ ). Já no tempo de 48 h, houve maior produção de

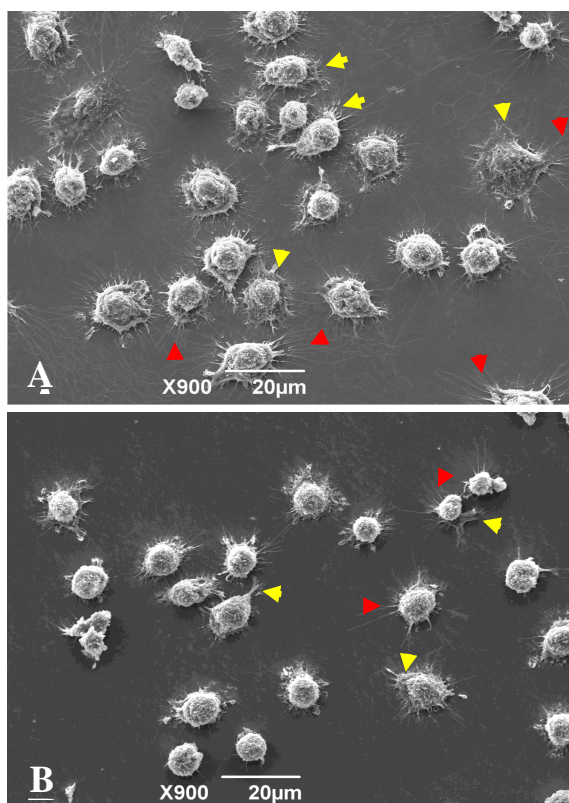
IL-6 em células J774-MARCO (78 pg/mL) em comparação com as células J774-MOCK (48 pg/mL) (Figura 6F,  $p < 0,05$ ). Todavia, não foram observadas diferenças na produção de IL-10 e IL-12 entre os grupos analisados (dados não mostrados).



**Figura 4. Cinética de infecção de células J774-MARCO por *L. major*.** Células J774-MARCO foram infectadas por promastigotas metacíclicas de *L. major* por 6 h a 37°C. Após esse intervalo, as células foram lavadas e reincubadas por adicionais 6, 12, 24 e 48 h. **A**) Percentual de aumento da infecção de células J774-MARCO por *L. major* em relação às células controle. **B**) Número de *L. major* por célula. O gráfico representa as médias  $\pm$  DP de um experimento representativo de três realizados em quintuplicata. Ao menos 400 macrófagos por lamínula foram contados. Teste *t* de Student \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

### Avaliação da produção de óxido nítrico

Em resposta à infecção por *L. major*, células J774-MARCO liberaram maior quantidade desse mediador em comparação às células controle em ambos os tempos estudados, respectivamente: 80  $\mu\text{M}$  e 62  $\mu\text{M}$  nos tempos de 24 ( $p < 0,001$ ) e 88  $\mu\text{M}$  e 56  $\mu\text{M}$  48 h ( $p < 0,01$ ) (Figura 7).

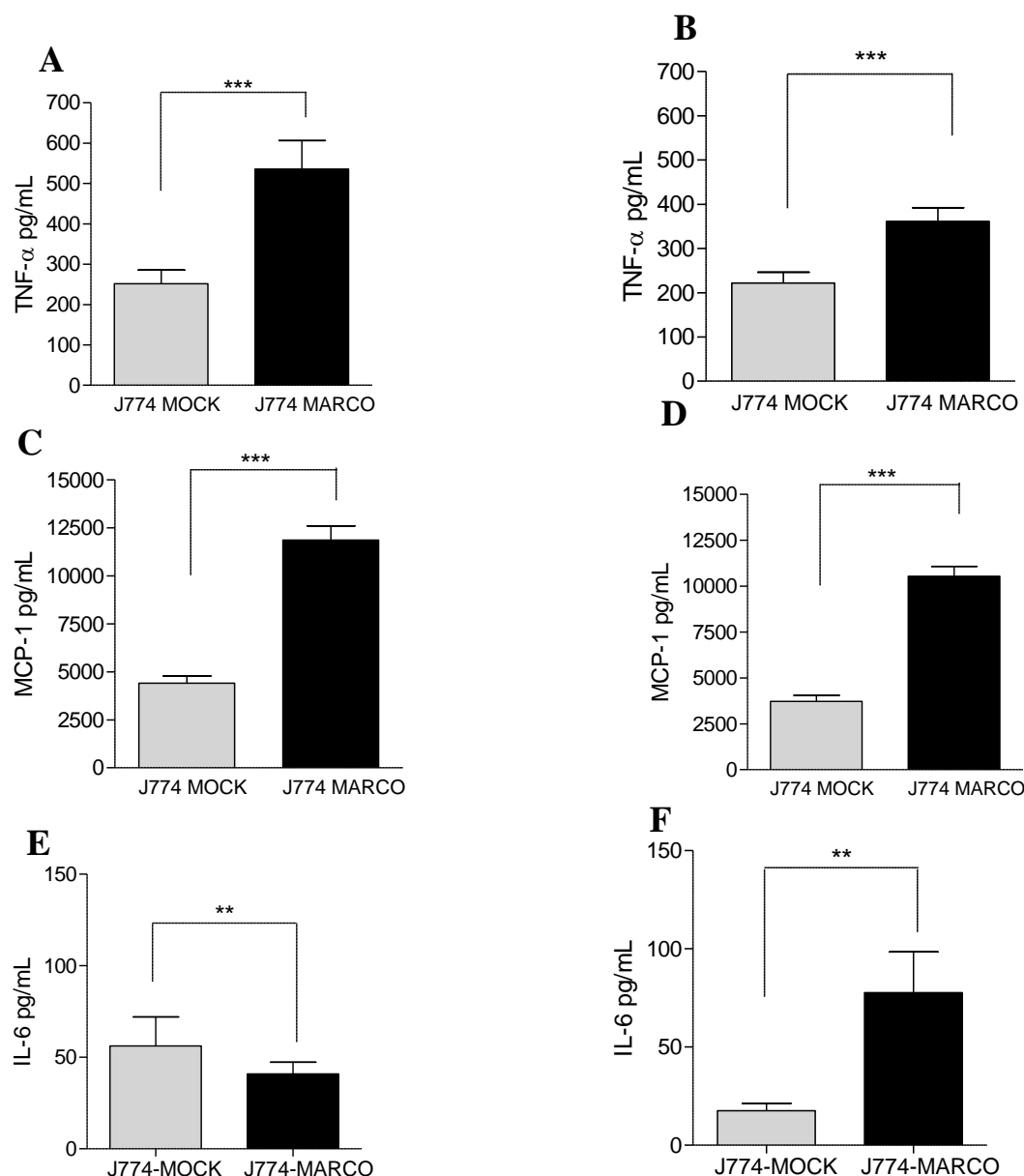


**Figura 5. Avaliação ultraestrutural de células J774-MARCO.** Células J774-MARCO e células controle J774-MOCK foram plaqueadas em meio RPMI completo e acondicionadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 97% de umidade. Decorridas 24 h, as células foram fixadas e as amostras foram processadas para observação no microscópio eletrônico de varredura JSM 6390LV (JEOL). **A-** Células J774-MARCO; **B-** J774-MOCK. As setas amarelas apontam para lamelipódios e as setas vermelhas para filopódios. As imagens foram obtidas com o aumento de 900x.

## DISCUSSÃO

Estudos apontam o receptor MARCO como uma glicoproteína de superfície com capacidade de reconhecer vários ligantes de microorganismos (van der Laan *et al.*, 1997; . Van der Lann *et al.*, 1999; Kraal *et al.*, 2000). No nosso estudo observamos que a superexpressão de MARCO não altera a co-localização de *L. major* com as células J774 (Figura 3). Ao avaliarmos o papel de MARCO na fagocitose de *L. major* por células J774 observamos que superexpressão de MARCO favoreceu tanto o percentual de infecção de *L. major* como o número de parasitos/célula nos tempos iniciais até 24 h após a infecção (Figura 4). A participação de MARCO na infecção por *L. major* já foi demonstrada Gomes e colaboradores (2009). Estudos anteriores apontam MARCO como uma proteína importante na fagocitose de bactérias patogênicas (van der Laan *et al.*, 1997; van der Laan *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 1999; Arredouani *et al.*, 2004; Mukhopadhyay *et al.*, 2006; Braun *et al.*, 2011; Mukouhara *et al.*, 2011). Entretanto, a literatura é escassa em trabalhos que demonstrem a participação de MARCO na fagocitose de protozoários. Em nosso ensaio de infecção, os parasitos foram expostos às células J774-MARCO por um período longo de 6 h a 37°C de infecção, enquanto que no ensaio de ligação foram expostos às células por 30 min a 4°C.





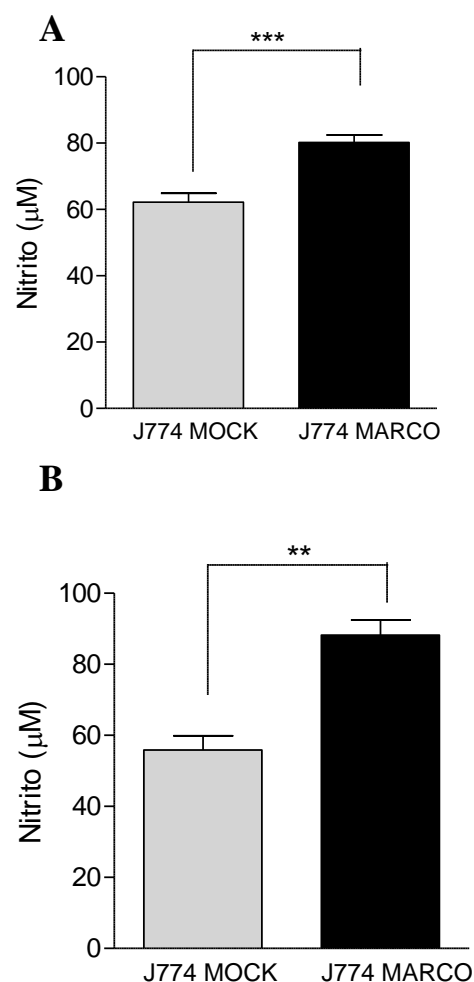
**Figura 6.** Avaliação da produção de MCP-1 e TNF- $\alpha$  em células J774-MARCO infectadas por *L. major*. Células J774-MARCO previamente estimuladas com IFN- $\gamma$  (100 U.I.) foram infectadas com promastigotas de *L. major* na proporção 10:1 por 6 h a 37°C. Após esse intervalo, as células foram lavadas com solução salina e reincubadas por adicionais 24 e 48 h. Os sobrenadantes das culturas foram, então, coletados para mensuração quantitativa de citocinas liberadas no meio de cultura com o kit CBA. **A e B:** Produção de TNF- $\alpha$  24 e 48 h, respectivamente, após infecção por *L. major*. **C e D:** Produção de MCP-1 24 e 48 h, respectivamente após infecção por *L. major*. **E e F:** Produção de IL-6 24 e 48 h, respectivamente após infecção por *L. major*. Os gráficos representam as médias  $\pm$  DP de um experimento realizado em sextuplicata. Teste *t* de Student \*\**p* < 0,05 , \*\*\**p* < 0,001.

Esse maior tempo de exposição do parasito às células superexpressando MARCO promove uma maior chance à entrada de *L. major*. Finalmente, o aumento no número de patógenos internalizados pode ser uma consequência indireta do aumento de projeções membranas, lamelipódios e

filopódios, modificações essas anteriormente descritas por Pikkarainen e colaboradores (1999) em células superexpressando MARCO. Nossa hipótese é que o aumento de projeções membranas induzidas pela superexpressão de MARCO favoreceria a fagocitose de *L. major*. A

análise qualitativa das imagens obtidas por microscopia de varredura mostrou a presença de lamelipódios e filopódios, (Figura 5) nos dois tipos celulares estudados. Foi observado que as células superexpressando MARCO (Figura 5A) estavam mais espalhadas, com maiores dimensões e maior número de lamelipódios e filopódios na membrana plasmática, características raramente visualizadas nas células J774-MOCK (Figura 5B). Granucci e colaboradores observaram que a expressão de MARCO medeia rearranjos do citoesqueleto em células dendríticas e microglia. Adicionalmente, foi demonstrado que macrófagos de camundongos *knockout* para MARCO apresentavam deficiência de adesão e espraiamento sobre a superfície (Chen *et al.*, 2005). Nossos dados juntamente com os da literatura, sugerem que MARCO ao induzir a formação de lamelipódios e filopódios, aumenta a área de contato da célula com promastigotas de *L. major*, o que pode facilitar a internalização de um maior número de parasitos. Como perspectiva iremos realizar a contagem de parasitos co-localizando com a célula superexpressando o receptor para tentar confirmar o nosso achado. No nosso modelo, MARCO pode estar participando, não apenas na fagocitose, como poderia estar influenciando a liberação de mediadores em células J774 infectadas por *L. major*. No presente estudo, foi demonstrado que a expressão de MARCO promove o aumento da liberação de TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-6 e NO tanto em células não

infectadas como durante a infecção por *L. major*. Tais mediadores têm sido reportados como moléculas envolvidas no controle da infecção por *Leishmania* (Liew *et al.*, 1990; Badolato *et al.*, 1996; Fonseca *et al.*, 2003; Allenbach *et al.*, 2008).



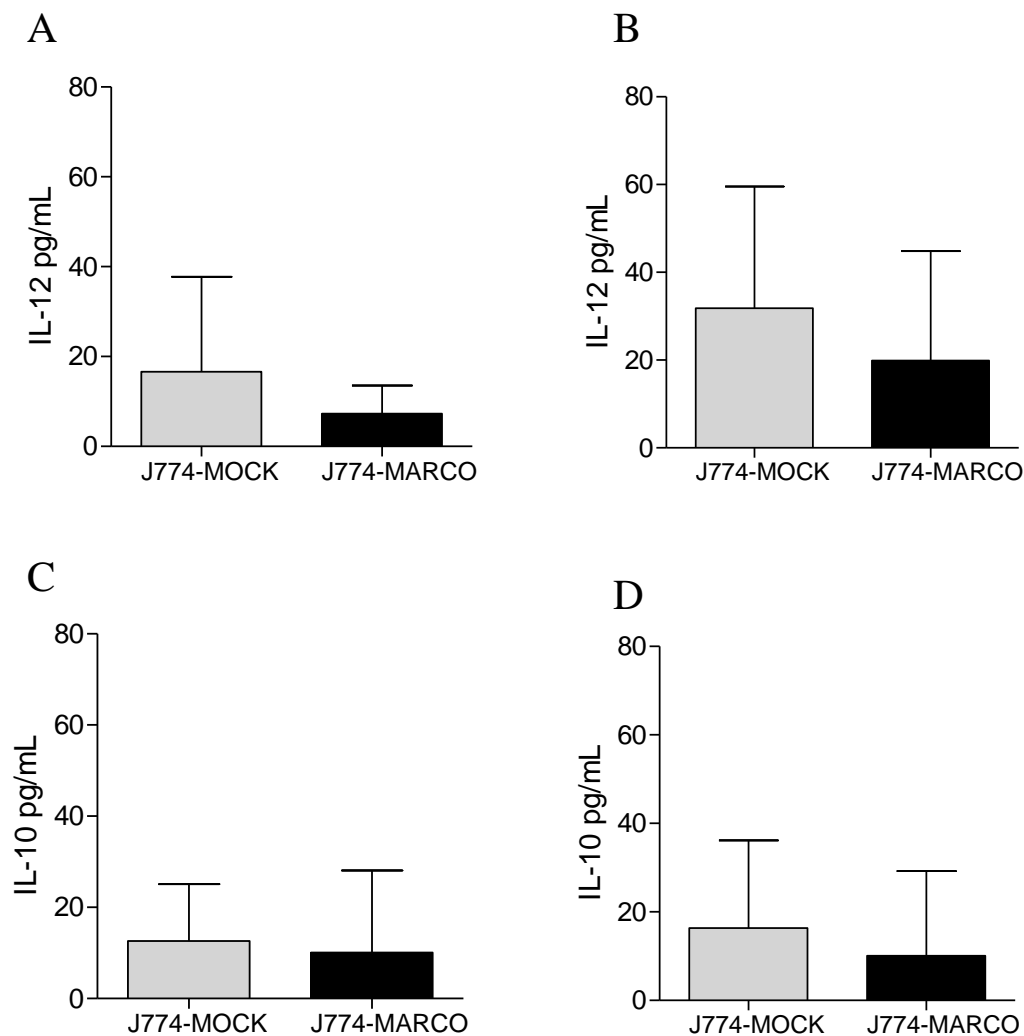
**Figura 7. Determinação da produção de NO em células J774-MARCO infectadas por *L. major*.** Células J774-MARCO previamente estimuladas com IFN- $\gamma$  (100 U.I.) foram infectadas por promastigotas metacíclicas de *L. major* na proporção 10:1 por 6 h a 37°C. Após esse intervalo, as células foram lavadas com e reincubadas por adicionais 24 e 48 h. Liberação de NO no meio de cultura foi determinado pela reação de Griess. **A)** Produção de nitrito 24 h após infecção por *L. major*. **B)** Produção de nitrito 48 h após infecção por *L. major*. Os gráficos representam as médias  $\pm$  DP de um experimento realizado em sextuplicata. Teste *t* de Student \*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001.

Assim, a indução da liberação de tais moduladores nas células superexpressando MARCO indica um papel desse receptor na resposta imune celular contra a infecção por *L. major*. Estudos anteriores demonstraram a participação do receptor MARCO na produção de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (Bowdish *et al.*, 2009) e na produção de NO e IL-12 em resposta a sequências de CpG-ODN presentes no DNA de vírus e bactérias (Józefowski *et al.*, 2006). Adicionalmente, a interação de LPS e patógenos, como *Staphylococcus aureus*, com o MARCO induz uma resposta imune efetora diferente a sua interação com os receptores SR-AI/A-II (Arredouani *et al.*, 2005; Jozefowski *et al.*, 2005).

Em suma, os resultados obtidos indicam que MARCO além de contribuir para a entrada de *L. major*, possivelmente atua no desenvolvimento de uma resposta efetora. No entanto, os mecanismos envolvidos na participação do receptor MARCO no desenvolvimento de uma resposta imune contra a infecção por *Leishmania* ainda necessitam de esclarecimento.

Novos ensaios com o silenciamento de MARCO serão necessários para a compreensão do papel dessa proteína como possível receptor envolvido na infecção por *L. major*, além de investigar a participação do receptor na ativação de mecanismos leishmanicidas e morte do parasito.

**APÊNDICE II- PRODUÇÃO DE IL-12 E IL-10 EM  
CÉLULAS J774-MARCO INFECTADAS POR *L. MAJOR***



**Avaliação da produção de IL-12 e IL-10 em células J774-MARCO infectadas por *L. major*.** Células J774-MARCO previamente estimuladas com IFN- $\gamma$  (100 U.I.) foram infectadas com promastigotas de *L. major* na proporção 10:1 por 6 h a 37°C. Após esse intervalo, as células foram lavadas com solução salina e reincubadas por adicionais 24 e 48 h. Os sobrenadantes das culturas foram, então, coletados para mensuração quantitativa de citocinas liberadas no meio de cultura com o *kit* CBA. **A e B:**Produção de IL-12 24 e 48 h, respectivamente, após infecção por *L. major*. **C e D:**Produção de IL-10 24 e 48 h, respectivamente após infecção por *L. major*. Os gráficos representam as médias  $\pm$  DP de um experimento realizado em sextuplicata. Teste *t* de Student