



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO

CAUÊ BARROS DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS DE LINHAGEM J774 NA
INFECÇÃO POR *Leishmania braziliensis***

FORTALEZA

2025

CAUÊ BARROS DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS DE LINHAGEM J774 NA
INFECÇÃO POR *Leishmania braziliensis***

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Jania Teixeira.

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S237a Souza, Cauê Barros de.
Avaliação da polarização de macrófagos de linhagem J774 na infecção por *Leishmania braziliensis* / Cauê Barros de Souza. – 2025.
44 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2025.

Orientação: Profa. Dra. Maria Jania Teixeira.

Coorientação: Prof. Dr. Camila Rabelo Oliveira Leal.

1. Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. *Leishmania braziliensis*. 3. Polarização de macrófagos. I. Título.

CDD 570

CAUÊ BARROS DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS DE LINHAGEM J774 NA
INFECÇÃO POR *Leishmania braziliensis***

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 28/07/2025

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Maria Jania Teixeira (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Me. Marla Jayssa Correa Da Silva

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Naya Lúcia de Castro Rodrigues

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ao meu amor e melhor amigo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha família. Aos meus pais, Cristina Lima e Teobaldo Izidoro, por sempre investirem na minha educação, incentivarem minha curiosidade e criatividade desde a infância, e por todo o suporte, carinho e dedicação ao longo dos desafios da vida adulta. Obrigado por me ensinarem, acima de tudo, o amor.

Ao meu irmão, Theo Barros — meu “mamão”, minha pessoa favorita em todo o universo, a parte de mim sem a qual não consigo viver —, meu amor e gratidão eternos.

Sou grato também às minhas avós, Maria de Fátima e Maria Leonice, e aos meus avôs, Antônio, Valmir e Teobaldo, por todas as histórias, ensinamentos e gargalhadas compartilhadas ao longo da vida.

À Professora Maria Jania Teixeira, minha orientadora, agradeço por me acolher de braços abertos como estagiário nesta etapa final da graduação, com seu jeito alegre e cativante que, além de ensinar, inspira.

Agradeço a todos do Laboratório de Parasitologia — professores, técnicos, doutores, mestres e estagiários — por construírem um ambiente de aprendizado leve, acolhedor e humano.

Minha sincera gratidão à Naya Rodrigues, por sua ajuda imprescindível durante a escrita deste trabalho. E, juntamente com Fabíola Fernandes, agradeço pelo modo leve e divertido de ensinar nos momentos práticos.

Agradeço à Jayssa Correa e ao Professor Josias Martins por gentilmente aceitarem compor minha banca examinadora. Jayssa, obrigado pela atenção, leveza e entusiasmo com que recebeu o convite. Professor Josias, agradeço pela consideração e simpatia constantes.

Aos meus amigos mais antigos e valiosos — Isadora Sattiva, Artur Tahim, Bruno Holanda e João Victor Medeiros —, mesmo que a vida tenha nos levado por caminhos distantes, vocês seguem presentes no meu peito e nos meus pensamentos.

À minha segunda família, Keven da Silva, Alfredo Erich e Jade Tavares, sou imensamente grato por todos os momentos de alegria, apoio, acolhimento e irmandade ao longo da jornada.

À minha sogra, Maria Tatiane, agradeço por sua imensa generosidade, cuidado e preocupação ao longo desses últimos anos. Ao Ícaro Juan, obrigado por me acolher tão afetuosamente como seu “titio Cauê”.

Aos meus companheiros e filhos de quatro patas, Diluc e Kaeya, agradeço por todo o apoio emocional, pela companhia fiel e pelo amor incondicional que só os animais sabem oferecer.

Minha mais profunda gratidão vai para o meu amor, meu parceiro e maior orgulho, Jonatan Teixeira da Silva. Nestes quatro anos, experienciamos o equivalente a uma vida de

obstáculos, conquistas e crescimento. Só nós dois — e talvez as estrelas que iluminam nossas madrugadas — sabemos tudo o que superamos, guiados pela certeza de que o que sentimos é real e de que sempre teríamos um ao outro.

Obrigado por confiar em mim mesmo quando nem eu conseguia; por simplesmente dizer “tudo bem” quando pensei em desistir — palavras que dissiparam o medo e me fizeram continuar. Obrigado por dedicar seu tempo, energia e saúde para me proporcionar uma vida mais tranquila nesta reta final da graduação. E, acima de tudo, por confiar a mim o seu bondoso e inestimável coração. Este é só o começo da nossa mágica aventura.

E, no fim, agradeço a mim — por ter atravessado tempestades em silêncio e me reerguido mesmo quando tudo parecia ruir. Por estar vivo, por ainda amar com profundidade, por ousar sonhar com o que vem adiante. E, sobretudo, por jamais abandonar aquilo que me torna quem sou.

“あーあ...雲はいいよなあ...自由で...”

“Āā... kumo wa ii yo nā... jiyūde...”

“Ah... as nuvens são incríveis, né... tão livres...”

— Shikamaru Nara, em *Naruto*, mangá de
Masashi Kishimoto.

RESUMO

A leishmaniose tegumentar representa um grave problema de saúde pública com milhões de novos casos no Brasil e no mundo. É uma doença infecto-parasitária negligenciada causada por parasitos do gênero *Leishmania*, sendo *L. (Viannia) braziliensis* a principal espécie associada à forma cutânea no Brasil. A infecção ocorre após a picada de insetos flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, e sua manifestação clínica depende de múltiplos fatores, como a espécie de *Leishmania* envolvida, a resposta imune e o metabolismo das células hospedeiras. Dentre essas células, os macrófagos, como principal célula hospedeira, desempenham um papel central no estabelecimento e controle da infecção, destacando-se especialmente por sua polarização funcional para os perfis M1 (pró-inflamatório) e M2 (anti-inflamatório). Este estudo investigou os efeitos da polarização macrofágica sobre a infecção por *Leishmania braziliensis* em macrófagos murinos J774, analisando parâmetros como carga parasitária, produção de citocinas (TNF- α e IL-10), níveis de óxido nítrico (NO), atividade da arginase e níveis de ureia, em 24 e 48 horas pós-infecção. Observou-se que os macrófagos M2 foram mais permissivos à infecção e apresentaram maior ativação da via da arginase, enquanto os M1 produziram maiores níveis de TNF- α e NO. No entanto, mesmo com perfil inflamatório, os M1 não conseguiram eliminar o parasita no período observado, sugerindo que a inflamação isoladamente não é suficiente para o controle da infecção. Além disso, a reprogramação metabólica induzida por *L. braziliensis* parece favorecer a persistência do parasita ao longo do tempo. Esses achados reforçam a importância de compreender as interações entre metabolismo e imunidade na leishmaniose e destacam a necessidade de novos estudos que explorem alvos terapêuticos capazes de modular essa resposta. Esses resultados reforçam que a polarização M2 favorece a sobrevivência do parasito, enquanto a resposta M1, apesar de mais inflamatória, não foi capaz de eliminar totalmente a infecção nos períodos analisados, sugerindo um possível papel dos mecanismos de evasão parasitária ou do efeito paradoxal do excesso inflamatório. Compreender a dinâmica entre metabolismo celular e resposta imune é crucial para o desenvolvimento de terapias mais eficazes.

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*; Leishmaniose tegumentar; Macrófagos; Polarização M1/M2; Mecanismos de evasão.

ABSTRACT

Tegumentary leishmaniasis represents a serious public health concern, with millions of new cases reported annually in Brazil and worldwide. It is a neglected infectious disease caused by parasites of the genus *Leishmania*, with *Leishmania (Viannia) braziliensis* being the main species associated with the cutaneous form in Brazil. Infection occurs through the bite of phlebotomine sandflies of the genus *Lutzomyia*, and its clinical manifestation depends on multiple factors, including the *Leishmania* species, the host's immune response, and the metabolic state of host cells. Among these, macrophages are the primary host cells and play a central role in both the establishment and control of infection, particularly through their functional polarization into M1 (pro-inflammatory) or M2 (anti-inflammatory) phenotypes. This study investigated the effects of macrophage polarization on *L. braziliensis* infection in murine J774 macrophages by analyzing parameters such as parasite load, cytokine production (TNF- α and IL-10), nitric oxide (NO) levels, arginase activity, and urea concentration at 24 and 48 hours post-infection. M2 macrophages were found to be more permissive to infection and exhibited greater activation of the arginase pathway, whereas M1 macrophages produced higher levels of TNF- α and NO. However, despite their inflammatory profile, M1 macrophages were not able to fully eliminate the parasite within the time frame observed, suggesting that inflammation alone is insufficient for effective parasite control. Furthermore, metabolic reprogramming induced by *L. braziliensis* appears to promote parasite persistence over time. These findings underscore the importance of understanding the interplay between cellular metabolism and immunity in leishmaniasis and highlight the need for further studies to explore therapeutic targets capable of modulating this response.

Keywords: *Leishmania braziliensis*; Cutaneous leishmaniasis; Macrophages; M1/M2 polarization; Evasion mechanisms.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Carga parasitária em macrófagos J774 polarizados para o perfil M1 e M2 infectados com <i>L. braziliensis in vitro</i>	33
Gráfico 2 – Produção de citocinas marcadoras de macrófagos M1 e M2 após polarização e infecção por <i>L. braziliensis in vitro</i>	34
Gráfico 3 – Níveis de óxido nítrico, ureia e atividade da arginase em macrófagos J774 polarizados e infectados por <i>L. braziliensis</i>	35

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp., mostrando fases no vetor e no hospedeiro vertebrado.....	16
Figura 2 – Ativação clássica e alternativa de macrófagos.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANOVA	Análise de Variância
ATPase	Adenosina Trifosfatase
B.O.D.	Biochemical Oxygen Demand (Estufa de Oxigênio Biológico)
CO ₂	Dióxido de Carbono
DALYs	Disability-Adjusted Life Years (Anos de Vida Perdidos por Incapacidade)
DTNs	Doença(s) Tropical(is) Negligenciada(s)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)
EROS / ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SBF	Soro Bovino Fetal
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSP70	Heat Shock Protein 70 (Proteína de Choque Térmico 70)
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFN- γ	Interferon Gama
IL	Interleucina
iNOS / NOS2	Óxido Nítrico Sintase Induzível
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LD	Leishmaniose Disseminada

LM	Leishmaniose Mucocutânea
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LT	Leishmaniose Tegumentar
LC	Leishmaniose Cutânea
M0	Macrófagos não polarizados
M1	Macrófagos polarizados para perfil inflamatório
M2	Macrófagos polarizados para perfil anti-inflamatório
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução Tampão Fosfato
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SOD1	Superóxido Dismutase 1
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador Beta
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 As leishmanioses.....	13
1.2 LTA e <i>Leishmania braziliensis</i>	17
1.3 Resposta Imune e Interação Parasita-Hospedeiro.....	19
1.3.1 Relação da Doença com Macrófagos.....	21
1.3.2 Polarização de Macrófagos – Perfis M1 vs. M2 e Suas Implicações.....	22
1.4 Mecanismos de Evasão.....	23
2 JUSTIFICATIVA	26
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral.....	27
2.1 Objetivos específicos.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. Parasitas.....	28
4.2. Cultura e polarização dos macrófagos J774.....	28
4.3. Infecção e determinação da carga parasitária em macrófagos.....	29
4.4. Dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias.....	29
4.5. Determinação de óxido nítrico e ureia.....	30
4.6. Atividade da Arginase.....	30
4.7. Análises estatísticas.....	31
5 RESULTADOS	32
6 DISCUSSÃO	36
7 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

1.1 As leishmanioses

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias de natureza antroponozoonótica, ou seja, acometem tanto seres humanos quanto diversas espécies de animais silvestres e domésticos e estão inseridas no grupo das Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), impactando milhões de pessoas em todo o mundo, especialmente aquelas em situação de maior vulnerabilidade socioeconômica e sua ocorrência está fortemente relacionada à desigualdade social (ALMEIDA; CARDOSO, 2020; GALVIS OVALLOS et al., 2020).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as leishmanioses estão integrando o grupo das seis doenças tropicais infecciosas mais importantes ou prioritárias em programas de controle, devido ao seu alto coeficiente de detecção, à fragilidade dos dados, conhecimentos disponíveis sobre a doença e à sua capacidade de produzir deformidades. (BRASIL, 2017; COSTA, 2008; DOS ANJOS et al., 2023; OMS, 2019). Embora representem uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, as DTNs recebem menos de 10% dos investimentos globais em pesquisa, resultando em escassez de tratamentos inovadores, métodos diagnósticos eficazes e vacinas acessíveis (GALVIS OVALLOS et al., 2020).

As leishmanioses estão amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, com registros em aproximadamente 99 países (WHO, 2024). Globalmente, estima-se que ocorram entre 1,5 a 2 milhões de novos casos e cerca de 70.000 mortes anualmente, com aproximadamente 350 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção, resultando em uma perda de cerca de 2,4 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs) (REITHINGER et al., 2007).

Aproximadamente 1,5 milhão de casos de leishmaniose tegumentar americana (LTA) surgem anualmente, dos quais 90% estão concentrados em apenas seis países: Irã, Arábia Saudita, Síria e Afeganistão (Velho Mundo), Brasil e Peru

(Novo Mundo) (ALVAR et al., 2012; GONTIJO; CARVALHO, 2003). Somente no Brasil entre os anos de 2001 e 2018 foram registrados 429.203 casos de LTA, dos quais 365.675 foram autóctones (REIS et al., 2020, ARAÚJO et al., 2025; COSTA, 2008, BRASIL, 2017; FREIRE et al., 2021).

Calcula-se entre 600.000 e 1.000.000 de novos casos de leishmaniose cutânea (LC) por ano, sendo a maior parte destes de ocorrência em regiões tropicais da América, bacia mediterrânea, Oriente Médio e Ásia Central (BURZA et al., 2018; WHO, 2023). Na América Latina, a leishmaniose é considerada uma endemia, com destaque para o Brasil, onde ocorre o maior número de casos de LC e o perfil epidemiológico da doença está fortemente associado a condições socioeconômicas precárias. Ademais, o Nordeste brasileiro está entre as principais regiões endêmicas do país tanto para a LTA quanto para a leishmaniose visceral (LV), especialmente nos estados da Bahia, Maranhão e Ceará (PINHEIRO, 2018).

Fatores como pobreza, falta de acesso à informação e limitações no sistema de saúde são determinantes que dificultam o diagnóstico, o tratamento adequado e o controle da leishmaniose, especialmente no Brasil (ARAÚJO et al., 2025). Além disso, a subnotificação é um problema crônico nos países endêmicos. Assim sendo, uma real avaliação da magnitude da disseminação da doença no Brasil e no mundo é inviabilizada e estabelece-se um cenário em que o impacto das leishmanioses tem sido historicamente subestimado. (COSTA, 2008; SOUSA, 2015).

Concomitantemente, a mudança ambiental resultante das atividades humanas tem modificado o perfil epidemiológico da doença tanto nas áreas onde a transmissão é florestal, em focos enzoóticos naturais, como nas áreas onde a transmissão é peri-urbana e peri-domiciliar, envolvendo reservatórios domésticos (Costa, 2008).

Além da sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, a importância das leishmanioses reside principalmente no seu potencial de assumir formas produtoras de lesões destrutivas, desfigurantes e incapacitantes irreparáveis, que podem levar a morte se não tratadas (GONTIJO; CARVALHO, 2003, BRASIL, 2017; FREIRE et al., 2021). Por apresentar esse grande espectro de manifestações clínicas e diversidade epidemiológica, as leishmanioses não correspondem a um quadro clínico isolado,

mas sim, a um complexo conjunto de doenças causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (GONTIJO; CARVALHO, 2003; PINHEIRO, 2018).

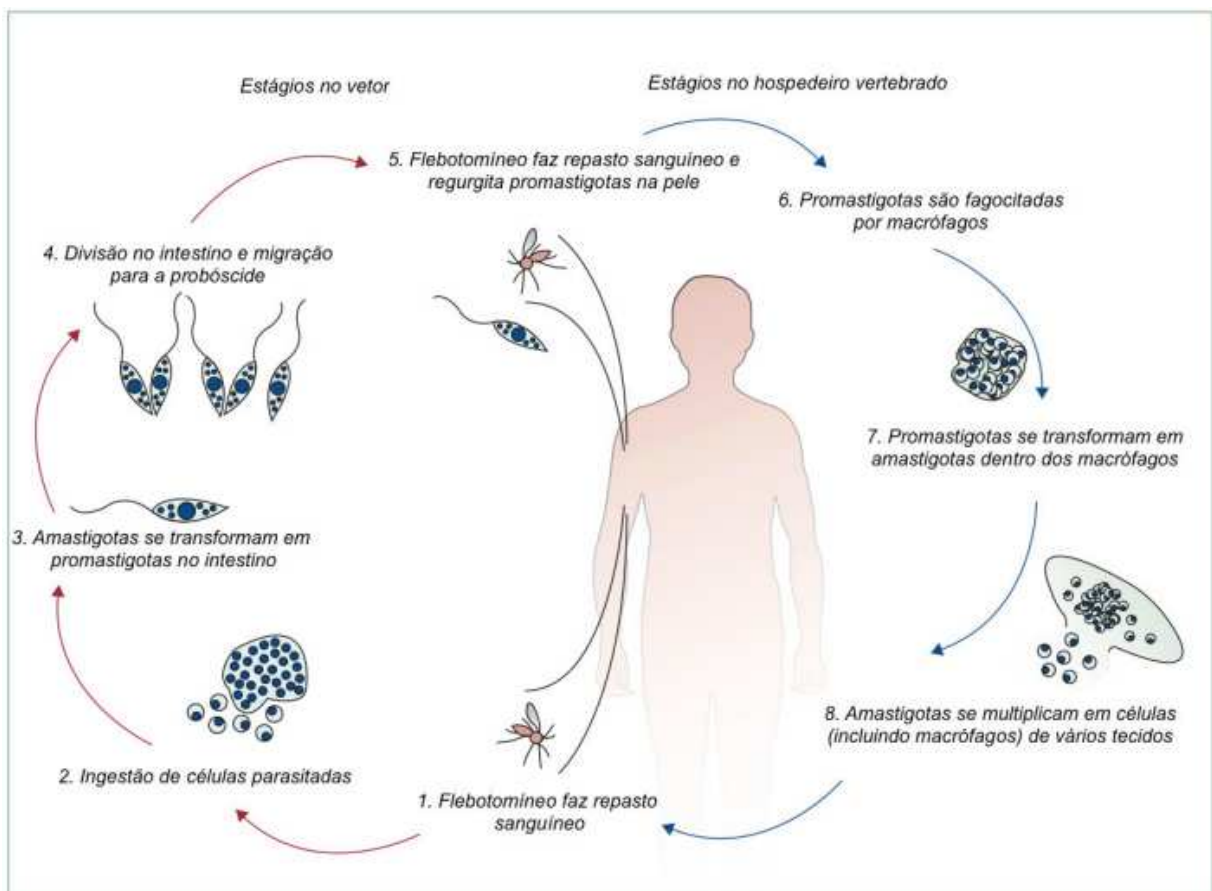
A leishmaniose pode se manifestar de diferentes formas, acometendo a pele, as mucosas ou atuando de maneira sistêmica. O estabelecimento das formas clínicas da doença depende do tropismo da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção (viscetrópicas ou dermatrópicas) e da resposta imune do hospedeiro (BRASIL, 2017; GONTIJO; CARVALHO, 2003; VENTURA et al., 2023).

As *Leishmanias* são protozoários parasitas com um ciclo de vida digenético (heteroxênico), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados (mamíferos, incluindo humanos) e insetos vetores (flebotomíneos), os quais são responsáveis pela transmissão dos parasitas de um mamífero a outro. Os parasitas apresentam duas formas morfológicas principais, a forma promastigota, extracelular, fusiforme e flagelada, e a forma amastigota, arredondada, com flagelo não exteriorizado e intracelular obrigatória, parasitando células fagocíticas do hospedeiro vertebrado, como macrófagos (VENTURA et al., 2023).

A infecção do hospedeiro invertebrado ocorre quando a fêmea do flebótomo ingere fagócitos infectados contendo as formas amastigotas do parasita durante o repasto sanguíneo. No interior do inseto, essas amastigotas se diferenciam em formas promastigotas. Durante um novo repasto sanguíneo, o inseto, regurgita os parasitos, inoculando as formas promastigotas metacíclicas infectantes na junção derme-epiderme de um hospedeiro vertebrado suscetível, como o homem. No local da inoculação, essas formas são rapidamente englobadas por células fagocíticas do hospedeiro, incluindo macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, recrutadas ao sítio da infecção. Uma vez internalizados nos macrófagos, os parasitos diferenciam-se em amastigotas dentro do fagolisossoma, onde se multiplicam por divisão binária. À medida que a carga parasitária aumenta, a célula hospedeira sofre lise, liberando as amastigotas, que, por sua vez, infectam novos macrófagos, promovendo a disseminação e exacerbando a infecção nos tecidos do hospedeiro (Figura 1) (BRASIL, 2017; DINIZ, 2013; OLIVEIRA, 2021; VENTURA et al., 2023).

De forma geral, as leishmanioses podem ser divididas em Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT). A LV é uma doença sistêmica, podendo ser fatal se não tratada. É causada por *Leishmania (L.) donovani* ou *Leishmania (L.) infantum*, sendo *L. infantum* o agente da LV nas Américas, tendo *Lutzomyia longipalpis* como seu principal inseto transmissor (GALVIS OVALLOS et al., 2020).

Figura 1 – Ciclo de vida de *Leishmania sp.*, mostrando fases no vetor e no hospedeiro vertebrado.



Fonte: REITHINGER et al., 2007. Adaptado.

Dentre as principais espécies causadoras da LTA está a *L. (V.) braziliensis*, essa espécie distingue-se de outras por sua capacidade de cronicidade, latência e tendência a metastatizar no hospedeiro humano (OLIVEIRA et al., 2019). Está associada às formas clínicas: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea disseminada (LD) e leishmaniose mucocutânea (LM). Outra espécie de

importância epidemiológica a *L. (L.) amazonensis* está associada a forma clínica denominada leishmaniose cutânea difusa (LCD) (BRASIL, 2017; MORATO, 2013).

A leishmaniose é transmitida por uma ampla diversidade de flebotomíneos, insetos dípteros pertencentes à subfamília *Phlebotominae*, sendo popularmente conhecidos como mosquitos-palha, birigui, tatuquira, asa branca, caravela, entre outros. No Brasil, as principais espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão da LTA são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcomei* e *L. migonei* (ARAÚJO et al., 2025; SOUSA, 2015).

1.2 Leishmaniose Tegumentar Americana e *Leishmania braziliensis*

A LTA afeta principalmente a pele e mucosas nasal, oral, faríngea e laríngea (ALMEIDA; CARDOSO, 2020). Primariamente, a doença ocorre em animais (zoonótica), com a infecção humana sendo secundária (Brasil, 2017).

De forma geral, as manifestações da LC variam de lesões cutâneas autocuráveis até formas que afetam mucosas e colocam em risco a vida. O resultado é determinado pela interação dos seguintes fatores: características do parasita, biologia do vetor e fatores do hospedeiro, com as respostas imunes ocupando a posição de maior destaque (BURZA et al., 2018; WHO, 2023, BRASIL, 2017; MORATO, 2013).

A leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a manifestação mais comum da doença. Com lesões papulares ou nodulares, principalmente em partes expostas do corpo, pode evoluir lentamente ou regredir sozinha, terminando em recuperação espontânea. Assumem formas de úlceras rasas, circulares com bordas elevadas bem definidas, e com o assoalho de aspecto granular. (BURZA et al., 2018; MARIA et al., 2024; REITHINGER et al., 2007; WHO, 2023). As lesões geralmente são únicas e surgem no local da picada do vetor, mas picadas múltiplas ou disseminação local podem gerar um número elevado de lesões (GONTIJO; CARVALHO, 2003; MARIA et al., 2024). Em casos de LCL, o exame em cortes histológicos permite

identificar com mais facilidade os parasitas nas lesões recentes; porém, à medida que a lesão se torna mais antiga, esses organismos tendem a se tornar cada vez mais escassos (MARIA et al., 2024).

A leishmaniose mucocutânea (LM), é uma forma clínica grave da LC, caracterizada por lesões destrutivas e de evolução arrastada que acometem, em geral, as mucosas do nariz, boca, faringe e laringe (CARVALHO et al., 2022). Essas lesões podem levar à destruição parcial ou total das membranas mucosas dessas regiões, comprometendo severamente funções respiratórias e alimentares, além de frequentemente propiciar infecções bacterianas secundárias (GONTIJO; CARVALHO, 2003; WHO, 2023). O acometimento mucoso pode surgir de forma concomitante à presença de lesões cutâneas ativas adjacentes ou a distância, ou vários anos após sua cicatrização (forma mucosa tardia) ou, mais raramente, sem qualquer histórico de lesão cutânea prévia (ALMEIDA; CARDOSO, 2020; REITHINGER et al., 2007). A LM é de difícil tratamento, possui prognóstico reservado quanto à cura e apresenta alto risco de deformidades permanentes (ALMEIDA; CARDOSO, 2020). Globalmente, mais de 90% dos casos de LM concentram-se em apenas quatro países: Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru (CARVALHO et al., 2022; WHO, 2023).

A leishmaniose cutânea disseminada (LD) caracteriza-se por um número elevado (>10) de lesões cutâneas polimórficas (acneiformes, nodulares, ulceradas, papulosas, pustulosas). Pode acometer regiões distintas e não contínuas do corpo, com ou sem envolvimento mucoso (SANDOVAL PACHECO et al., 2021). Essa forma clínica resulta da disseminação metastática do parasita que ocorre algumas semanas após a infecção (CARVALHO et al., 2022). Um fator de risco crucial para o desenvolvimento da LD é a imunossupressão do hospedeiro, como em pacientes coinfectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) causador da AIDS (BURZA et al., 2018). Usualmente, a imunidade celular ainda é preservada, evidenciada por teste de Montenegro positivo, e boa resposta à terapêutica convencional (GONTIJO; CARVALHO, 2003; PINHO et al., 2022).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) se encontra entre as formas mais graves e menos comuns de LTA, causada por *L. amazonensis*, está situada no pólo anérgico da doença com deficiência específica na resposta imune celular a

antígenos de *Leishmania*, em oposição à forma polar resistente representada pela LM e parte das LCL. Caracteriza-se pela presença de múltiplas lesões nodulares não-ulcerativas com formação de placas devido à disseminação do parasita. Evolui de forma lenta recobrando grandes extensões cutâneas, as lesões, geralmente, não cicatrizam espontaneamente e classicamente não respondem ao tratamento medicamentoso e a intradermorreação de Montenegro (IDRM) apresenta-se negativa. Suas lesões nodulares e infiltrações cutâneas pronunciadas simulam quadro de hanseníase virchowiana, contendo numerosos parasitas (DE OLIVEIRA; BRODSKY, 2012; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

O controle da LTA é desafiador devido à diversidade de agentes etiológicos, vetores, reservatórios e padrões epidemiológicos regionais, somada à carência de pesquisas e ao desconhecimento de elementos da cadeia de infecção, agravando ainda mais essa dificuldade (BRASIL, 2017; GALVIS OVALLOS et al., 2020).

1.3 Resposta Imune e Interação Parasita-Hospedeiro

As leishmanioses constituem infecções parasitárias de natureza complexa que afetam predominantemente células mieloides nos hospedeiros mamíferos. Dentre essas células, o sistema fagocítico mononuclear, formado principalmente por monócitos e macrófagos, exerce papel central na patogênese tanto da forma cutânea quanto da visceral da doença. Esses fagócitos atuam como os principais efetores da resposta imune inata frente à *Leishmania*, participando ativamente do controle da infecção e também da mediação de seus efeitos patológicos (BOGDAN, 2020; GIUDICE et al., 2012).

Logo após a inoculação das formas promastigotas na derme do hospedeiro, estas enfrentam imediatamente a maquinaria do sistema imunológico inato, sendo rapidamente captadas por neutrófilos. Esses neutrófilos, ao sofrerem apoptose, passam a servir como veículos de transmissão para macrófagos derivados de monócitos ou residentes em tecidos, permitindo a entrada silenciosa do parasita, mecanismo conhecido como “cavalo de Troia”. A fagocitose de neutrófilos

apoptóticos infectados, que ainda carregam promastigotas viáveis, não só facilita a infecção dos macrófagos como também reduz sua atividade microbicida ao promover a liberação de TGF- β , um fator imunossupressor que favorece a sobrevivência do parasita (BOGDAN, 2020).

A infecção dos macrófagos pela *Leishmania* ocorre por meio de múltiplas interações, envolvendo o reconhecimento de ligantes parasitários por receptores presentes na membrana da célula macrófaga. Uma vez fagocitado, o parasita se transforma em sua forma amastigota. Essas amastigotas podem posteriormente infectar outras células fagocíticas, como macrófagos, células dendríticas e até mesmo fibroblastos. No interior do macrófago, os parasitas permanecem dentro de um compartimento conhecido como vacúolo parasitóforo, ou fagolisossoma (Brasil, 2017).

Além de atuarem como célula hospedeira para os parasitas, os macrófagos também exercem função efetora na ativação da resposta imune adaptativa e na destruição do patógeno por meio de mecanismos microbicidas. Esses mecanismos incluem adaptações estruturais, como a intensificação da fagocitose e a formação de vacúolos parasitóforos, além de alterações celulares que envolvem a produção de citocinas e espécies reativas, como óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS), que constitui um dos principais mecanismos efetores contra o protozoário, sendo considerados os mais eficazes na contenção da infecção (PINHO et al., 2022). Sua capacidade de eliminar *Leishmania* está diretamente relacionada ao seu estado de ativação, sendo considerados a linha de frente na defesa contra o parasita (Brasil, 2017; CARFAGNA et al., 2020; CARVALHO et al., 2022; DOS ANJOS et al., 2023).

A síntese de NO e ROS é regulada por vias de ativação que envolvem a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e o complexo enzimático NADPH oxidase (PINHO et al., 2022).

Quando ativados, especialmente pela ação do interferon-gama (IFN- γ), os macrófagos passam a liberar substâncias tóxicas ao parasita, como o ânion superóxido (O_2^-). Esses produtos metabólicos são essenciais para limitar a

replicação intracelular do protozoário e contribuem significativamente para o controle da doença (CARVALHO et al., 2022; BRASIL, 2017).

Citocinas inflamatórias como o interferon-gama (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) atuam de forma sinérgica, intensificando a produção dessas moléculas reativas (CARVALHO et al., 2022). A iNOS, também conhecida como NOS2, é uma enzima chave nesse processo, catalisando a conversão de L-arginina em óxido nítrico. Sua atividade é essencial para controlar a persistência do parasita, inclusive após a resolução da infecção primária, em indivíduos imunocompetentes (PINHO et al., 2022).

A replicação intracelular do protozoário desencadeia a liberação de antígenos que ativam a resposta imunológica específica. No entanto, por estarem localizadas no interior das células, as formas amastigotas tornam-se inacessíveis à ação direta de anticorpos, o que compromete a eficácia da imunidade humoral no controle da infecção (Brasil, 2017).

1.3.1 Relação da Doença com Macrófagos

A interação entre o parasita *Leishmania* e os macrófagos desempenha papel determinante no desfecho da infecção, configurando-se como um processo multifacetado. Dependendo do perfil funcional que assumem, os macrófagos podem atuar como barreiras contra o parasita ou, inversamente, fornecer um ambiente propício à sua proliferação (CARFAGNA et al., 2020; SANDOVAL PACHECO et al., 2021).

A permanência da *Leishmania* no interior de células imunocompetentes contribui significativamente para o desenvolvimento de uma resposta inflamatória exacerbada, intrinsecamente associada a consequências patológicas relevantes (CARVALHO et al., 2022). Essa dinâmica imunológica resulta de um complexo equilíbrio entre mecanismos efetores e reguladores, sendo o encontro inicial do parasita com o sistema imune inato um evento determinante para o perfil da resposta adaptativa subsequente e, conseqüentemente, para o curso clínico da doença (CARFAGNA et al., 2020).

Apesar da especialização dos macrófagos em destruir microrganismos, as *Leishmanias* desenvolveram estratégias para subverter essa função, neutralizando a capacidade microbicida da célula hospedeira e garantindo sua sobrevivência. Isso permite sua multiplicação até o rompimento da célula, liberando novas formas parasitárias capazes de infectar outros macrófagos e perpetuar a infecção (Brasil, 2017).

1.3.2 Polarização de Macrófagos – Perfis M1 vs. M2 e Suas Implicações

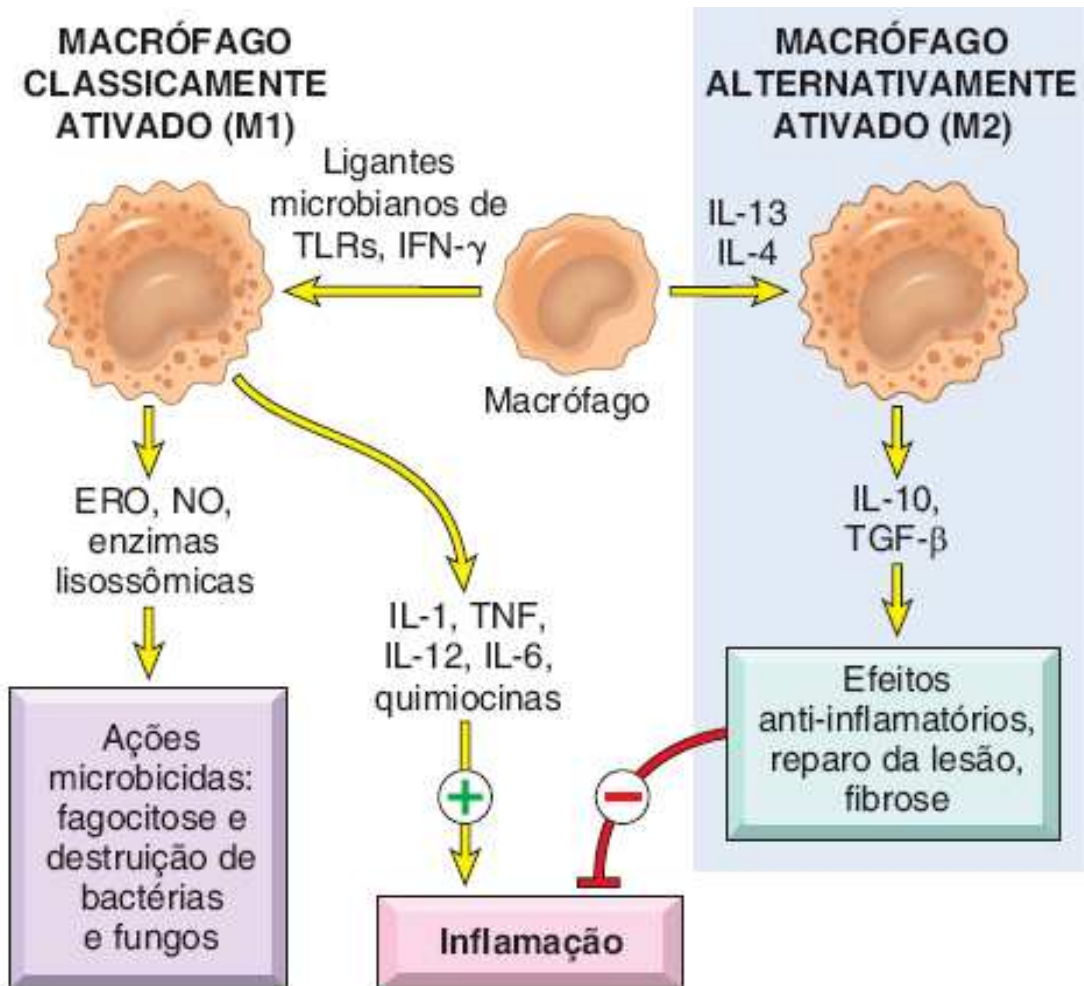
A polarização dos macrófagos é um processo essencial na resposta imune contra a leishmaniose e envolve a diferenciação dessas células em perfis funcionalmente distintos, conhecidos como M1 (ativação clássica) e M2 (ativação alternativa). Os macrófagos constituem uma população celular altamente heterogênea, capaz de assumir múltiplos fenótipos de ativação que representam extremos opostos de um mesmo espectro funcional. (CARFAGNA et al., 2020)

Os macrófagos M1 são induzidos por estímulos como o IFN- γ , sendo caracterizados pela produção de citocinas pró-inflamatórias (como IL-12 e o TNF- α), quimiocinas e agentes microbicidas, como o óxido nítrico (NO), sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Essas células exercem um papel fundamental na destruição de parasitas intracelulares e estão associadas a uma resposta imunológica eficaz, geralmente correlacionada com resistência à infecção e resolução das lesões (CARFAGNA et al., 2020; SANDOVAL PACHECO et al., 2021). De acordo com Conceição-Silva et al. (2014), a predominância de uma resposta Th1 mediada por IFN- γ e IL-12 favorece a cura e a proteção contra reinfecções.

Por outro lado, os macrófagos M2 apresentam propriedades imunorreguladoras e anti-inflamatórias, com secreção de citocinas como IL-10 e TGF- β . Estes ativam a enzima arginase-1, que compete com a iNOS pela L-arginina, diminuindo a produção de NO e favorecendo a replicação do parasita. Tal perfil é comumente observado em ambientes suscetíveis à infecção, estando associado à manutenção do parasita no interior das células hospedeiras e à progressão da leishmaniose (ALMEIDA et al., 2023; CARFAGNA et al., 2020; DOS ANJOS et al., 2023; SANDOVAL PACHECO et al., 2021).

A escolha entre os perfis M1 e M2 não é fixa, sendo regulada por diversos fatores do microambiente tecidual, incluindo citocinas derivadas de células imunes e estromais (como IFN- γ , IL-4, IL-10 e TGF- β), condições locais como hipóxia, tonicidade, concentração de aminoácidos, produtos metabólicos e até substâncias secretadas pelo próprio parasita (Figura 2) (BOGDAN, 2020).

Figura 2 - Ativação clássica e alternativa de macrófagos.



Fonte: KUMAR et al., 2025

Segundo Tomiotto-Pellissier et al. (2018), não se pode atribuir um papel unicamente “bom” ou “ruim” aos macrófagos M1 ou M2, uma vez que ambos são necessários para o equilíbrio imunológico. Dessa forma, a chave para o controle eficaz da leishmaniose pode estar na harmonia entre a ação microbicida potente dos M1 e a regulação imunológica promovida pelos M2.

1.4 Mecanismos de Evasão

A *Leishmania* desenvolveu diversos mecanismos para escapar das respostas imunes do hospedeiro e garantir sua sobrevivência intracelular (BOGDAN, 2020; REVERTE et al. 2022). Dentre as estratégias de evasão mais estudadas estão o papel facilitador da saliva do vetor, a modulação da polarização dos macrófagos, a resistência ao estresse oxidativo, a reprogramação do metabolismo celular e a interferência em processos imunológicos do hospedeiro (CONCEIÇÃO-SILVA et al., 2014; OLIVEIRA, 2021; MORATO, 2013).

A saliva do flebotomíneo exerce papel facilitador na infecção. Compostos presentes na saliva não apenas aumentam a suscetibilidade do hospedeiro, como também modulam a resposta imune inicial, favorecendo o estabelecimento do parasita. Estudos mostram que a pré-exposição à saliva altera o perfil de citocinas e o recrutamento celular, podendo inclusive induzir apoptose em neutrófilos, beneficiando a disseminação da infecção (CONCEIÇÃO-SILVA et al., 2014).

No que diz respeito à polarização dos macrófagos, o parasita é capaz de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-12, ao mesmo tempo em que estimula a liberação de IL-10 e TGF- β , promovendo uma mudança de uma resposta imune Th1 para uma Th2, menos eficiente na eliminação do patógeno (REVERTE et al. 2022). Além disso, a *Leishmania* induz a expressão da enzima arginase-1, que desvia o metabolismo da L-arginina para a produção de poliaminas, criando um ambiente intracelular favorável à sua replicação. Esse efeito é observado mesmo em hospedeiros geneticamente resistentes, sendo considerado um marcador de evolução da doença (STEMPIN et al., 2010).

A resistência à ação do NO e ROS também é um fator-chave. A expressão de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD1), é outro possível recurso utilizado para neutralizar o estresse oxidativo gerado por macrófagos ativados, limitando a eficácia da resposta inflamatória (CARNEIRO et al., 2016; DE OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012). Além disso, o parasita pode aumentar a expressão de proteínas como ATPase e HSP70, reduzindo a produção de peróxido de

hidrogênio por monócitos, como observado em casos refratários de leishmaniose mucosa (URDAPILLETA et al., 2024).

Moléculas de superfície do parasito como LPG e gp63, atuam em macrófagos M2 suprimindo genes não codificadores de RNA, criando um ambiente permissivo à infecção (SANDOVAL PACHECO et al., 2021). Ainda, A gp63 está relacionada com a com a inibição da biogênese do fagolisossoma, adesão celular e com a fixação do complemento e sua mediação na resistência à lise (BOGDAN, 2020).

Ademais, o parasito pode modular a expressão de quimiocinas e seus receptores, bem como a função de integrinas, alterando o recrutamento e a migração celular no sítio da infecção (DE MENEZES et al., 2016). Em conjunto, esses mecanismos evidenciam a capacidade adaptativa da *Leishmania* em resistir às barreiras imunológicas do hospedeiro, garantindo sua permanência e disseminação, mesmo em condições adversas (CONCEIÇÃO-SILVA et al., 2014).

2 JUSTIFICATIVA

As leishmanioses representam um complexo grupo de doenças infecciosas parasitárias endêmicas em diversas partes do mundo, com uma expressiva concentração de casos no Brasil. No contexto nacional, *Leishmania braziliensis* é a principal causadora da LTA, associada a diversas manifestações clínicas, das formas cutâneas localizadas às mais graves, como a mucosa e a disseminada, que apresentam maior resistência ao tratamento e maior risco de recidiva.

A variabilidade genética e a virulência entre as diferentes cepas de *L. braziliensis* condicionam fortemente a resposta imune do hospedeiro e contribuem para a diversidade das manifestações clínicas observadas. Apesar de sua relevância epidemiológica, há poucos estudos aprofundados sobre a infecção de macrófagos humanos por *L. braziliensis*, e a falta de modelos experimentais que mimetizam integralmente a doença humana, limita a pesquisa.

Nesse cenário, a polarização de macrófagos se destaca como um fator determinante para o controle da doença. Macrófagos são as principais células hospedeiras para *Leishmania* e, ao mesmo tempo, as principais células efetoras do sistema imune capazes de conter a infecção. A eliminação ou persistência do parasita está diretamente relacionada à ativação e ao fenótipo dos macrófagos, que podem se diferenciar em dois perfis: M1, pró-inflamatório, e M2, anti-inflamatório. Contudo, o estudo da polarização de macrófagos em pacientes com leishmaniose apresenta dificuldades.

A avaliação do potencial imunomodulador de *L. braziliensis* é um exemplo da possibilidade e contribuição para este tipo de pesquisa. Portanto, entender como a *L. braziliensis* modula a polarização dos macrófagos *in vitro* é fundamental para aprimorar as estratégias de intervenção mais eficazes de controle e novos alvos terapêuticos de uma doença que ainda representa um grave problema de saúde pública.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar e caracterizar a polarização de macrófagos da linhagem J774 infectados por *Leishmania braziliensis* *in vitro*.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a carga parasitária dos macrófagos polarizados para os perfis M1 e M2 após infecção por *L. braziliensis*.
- Avaliar as citocinas marcadoras de macrófagos M1 e M2 infectados por *L. braziliensis*.
- Avaliar a resposta microbicida de macrófagos polarizados infectados por *L. braziliensis* via produção de óxido nítrico, arginase e ureia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Parasitas

Foram utilizadas nos experimentos promastigotas (cedidos pela Dra. Alda Cruz, FIOCRUZ-RJ) da cepa de *Leishmania braziliensis* "Thor" (MCAN/BR/98/R619) até a 5^a. passagem de cultivo. Os parasitas foram cultivados em estufa B.O.D., a 25°C em meio N.N.N., contendo Schneider suplementado com 20% de soro bovino fetal inativado (SBF Aldrich-Sigma), 2% de urina humana estéril, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina.

4.2. Cultura e polarização dos macrófagos J774

A linhagem de macrófagos murinos J774, obtida da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Bahia (Brasil), foi cultivada em garrafas de cultura celular e mantida em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 2 mM de L-glutamina e solução antibiótico-antimicótico a 1%, em incubadora umidificada a 37 °C com 5% de CO₂ (Thermo Electron Corporation). Após atingirem a confluência e aderirem à superfície da garrafa, as células foram destacadas por raspagem utilizando cell scraper (TPP), centrifugadas, ressuspendidas em meio fresco, contadas na câmara de Neubauer e, então, distribuídas em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas de vidro (13 mm). Os macrófagos de perfil M0 foram incubados por 16 a 18 horas para aderirem à superfície das lamínulas, em concentração de 1×10^6 células/mL. Após esse período, as placas foram lavadas com solução tampão fosfato (PBS, pH 7,4) aquecida a 37 °C.

Para induzir o fenótipo M1, foi adicionado aos macrófagos aderidos à placa meio RPMI suplementado com 5% de SBF e 1 µg/mL de LPS (Sigma), e as células foram incubadas por 4 horas. Para induzir o fenótipo M2, foi adicionado aos macrófagos aderidos à placa meio RPMI suplementado com 5% de SBF e 10 ng/mL de IL-4 (Sigma), e as células foram incubadas por 4 horas. Após esse período, as

células foram lavadas duas vezes com solução tampão fosfato (PBS, pH 7,4) à 37 °C e utilizadas para os demais experimentos.

4.3. Infecção e determinação da carga parasitária em macrófagos

Para a infecção dos macrófagos com cepa de *L. braziliensis*, as culturas dos parasitos foram centrifugadas a 3.000 rpm, por 15 minutos a 4°C. Em seguida, as formas promastigotas dos parasitos foram contadas em câmara de Neubauer e diluídas em meio RPMI suplementado na concentração de 1×10^7 parasitos/mL e distribuídas em cada poço. Os macrófagos M0, M1 e M2 infectados foram incubados em estufa 5% de CO₂, 37°C e 95% de umidade por 4 horas e a placa foi lavada com solução tampão fosfato (PBS, pH 7,4) à 37°C. Após espera de 24 e 48 horas, os sobrenadantes foram retirados dos poços e armazenados em freezer -20°C para posterior análise de citocinas e demais mediadores. Para quantificar o nível de infecção dos macrófagos M0, M1 e M2, as lamínulas contendo as células foram lavadas com salina, e em seguida, fixadas e coradas com corante Giemsa (Sigma-Aldrich). As lamínulas coradas foram montadas em lâminas de vidro e examinadas em microscopia óptica. Áreas de 50 células foram examinadas e o número de amastigotas/50 células foi determinado.

4.4. Dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias

A produção das citocinas nos sobrenadantes obtidos das culturas de macrófagos M1 e M2 foi determinada utilizando-se a técnica ELISA, como recomendado pelo fabricante dos kits utilizados (BD Biosciences). Resumidamente, placas de 96 poços, fundo chato (Nunc-Immuno), foram sensibilizadas com anticorpo de captura anti-citocina purificado, na concentração determinada pelo fabricante, por 12 a 18 horas, 4°C. As placas foram lavadas utilizando a solução de lavagem recomendada pelo fabricante (PBS com Tween 20 a 0,05%); e em seguida, foi realizado bloqueio com PBS e soro bovino fetal (SBF 10%) ou solução fornecida

pelo fabricante, seguido de incubação por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS + Tween 20, foram adicionados 100 µL das amostras e das diluições do padrão da citocina (para a elaboração de curva-padrão). Todas as amostras e diluições foram avaliadas em triplicata. A placa foi incubada por mais 2 horas à temperatura ambiente e em seguida lavada, e então, as amostras foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com anticorpo de detecção ligado à enzima peroxidase. Após esse passo, a placa foi submetida a nova lavagem e em seguida a solução substrato foi adicionada. Depois da incubação final, por 30 minutos à temperatura ambiente, a reação foi parada com ácido fosfórico (1:20) e a densidade óptica foi avaliada no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram analisados utilizando-se do software Softmax® v.5 (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA, USA).

4.5. Determinação de óxido nítrico e ureia

A produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada pela acumulação de nitrito no meio de cultura usando o reagente de Griess, o nitrito presente na amostra reage em meio ácido com uma amina aromática (sulfanilamida), produzindo um sal diazônico. Este reagirá com NEED (N-(1-naftil) etilenodiaminadihidroclorato), formando um complexo de coloração rosada (GREEN et al., 1982). Para tal, 100 µL dos sobrenadantes foram incubados com 100 µL do reagente de Griess (1 mL de ácido fosfórico 5%; 1 mL de sulfonilamida 1% em ácido fosfórico 5%; 1 mL de NEED 0,1%; 1 mL de água destilada), à temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro com filtro de 540 nm em leitor de ELISA. As absorbâncias obtidas foram interpoladas à curva padrão de nitrito de sódio. A determinação de ureia foi realizada utilizando o kit Ureia UV - Liquiform (Labtest Diagnóstica S.A).

4.6. Atividade da Arginase

Para avaliar a atividade da arginase foram cultivados 200.000 macrófagos em uma placa de 96 poços. Após os tempos de 24 e 48 horas, os cultivos celulares foram lavados com solução salina tampão fosfato (PBS) e lisados com 100 µL de uma solução de Triton X-100 a 0,1% por 15 minutos. Para medir a atividade total da arginase, foram adicionados 10 µL de uma solução de MnCl₂ a 100 mM e incubados a 56°C por 7 minutos. Foram adicionados 100 µL de arginina a 0,5 M e incubados a 37°C por 1 hora. A reação foi interrompida com uma mistura ácida, e a concentração de arginase foi determinada a 540 nm usando um leitor de microplacas (CLIMACO-ARVIZU et al., 2016).

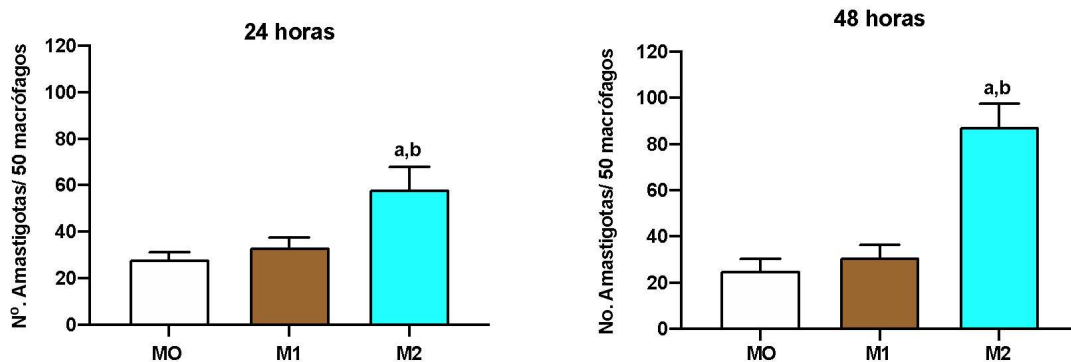
4.7. Análises estatísticas

Para verificar a significância estatística entre os grupos, foi realizada comparação múltipla dos dados paramétricos, utilizando a Análise de Variância (ANOVA), de uma via, seguido pelo teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas usando o software GraphPad Prism version 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e em todos os testes utilizados, com significância mínima de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Os resultados dos níveis de carga parasitária podem ser observados no Gráfico 1. Após 24 horas, foi observado que macrófagos M2 apresentaram uma carga parasitária significativamente maior em comparação aos macrófagos M0 e M1, indicando maior permissividade à infecção. Não há diferença estatística entre M0 e M1. Após 48 horas a diferença se torna ainda mais evidente. Macrófagos M2 exibem aumento expressivo no número de amastigotas, sendo significativamente mais infectados do que os perfis M0 e M1. Macrófagos M1 mantêm níveis de carga parasitária semelhantes aos M0.

Gráfico 1 – Carga parasitária em macrófagos J774 polarizados para o perfil M1 e M2 infectados com *L. braziliensis in vitro*.



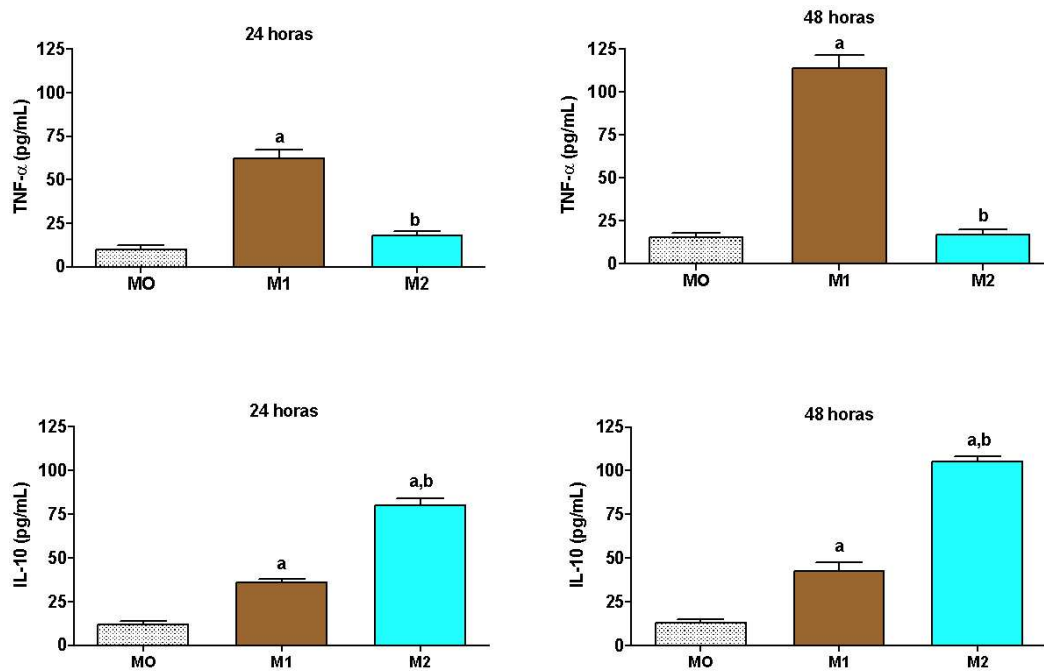
Fonte: Elaborado pelos autores. Carga parasitária em macrófagos de perfil M1 e M2 infectados com cepas de *L. braziliensis*. Os valores representam média aritmética \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes. $p < 0,05$ (One-way ANOVA, pós-teste de Tukey). M0 = macrófago não polarizado; M1 = macrófago de perfil inflamatório; M2 = macrófago de perfil anti-inflamatório/regulatório.

Os níveis de produção das citocinas TNF- α (pró-inflamatória, marcador de macrófagos M1) e IL-10 (anti-inflamatória, associada ao perfil M2) foram representados no Gráfico 2. Para o TNF- α (painéis superiores), após 24 horas os macrófagos M1 produziram níveis significativamente mais altos de TNF- α em comparação aos perfis M0 e M2. Após 48 horas, o padrão se manteve, com o perfil M1 mantendo a maior produção de TNF- α .

Já para o IL-10 (painéis inferiores), após 24 horas, os macrófagos M2 apresentaram níveis estatisticamente significante maiores de IL-10, seguidos por M1 e M0. 48 horas após a infecção, o perfil M2 manteve a maior produção de IL-10, com

níveis significativamente mais altos do que M1 e M0, reforçando seu caráter anti-inflamatório.

Gráfico 2 – Produção de citocinas marcadoras de macrófagos M1 e M2 após polarização e infectados por *L. braziliensis* *in vitro*.



Fonte: Elaborado pelos autores. Citocinas anti-inflamatórias/regulatórias em macrófagos de perfil M1 e M2 infectados com cepas de *L. braziliensis*. Os sobrenadantes foram utilizados para a dosagem de TNF-a e IL-10 nos tempos de 24 e 48 horas. Os valores representam média aritmética \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes. $p < 0,05$ (One-way ANOVA, pós-teste de Tukey). MO = macrófago não polarizado; M1 = macrófago de perfil inflamatório; M2 = macrófago de perfil anti-inflamatório/regulatório.

Os dados do Gráfico 3 mostram a produção de óxido nítrico (A), a atividade da arginase (B) e os níveis de ureia (C) em macrófagos J774 polarizados para os perfis M1 (inflamatório) e M2 (regulatório), infectados com *Leishmania braziliensis* (LbS), nos tempos de 24 e 48 horas. Os grupos analisados incluem macrófagos não polarizados (M0), M1 e M2, com e sem infecção.

Com 24 horas, o grupo M1+LbS apresentou produção de NO, significativamente superior aos demais grupos. Os grupos M0, M0+LbS e M1 mostraram níveis semelhantes e mais baixos, assim como, os grupos M2 e M2+LbS. Após 48 horas após a infecção, houve uma maior variação na produção de NO entre

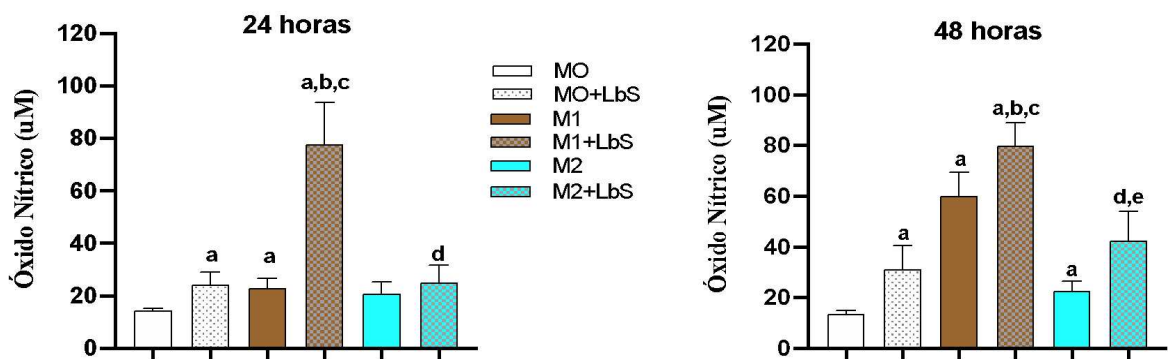
os grupos. Mantendo-se consideravelmente mais elevada no grupo M1+LbS, seguido do grupo M1 que também apresentou aumento em relação aos grupos M0, M2 e M2+LbS. O grupo M2+LbS mostrou aumento em relação ao M2, mas ainda com níveis inferiores aos perfis inflamatórios.

Para a arginase com 24 horas de infecção, observou-se níveis baixos em todos os grupos avaliados. Porém, com 48 horas, houve uma forte indução da atividade de arginase no grupo M2+LbS, significativamente maior que em todos os outros grupos.

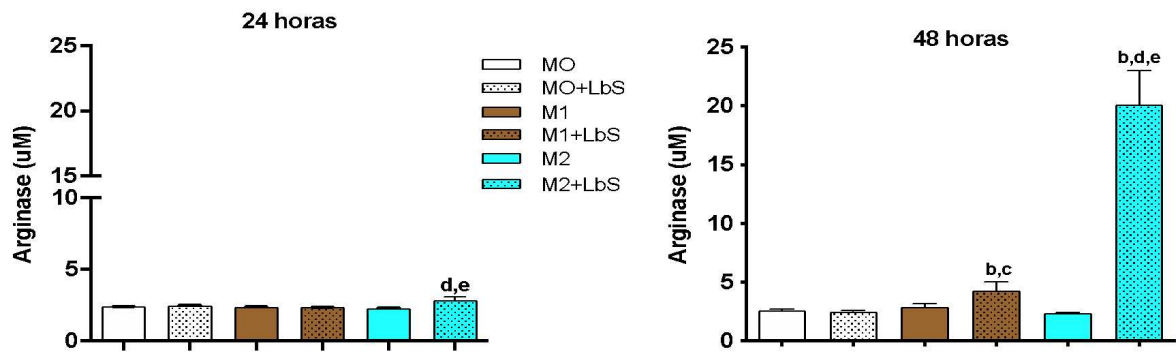
Por fim, destaca-se a análise dos níveis de ureia, um produto da atividade da arginase. Todos os grupos apresentaram níveis relevantes de produção de ureia. Com 24 horas, os grupos M2 e M2+LbS apresentaram os maiores níveis de ureia, sendo o aumento mais expressivo para M2+LbS em comparação a M1, M1+LbS e M0. Após 48 horas, esse padrão se mantém, com o grupo M2+LbS apresentando maior produção de ureia, indicando atividade elevada da via da arginase.

Gráfico 3 – Níveis de óxido nítrico, ureia e atividade da arginase em macrófagos J744 polarizados para o perfil M1 e M2 infectados com *L. braziliensis in vitro*.

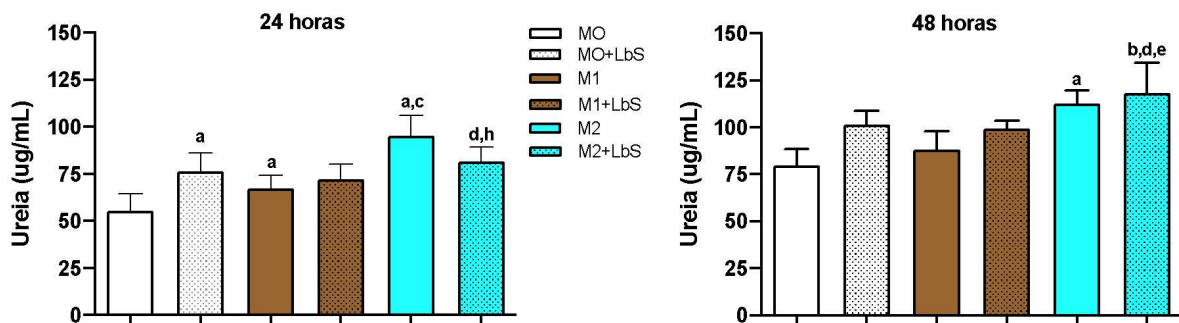
A) Óxido nítrico



B) Arginase



C) Ureia



Fonte: Elaborado pelos autores. Níveis de óxido nítrico, ureia e atividade de arginase em macrófagos de perfil M1 e M2 infectados com cepas de *L. braziliensis*, nos tempos de 24 e 48 horas. Os valores representam média aritmética \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes. $p < 0,05$ (One-way ANOVA, pós-teste de Tukey). MO = macrófago não polarizado; M1 = macrófago de perfil inflamatório; M2 = macrófago de perfil anti-inflamatório/regulatório.

6 DISCUSSÃO

Os resultados de carga parasitária indicam uma maior permissividade à infecção por *Leishmania braziliensis* nos macrófagos M2 em comparação com os perfis M0 e M1. Esta observação é altamente consistente com o papel conhecido dos macrófagos M2 na progressão da doença e na sobrevivência parasitária. (MARIA et al., 2024; SANDOVAL PACHECO, 2021). Macrófagos M2 são classicamente associados à suscetibilidade a patógenos intracelulares, incluindo *Leishmania* e uma maior densidade de células com esse perfil está associada a formas mais graves da doença em pacientes, como na LCD. Essa característica torna o ambiente mais favorável para a replicação e sobrevivência do parasita (MARIA et al., 2024; SANDOVAL PACHECO, 2021; SILVA, 2018). Um estudo anterior com *L. major* em modelos murinos já demonstrou que macrófagos M2 estão diretamente ligados à sobrevivência do parasita e à progressão da doença (MARIA et al., 2024).

A capacidade da *Leishmania* de modular o metabolismo do hospedeiro em seu benefício é crucial para a permissividade dos macrófagos M2, cuja via metabólica predominante é a fosforilação oxidativa. A *Leishmania* utiliza dessa via para sua sobrevivência e proliferação intracelular (OLIVEIRA, 2021). Em seu trabalho, Oliveira (2021) demonstrou que a inibição do metabolismo mitocondrial (como a fosforilação oxidativa) e da síntese de ácidos graxos demonstrou reduzir a carga parasitária e a taxa de infecção. A observação de um aumento expressivo no número de amastigotas após 48 horas em M2 indica que o parasita consegue se estabelecer e proliferar eficazmente nesse perfil.

A ausência de diferença estatística na carga parasitária entre os macrófagos M0 e M1 (tanto em 24 quanto em 48 horas) merece atenção, pois os macrófagos M1 são tipicamente microbicidas. Os macrófagos M1 são ativados por vias clássicas (como IFN- γ e LPS) e sua atividade é conhecidamente exercida por meio da produção de óxido nítrico (NO) via iNOS e espécies reativas de oxigênio (ROS). Uma resposta M1 é geralmente considerada protetora contra patógenos intracelulares. (CARVALHO et al., 2022). No entanto, *L. braziliensis* e outras espécies de *Leishmania* são destacadas por sua capacidade de evadir ou modular a resposta imune do hospedeiro (SILVA, 2018). Embora a produção de ROS por monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea por *L. braziliensis* possa aumentar a capacidade de eliminar o parasito, resultando em menor percentual de células infectadas e menor carga parasitária intracelular, a persistência do parasita

em M1 pode indicar que os mecanismos de evasão do parasita superam a resposta microbida no período observado ou que a resposta inflamatória exacerbada é mais prejudicial (CARNEIRO et al., 2016, 2021; PINHO et al., 2022).

O presente estudo reforçou o conhecido papel dos macrófagos M1 como produtores de citocinas pró-inflamatórias incluindo TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-23 (MILLS, 2015), ao demonstrar que os macrófagos M1 produziram níveis significativamente mais altos de TNF- α em comparação aos perfis M0 e M2. O TNF- α é considerado uma citocina crucial para o controle do crescimento do parasita. A infecção por *L. braziliensis* em humanos é frequentemente associada a uma resposta imune Th1 exacerbada com alta produção de IFN- γ e TNF- α , que paradoxalmente, não erradica o parasita e contribui para a inflamação tecidual crônica como em pacientes com LC e LM (CARNEIRO et al., 2016; CARVALHO et al., 2022; FLÓRO, 2023). Foi demonstrado que em lesões causadas por *L. braziliensis* em humanos, apesar de um número pequeno de macrófagos e escasso parasitismo, não houve diferença estatística entre populações de macrófagos M1 e M2 (SANDOVAL PACHECO, 2021). Esses fatores, sugerem que a resposta M1 pode não ser totalmente eficaz na eliminação do parasita no curto prazo. A manutenção da alta produção de TNF- α pelos macrófagos M1 por 48 horas indica a persistência de sua resposta pró-inflamatória em tentar controlar a infecção.

Contrastantemente, a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória crucial para a persistência do patógeno, frequentemente produzida por macrófagos M2. A sua produção pelos macrófagos M2 leva à diminuição da atividade microbida e favorece o estabelecimento do parasita (SILVA, 2018; STEMPIN et al., 2010; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018). O aumento contínuo da produção de IL-10 em M2 após 48 horas é um indicativo do reforço do fenótipo M2, que favorece a proliferação intracelular do parasita, o que se alinha perfeitamente com o aumento da carga parasitária observada nesse perfil.

A alta produção de NO pelos macrófagos M1 infectados por *L. braziliensis* (M1+LbS) é um pilar da resposta microbida classicamente ativada por IFN- γ e LPS, que induzem a expressão de iNOS. O NO é um dos principais mediadores leishmanicidas (FLÓRO, 2023; SILVA, 2018). Nesse contexto, a distinção entre "M1" e "M1+LbS" é crucial. M1 se refere a macrófagos polarizados pela via clássica Th1

não infectados, desse modo, a baixa produção de NO inicial para M1 pode sugerir que a infecção por *L. braziliensis* (LbS) é um estímulo potente para a indução de NO em macrófagos M1, além da própria polarização. A manutenção de níveis elevados de NO em M1+LbS em 48 horas denota um esforço contínuo do sistema imune ao combater o parasita. Em contrapartida, a produção de NO pelos macrófagos M2+LbS permaneceu inferior aos perfis inflamatórios, o que é esperado, pois macrófagos M2 são caracterizados por baixa produção de NO devido à competição pela L-arginina com a arginase-1. (BOGDAN, 2020; SILVA, 2018)

A arginase-1 é uma enzima característica dos macrófagos M2 e compete com a iNOS por um substrato comum L-arginina. A arginase-1 catalisa a L-arginina em ornitina e ureia. A ornitina é então utilizada para a produção de poliaminas, que são essenciais para o crescimento e proliferação de parasitas intracelulares como a *Leishmania* (BOGDAN, 2020; CARFAGNA et al., 2020). A arginase-1 é, inclusive, considerada um marcador da doença na leishmaniose. A indução intensa da arginase em M2+LbS em 48 horas, juntamente com o aumento da produção de ureia, é um achado chave que se relaciona diretamente com a maior carga parasitária observada nos macrófagos M2. (STEMPIN et al., 2010)

Isso corrobora com uma estratégia bem documentada do parasita, a modulação do metabolismo do macrófago hospedeiro para seu próprio benefício. A observação de níveis baixos de uréia e arginase-1 em todos os grupos em 24 horas sugere que, nas fases iniciais da infecção, essa reprogramação metabólica pró-parasita ainda não atingiu seu pico, mesmo em macrófagos com predisposição (M2) (OLIVEIRA, 2021). O fato dos níveis registrados aumentarem significativamente em M2+LbS em 48 horas, indica que a indução desses mecanismos pró-parasitários é um processo dependente do tempo, que se intensifica à medida que a infecção por *Leishmania* se estabelece. Esse aumento dependente do tempo reflete a intensificação da polarização M2. Estudos demonstram que, embora o fenótipo M1 (pró-inflamatório, microbicida) possa predominar nas fases iniciais da infecção (por exemplo, na 6ª semana pós-infecção), o fenótipo M2 (anti-inflamatório, pró-parasita) tende a se tornar predominante em fases mais tardias (observado entre 12 e 25 semanas pós-infecção em modelos murinos de *L. braziliensis*) (FLÓRO, 2023).

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo fornecem uma visão abrangente e coerente sobre a dinâmica da polarização macrofágica e seu impacto na infecção, destacando a permissividade dos macrófagos M2 e a natureza paradoxal do NO. A temporalidade dessas respostas, com o perfil M1 predominando inicialmente e o M2 se estabelecendo em fases posteriores é fundamental para entender a imunopatogênese da leishmaniose e pode guiar futuras estratégias terapêuticas que visem modular a resposta metabólica e inflamatória do hospedeiro. Dessa forma, investigações adicionais são imprescindíveis na contribuição para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e direcionadas. Este trabalho basal integra um conjunto mais amplo de pesquisas conduzidas pelo Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Fernanda Silva et al. Leishmaniasis: immune cells crosstalk in macrophage polarization. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, n. 5, p. 276, 2023.

ALMEIDA, Sandra & CARDOSO Cristiane. (2020). **LEISHMANIOSE CUTÂNEA NA AMAZÔNIA OCIDENTAL BRASILEIRA**. 10.35170/ss.ed.9786586283136.14.

ALVAR, Jorge et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

ARAÚJO, João Victor Barros et al. Análise epidemiológica da Leishmaniose no Brasil nos anos de 2018 a 2023. 2025.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**, v. 189, 2017.

BOGDAN, Christian. Macrophages as host, effector and immunoregulatory cells in leishmaniasis: Impact of tissue micro-environment and metabolism. **Cytokine: X**, v. 2, n. 4, p. 100041, 2020

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, set. 2018.

CARFAGNA, Ivanna Emilce et al. Involvement of lipids from *Leishmania braziliensis* promastigotes and amastigotes in macrophage activation. **Molecular Immunology**, v. 125, p. 104-114, 2020.

CARNEIRO, Pedro Paulo et al. Blockade of TLR2 and TLR4 attenuates inflammatory response and parasite load in cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 706510, 2021.

CARNEIRO, Pedro Paulo et al. The role of nitric oxide and reactive oxygen species in the killing of *Leishmania braziliensis* by monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis. **PloS one**, v. 11, n. 2, p. e0148084, 2016.

CARVALHO, Augusto M.; BACELLAR, Olívia; CARVALHO, Edgar M. Protection and pathology in *Leishmania braziliensis* infection. **Pathogens**, v. 11, n. 4, p. 466, 2022.

CLIMACO-ARVIZU, Samantha et al. Aryl hydrocarbon receptor influences nitric oxide and arginine production and alters M1/M2 macrophage polarization. **Life sciences**, v. 155, p. 76-84, 2016.

CONCEIÇÃO-SILVA, Fátima; MORGADO, Fernanda Nazaré; COUTINHO, Sergio G. A resposta imune na leishmaniose tegumentar americana ativa. **Leishmanioses do Continente Americano**, v. 1, p. 355-379, 2014.

COSTA, Jackson ML. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. **Gazeta médica da Bahia**, v. 74, n. 1, 2008.

DE MENEZES, J. P.; SARAIVA, E. M.; DA ROCHA-AZEVEDO, B. The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, 4 maio 2016.

DE OLIVEIRA, Camila I.; BRODSKYN, Claudia I. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. **Frontiers in immunology**, v. 3, p. 145, 2012.

DINIZ, Ângela Giudice. **Monócitos e macrófagos participam da proteção e da patologia associada à infecção por *Leishmania Braziliensis***. 2013.

DOS ANJOS, Luana Ribeiro et al. Evidence of guanidines potential against *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Exploring in vitro effectiveness, toxicities and of innate immunity response effects. **Biomolecules**, v. 14, n. 1, p. 26, 2023.

FREIRE, M. L. et al. Anti-mitochondrial Tryparedoxin Peroxidase Monoclonal Antibody-Based Immunohistochemistry for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 790906, 2021.

FLÓRO, M. **Análise fenotípica de macrófagos e histopatologia em camundongos infectados com *Leishmania braziliensis***. 2023. Disponível em: <<https://repositorio.unicamp.br/acervo/detalhe/1267387>>. Acesso em: 1 jul. 2025.

GALVIS OVALLOS, Fredy et al. Leishmanioses no Brasil: aspectos epidemiológicos, desafios e perspectivas. **Atualidades em medicina tropical no Brasil: protozoários**, 2020.

GIUDICE, Angela et al. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. **BMC infectious diseases**, v. 12, p. 1-9, 2012.

GONTIJO, Bernardo; CARVALHO, Maria de Lourdes Ribeiro de. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 71-80, 2003.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, v. 126, p. 131-138, 1982.

MARIA et al. Analysis of clinical cure outcome, macrophages number, cytokines levels and expression of annexin-A1 in the cutaneous infection in patients with *Leishmania braziliensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 57, 1 jan. 2024.

MILLS, Charles Dudley. Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 212, 2015.

MORATO, Camila Imai. **Avaliação da modulação da infecção de macrófagos humanos com *Leishmania (Viannia) braziliensis* por leucotrienos**. 2013.

OLIVEIRA, Elaine Carvalho de. **Investigação do papel de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis* na reprogramação metabólica em macrófagos murinos infectados**. 2021.

OLIVEIRA, L. B. et al. The Paradoxical Leishmanicidal Effects of Superoxide Dismutase (SOD)-Mimetic Tempol in *Leishmania braziliensis* Infection in vitro. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, 26 jun. 2019.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas. Washington, D.C.: OPS, 2019.

PINHEIRO, Luana Caroline Santos. **AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM MACRÓFAGOS COINFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Leishmania) chagasi***. 2018.

PINHO, Nathalia et al. Nitric oxide resistance in *Leishmania (Viannia) braziliensis* involves regulation of glucose consumption, glutathione metabolism and abundance of pentose phosphate pathway enzymes. **Antioxidants**, v. 11, n. 2, p. 277, 2022.

REITHINGER, Richard et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

REVERTE, Marta; SNÄKÄ, Tiia; FASEL, Nicolas. The dangerous liaisons in the oxidative stress response to leishmania infection. **Pathogens**, v. 11, n. 4, p. 409, 2022.

SANDOVAL PACHECO, C. M. et al. Macrophage Polarization in the Skin Lesion Caused by Neotropical Species of *Leishmania sp.* **Journal of Immunology Research**, v. 2021, p. 1–8, 10 abr. 2021.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; Jon C. Aster; et al. **Robbins & Kumar Patologia Básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2025. *E-book*. p.Capa. ISBN 9786561110143. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9786561110143/>. Acesso em: 07 ago. 2025.

SILVA, Silvana C. et al. Molecular epidemiology and in vitro evidence suggest that *Leishmania braziliensis* strain helps determine antimony response among American tegumentary leishmaniasis patients. **Acta tropica**, v. 178, p. 34-39, 2018.

SOUSA, Rosana Santos. O polimorfismo genético intraespecífico e o comportamento biológico da infecção por *Leishmania braziliensis*. 2015.

STEMPIN, Cinthia Carolina et al. Arginase in Parasitic Infections: Macrophage Activation, Immunosuppression, and Intracellular Signals. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1–10, 1 jan. 2010

TOMIOTTO-PELLISSIER, F. et al. Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 31 out. 2018.

URDAPILLETA, Ada Amália Ayala et al. Treatment of Refractory Mucosal Leishmaniasis Is Associated with Parasite Overexpression of HSP70 and ATPase and Reduced Host Hydrogen Peroxide Production (Brief Report). **Biomedicines**, v. 12, n. 10, p. 2227, 2024.

VENTURA, Bianca Domingues et al. **Comparação do perfil dos macrófagos oriundos de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) major***. 2023.

REIS, Y. V. DOS; PINTO, M. C.; ALEVI, K. C. C. PANORAMA ATUAL DAS LEISHMANIOSES NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL: UMA MINI-REVISÃO. **Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Protozoários**, p. 271–288, maio 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Leishmaniasis*. 2023. Disponível em: [<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>] Acesso em: 2 março de 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis**. Global Health Observatory. 2024. Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/gho-ntd-leishmaniasis>. Acesso em: 6 jul. 2025.