

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

LAÍS LIMA DE OLIVEIRA REKOWSKY

**O PAPEL DO ALLOGRAFT INFLAMMATORY FACTOR 1(AIF1) NA MATURAÇÃO
E FUNÇÃO DE MACRÓFAGOS NO COMBATE À INFECÇÃO POR *Leishmania***

**ARACAJU
2024**

LAÍS LIMA DE OLIVEIRA REKOWSKY

**O PAPEL DO ALLOGRAFT INFLAMMATORY FACTOR 1(AIF1) NA MATURAÇÃO
E FUNÇÃO DE MACRÓFAGOS NO COMBATE À INFECÇÃO POR *Leishmania***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde da Universidade Federal de
Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau
de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Priscila Lima Santos

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Luís Louzada da
Silva

**ARACAJU
2024**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE – BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

R381p Rekowsky, Laís Lima de Oliveira
O papel do *allograft inflammatory factor 1*(AIF1) na maturação e função de macrófagos no combate à infecção por leishmania / Laís Lima de Oliveira Rekowsky ; orientadora Priscila Lima Santos ; coorientador Ricardo Luís Louzada da Silva. – Aracaju, 2024.
63 f. : il.

Tese (doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2024.

1. Ciências da saúde. 2. Leshmaniose. 3. *Allograft Inflammatory Factor 1*. 4. Macrófagos. 5. Inflamação. I. Santos, Priscila Lima, orient. II. Silva, Ricardo Luís Louzada da, coorient. III. Título.

CDU 616.993.161

LAÍS LIMA DE OLIVEIRA REKOWSKY

**O PAPEL DO ALLOGRAFT INFLAMMATORY FACTOR 1(AIF1) NA MATURAÇÃO
E FUNÇÃO DE MACRÓFAGOS NO COMBATE À INFECÇÃO POR *Leishmania***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde da Universidade Federal de
Sergipe como requisito final à obtenção do grau de
Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em: ____/____/____

Profa. Dra Priscila Lima Santos
Prof. Dr. Ricardo Luis Louzada da Silva
Universidade Federal de Sergipe-UFS
Departamento de Educação em Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde- PPGCS

Profa. Dra. Patrícia Marques Souza
Universidade Federal de Sergipe
Departamento de Educação em Saúde

Profa. Dra. Tatiana Rodrigues de Moura
Universidade Federal de Sergipe
Departamento de Morforlogia
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde- PPGCS

Prof. Dr. Michael W. Lipscomb
University of Minnesota
Department of Pharmacology

Dra. Camila Nathália Santos
Universidade Federal de Sergipe
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde- PPGCS

RESUMO

REKOWSKY, L.L.O. PAPEL DO GENE *Allograft Inflammatory Factor 1* (AIF1) NA MATUREZAÇÃO E FUNÇÃO DE MACRÓFAGOS NO COMBATE À INFECÇÃO POR *Leishmania*.

Macrófagos e monócitos são as principais células no combate à infecção por *Leishmania*. Sendo assim, correspondem às células alvo dos mecanismos de evasão condicionados por parasitas na tentativa de suprimir a resposta inflamatória e garantir sua sobrevivência. O *Allograft Inflammatory Factor-1* (AIF1) é um gene expresso essencialmente em células de linhagem mieloide, principalmente células dendríticas e macrófagos. Sua expressão nessas células está diretamente relacionada com a ativação das vias da cascata inflamatória na promoção da resposta imune. Nesse estudo nós observamos que a *Leishmania donovani* induz uma redução na expressão do AIF1 em macrófagos no baço *per si* (7,98% $\pm$ 2.1 para 2.30% $\pm$ 0.6) para bloquear a resposta pró-inflamatória destas células e assim garantir sua sobrevivência intracelular tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Além disso, a super expressão ectópica do AIF1 induzida em macrófagos derivados da medula óssea infectados consegue reverter a imunomodulação causada pela infecção por *L.donovani* de citocinas inflamatórias importantes para a resposta em macrófagos como IL-6, TNF- α além de Arg1 e iNOS. Ademais, ao silenciar o AIF1 em células progenitoras da medula óssea mesmo sob estímulo de M-CSF a diferenciação de monócitos em macrófagos apresenta diminuição do desenvolvimento de macrófagos com ainda uma coexpressão significativamente diferente da molécula Ly6C na população sem AIF1. Além disso, corroboramos a importância do AIF1 no desenvolvimento de macrófagos derivados da medula óssea utilizando um modelo de camundongo único com deleção condicional do AIF1 nas células da medula óssea que expressam constitutivamente o gene VAV1 pelo sistema LoxP-cre. Com isso foi possível corroborar uma diminuição tanto nos progenitores de monócitos uma significativa diferença nos perfis celulares de monócitos e macrófagos derivados da medula óssea gerados na ausência do AIF1 com um aumento de fenótipo para o desenvolvimento de macrófagos Ly6C low/antiinflamatórios em camundongos *knockout* comparados com seus respectivos controles. Esses achados também são encontrados em mesma perspectiva, porém em números menos pronunciados no baço. Posteriormente, polimorfismos genéticos de único nucleotídeo (SNP) do AIF1 foram analisados em amostras de pacientes com diagnóstico para Leishmaniose Visceral (LV) e foi observado que um alta frequência do polimorfismo rs3132451 em controles endêmicos comparados com pacientes Leishmaniose Visceral (OR = 1.0, 67%CI = 0.00-0.00, P= 0.04) pode presumir uma associação desse polimorfismo de resistência à doença. Já os polimorfismos rs4711274 e rs2269475 foram significativamente maiores no grupo de pacientes apresentando, portanto, um genótipo de susceptibilidade à LV. Juntos, esses dados dão suporte à hipótese de estudo revelando um papel importante do AIF1 como fator chave no desenvolvimento de macrófagos derivados da medula óssea sendo, portanto, uma via de evasão utilizada por parasitas como a *Leishmania* para subverter a resposta imune eficaz e garantir sua sobrevivência. Por fim, a presença de polimorfismos genéticos do AIF1 nos pacientes com Leishmaniose Visceral corrobora a relevância também na clínica do papel do AIF1 no desenvolvimento de macrófagos e na sua função contra a Leishmaniose Visceral.

Palavras-chave: Allograft Inflammatory Factor 1, AIF1; Macrófagos; Monócitos; Leishmaniose.

ABSTRACT

REKOWSKY, L.L.O. THE ROLE OF *Allograft Inflammatory Factor 1*(AIF1) IN MACROPHAGES DEVELOPMENT AND FUNCTION AGAINST *LEISHMANIA*

Monocytes and macrophages are the main cells against *Leishmania* infection. Then, these cells represent a target for immune system evasion to parasites to avoid inflammation and increase survival. *Allograft Inflammatory Factor-1* (AIF1) gene is essentially expressed in myeloid lineage cells, especially dendritic cells, and macrophages. AIF1 expression can be correlated with inflammatory cascade activation to promote immune response in these cells. We observed *in vitro* and *in vivo* that *Leishmania donovani* infection induces a downregulation of AIF1 in spleen macrophages ($7,98\% \pm 2.1$ to $2.30\% \pm 0.6$) to block the proinflammatory response and increases the intracellular survival chances. Furthermore, ectopic upregulation of AIF1 in bone marrow derived macrophages can revert the immunomodulation that *L.donovani* infection causes in some of cytokines that is crucial to develop proinflammatory response in macrophages such as IL-6, TNF- α , Arg1 and iNOS. In addition, silencing AIF1 gene in bone marrow stem cells affects macrophages derived from monocytes development with a retention of Ly6C expression in these populations in a lack of AIF1 expression even under M-CSF stimulation. We confirmed the importance of AIF1 in bone marrow derived macrophages using a unique mouse model that presents a deletion of AIF1 gene expression in cells that express constitutively VAV1 gene, which is all kind of hematopoietic stem cells, using the LoxP/Cre system of conditional *knockout* of a target gene. By this, we corroborate a decrease in the numbers of monocytes and macrophages progenitors and a significant difference between both groups in the subtypes of monocytes and macrophages in the absence of AIF1 with an increase of anti-inflammatory subset Ly6C low in knockout model compared to controls. These data were corroborated in spleen samples less pronounced results as in bone marrow. Ultimately, Single Nucleotide Polymorphism (SNP) analysis was performed to evaluate the frequency of AIF1 SNP in Visceral Leishmaniasis patients and we could observe a significant higher frequency of AIF1 rs3132451 SNP mutation in endemic controls compared to patients (OR = 1.0, 67%CI = 0.00-0.00, P= 0.04) which we presumed as a genotype of resistance to *Leishmania*. However, rs4711274 and rs2269475 polymorphisms were significantly higher in patients' group which configure as a genotype of susceptibility of Leishmaniasis. Together, these data support the hypotheses of an important role of AIF1 as a key-factor in the macrophages derived bone marrow cells and as an evasion pathway used to parasites as *Leishmania* to subvert immunity response and survive. Lastly, the presence of AIF1 polymorphisms correlation in Visceral Leishmaniasis group of patients corroborates the clinical relevance of the role AIF1 in macrophages development and function against Visceral Leishmaniasis.

Palavras-chave: Allograft Inflammatory Factor 1, AIF1; Macrophages; Monocytes; Leishmaniasis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1. <i>Allograft Inflammatory Factor 1</i>	12
2.2. Desenvolvimento de monócitos e macrófagos	15
2.2.1. Desenvolvimento de monócitos e macrófagos na medula óssea	15
2.2.2. Perfil celular, classificação e função dos monócitos	17
2.2.3. Perfil celular, classificação e função de macrófagos	19
2.2.4. O papel de monócitos e macrófagos na resposta contra patógenos	20
2.3. Aspectos imunológicos da Leishmaniose	22
2.4. Aspectos genéticos na Leishmaniose	25
3. OBJETIVOS	27
3.1. OBJETIVO GERAL	27
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4. METODOLOGIA	28
4.1. MODELOS ANIMAIS	28
4.3. ISOLAMENTO DE MONÓCITOS E MACRÓFAGOS	31
4.4. INFECÇÃO POR <i>LEISHMANIA DONOVANI</i>	31
4.5. CITOMETRIA DE FLUXO	32
4.6. SILENCIAMENTO GENÉTICO POR CRISPR CAS9	32
4.7. EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-QPCR	33
4.8. EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT	33
4.10. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	34
4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
5. RESULTADOS	36
5.1. Macrófagos e monócitos do baço de camundongos selvagem expressam AIF1	36
5.2. Infecção por <i>Leishmania</i> diminui a expressão de AIF1 em macrófagos do baço de camundongos selvagem	37
5.3. Expressão ectópica do AIF1 em macrófagos têm efeito antiparasitário e aumenta resistência imune contra <i>Leishmania</i>	38
5.4. A expressão do AIF1 interfere no desenvolvimento de monócitos e macrófagos em células da medula óssea	40
5.5. A ausência do AIF1 interfere na conversão de monócitos em macrófagos <i>in vitro</i>	41
5.6. Modelo animal “ <i>knockout</i> ” para AIF1 em células que expressam VAV1 confirma a deleção condicional do gene em progenitores da medula óssea e em órgãos linfóides	43
6. DISCUSSÃO	51
7. CONCLUSÃO	54

8. PERSPECTIVAS	55
REFERÊNCIAS.....	56

1. INTRODUÇÃO

Allograft Inflammatory Factor 1 (AIF1), é uma proteína citoplasmática adaptadora de ligantes de cálcio ionizado que participa da cascata inflamatória na resposta imune. Sua localização de transcrição gênica fica situada numa região agrupada com outros genes importantes na resposta inflamatória, como o complexo de histocompatibilidade de classe III (MHC-III), como o Fator de Necrose Tumoral α e β (TNF- α/β) e o fator nuclear κ B (NF κ B) (DEININGER; MEYERMANN; SCHLUESENER, 2002a; UTANS et al., 1995a; ZHAO; YAN; CHEN, 2013b).

Originalmente o gene *AIF1* foi caracterizado e clonado a partir do isolamento de tecidos de modelos de ratos após transplante cardíaco em vários estágios de rejeição crônica (UTANS et al., 1995b). Sua expressão gênica inicialmente foi descrita em células de linhagem mieloide principalmente em macrófagos e neutrófilos, porém estudos posteriores revelaram sua expressão também células dendríticas e linfócitos do tipo B (ELIZONDO et al., 2019) além de células teciduais não imune como em fibroblastos, células endoteliais e células do músculo liso (KADOYA et al., 2014; ROWLEY et al., 2017a).

A partir de técnicas de modulação gênica (silenciamento e super expressão), estudos conseguiram demonstrar que a supressão do *AIF1* induz a apoptose celular em macrófagos e o aumento de sua expressão é importante para a migração destas células (YANG et al., 2005). Em trabalho realizado por Elizondo e colaboradores (2017 e 2019), ao silenciar o *AIF1* em células dendríticas houve uma interferência na proliferação de linfócitos T com desvio da polarização Th1 e Th17 além de induzir aumento de células T reguladoras (CD25+ Foxp3+) com altas produções de IL-10; foi também observado que a expressão do *AIF1* está diretamente correlacionada com o desenvolvimento e diferenciação de células dendríticas clássicas (cDC1) e células dendríticas derivadas de monócitos inflamatórios (moDC) (ELIZONDO et al., 2017, 2019). Juntos esses dados corroboram que o AIF1 exerce papel indiscutível nas células do sistema imune, não somente na ativação de vias inflamatórias como também na proliferação, migração e sobrevivência celular. Porém, ainda não há descrição a respeito do envolvimento desse gene no desenvolvimento e maturação de macrófagos derivados de monócitos, uma das principais células de resposta imune inata.

O *AIF1* tem sido bastante caracterizado na patogênese de inúmeras doenças. Em doenças de caráter autoimune, como na artrite reumatoide, esclerose sistêmica e Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1), o aumento da expressão do AIF1 é correlacionado como fator preditivo no desenvolvimento da doença (DEL GALDO et al., 2006; ELIZONDO et al.,

2020; PIOTROWSKA et al., 2020). Em condições inflamatórias crônicas como na obesidade, o AIF1 participa na regulação diminuindo a expressão de MAOA (*Monoamine Oxidase A*), enzima importante no catabolismo de catecolaminas dos adipócitos e em macrófagos no tecido adiposo o que aumenta o estoque energético e limita o gasto de energia nesse tecido, fator crucial na patogênese da obesidade (CHINNASAMY et al., 2023). Além disso, o AIF1 também vêm sendo descrito como biomarcador importante para prognóstico de doenças como é o caso da nefropatia diabética, complicação grave no Diabetes *Mellitus* do tipo 2 (DM2) onde concentrações séricas altas AIF1 foram encontradas no soro de pacientes com complicações renais diagnosticadas (FUKUI et al., 2012a). Também já há relatos de uma associação positiva com a alta expressão do AIF1 em infiltrados tumorais com piores prognósticos em diversos tipos de câncer (LIU et al., 2023). No entanto, nenhum estudo tem correlacionado o papel desse gene no contexto de doenças infecciosas e parasitárias como a leishmaniose, que apesar de curável ainda apresenta caráter endêmico crônico e constitui um grave problema de saúde pública principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil.

Por ser um parasito intracelular obrigatório, a *Leishmania* necessita evadir da resposta de células fagocíticas como macrófagos os quais, a depender do seu fenótipo de ativação, podem se tornar um ambiente ideal à multiplicação e sobrevivência da forma intracelular (amastigota) desse parasita ou pode controlar a infecção (CARNEIRO et al., 2021; ENGWERDA; ATO; KAYE, 2004; FILARDY; PIRES; DOSREIS, 2011). Alguns estudos têm demonstrado que a própria *Leishmania* é capaz de modular o perfil de ativação de macrófagos, estimulando a produção de citocinas de perfil anti-inflamatório (indução de resposta Th2), principalmente a elevando a liberação de IL-10, IL-4 e CD163 (SILVA et al., 2017), além de ter a capacidade de relocar o metabolismo da L. arginina para a via da arginase à qual compromete a produção de reativos de oxigênio que são os bioativos necessários para o combate do parasito (WILKINS-RODRÍGUEZ et al., 2020).

Além disso, a *Leishmania* também interfere na expressão de diversos fatores de transcrição e RNA mensageiro (mRNA) de inúmeros genes importantes para a resposta inflamatória por exemplo *IL-6*, *Nos2*, *IL-10*, *SOCS3*, *CSF1*, entre outros (VERAS; RAMOS; DE MENEZES, 2018). Nesse sentido, as vias de genes com papel inflamatório nas células imune, incluindo o AIF1, se apresentam como importantes focos de adaptação utilizadas por este parasita para sua sobrevivência constituindo assim alvo de estudo importante com vistas a elucidar genes que influenciem diretamente na patogênese de doenças infecciosas e parasitárias endêmicas crônicas.

Merece ressalva que correlações genotípicas de Polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) do *AIF1* já vem sendo descritos principalmente em casos de artrite reumatóide associado com genótipo de maior risco no desenvolvimento da doença ou com uma apresentação de sua forma mais ativa e sintomática (PAWLIK et al., 2013a). No caso da esclerose sistêmica, doença autoimune do tecido conjuntivo, polimorfismos do *AIF1* apresentaram associação positiva com formas sistêmicas, difusa e limitada da doença assim como uma correlação de ligação com alelos do gene *TNF α* que pode predizer o papel modulador desses genes em doenças de cunho inflamatório (OTIENO et al., 2007). Polimorfismos desse gene em pacientes diabéticos também são correlacionados com maior predisposição no desenvolvimento do Diabetes *Mellitus* tipo 1 (NISHIMURA et al., 2003). No entanto, não há estudos que correlacionam polimorfismos do gene *AIF1* no risco ou desfecho da Leishmaniose Visceral (LV), forma mais grave e letal da doença.

Sendo assim, sabendo da importância do *AIF1* na modulação no sistema imune e na sua participação na patogênese de diversas doenças de cunho inflamatório, o principal objetivo deste estudo consiste em avaliar o papel do *AIF1* no contexto de doenças infecto-parasitárias endêmicas crônicas como a Leishmaniose assim como no desenvolvimento celular de macrófagos e monócitos. *A hipótese desse estudo é que o AIF1, por exercer um papel modulador no processo inflamatório do macrófago, influencia diretamente no desfecho clínico da leishmaniose, sendo sua ausência associada a resistência do parasito e maior gravidade e cronicidade da doença. Além disso, sua expressão também pode estar correlacionada com o desenvolvimento e maturação celular destes macrófagos e monócitos, influenciando, portanto, na imuno modulação destas células.*

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Allograft Inflammatory Factor 1*

A proteína *Allograft Inflammatory Factor 1* (AIF1) corresponde a uma cadeia polipeptídica de 147 aminoácidos encontrada no citoplasma, com peso molecular de aproximadamente 17kD e é codificada pelo mRNA do gene de mesmo nome. Esse gene foi pioneiramente descrito e caracterizado como uma molécula adaptadora de ligantes de cálcio de com histórico de conservação evolucionário em diversas espécies (UTANS et al., 1995b). É importante ressaltar que alguns homólogos do AIF1 podem ser identificados no meio científico já que apresentam mesma sequência, porém com pequenas variações nas cadeias de aminoácidos, como é o caso da molécula adaptadora de cálcio ionizado do tipo 1 (Iba1), o fator de resposta de micróglias tipo 1 (MRF-1) ou *daintain* (DEININGER; MEYERMANN; SCHLUESENER, 2002b).

Ao longo dessa primeira descrição do *AIF1*, alguns estudos buscaram entender as mais diversas funções ao qual essa molécula poderia ser associada nos mecanismos celulares. Um estudo molecular realizado por Ohsawa e colaboradores em 2000, demonstraram que em células de linhagem de micróglias, na ausência do estímulo de M-CSF, a proteína do AIF1 permanece localizada no citoplasma celular, porém com o estímulo de M-CSF esta proteína transloca para a membrana e fica colocalizada com ligação direta à moléculas de F-Actina, descrevendo assim o papel do AIF1 na reorganização da membrana destas células o que foi o ponto de partida para instigar a investigação da participação desse gene no processo de fagocitose por macrófagos (OHSAWA et al., 2000). Além disso, no estudo realizado por Autieri e colaboradores (2001), sugeriram que a expressão constitutiva de *AIF1* exercia efeito em aumentar o crescimento de células da musculatura lisa vascular e no aumento da expressão de proteínas do ciclo celular, função ao qual foi atribuída pela capacidade de ligação do AIF1 a moléculas de cálcio (AUTIERI; CARBONE; EISEN, 2001).

Apesar disso, a função majoritária do *AIF1* tem sido descrita nas células do sistema imune, principalmente em macrófagos, já que na sua identificação foi observada alta expressão do desse gene no baço, órgão predominantemente composto por células do sistema imune, o que definiu esse gene como um dos transcritos de células inflamatórias. Ademais, a transcrição gênica do *AIF1* foi perceptível, mesmo sem estímulo de citocinas inflamatórias como IFN- γ , na medula óssea total, em macrófagos derivados da medula óssea, macrófagos peritoneais, neutrófilos peritoneais em quantidades significantes além de baixa expressão ou

nenhuma foi encontrada em linfócitos T (UTANS et al., 1995b). No caso de macrófagos, o *AIF1* demonstrou inúmeros efeitos nessa célula já que a superexpressão por transfecção com plasmídeo AIF-1/PCDNA3.1(+) em células de linhagem foi observada aumento na produção de óxido nítrico, menor apoptose com maior expressão de caspase 3 clivada, e aumento de migração celular observada tanto por contagem de células em câmara específica para avaliar quimiotaxia ou mesmo pela expressão de MCP-1 nas culturas de células silenciadas e não silenciadas (YANG et al., 2005).

Em um outro estudo utilizando macrófagos de linhagem com intenção de estabelecer um clone murino que fosse possível de utilizar na geração de anticorpos monoclonais perceberam que a super expressão de *AIF1* induzia um aumento na expressão de IL-6, IL-10, IL-12p40 principalmente sob estímulo de LPS na cultura. Além disso, importante correlação genômica do AIF1 com sítios de fosforilação de kinases importantes da resposta imune foram demonstradas no cDNA do *AIF1* como a proteína Kinase A e C (PKA e PKC) (WATANO et al., 2001a). Vale destaque que o silenciamento do gene nos macrófagos também leva a uma menor apresentação de antígenos por essa célula, assim como uma menor resposta de proliferação de linfócitos T (ROWLEY et al., 2017b).

Posteriormente os estudos sobre o *AIF1* foram avançando para outros tipos celulares como é o caso das células dendríticas, principal célula apresentadora de antígeno, onde foi demonstrado efeito que o silenciamento da expressão do *AIF1* nessas células proporciona um desvio da condução da resposta efetora de células T (CD4⁺ e CD8⁺) para um perfil regulatório, com aumento de células de perfil regulatório (CD25⁺ FOXP3⁺) assim como alta produção de IL-10 (ELIZONDO et al., 2017, 2019). Além disso, a inibição da expressão do AIF1 em células progenitoras mieloides, mesmo após estímulo de FLT3-L *in vitro* (citocina responsável para geração de células dendríticas a partir de um progenitor mielóide), impede a diferenciação celular total para o perfil convencional das células dendríticas (cDC1) tipo celular essencialmente responsável por realizar a apresentação de antígenos para as células T além de gerar o estímulo de resposta pró-inflamatório nestas células. Merece destaque que nesse mesmo estudo realizado foi demonstrado que há uma interação direta do *AIF1* com proteína PKC e que pode modular diretamente a expressão do fator de transcrição RelB (importante fator de transcrição da cascata da via de NFκB (ELIZONDO et al., 2019).

Ademais, com a expressão do AIF1 associada a ativação da resposta pró-inflamatórias estudos posteriores trazem, portanto, diversas associações com a participação desse gene na patogênese das mais variadas doenças origem inflamatória e autoimune (DE LEON-OLIVA

et al., 2023; ZHAO; YAN; CHEN, 2013a). Por exemplo, alta expressão do *AIF1* em infiltrados de células mononucleares foi encontrado em pacientes com artrite reumatoide ativa (KIMURA et al., 2007), na vascularização pulmonar de pacientes com esclerose sistêmica (DEL GALDO et al., 2006) e no pâncreas de modelos murinos pré-diabéticos do tipo I (CHEN et al., 1997) assim como um papel importante do *AIF1* na viabilidade das células β pancreáticas e consequentemente na secreção adequada de insulina (HUANG et al., 2011). Além disso sua expressão condicionada com uma associação positiva com indicadores metabólicos (IMC, níveis séricos de triglicérides e de glicose) dá suporte também ao uso deste marcador como fator preditivo da ativação de macrófagos nos tecidos corporais em condições inflamatórias de acometimento crônico e progressivo como é o caso da obesidade, resistência à insulina e complicações graves da Diabetes *Mellitus* tipo 2 como a neuropatia e nefropatia diabética (FUKUI et al., 2012b; REN et al., 2018; ZAKAREYA et al., 2016).

No caso da participação do *AIF1* em lesões de carcinoma hepatocelular foi encontrado um aumento na expressão do *AIF1* no tecido afetado quando comparado com o tecido saudável adjacente. Além disso demonstraram um potencial terapêutico na reversão da proliferação celular e migração deste tipo de carcinoma ao silenciar o *AIF1* (ZHANG et al., 2018) A alta expressão do *AIF1* também tem sido associada ao câncer de mama em inúmeros estudos com o objetivo de avaliar o potencial da imuno modulação desse gene na proliferação celular revelando associação positiva com a redução na proliferação celular e migração de células cancerígenas ao silenciar o *AIF1* (LIU et al., 2008; SLIM et al., 2018; ZHENG et al., 2021).

Por fim, alguns estudos também avaliaram a função do *AIF1* em doenças de cunho neurológico, principalmente devido ao fator que as células micróglias desempenham importante papel na homeostase cerebral e está associada a maior parte dos acometimentos patológicos no cérebro (LI; BARRES, 2018). Em estudo realizado por Lituma e colaboradores (2021), a deleção completa do *AIF1* afetou até mesmo no processo de crescimento sináptico em camundongos fase de desenvolvimento e que resultou em consequências comportamentais para o camundongo em sua fase adulta (LITUMA et al., 2021) Além disso, um outro estudo revelou que uma maior expressão de *AIF1* em células micróglias afetadas de pacientes com Alzheimer foi encontrada comparados com os tecidos adjacentes saudáveis (KENKHUIS et al., 2022). Por fim, vale ressaltar que a expressão gênica de *AIF1* também foi aumentada em células cultivadas em condições de hipóxia e que estas eram capazes de aumentar os níveis séricos do *AIF1* demonstrando um potencial efeito

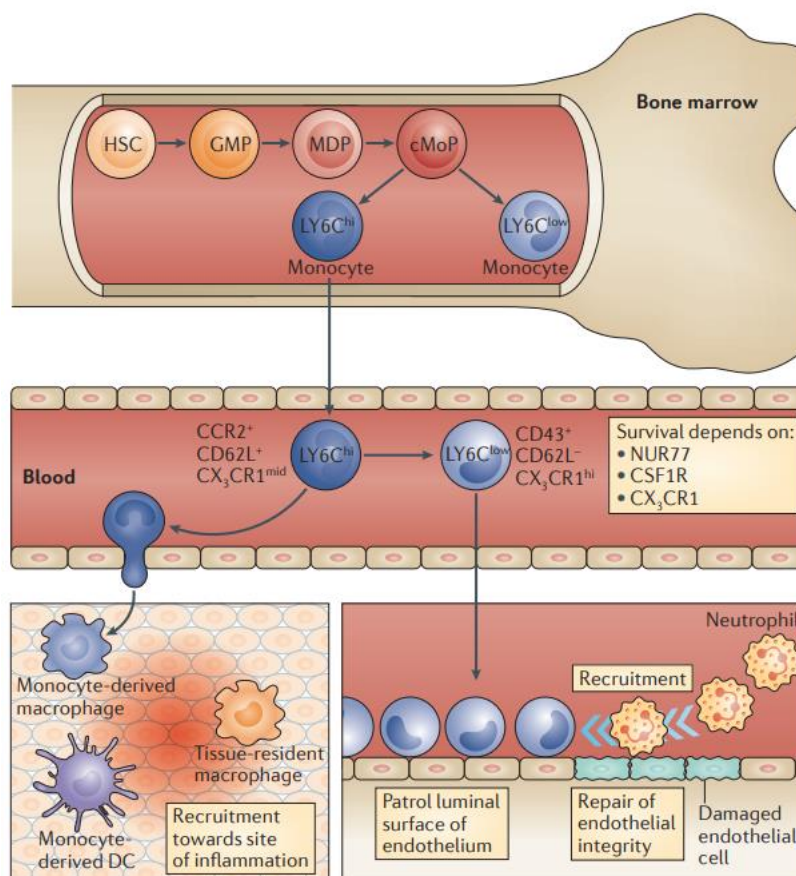
também na patogênese de doenças vasculares cerebrais de origem isquêmica e que pode afetar a homeostase dos demais órgãos do organismo (FUKASAWA et al., 2023).

2.2. Desenvolvimento de monócitos e macrófagos

2.2.1. Desenvolvimento de monócitos e macrófagos na medula óssea

Células tronco hematopoiéticas circulam na medula óssea de adultos saudáveis e devido a sua habilidade de auto renovação e plasticidade a partir dela podem ser gerados progenitores de inúmeras células do sistema imune linfóide e mieloide além do grupo de células sanguíneas (GOODMAN; HODGSON, 1962; WEISSMAN; ANDERSON; GAGE, 2001). A partir dos progenitores linfóides CLP (*Common Lymphoid Progenitors*) são produzidos toda a linhagem de linfócitos, incluindo os linfócitos T, B e ainda células *Natural Killer* (NK). Já no caso dos progenitores mielóides são geradas outras duas linhagens, a dos progenitores de megacariócitos e eritrócitos (MEPs) que irão gerar as células vermelhas do sangue e os progenitores de granulócitos e macrófagos (GMPs) (IWASAKI; AKASHI, 2007). O grupo de GMP ainda tem a capacidade de gerar um outro progenitor crítico no desenvolvimento especificamente de várias células granulocíticas como é o caso de monócitos, macrófagos e células dendríticas conhecido como MDP (MANZ et al., 2002).

O desenvolvimento de células derivadas de progenitores MDP a depender do estímulo recebido por fatores de transcrição importantes como IRF8 e PU.1 levarão ainda a uma subdivisão entre dois outros progenitores que seriam específicos para a geração de monócitos (cMoP) e um outro precursor específico para as células dendríticas (CDP). (ZHU; THOMAS; HEDRICK, 2016). A geração de monócitos e macrófagos pela medula óssea é derivada do progenitor cMoP que levará ao desenvolvimento de monócitos Ly6C high e Ly6C low, que apesar de ambos representar a população de monócitos, exercem funções diferentes. Uma vez na circulação sanguínea, os monócitos Ly6C high/CX3CR1 mid/CCR2+/CD62L+ são os principais responsáveis para o desenvolvimento de macrófagos e/ou células dendríticas quando recrutados ao sítio inflamatório. Já a população Ly6C low /CX3CR1 high/CD43+/CD62L- é conhecida por atuar na patrulha do endotélio vascular e no recrutamento inicial de neutrófilos (Figure 01) (GINHOUX; GUILLIAMS, 2016; GINHOUX; JUNG, 2014)

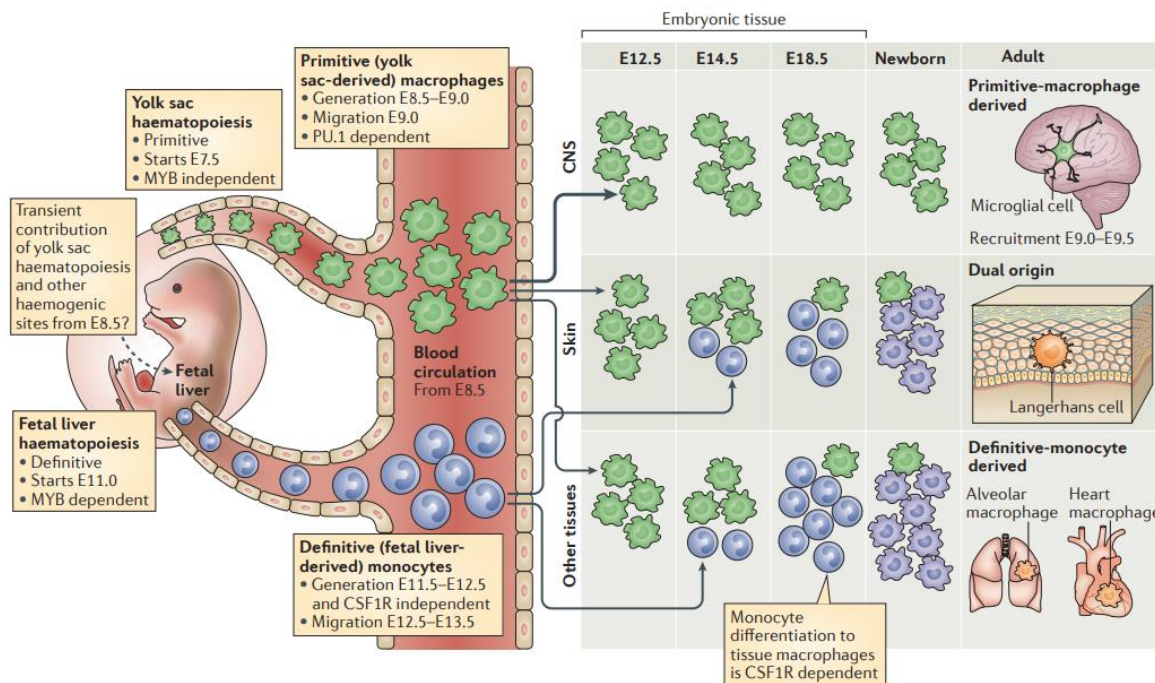


(Ginhoux, F.; Jung, S. Monocytes and macrophages developmental pathways and tissue homeostasis. *NatureReviews*, 2014)

Fig. 01. Produção de monócitos e macrófagos a partir de progenitores da medula óssea.

Os monócitos são gerados a partir de um precursor de macrófagos e granulócitos (MDP) que posteriormente se diferencia tanto em um precursor específico para células dendríticas (CDP) como em um precursor comum de monócitos (cMoP) este último que gerará os monócitos circulantes e de patrulha. Na circulação sanguínea monócitos de perfil Ly6Chigh/CCR2+/CD62L+/CX3CR1mid quando recrutados em situação de inflamação tecidual se diferenciam em macrófagos derivados de monócitos ou em células dendríticas derivadas de monócito e atuam junto com os macrófagos residentes. Já o perfil de monócitos Ly6C low/CD43+/CD62L-/CX3CR1 high integram o grupo de monócitos de patrulha endotelial e atua no recrutamento de neutrófilos em caso de dano celular endotelial.

No caso específico do desenvolvimento de macrófagos, vale ressaltar grande parte da sua população celular presente nos tecidos são formados primitivamente durante o desenvolvimento embrionário pelo saco vitelínico ou pela hematopoiese no fígado (Figura 02). Após o nascimento esse desenvolvimento passa a ser realizado pela medula óssea a partir da conversão de monócitos circulantes para renovação da população tecidual ou quando recrutados em situações de inflamação. Esses macrófagos são denominados macrófagos derivados de monócitos da medula óssea (GEISSMANN et al., 2010a; WYNN; CHAWLA; POLLARD, 2013a).



(Ginhoux, F.; Jung, S. Monocytes and macrophages developmental pathways and tissue homeostasis. *NatureReviews*, 2014)

Fig. 02. Desenvolvimento embrionário de macrófagos primitivos. A geração de macrófagos primitivos é derivada de monócitos gerados por hematopoiese fetal no fígado e no saco vitelínico. Esses monócitos se diferenciam em macrófagos por meio do estímulo dependente de CSF1R. Uma vez nos tecidos adultos essas células são distribuídas como macrófagos definitivos teciduais. As células micróglias são unicamente formadas por células provenientes do saco vitelínico embrionário enquanto as demais células têm desenvolvimento de ambas as origens. Na fase adulta, em caso de recrutamento, monócitos são gerados pela hematopoiese da medula óssea e migram pela circulação sanguínea ao tecido onde terminarão o seu processo de diferenciação nos macrófagos derivados da medula óssea para auxiliar no processo inflamatório junto com os macrófagos teciduais já existentes.

Fatores de crescimento responsáveis por auxiliar na diferenciação de monócitos e macrófagos são conhecidos como CSF1R, um receptor tirosina quinase expresso na maioria das células mononucleares. Além disso, alguns estudos mostram que o desenvolvimento desses macrófagos está bastante associado ao estímulo de CSF1 já que em modelos sem expressão desse fator de crescimento apresentavam menor frequência de macrófagos ou com anormalidade (POLLARD, 2009). Assim como para monócitos, alguns fatores de transcrição como PU1, Spl1 exercem interferência direta na frequência de macrófagos CD11b⁺ F4/80⁺, tais achados reforçam a importância no entendimento das vias que afetam a produção e a função destas células (SCHULZ et al., 2012).

2.2.2. Perfil celular, classificação e função dos monócitos

Os monócitos compõem uma das células de defesa do sistema fagocítico mononuclear, componente da resposta imune inata. Correspondem à derivados leucocitários da medula óssea e que é encontrado na circulação sanguínea ou em alguns órgãos linfóides como o baço, um grande reservatório de monócitos (SWIRSKI et al., 2009). Seus receptores de reconhecimento padrão conferem a estas células a capacidade de fagocitose e de apresentação de antígenos além de produção de quimiocinas na circulação sanguínea. Além disso, sua capacidade de se diferenciar em macrófagos e/ou células dendríticas quando são recrutados para os tecidos frente a um estímulo antigênico ou inflamatório traz a esta célula uma plasticidade interessante no entendimento de processos patológicos associados ao sistema imune (CHIU; BHARAT, 2016).

Já é estabelecido na literatura dois tipos principais de monócitos, tanto em murinos como em humanos que são subdivididos em (1) monócitos inflamatório clássicos (de perfil Ly6C high CCR2+ em camundongos e de perfil CD14+ CD16-CCR2+ equivalente em humanos; e os (2) monócitos não clássicos ou de patrulha (Ly6C low CX3CR1 high em camundongos e CD14 dimCD16+ CX3CR1 high em humanos (MITCHELL; ROEDIGER; WENINGER, 2014). Sua forma clássica é resultado da proliferação que acontece ainda na medula óssea e ao ser liberado na circulação sanguínea passa a ser circulante dependente de CCR2 (SERBINA; PAMER, 2006). Num caso de processo infeccioso, esses monócitos são atraídos por quimiocinas até o sítio inflamatório e lá desempenham podem se diferenciar em macrófagos ou células dendríticas derivadas de monócitos. No caso dos monócitos não clássicos, estes foram descritos como células rastejantes do endotélio que apresentam sua função associada a sobrevivência das células do lúmen endotelial, fagocitose de células do endotélio danificadas assim como participante do recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório (CARLIN et al., 2013a).

Em modelos murinos é possível distinguir monócitos pró-inflamatórios pela sua expressão de Ly6c. Assim sendo, monócitos com uma função pró-inflamatória são caracterizados como Ly6c high CCR2 high CX3CR1low. Esses monócitos possuem habilidades importantes de transportar partículas antigênicas até os linfonodos ou caso sejam acumulados no sítio inflamatório podem se diferenciar em macrófagos totalmente diferenciados ou células dendríticas dependendo do estímulo presente no ambiente (GEISSMANN; JUNG; LITTMAN, 2003; JAKUBZICK et al., 2013). No caso de monócitos Ly6C low que são mais conhecidos como monócitos de patrulha do endotélio vascular, suas funções são mais envolvidas na resposta inicial a patógenos ou na fase de reparação tecidual.

É válido ressaltar que essa mesma dicotomia é encontrada em monócitos de humanos somente com marcadores específicos diferentes (KRATOFIL; KUBES; DENISET, 2017).

A respeito do desenvolvimento de monócitos, os monócitos clássicos (Ly6C high CCR2+) são derivados de progenitores hematopoiéticos que são progenitores comuns tanto para macrófagos quanto para células dendríticas se sob estímulo de MCSF (ou também CD115) (HETTINGER et al., 2013). Já os monócitos não clássicos ou de linhagem intermediária (Ly6C low) são dependentes do receptor nuclear Nr4a1 (*Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member1*) para não sofrer apoptose e na sua conversão em monócitos do tipo clássico quando recrutado para o sítio inflamatório (CARLIN et al., 2013b; HILGENDORF et al., 2014)

Inúmeros fatores de transcrição têm sido correlacionados extensivamente como fatores de regulação na diferenciação e no desenvolvimento de monócitos como IRF8, PU.1, GATA2 o próprio Nr4a1 entre outros (JOHNSON et al., 2023). Sabendo disso e com resultados mostrando que no caso de células da medula óssea silenciadas para AIF1 consequentemente apresentam redução na expressão de um fator já reconhecido como modulador do desenvolvimento de monócitos levanta ainda mais a hipótese de ligação do AIF1 na regulação do desenvolvimento e diferenciação destas células.

2.2.3. Perfil celular, classificação e função de macrófagos

Os macrófagos são células provenientes de progenitores mielóides e que foram pioneiramente classificadas como parte do sistema de células mononucleares fagocíticas junto com monócitos e células dendríticas (FOGG et al., 2006). Praticamente em todo tecido de organismo vivo são encontrados macrófagos e estes podem ter diferentes nomenclaturas a depender do tecido e localização, como é o caso das células de *Kupffer* no fígado, as células microgliais no cérebro, histiócitos no tecido conjuntivo, entre outros (GINHOUX; GUILLIAMS, 2016; WYNN; CHAWLA; POLLARD, 2013b).

Inúmeros estudos têm evidenciado a heterogeneidade e plasticidade de macrófagos principalmente porque a depender do microambiente gerado ao seu redor, os macrófagos podem possuir um perfil pró-inflamatório, classicamente induzido após ativação via receptores de Toll (TLR) e IFN γ , caracterizando um macrófago (M1). Já o perfil alternativo (M2) pode ser induzido por citocinas como IL-4/IL-13 (M2a) ou por imunocomplexos (M2b)

ou citocinas antinflamatórias como IL-10 ou TGF β (M2c) (BISWAS; MANTOVANI, 2010; GORDON; MARTINEZ, 2010)

Macrófagos derivados de monócitos podem ser identificados em amostras de murinos como CD11b⁺ F4/80⁺ Ly6c low/high (BUTENKO et al., 2020). Macrófagos Ly6C high são derivados dos monócitos de perfil clássico são importantes no processo de inflamação aguda e apresenta uma maior resposta inflamatória. Em contraste, os macrófagos Ly6C low representam um subtipo mais voltado para remodelação tecidual antiinflamatória. É importante ressaltar que há uma conversão do perfil Ly6C high no perfil Ly6C low regulada por fatores de transcrição Nr4a1 e Cebp β (LI et al., 2022).

Já no caso de macrófagos humanos inúmeros fatores de transcrição podem diferenciar os subtipos de macrófagos de acordo com seu perfil de ativação como é o caso de macrófagos M1 caracterizado pela expressão de fatores de transcrição IRF5, CCR7 além de marcadores como CD68 e ou algumas citocinas pró-inflamatórias como TNF α , IL-12 entre outras. Já no caso dos subtipos anti-inflamatórios (M2), estes apresentam alta expressão de IRF4 e alguns marcadores específicos como CD163, CD206, IL-10 (GÜNTNER; ANDERS, 2013; WEI et al., 2023).

Conhecidos como fagócitos profissionais, os macrófagos consistem em uma das principais células da defesa imune inata e dos processos de remodelação tecidual. Além disso, os macrófagos também regulam processos homeostáticos do organismo como angiogênese, homeostase metabólica entre outros. Apesar disso, entender o balanço entre essas funções e a regulação de fatores que levam a subverter essas funções de macrófagos para condições de doença agudas ou crônicas é necessário para controle eficiente de diversas patologias(WYNN; CHAWLA; POLLARD, 2013c).

2.2.4. O papel de monócitos e macrófagos na resposta contra patógenos

O processo inflamatório corresponde a um processo natural de reação após alguma situação que rompe a barreira homeostática do organismo. Quando o processo agudo se inicia, inúmeras células do sistema imune, principalmente da resposta imune inata, começam a tentar impedir que aquele agente invasor leve a alguma condição patológica ao organismo, nesse momento que genes são ativados após reconhecimento de antígeno por receptores e cascatas de sinalização são seguidas do citoplasma celular ao núcleo gerando produtos como reativos de oxigênio, quimiocinas, citocinas e outros produtos necessários para conter os mais

diversos tipos antígenos reconhecidos (SINGH et al., 2019). No entanto, em caso de persistência do processo inflamatório e sua cronificação esse processo se torna patológico e está relacionado a diversos prognósticos fatais como é o caso de doenças cardiovasculares, câncer, diabetes, artrite, doença de Alzheimer entre outros (AGGARWAL, 2004; LASKIN et al., 2011).

Dentro dos protagonistas do processo inflamatório temos o sistema fagocítico representado por monócitos, macrófagos e células dendríticas (VAN FURTH; COHN, 1968). Estas células que derivam de um mesmo progenitor comum na medula óssea possuem papéis diferentes, porém complementares em todo o processo inflamatório. Quando algum tecido sofre dano ou injúria seja por patógeno ou algum outro processo físico, mecânico ou químico, monócitos circulantes (Ly6C + em camundongos) são recrutados para o sítio inflamatório atraídos por quimioquinas (GEISSMANN et al., 2010b).

Nos tecidos, esses monócitos passam por um processo de diferenciação celular para então se tornar o que já é bem estabelecido como macrófagos derivados de monócitos ou uma célula dendrítica de perfil mais inflamatório. A depender do microambiente gerado pelo processo inflamatório, os monócitos se diferenciam nas células necessárias para a linhagem pró-inflamatória ou anti-inflamatória. No geral, monócitos são induzidos a diferenciação de macrófagos por exposição a M-CSF. Em adição a esse estímulo, em caso de por exemplo infecção por LPS de bactéria ou IFN γ os macrófagos gerados serão de perfil M1 enquanto a presença de IL-4 no sítio inflamatório levará a uma diferenciação para o tipo M2 (MARTINEZ et al., 2008; MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009; STEIN et al., 1992). É importante notar que durante todo e qualquer processo de diferenciação celular inúmeras cascatas de sinalização são moduladas e genes e fatores de transcrição são imprescindíveis para a diferenciação ser completa.

No caso por exemplo de um processo alérgico asmático, o complexo inflamatório gerado nos alvéolos de forma crônica gera uma resposta linfocitária do tipo Th2 levando a mastócitos, eosinófilos e macrófagos pulmonares a um estímulo anti-inflamatório com altos níveis de IL-4, IL-13 e IL-33 o que implica no agravamento ainda maior da asma (GORDON, 2003). Já em casos de falência renal aguda, a ativação das células imune padrões de dano molecular (DAMPs) um estímulo pró-inflamatório gerado pelas células teciduais iniciam o processo inflamatório e recrutam células circulantes a partir da expressão de CCR2 para melhor controle da inflamação. Nesse caso, os macrófagos derivados de monócitos contribuem com a disfunção no endotélio vascular gerando uma disfunção extra-hepática no órgão (TRIANTAFYLLOU et al., 2018).

Apesar disso, alguns estudos mostram resultados onde em caso de animais com depleção de macrófagos alveolares, estes apresentavam prognóstico de hipóxia fatal (SCHNEIDER et al., 2014) e resultados similares em casos de infecção pelo vírus influenza do tipo H1N1, em amostras de porcos com depleção de macrófagos alveolares obtiveram taxa de mortalidade 40% maior por severidade dos sintomas respiratórios (KIM et al., 2008). No caso da COVID-19 uma doença viral caracterizada por uma tempestade de citocinas que leva a um grau de severidade aos pacientes acometidos, os macrófagos foram as principais células a induzir elevadas expressões de citocinas pró-inflamatórias. Ademais, nesses casos, ao isolar células de pacientes com prognóstico grave de COVID-19 foi possível observar que houve uma proliferação aumentada de monócitos, porém imaturos o que chamou atenção para a atuação da mielopoiese em casos patológicos (KNOLL; SCHULTZE; SCHULTE-SCHREPPING, 2021; SCHULTZE; MASS; SCHLITZER, 2019).

Em um estudo realizado com células dendríticas derivadas de monócitos (Ly6C⁺ CCR2⁺ CD11c^{high}) apresentaram alta taxa de proliferação de *L.major* e sua frequência aumentada foi comprovada pela alta expressão de células com esse perfil de marcadores (HEYDE et al., 2018a). Ainda sobre a infecção com *L.major*, tanto monócitos murinos como monócitos humanos foram mais permissivos a infecção na fase aguda porém apesar de inicialmente servir como ambiente propício para multiplicação do parasita, numa fase tempo dependente foi demonstrado uma função efetora dessas células na produção de reativos de oxigênio, aumento da expressão de iNOS e controle mais eficaz do parasito (ROMANO et al., 2017). Num outro estudo realizado com *T.gondii*, após infecção oral com cepa não letal do parasito foi demonstrado um aumento significativo de células Ly6C⁺ Ly6G⁻ F4/80⁺ CD11b⁺ CD11c⁻ nas fases iniciais da infecção. No entanto, se estas células são depletadas a infiltração de neutrófilos acaba causando necrose e dano tecidual o que mostra a importância dessa célula no microambiente inflamatório (DUNAY et al., 2008).

Todos esses achados apontam para a lacuna existente sobre o real papel dessas células no contexto das doenças infecciosas e parasitárias e entender mecanismos que modulem suas respostas podem representar um caminho para o controle mais efetivo de doenças ou mesmo formulação de inibidores que auxiliem o controle de patógenos.

2.3. Aspectos imunológicos da Leishmaniose

As leishmanioses são antroponoses causadas pela infecção com protozoários digenéticos da família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania*. Possui um largo espectro

clínico, variando desde formas tegumentares a uma forma visceral, e caracteriza-se como um agravo importante para a saúde pública devido à sua alta prevalência e endemicidade (BRASIL, 2017). Há entre 12 e 15 milhões de infectados no mundo, com 30.000 mortes por leishmanioses anualmente. Além disso, estima-se um milhão de novos casos e 350 milhões com risco de acometimento da doença (ALVAR et al., 2012). Em uma análise espacial da leishmaniose no estado de Sergipe, no período de 2010 a 2015 o número de casos da forma tegumentar (LT) foram de 37 casos enquanto o número da forma visceral (LV) chegou a 382 casos confirmados, sendo o município de Aracaju o que abrange mais de 90% dos casos registrados (n= 356) (ARAÚJO, 2017; RIBEIRO et al., 2021).

No meio do espectro, a forma tegumentar (LT) representa a forma clínica mais frequente. Na LT, a imunidade celular está preservada, o que pode ser verificado pela positividade ao teste cutâneo com *Leishmania* Intradermoreação de Montenegro (IDRM) e de outros testes *in vitro*, tais como a proliferação celular e a produção de IFN- γ em culturas de células mononucleares de sangue periférico estimuladas com antígenos. Por seu caráter ser espectral, algumas pessoas podem se infectar sem desenvolver doença (assintomáticos), como é o caso dos indivíduos positivos ao teste de Montenegro (DTH+), mas sem história de LT e sem cicatrizes compatíveis (BRASIL, 2017). A LT é uma doença relativamente benigna e, alguns dos casos, resolve-se após alguns meses, até mesmo sem tratamento. No entanto, algumas espécies do novo mundo, a exemplo de *L. braziliensis*, podem atingir a mucosa (LM) ou desenvolver uma forma mucocutânea (LMC), onde há grande destruição do septo nasal, palato mole e laringe, podendo comprometer significativamente a qualidade de vida do paciente, afetando desde a alimentação podendo até levar a extensa desfiguração do nariz. Ademais, a *L. amazonensis* também possui a capacidade de produzir formas mais graves da doença como a leishmaniose disseminada (LD), a leishmaniose cutânea difusa (LCD) e até a alguns casos de leishmaniose visceral (LV) (ALVAR et al., 2012; BRASIL, 2017; GOTO; LAULETTA LINDOSO, 2012)

A resposta imune manifestada na forma mucosa (LM) é caracterizada pelo exagero das respostas celulares e pela escassez de parasitos. A IDRM geralmente apresenta-se fortemente positiva, significativamente superior à observada na LT e ocasionalmente com flictenas e/ou necrose. A resposta proliferativa e a produção de IFN- γ e TNF- α estimuladas por antígenos também são significativamente maiores do que as observadas na LT. Esta resposta exacerbada do tipo 1 promove destruição de tecido onde houver depósito de partículas antigênicas, uma produção relativamente baixa de IL-10, além também da diminuição da expressão nas biópsias das lesões de LM do receptor de IL-10, quando

comparada à LCL (FARIA et al., 2015). Na leishmaniose cutânea difusa (LCD) existe uma anergia (ausência de resposta celular específica), e está associada à acentuada proliferação dos parasitos e à disseminação da infecção, mesmo em pacientes sem causas conhecidas de imunodeficiência. Apesar desta ausência de resposta, os níveis de anticorpos circulantes são altos e o perfil de citocinas da resposta imune nestes casos é predominantemente de perfil anti-inflamatório (Th2), com baixa produção de IFN- γ e níveis altos de IL-10 (BRASIL, 2017).

Referente à Leishmaniose Visceral (LV), o período de incubação é bastante variável, mas geralmente permeia entre 6 meses e 2 anos. A maioria dos casos no novo mundo é causado por *L. infantum*, porém há relato de casos causados por *L. amazonensis*. O quadro clínico consiste em febre prolongada, perda de peso, hepatoesplenomegalia e pancitopenia e se deve à infiltração do parasito nas células da medula óssea, do fígado e baço. Além disso, há liberação de diversas citocinas inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-6, principais causadoras da febre e perda de peso, e citocinas reguladoras e anti-inflamatórias, como a IL-10 e IL-27, que causam imunossupressão da resposta celular específica a antígenos do parasito o que caracteriza essa forma como uma das formas mais graves da leishmaniose e que apresenta as maiores taxas de mortalidade (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012).

O macrófago é a célula alvo da maioria dos parasitos intracelulares, incluindo entre eles os parasitos do gênero *Leishmania*. Essa célula, a depender do seu fenótipo de ativação, pode se tornar um local propenso à multiplicação de amastigotas ou pode controlar a infecção (LIU; UZONNA, 2012). Estudos têm demonstrado a importância das citocinas do perfil Th1, principalmente IL-12 e IFN- γ , para a ativação de macrófagos do tipo M1 e produção de reativos de oxigênio (EROS) e nitrogênio (óxido nítrico – NO) o que torna possível o controle da infecção por *Leishmania*. No caso da resposta Th2 (anti-inflamatória), a IL-10 é apontada como principal citocina responsável pelo estado anérgico dos macrófagos (fenótipo M2), que compromete diretamente no controle do parasitismo (DOS SANTOS et al., 2016).

De maneira geral, quando as promastigotas são introduzidas na pele, encontram neste local algumas células do sistema imune (linfócitos T e B, macrófagos residentes, células de Langerhans e mastócitos). Por um mecanismo ainda não totalmente esclarecido, envolvendo receptores e ligantes em ambas as superfícies, o parasito adere-se à superfície dos macrófagos e células de Langerhans passando para o meio intracelular por meio de um processo de fagocitose mediada por receptores. Nos macrófagos, os parasitos internalizados ficam dentro de um vacúolo parasitóforo (fagolisossoma), que os separa do citoplasma celular. Para

sobreviver neste ambiente potencialmente tóxico, os parasitos passam por transformações químicas e estruturais para assumir sua forma amastigota para se multiplicar até a ruptura da célula, quando são liberadas para infectar outros macrófagos, propagando a infecção. Aquelas formas promastigotas que não forem internalizadas serão destruídas no meio extracelular por outras células da resposta inata, e as partículas antigênicas produzidas neste processo também poderão ser utilizadas pelas células apresentadoras de antígeno no processo de reconhecimento antigênico. É provavelmente neste momento que características como intensidade e qualidade da resposta imune são definidas, influenciando assim a evolução da doença para cura espontânea, formas autolimitadas ou formas progressivas(WHEELER; GLUENZ; GULL, 2011).

2.4.Aspectos genéticos na Leishmaniose

Na última década, vários estudos avaliando polimorfismos de parasitos e de hospedeiros demonstraram que fatores genéticos de ambos podem estar associados a diferentes formas clínicas, revelando biomarcadores relevantes para a compreensão da patogênese da doença (HIPPIÓLITO et al., 2019; RÊGO et al., 2019). Em estudo realizado por Buates e Matlashewski, 2001, avaliou pela primeira vez as mudanças globais na expressão gênica causada pela infecção por *Leishmania donovani* e mostrou que este parasito per si é capaz de reduzir em cerca de 37% a expressão de alguns genes associados à cascata de ativação inflamatória e aumentar a expressão do RNA mensageiro de MIPs (fator de ativação de macrófagos inflamatórios) o que pode ser correlacionado com maiores taxas de infecção (BUATES; MATLASHEWSKI, 2001). Já um outro estudo realizado com isolados de cepas da *Leishmania braziliensis* de diferentes apresentações clínicas de pacientes com LT mostrou que a infecção pode causar uma redução na expressão em fatores de transcrição associados aos receptores do tipo Toll (*TLR*) e outras citocinas que em conjunto levam o macrófago a um estado anérgico e consequentemente favorece a infecção (SOUSA et al., 2018)

Ademais, é importante ressaltar que cada uma das etapas que compõem a resposta imune pode ser afetada por polimorfismos genéticos, principalmente nas variações que afetam apenas um dos pares de base, chamados de Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos (SNPs), os quais induzem no indivíduo uma maior ou menor susceptibilidade às doenças e variações no comportamento clínico e resposta terapêutica (WILSON; STREIT, 1996). Um estudo realizado na Venezuela demonstrou uma associação entre um alelo na posição -308

(alelo 2) que determina maior produção TNF- α e um polimorfismo do gene do TNF- α com o desenvolvimento de LM (CABRERA et al., 1995). Esse mesmo polimorfismo foi também associado a LV em outro estudo realizado em Natal, Rio Grande do Norte, Brasil (PEACOCK et al., 2007).

Segundo um estudo realizado na área endêmica de Corte de Pedra-BA, na tentativa de identificar a contribuição de fatores genéticos do hospedeiro no curso clínico da leishmaniose tegumentar, demonstrou uma agregação de casos de LC e LM em famílias por meio da análise estatística de cluster, sugerindo a participação de componentes ambientais ou genéticos comuns na determinação dessas formas clínicas da doença (CASTELLUCCI et al., 2014). Outro estudo que avaliou polimorfismos utilizando testes de associação familiar para o alelo C da IL6 (-174 G/C) mostrou que este alelo está mais frequente na forma mucosa (forma mais grave da doença), além desse, pode ser observado também uma alta frequência do alelo G de MCP-1 (-2518 A/G) (CASTELLUCCI et al., 2006). No caso da LV, Frade e colaboradores, em 2011, encontraram a elevada frequência do alelo T do TGF β 1 (-509) o que conferia um risco duas vezes maior do acometimento da doença e que possuiu associação positiva com a frequência de hemorragia (FRADE et al., 2011). Esses dados demonstram a importância na continuidade das avaliações genéticas e funcionais de variados marcadores da resposta imune a infecção por parasitos *Leishmania*, principalmente naqueles marcadores recentemente descobertos e com papel ainda pouco esclarecidos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel do gene *Allograft Inflammatory Factor 1* (AIF1) no desenvolvimento de macrófagos no desfecho da leishmaniose visceral.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Compreender a participação do AIF1 na resposta imune de macrófagos contra a parasitos *Leishmania*;

Hipótese: O AIF1, devido ao seu caráter inflamatório, participa na ativação da via pró-inflamatória em macrófagos que auxiliam no combate efetivo da infecção sendo indispensável no controle eficiente de parasitos intracelulares como Leishmania.

- II. Avaliar o papel do AIF1 no desenvolvimento de monócitos e macrófagos em modelos murinos com deleção condicional do AIF1 em células progenitoras da medula óssea;

Hipótese: A deleção condicional do AIF1 células tronco hematopoiéticas compromete o desenvolvimento celular de monócitos e macrófagos derivados de progenitores mieloides.

- III. Avaliar frequência de polimorfismos genéticos para o gene AIF1 em amostras de pacientes com diagnóstico leishmaniose visceral e controles endêmicos;

Hipótese: A presença de polimorfismos genéticos do AIF1 associados a casos da leishmaniose visceral comparados com os controles endêmicos confirmam o importante papel deste gene na resposta modulada por este parasito.

4. METODOLOGIA

4.1. MODELOS ANIMAIS

Para os ensaios *in vivo* que avaliaram o efeito da infecção por *leishmania* na cascata de diferenciação de macrófagos foram utilizados modelos murinos selvagens do tipo C57BL/6 (*The Jackson Laboratory/ Bar Harbor, ME*), ambos os gêneros, com média de idade entre 8 e 12 semanas. Esses camundongos foram desafiados com a infecção pela espécie *Leishmania donovani* injetadas de forma intravenosa. Após transcorridos 07-14 dias de infecção os animais foram eutanasiados conforme protocolo pré-estabelecido e aprovado para coleta de amostras de baço para avaliação dos marcadores celulares de macrófagos e monócitos.

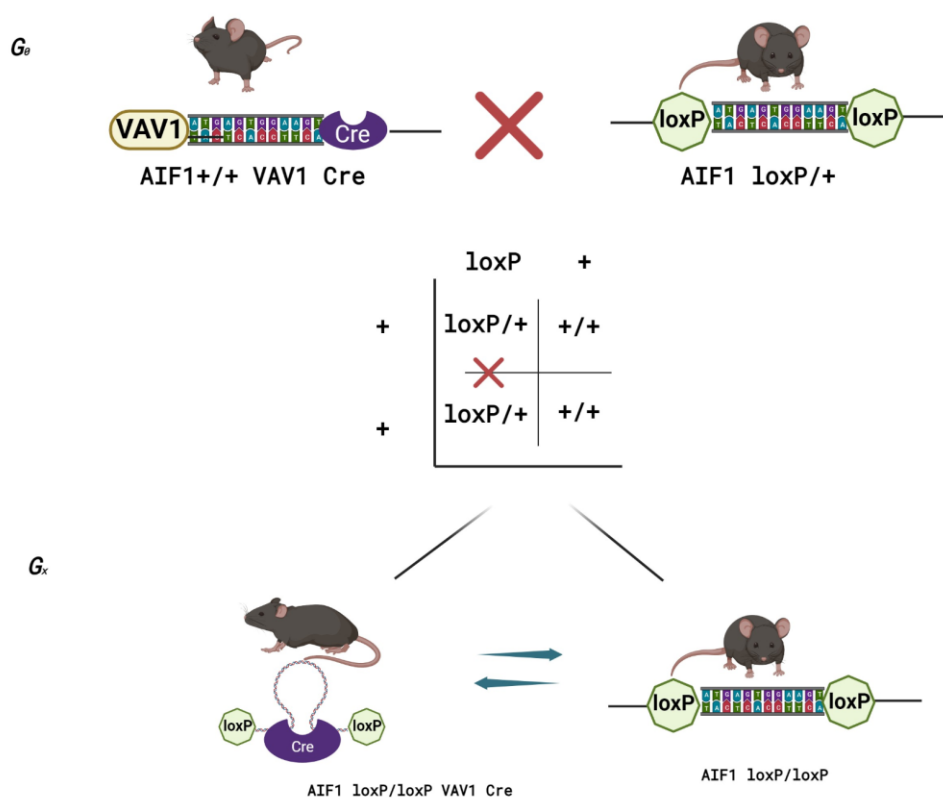
Para os estudos *in vitro*, modelos de camundongo também do tipo C57BL/6 foram sacrificados e foram coletadas células da medula óssea do fêmur e tíbia. Para a remoção de debris celulares foi utilizado separação por gravidade via filtro com 70µm de nylon e as células ressuspensas e cultivadas em meio RPMI (*Thermo Fisher; Grand Island NY*) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal inativado (*SBF, Gibco*) e 100ul de antibióticos (penicilina e estreptomicina (*Gibco*)).

Modelos murinos C57BL/6 com deleção condicional do gene AIF1 especificamente em células tronco da medula óssea foram gerados em laboratórios especializados a partir de técnicas moleculares e estratégias de acasalamento. Inicialmente é necessário a determinação do transcrito do gene alvo que será deletado, a partir daí é traçada estratégia de recombinação desse transcrito com a sequência loxP (*locus of x-over, P1*), o qual consiste num fragmento de DNA com cerca de 34 pares de base que tem a capacidade de mediar a deleção de um gene a partir da inserção de pelo menos duas regiões loxP gerando assim um modelo animal com o gene de interesse flanqueado (*floxed*). Para prosseguir com a deleção do gene em um tipo celular específico (deleção condicional) é necessário também selecionar um gene promotor que caracterize esta célula. A partir disso é gerado um outro modelo que possui a região promotora alvo escolhida associada a enzima bacteriófaga *cre recombinase* que têm a função de catalisar por inversão ou translocação o gene alvo entre duas regiões loxP (KIM et al., 2018).

Nesse estudo, modelos murinos C57BL/6 foram submetidos a transfecção de células germinativas com clones selecionados positivamente, com plasmídeos bacterianos com resistência antibiótica específica, gerando pelo menos um animal com região do gene alvo

(AIF1) flanqueado com duas regiões loxP os quais são recombinados com acasalamento estratégico até a geração de um modelo animal AIF1 floxed. Seguindo, para deleção específica em células progenitoras da medula óssea, foi então adquirido um outro modelo animal que apresenta a enzima cre recombinase ligada a uma região promotora do fator de transcrição VAV1. VAV1 é fisiologicamente ativo exclusivamente das células hematopoiéticas e sua atividade controlada pelo fator de modificação de nucleotídeo guanina (GEF- Guanine Nucleotide Exchange Factors) (JUX et al., 2013)

Sendo assim, a partir da realização de sucessivos cruzamentos entre as duas linhagens foi produzido filhotes homozigotos que apresentam anulação da expressão do AIF1 nas células hematopoiéticas da medula óssea. Com esse modelo foram realizadas análises *ex vivo* avaliando o papel específico desse gene no desenvolvimento de macrófagos e monócitos (Figura 03).



Created with BioRender.com

Fig. 06. Geração de modelo “knockout” para AIF1 em células progenitoras mieloides.

Modelos murinos C57BL/6 foram gerados por técnicas de biotecnologia molecular em laboratórios especializados para gerar um modelo com o alelo para o gene AIF1 flanqueado por duas regiões loxP (Taconic Biosciences). Um outro modelo foi gerado com a enzima cre recombinase ligada à região promotora que codifica o fator de transcrição VAV1 expresso em toda e qualquer célula progenitora mielóide da medula óssea (Jackson Laboratory). Após o cruzamento de ambos (G0), por regra

mendeliana básica, camundongos com genótipo de interesse são submetidos a sucessivos acasalamentos estratégicos (Gx) a fim de gerar camundongos que expressam o gene alvo flanqueado condicionalmente nas células de interesse (AIF1 flox VAV1 iCre) os quais são então utilizados no estudo para manutenção da colônia e para compor os grupos experimentais sendo então comparados com camundongos de mesma ninhada que não expressam a cre recombinase (AIF1 flox).

A estratégia de acasalamento portanto segue a linha da lei de Mendel básica para que seja mantido o genótipo de interesse. Para isso, os filhotes gerados das gaiolas de acasalamento, no período de desmame (21 dias após nascimento) são submetidos a coleta de amostra para genotipagem a partir de fragmentos da cauda. Dessa amostra então é extraído DNA genômico que é amplificado por reação de PCR convencional e analisado utilizando gel de agarose corado com brometo de etídio. É válido ressaltar que todos os animais são mantidos em biotérios com instalações específicas para o cuidado com animais de pesquisa. Além disso, todo e qualquer procedimento é realizado seguindo protocolo aprovado por órgãos de regulamento ético específico da instituição.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

Pacientes diagnosticados com Leishmaniose Visceral pelo centro de referência de tratamento no HU-UFS foram recrutados para coleta de amostra de sangue por veia periférica para posterior extração de DNA genômico. Como controles foram recrutados indivíduos que residam na mesma área ou residência do paciente caso, porém que não apresentam sintomas da doença e que apresentaram teste de Montenegro positivo após reação à injeção via intradérmica de antígenos solúveis da *Leishmania*.

Os pacientes sintomáticos foram então categorizados de acordo com a severidade da doença com base em critérios como o número da contagem de plaquetas menor que $50.000/\text{mm}^3$, sangramento espontâneo, infecções bacterianas, contagem de neutrófilos abaixo de $500/\text{mm}^3$, dispnéia e icterícia (SAMPAIO *et al*, 2019). Os critérios de inclusão correspondiam a confirmação do diagnóstico de Leishmaniose Visceral após a punção de líquido aspirado da medula óssea e observação e contagem de cultura positiva com presença de parasitas leishmania em meio de cultura NNN (Sigma-Aldrich) ou teste sorológico rK39 positivo (KalazarDetect Rapid Test: InBios International Inc). Foram excluídos do trabalho pacientes em processo de gestação ou com coadocimento por doenças que podem interferir na resposta imune à Leishmaniose como Hanseníase, HIV, HTLV-1.

4.3.ISOLAMENTO DE MONÓCITOS E MACRÓFAGOS

Para o isolamento partindo de progenitores mielóide, células da medula óssea de camundongos selvagens C57BL/6 foram extraídas e cultivadas sob estímulo de citocina M-CSF (*Macrophage colony-stimulating factor*, *CSF1*) na concentração de 20ng/ml ou equivalente estímulo utilizando sobrenadante de células de linhagem do tipo L929. Após 06 dias de cultura essas células em incubadora sob condições controladas, o isolamento celular foi confirmado via citometria de fluxo para marcadores de macrófagos (CD11b+F4/80+CD115+Ly6C/G neg CD11C neg) e de monócitos (CD11b+CD115+LY6C+).

Já no caso de células totalmente diferenciadas presentes no baço, as células foram isoladas a partir de técnica conhecida como “*cell sorting*” utilizando equipamento de citometria especializado (BD FACSJazz, BD Biosciences), a qual consiste em separar as células selecionadas a partir da marcação com anticorpos que identificam as células de interesse. Nessa etapa, o baço foi extraído e as células passaram por processo de dissociação (GentleMACS dissociator/Miltenyi), lise de células vermelhas do sangue, filtração de debris celulares e por fim a marcação das células com marcadores de monócitos (CD11b hi, Ly6C/G+, CD115+, MHC II neg /BD Biolegend), e para macrófagos (CD11b low, Ly6C/G neg, F4/80+, MHCII+/ BD Biolegend).

4.4.INFEÇÃO POR *LEISHMANIA DONOVANI*

Cepas de *Leishmania donovani* (cepa MHOM/IN/80/DD8) foram utilizadas para realizar estudos *in vivo* e infecções *in vitro*. Para promover crescimento e expansão da cepa elas foram inoculadas em meio NNN (*Novy, Mac Neal and Nicole*) junto com meio de cultura específico (*Schneider's Insect Medium*, *Thermo Fisher*) suplementado com 10% de SBF e 1% de solução antibiótica (penicilina/estreptomicina). A cepa expandida foi estocada sob refrigeração à -80°C e quando em uso eram expandidas e cultivadas no meio de cultura suplementado em incubadora à 24°C.

Para a infecção *in vivo* foram utilizados parasitas em sua fase estacionária de crescimento 10⁶ diluídos em 200µl de solução salina aquecida à 37°C injetados em veia da cauda do camundongo. O grupo controle recebeu apenas somente a solução salina aquecida pela mesma via. No caso dos estudos *in vitro* os monócitos e macrófagos que foram isolados da medula óssea foram infectados com as promastigotas da *leishmania* na proporção (5

parasitas para cada macrófago, 5:1) e incubados por um período de 48 a 72 horas onde as células foram preparadas para a respectiva análise a ser conduzida. Vale destacar que em alguns experimentos, os parasitos *Leishmania* também foram marcados com um marcador fluorescente *Cell Tracker* (Thermo Fisher) o que permite avaliar a carga parasitária das células avaliando a população *Cell Tracker*+ nas células infectadas via citometria de Fluxo ou por meio de técnica molecular de PCR em tempo real modificada como publicado por Weirather e colaboradores, 2014 (WEIRATHER et al., 2011).

4.5.CITOMETRIA DE FLUXO

Para a avaliação das células nos ensaios *in vitro*, as células foram coletadas das placas de cultura utilizando remoção mecânica com *CellScraper*. Já para os ensaios *ex vivo*, os tecidos foram dissociados e mantidos em solução salina. A partir da suspensão de células isoladas do tecido, o meio foi substituído por uma solução de 1mM EDTA em solução salina com o respectivo anticorpo fluorescente utilizado para marcação além dos seus respectivos controles.

Para a marcação de moléculas intracelulares as células foram fixadas utilizando 3% de solução de paraformaldeído e para permeabilizar a célula foi utilizada solução de 0,15% de saponina diluída em solução salina. As células então foram submetidas a análise de fluorescência utilizando o equipamento de citometria de fluxo BD FACSVerse e BD Lyric (BD Biosciences) e a análise dos dados foi feita utilizando o FlowJo v_10.9.0. Todas as estratégias de *gate* para as marcações de AIF1 foram realizadas com a normalização usando seus respectivos controles isotipo.

4.6.SILENCIAMENTO GENÉTICO POR CRISPR CAS9

O sistema de “*knockout*” utilizando CRISPR Cas9 foi gerado para deletar a expressão do gene AIF1 em células da medula óssea e nas células isoladas CD11b+Ly6C/G+CD115+MHCII neg. O plasmídeo para envolver o gene alvo foi criado utilizando o GeneArt CRISPR Nuclease Vector Kit (Thermo Fisher) segundo já publicado por (ELIZONDO et al., 2019). A sequência do gRNA do AIF1 gerando o plasmídeo foi 5’-GCTGAAGAGATTAATTAGAG-3’ (pAIF1). Já o plasmídeo controle foi gerado a partir de sequências aleatórias (pControle).

Esses plasmídeos então foram purificados utilizando o kit PureLink HiPure Plasmid Maxiprep (Thermo Fisher) e MiraCLEAN Endotoxin Removal (Mirus, Madison WI). As

células então foram transfectadas com o plasmídeo do gene alvo (pAIF1) a partir de uma onda de eletricidade nos parâmetros de 230V por 04 milissegundos em 05 pulsos. Essa mesma técnica foi utilizada para a geração de silenciamento do gene AIF1 nas células mediado pela molécula de RNA de interferência na concentração de 0,5nmol. A sequência do RNA de interferência utilizada foi 5'- GGCAAGAGAUCUGCCAUCUUG-3' que foi também submetida a eletroporação com 310V, 10 milissegundos em um único pulso.

4.7.EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-QPCR

Para avaliar o perfil de expressão gênica nas células selecionadas, as células foram extraídas utilizando o reagente Trizol (Thermo Fisher) para extração de RNA. O RNA extraído então foi convertido em uma molécula de fita única de DNA complementar (cDNA) gerada a partir de kit específico utilizando a Enzima Transcriptase Reversa (High Capacity, Thermo Fisher). Para a reação foi utilizado um mix preparado especificamente para a técnica em questão (MasterMix TaqMan Fast Advanced, Cat#4444557) e as sondas utilizadas foram AIF1(Mm00479862_g1), RelB (Mm00485664_m1), ID2 (Mm00711781_m1), IRF8 (Mm00492567_m1), IRF4 (Mm00516434_m1), NR4a1 (Mm01300401_m1), C/EBPb (Mm00843434_m1), KLF4 (Mm00516104_m1), PU.1 (SPIB1; Mm00488140_m1), IL-6 (Mm00446190_m1) e IL-10 (Mm01288386_m1). Para a identificação da *L. donovani* foi utilizada sonda com a sequência (Forward- GCGGTGGCTGGTTTTAGATG, Reverse- TCCAATGAAGCCAAGCCAGT a sequência da sonda CCCATACCACCAAACGCAGCCCA). As amostras foram analisadas no equipamento QuantStudio5 (Thermo Fisher). A análise de expressão foi calculada quantitativamente por meio de método comparativo de ciclos Ct (2-DELTADELTA) e a normalização do gene foi utilizada os genes endógenos GAPDH (Mm99999915_g1) ou BetaActina (Mm0219580_g1).

4.8. EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Para avaliação e quantificação da expressão de proteínas, as células foram submetidas a um processo de lise com solução comercial conhecida como NP-40 buffer suplementada com coquetel de inibidor de protease. As proteínas extraídas no lisado foram então submetidas a corrida de eletroforese utilizando gel com 10% SDS sendo transferido para um papel de nitrocelulose específico utilizando um sistema de transferência semi-seco (*PowerBlotter, Thermo Fisher*). A membrana então foi bloqueada utilizando 5% de leite seco

para evitar ligação de anticorpo de forma inespecífica e posteriormente procedido marcação com anticorpos primário e secundário de acordo com as proteínas do estudo. As bandas contendo proteínas fluorescentes foram detectadas utilizando o equipamento Licor Odyssey (Licor, Lincoln NB) e as imagens analisadas pelo software Image Studio 5.2 (Licor).

4.9. GENOTIPAGEM PARA POLIMORFISMOS DE ÚNICO NUCLEOTÍDEO (SNP)

O DNA genômico foi extraído seguindo protocolo recomendado pelo fabricante do kit de extração PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen). A concentração e pureza do DNA foi medido por meio de espectrofotometria utilizando o Nanodrop (Thermo Fisher) considerando puro DNA genômico com razão 1,80-2,00 na absorbância A260/280). As amostras de DNA então foram avaliadas quanto a presença de amplificação para os polimorfismos de AIF1 já descritos na literatura rs4711274, rs2259571, rs2269475 e rs3132451 utilizando sondas Taqman (Thermo Fisher) por meio de amplificação gênica com aparelho 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems) em corrida padrão.

4.10. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

O baço dos camundongos foram fixados e seccionados por criosecção para assim ser transferido para lâminas contendo L-poly Lysine. Para permeabilização celular necessária para a marcação foi utilizado solução de 0.3% Triton-X e para inibir ligações inespecíficas de anticorpos a amostra foi bloqueada utilizando solução de 0.2% de Albumina Sérica Bovina (BSA). As lâminas crioseccionadas foram então marcadas com os marcadores de macrófagos e monócitos CD11b, CD64, F4/80, AIF1 ou IgG com controles desses marcadores. Para marcação do núcleo celular foi utilizado DAPI e as imagens foram feitas em microscópio de fluorescências FSX100 (Olympus, Waltham MA). A aquisição das imagens e edição foi realizada utilizando software *ImageJ* (Rasband, W.S., ImageJ, U.S National Institutes of Health- NIH) e FlowJo (Flow Jo LLC; Ashland, OR).

4.11. PERFIL DE CITOCINAS NO SOBRENADANTE CELULAR POR ELISA

Os sobrenadantes dos ensaios *in vitro* e *ex vivo* de células infectadas e não infectadas foram coletados e refrigerados a -80°C até a realização das dosagens por ELISA. Além disso, soro de animais infectados *in vivo* também foram coletados e seguiram o mesmo protocolo de

acondicionamento. As citocinas analisadas em ambas as amostras foram IL-6 e TNFalfa por Kit de dosagem específica.

4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para realização dos testes estatísticos foi utilizado o software GraphPad Prism v8.0 (GraphPad Software, La Jolla CA). O teste “*t-student*” foi utilizado com amostras bicaudal para avaliar diferenças significativas entre os dois grupos. As margens de desvio padrão das barras dos gráficos foram indicados considerando significantes valores $<0.05^*$, $<0.01^{**}$ e NS como não significante.

Para as análises de polimorfismos foram utilizados cinco modelos genéticos de comparação: codominante, dominante, recessivo, superdominante e log-additive. Estes foram analisados utilizando cálculo de regressão logística univariada via SNPassoc relacionado a associação de cada locus com os diferentes resultados como é realizado em estudos de caso-controle. Dados significantes foram considerados quando $p \leq 0.05$ e a seleção dos modelos genéticos seguiram os critérios da *Akaike Information Criterion* (AIC).

5. RESULTADOS

5.1. Macrófagos e monócitos do baço de camundongos selvagem expressam AIF1

A partir da microscopia do baço de camundongos foi possível demonstrar colocalização dos marcadores celulares de monócitos e macrófagos (CD11b+ e F4/80+) com a expressão do AIF1 (Fig. 3A). Quantitativamente, a coexpressão do AIF1 nos grupos celulares do baço foram 47.4% nas células CD11b+ e 29.3% nas células F4/80+ (Fig. 3B). Corroborando os dados anteriores ao se dissociar o baço para uma solução de células e proceder com a marcação para AIF1 e avaliar sua coexpressão junto aos marcadores celulares já citados foi possível notar coexpressão do AIF1 principalmente nos macrófagos do baço os quais apresentaram marcação CD11b *low* or *neg*/ F4/80+ CD68+ (Fig. 3C).

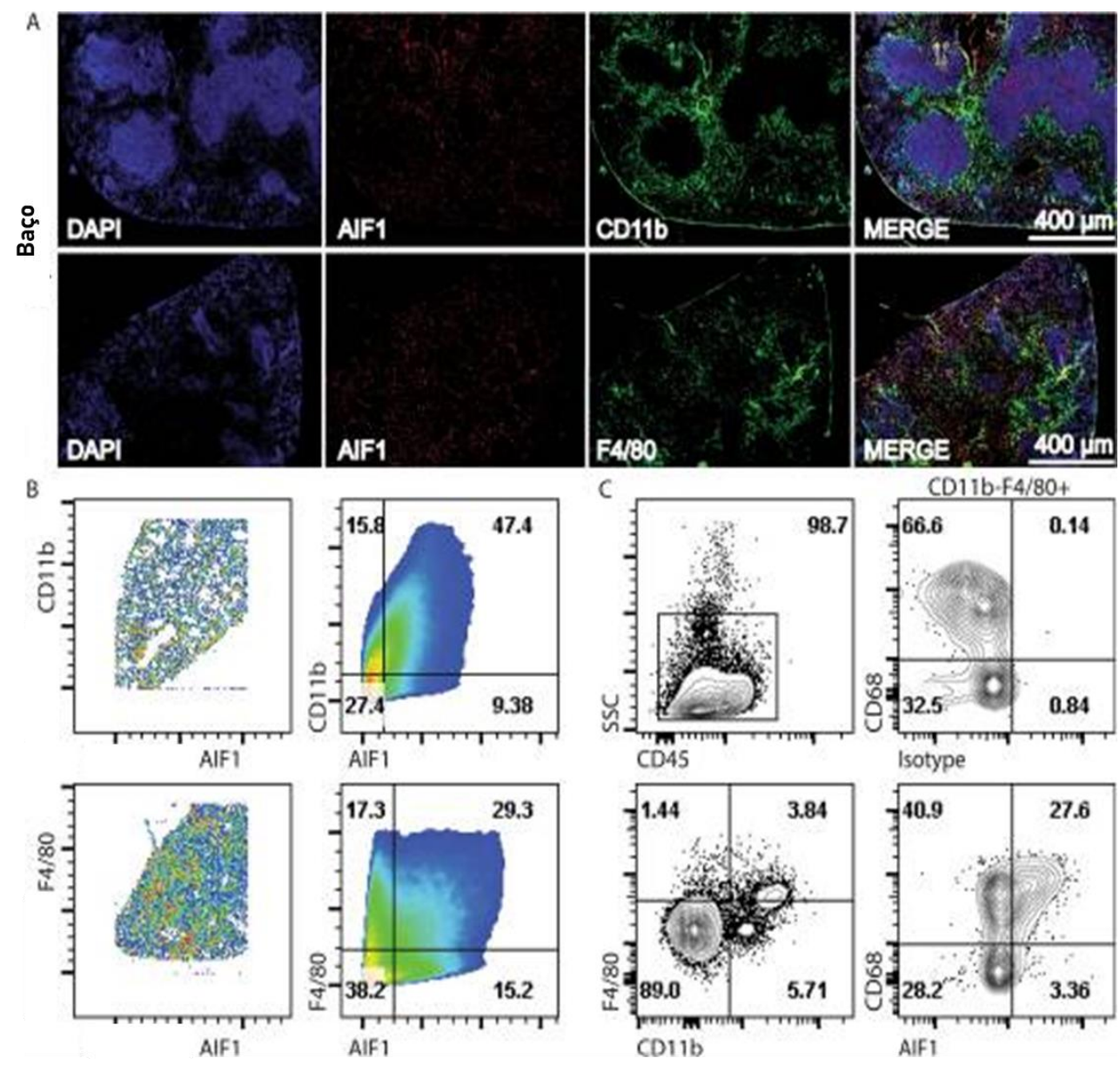


Figura 03. Macrófagos teciduais derivados de monócitos expressam AIF1. Lâminas crio seccionadas do baço de camundongos WT C57BL6 (n=6) foram preparadas com fins de avaliar a expressão de AIF1 nas células utilizando microscopia de fluorescência e citometria de fluxo. **(A)** Os tecidos foram crio seccionados com uma espessura de 16 µm e marcados com anticorpos fluorescentes conjugados para os marcadores CD11b ou F4/80 junto com AIF1. Para coloração do núcleo celular foi utilizado corante DAPI. As imagens foram adquiridas por método padrão de microscopia de fluorescência e apresentadas sob uma ampliação de imagem de 4x. Os dados de microscopia representam dois experimentos independentes com um total de dois camundongos. A escala de barra representa 400µm. **(B)** As imagens foram posteriormente analisadas pelo software FlowJo para dados quantitativos. A colocalização da intensidade dos marcadores celulares com o AIF1 foi gerado. **(C)** Na análise por citometria de fluxo, o baço foi dissociado e as células submetidas a marcação com anticorpos para CD11b, CD68, F4/80, CD45 e AIF1. As células então foram analisadas comparando a expressão de AIF1 e CD68 nas células CD11b negativas F4/80+. Os dados de citometria correspondem a 04 experimentos independentes.

5.2. Infecção por *Leishmania* diminui a expressão de AIF1 em macrófagos do baço de camundongos selvagem

Para avaliar se a expressão de AIF1 é alterada durante a infecção por *Leishmania*, camundongos selvagens foram desafiados com cepa de *L.donovani* por via intravenosa. Após 07 dias de infecção o baço dos camundongos infectados e dos camundongos controle (que receberam apenas solução salina) foram coletados e suas células analisadas por citometria de fluxo. Inicialmente há um aumento da quantidade de células positivas para F4/80 após a infecção e estas células são as células que apresentam predominantemente a expressão do AIF1 principalmente no subtipo F4/80+CD68+CD11b neg/low (Fig. 4A). No entanto, ao analisar a infecção durante período de tempo foi notado que a expressão do AIF1 é reduzida significativamente de 7,98% +/-2.1 para 2.30% +/- 0.6 (Fig. 4 B,C). A infecção também foi confirmada via qPCR (Fig. 4D).

Ao analisar a cinética da infecção junto com a expressão do AIF1 em macrófagos do baço dia após dia por citometria de fluxo através da percentagem de *L.donovani* marcada com *Cell-Tracker* nas células CD68+ F4/80+ revelaram que o aumento na infecção por *L.donovani* é inversamente proporcional à expressão de AIF1 nessas células em comparação com o grupo controle (Fig. 4E). Além disso, vale ressaltar que a multiplicação do parasita junto com a redução da expressão do AIF1 foi notadamente significativa com pico máximo com 09 dias após infecção.

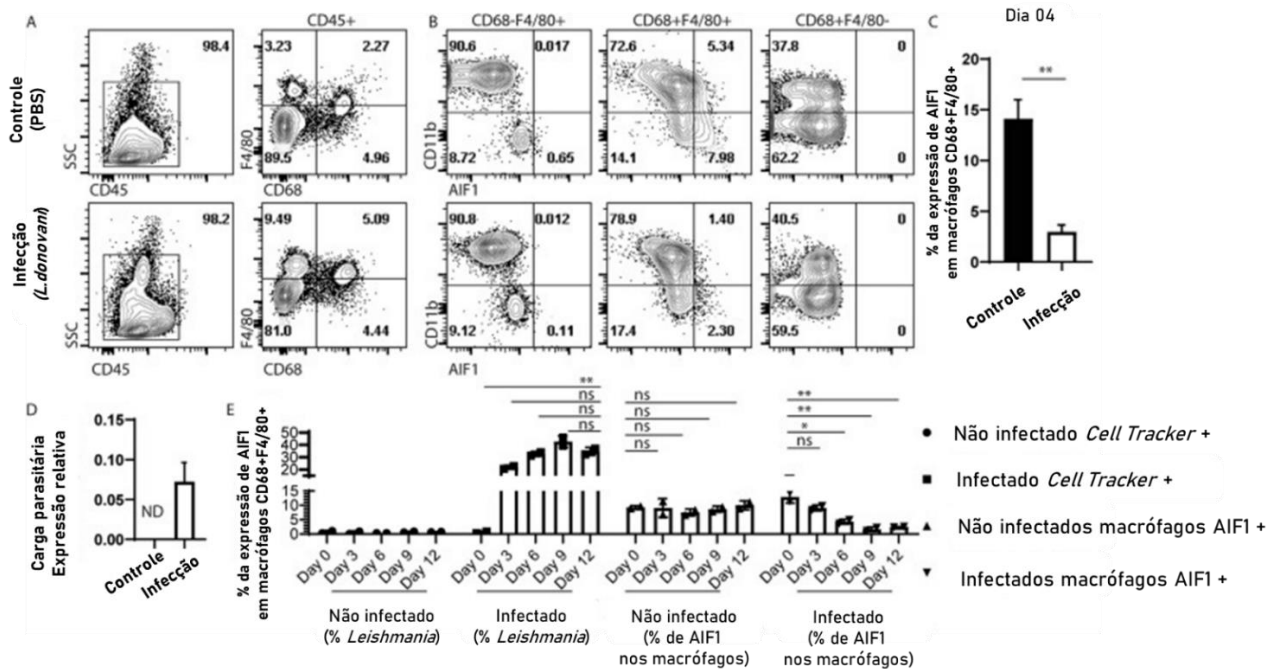


Figura 04. A infecção por *Leishmania* está associada a uma menor quantidade de macrófagos do baço com expressão de AIF1. Camundongos WT C57BL/6 (n=9) foram infectados com promastigotas de *Leishmania donovani* (10^6) injetadas via intravenosa. O grupo controle (n=9) recebeu apenas solução salina (PBS). Após 07 dias da infecção, os camundongos foram eutanasiados e foram coletado o baço dos respectivos grupos, as células foram então dissociadas e marcadas com anticorpos para citometria de fluxo. (A) As células foram separadas no grupo CD45+ para analisar a presença de F4/80 e CD68. (B) A expressão de CD11b e AIF1 foram analisadas com cada quadrante das células F4/80 vs. CD68 tanto no grupo controle como no grupo infecção. Toda a análise foi normalizada utilizando o controle isótipo como parâmetro. (C) A porcentagem da expressão de AIF1 nas células F4/80+CD68+ está apresentada também em gráfico de barras. (D) A carga parasitária entre o grupo controle e o grupo infecção foi mensurada por qPCR em 7 dias após a infecção. Os dados mostram média $\pm$ desvio padrão de 03 experimentos independentes com 03 camundongos por grupo. (E) *Cell Tracker* foi utilizado para marcação da *L. donovani* e foram injetadas nos camundongos C57BL/6 (n=10) e assim procedeu a frequência de macrófagos infectados a cada 03 dias por 02 semanas. Os camundongos controle (n=10) receberam apenas solução salina. A porcentagem de *L. donovani* está determinada pela frequência de *Cell Tracker* nas células CD11b+/- F4/80+ CD68+ comparando grupo controle com grupo infectado. Os dados foram representados por média $\pm$ desvio padrão e representa dados de 02 experimentos independentes com 02 camundongos por grupo. Foi considerado resultado significativo após teste-t não pareado * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e ns= não significativo.

5.3. Expressão ectópica do AIF1 em macrófagos têm efeito antiparasitário e aumenta resistência imune contra *Leishmania*

Os experimentos *in vivo* mostraram uma correlação inversa e significativa entre a infecção por *L. donovani* e a expressão do AIF1, sabendo disso os estudos *in vitro* foram conduzidos para corroborar efeito nas células geradas a partir da medula óssea. Foi possível observar que a expressão do AIF1 é restrita a células específicas de origem mieloide sendo CD11b+ F4/80+ Gr-1- CD11c- (Fig. 5A). Ao analisar a expressão do AIF1 comparando grupo infectado com grupo controle por expressão gênica, a expressão do AIF1 foi significativamente menor no grupo infectado (Fig. 5B) assim como uma redução também na expressão da citocina IL-6 (Fig. 5C).

Em seguida os experimentos foram conduzidos para promover um aumento condicional do AIF1 por meio de uma molécula promotora desse gene e avaliar como esse aumento afeta a infecção

por *L.donovani* (Fig. 5D). Com esses resultados foi possível notar que a superexpressão de AIF1 condicionada em macrófagos reduz a carga parasitária (Figura.4) e restaura a expressão de IL-6 (Fig. 5E). Posteriormente, por análise de transcriptoma revelaram que a superexpressão do AIF1 tem efeitos na expressão de outros genes como inibição da Arg1, aumento de iNOS e TNF α durante a infecção, não foram encontrados efeitos significativos na expressão de IL-10 (Fig. 5F).

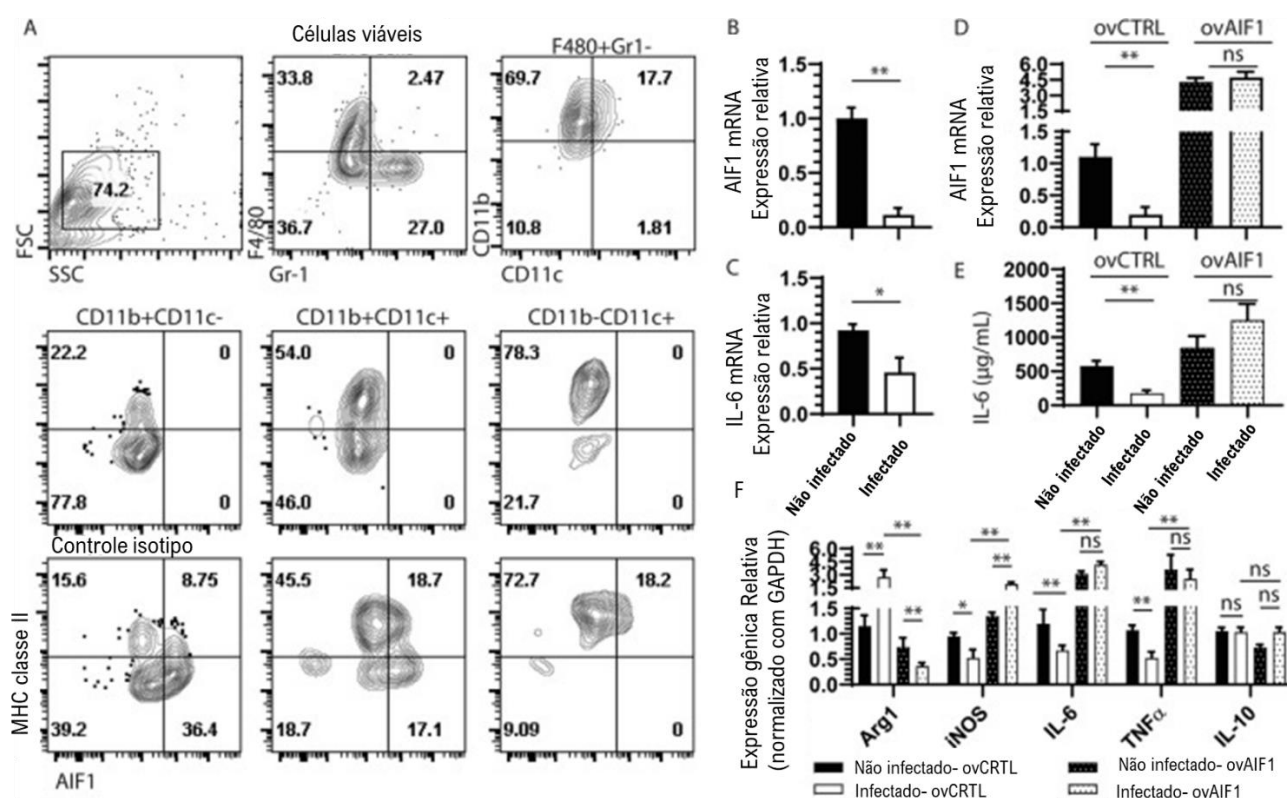


Figura 05. Expressão de AIF1 em macrófagos derivados da medula óssea sob estímulo de M-CSF. Células da medula óssea de camundongos selvagens (n=8) foram coletadas e diferenciadas em macrófagos pela estimulação de M-CSF por 06 dias. As células diferenciadas estimuladas foram marcadas com Gr-1, F4/80, CD11b, MHC de classe II, CD11c e AIF1 para análise por citometria de fluxo. (A) Células F4/80+ Gr1- foram então avaliadas para a expressão de AIF1 nas células CD11b+CD11c- e nas células CD11b- CD11c+. Marcadores isotipos controle foram utilizados para estabelecimento das estratégias de análise celular. (B,C) Para as análises de transcriptoma para AIF-1 e IL-6 foram utilizado grupo de macrófagos derivados da medula óssea com ou sem infecção por *Leishmania donovani*. Os dados de PCR em tempo real foram normalizados com GAPDH em cada grupo estudado. (D) Macrófagos derivados da medula óssea foram transfectados com um plasmídeo com vetor irrepressível desenhado para expressar altos níveis de AIF1 (ovAIF1) e posteriormente submetidos a infecção com *L.donovani*. Um outro vetor com expressão inespecífica foi utilizado como controle (ovCTRL) para o grupo ovAIF1 e submetidos a infecção por *Leishmania*. (E) Análise de sobrenadante foi performada para analisar níveis de IL-6 comparando grupo ovCTRL versus ovAIF1 frente à infecção. (F) PCR em tempo real foi realizado para análise de transcriptoma com foco na avaliação de transcritos como Arg1, iNOS, IL-6, TNF α e IL-10 quando as células foram estimuladas para apresentar uma superexpressão de AIF1 e infectadas por *L.donovani*. Os dados foram representações de 04 experimentos independentes em triplicatas por cada grupo experimental. Os dados foram apresentados por meio de média $\pm$ desvio padrão. A análise estatística foi determinada por teste t não pareado. * p < 0.05 e ** p < 0.01.

5.4.A expressão do AIF1 interfere no desenvolvimento de monócitos e macrófagos em células da medula óssea

Na tentativa de avaliar se o AIF1 exerce efeito na diferenciação e conversão de monócitos para macrófagos foi então realizado ensaio *in vitro* a partir do silenciamento do AIF1 em células progenitoras da medula óssea antes do estímulo com MCSF. A transfecção foi realizada pela técnica Crispr-Cas9 a partir do plasmídeo de gRNA do AIF1 (pAIF1) onde foi possível constatar uma redução de cerca de 28% $\pm$ 9 comparado com o grupo controle (Fig. 7 A,B).

Vale ressaltar que o procedimento de silenciamento não afetou a viabilidade das células ou mesmo o número total de células. No entanto, após análise por citometria de fluxo foi observado uma distribuição de monócitos e macrófagos diferentes entre ambos os grupos (CD11b⁺ F4/80⁺ e CD11b⁺ F4/80⁻) (Fig. 7C). Já para o marcador Ly6C houve um aumento pronunciado na população de células silenciadas comparados com o controle (Fig. 7D).

Analisando agora do ponto de vista do perfil de genes expressos em ambas as populações, o silenciamento do AIF1 é capaz de induzir um aumento significativo na expressão de genes que são importantes na regulação de desenvolvimento de monócitos como C/EBP β e KLF4 concomitante com a redução de ID2, RelB e IRF4 (Fig. 7E). A expressão de genes como PU.1 e Nr4a1 não sofreram alterações. Também não foram encontradas alterações na expressão de genes e proteínas da cascata de sinalização da via NF κ B como p38, ERK1/2, I κ B, p65 e p85/p100 (dados não mostrados).

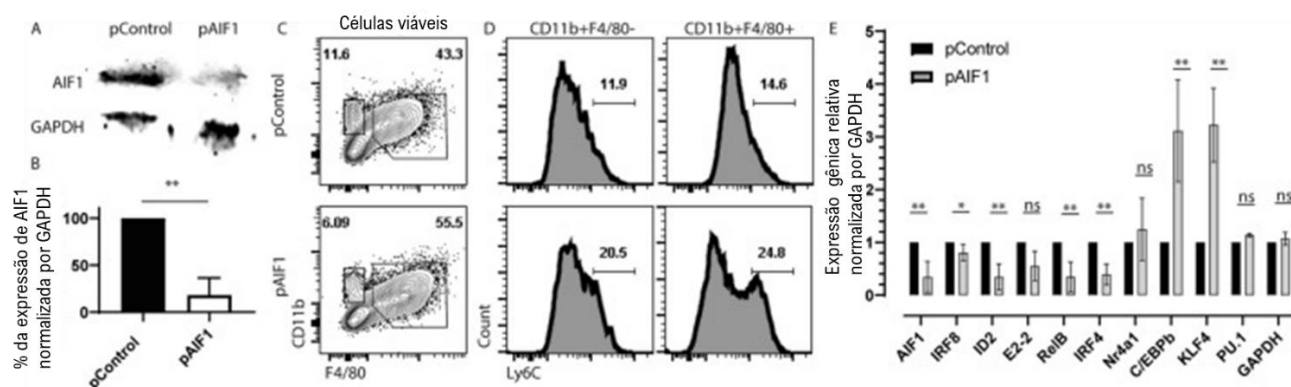


Figura 07. O silenciamento do AIF1 em células da medula óssea restaura a diferenciação de macrófagos. Células da medula óssea coletadas de camundongos selvagens foram coletadas e transfectadas com plasmídeo Crispr-Cas9 carregando o gRNA do AIF1 (pAIF1). Um gRNA com nucleotídeos desordenados do AIF1 foi utilizado como controle (pControl). As células da medula óssea transfectadas foram estimuladas por 06 dias com M-CSF. (A) Análise por Western Blot foi realizada comparando pControl com o grupo pAIF1 para avaliar o silenciamento da expressão do AIF1. GAPGH foi utilizado como controle interno. (B) Os gráficos de barra representam a porcentagem do silenciamento calculado utilizando a intensidade de fluorescência captada (ImageStudio 5.0). (C) Para estudos análogos, as células com silenciamento de AIF1 e as células controle foram coletadas e marcadas para CD11b, F4/80, Ly6C e analisadas por citometria de fluxo. (D) A presença de monócitos Ly6C⁺ foram

analizadas tanto nas células CD11b⁺ F4/80^{neg} como nas células CD11b⁺F4/80⁺. (E) O RNA total foi isolado das células com e sem silenciamento de AIF1 estimuladas com M-CSF. PCR em tempo real foi performed para avaliar a expressão de AIF1, IRF8, Id2, E2-2, RelB, IRF4, Nr4a1, C/EBP β , KL4 e PU.1. GAPDH foi utilizado como controle interno. Todos os dados foram normalizados com o respectivo controle. Os dados foram apresentados por média $\pm$ desvio padrão e são representativos de pelo menos 03 experimentos independentes. As análises estatísticas foram determinadas por test-t não pareado. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$.

5.5. A ausência do AIF1 interfere na conversão de monócitos em macrófagos *in vitro*

Para então avaliar se os resultados *in vitro* possuem mesma apresentação *ex vivo*, células do baço foram extraídas e criteriosamente isoladas obtendo então tanto células com marcadores de monócitos (CD11b high CD115⁺ Ly6C/G⁺ F4/80 low) e macrófagos (CD11b low CD115⁺ Ly6C/G^{neg} F4/80⁺ sendo estas avaliadas para a expressão do AIF1 (Fig 8 A,B). Em seguida, foi performed então o isolamento de monócitos da medula óssea (CD11b hi CD115⁺ Ly6C/G⁺ MHC class II neg), esses monócitos foram então cultivados sob o estímulo de MCSF por 04 dias e silenciados para o gene do AIF1. Após 02 dias do silenciamento foi possível observar uma discrepante proporção na quantidade de monócitos e macrófagos comparando o grupo silenciado (Fig. 8D). A partir do quarto dia a população de monócitos (CD11b⁺ F4/80⁺ Ly6C⁺ MHCII neg) no grupo de células com silenciamento do AIF1 é de 16,9% $\pm$ 2.7 maior comparando com o grupo controle que apresentou apenas 2.79% $\pm$ 0.6 (Fig. 8 E). Não houve diferença na quantidade de células que representariam os macrófagos residentes (CD11b⁺ F4/80⁺ Ly6C⁻ MHCII⁺).

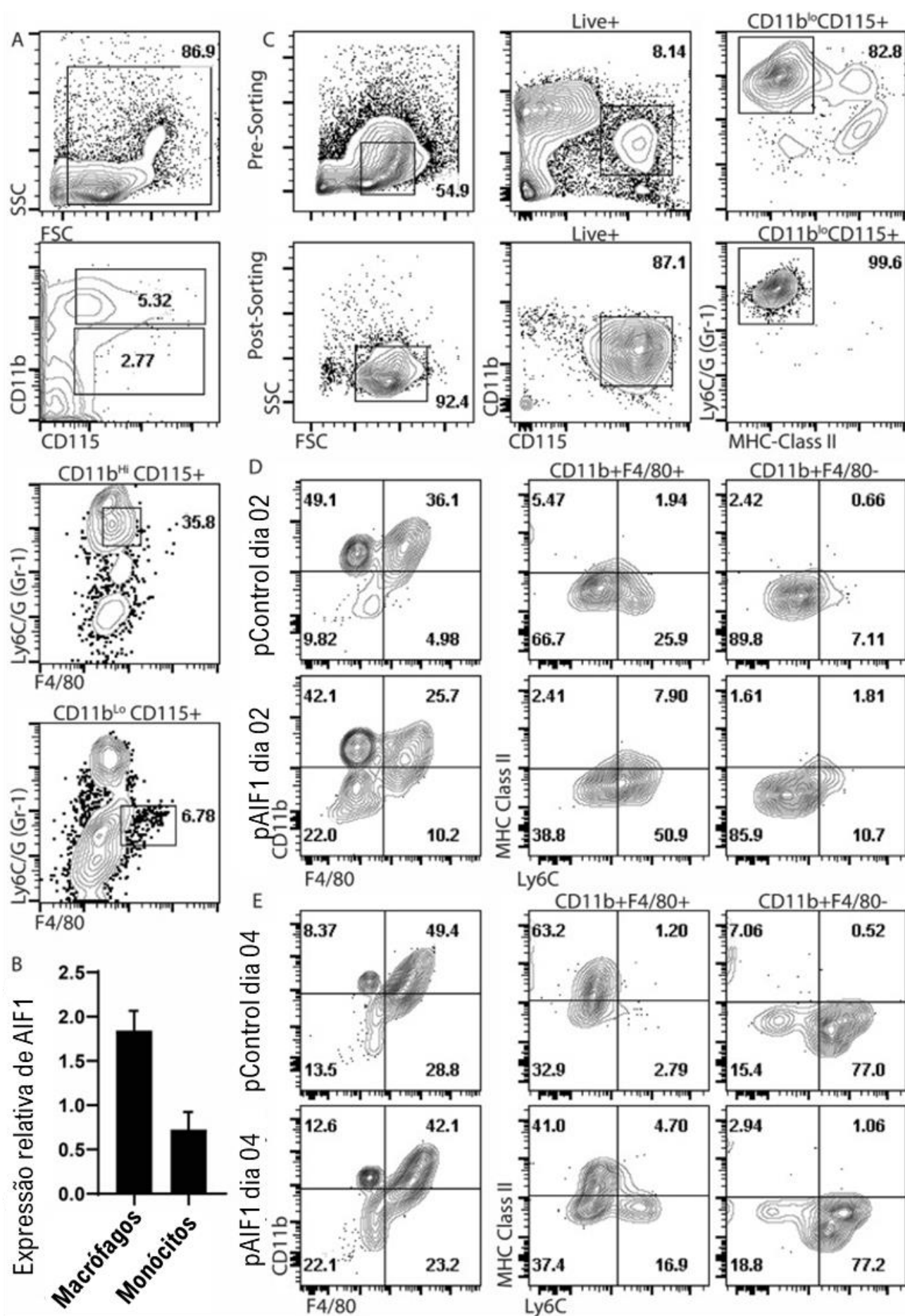


Figura 08. Monócitos Ly6C⁺ necessita de AIF1 para completar sua diferenciação em macrófagos.

(A) Monócitos CD11b high CD115⁺ Ly6C/G⁺ F4/80 neg e macrófagos CD11b low CD115⁺ Ly6C/G neg F4/80⁺ foram isolados por citometria do baço de camundongos selvagens C57BL/6 (n=3). (B) A expressão do AIF1 foi analisada por PCR em tempo real comparando populações de monócitos e macrófagos. (C) As células da medula óssea isoladas de camundongos C57BL/6 (n=6) foram apresentadas antes do isolamento (pre-sorting) e depois do isolamento (post sorting) para purificação dos monócitos CD11b low CD115⁺ Ly6C/G⁺ F4/80 neG. (D) 2 dias e (E) 04 dias sob estímulo de M-CSF, as células foram avaliadas quanto a expressão de Ly6C e MHC de classe II nas populações de células CD11b⁺F4/80⁺ e CD11b⁺ F4/80 neg. Os dados foram apresentados por média $\pm$ desvio padrão e correspondem a 03 experimentos independentes. A análise estatística foi determinada pelo teste-t não pareado. * p <0.05 e ** p < 0.01.

5.6. Modelo animal “knockout” para AIF1 em células que expressam VAV1 confirma a deleção condicional do gene em progenitores da medula óssea e em órgãos linfóides

Para confirmação de genótipo do modelo de camundongos *knockout* condicional para AIF1 (AIF1 loxP/loxP VAV1 Cre e AIF1 loxP/loxP), amostras da cauda do camundongo filhote são coletadas durante o desmame (cerca de 03 semanas de idade ou 21 dias). Após extração de DNA genômico e amplificação por PCR o genótipo é confirmado pela presença da amplificação da região do AIF1 flanqueada com as regiões loxP (397 pares de base) comparado com o modelo selvagem onde a região do AIF1 sem flanqueamento (367 pares de base). A presença da amplificação da recombinase iCRE (220 pares de base) confirma a presença do genótipo equivalente ao modelo *knockout* condicional (Figura 9A).

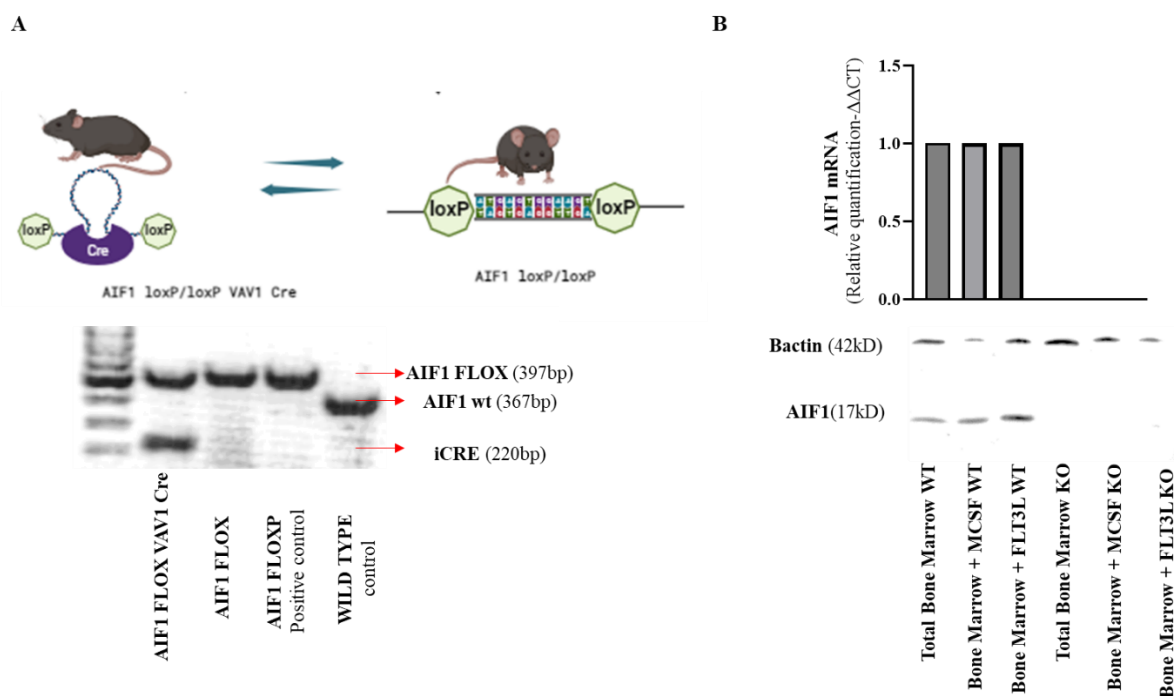


Figura 09. **Confirmação do modelo de camundongo *knockout* para AIF1 em células mieloides.** O

DNA genômico foi coletado com amostras de tecido da cauda do camundongo filhote durante o desmame parental (03 semanas de idade) prosseguindo com amplificação de regiões de interesse por PCR convencional em gel de agarose. Para confirmação de fenótipo a expressão do mRNA de AIF1 foi avaliada pela coleta de células da medula óssea total ou células diferenciadas sob estímulo de M-CSF e FLT3. **(A)** Genótipo de camundongo com *knockout* condicional para AIF1 (AIF1 flox VAV1 cre) grupos controle representados por camundongos de mesma ninhada sem a presença de iCRE recombinase no genoma (AIF1 flox) **(B)** Expressão relativa de RNA mensageiro para AIF1 presente nas células da medula óssea de camundongos com *knockout* condicional e seus controles tanto em células da medula óssea total como em células da medula óssea sob estímulo de M-CSF e FLT3. A ausência da produção de proteína também foi confirmada por *Western Blot*. Os dados foram apresentados por média $\pm$ desvio padrão e correspondem a 03 experimentos independentes.

Para confirmação de fenótipo alvo foi realizado isolamento das células da medula óssea de camundongos *knockout* e comparados com seu respectivo controle de mesma ninhada. Células da medula óssea total também foram isoladas e cultivadas sob o estímulo de M-CSF e FLT3L por pelo menos 07 e 10 dias respectivamente para estímulo de desenvolvimento de macrófagos e células dendríticas respectivamente. Ao final, as amostras foram submetidas à extração de RNA, realizada conversão para DNA complementar de fita simples (cDNA) e realizada análise de expressão gênica de AIF1 por RT-qPCR. Também foi realizada confirmação de produção de proteínas por meio de técnica de extração de lisado de proteínas com eletroforese e análise de Western Blot para avaliação da produção de AIF1 em comparação com o controle endógeno β actina (Figura 9B).

5.7. **Deleção condicional do AIF1 em células VAV1+ interfere na frequência na medula óssea e no baço**

Células da medula óssea de camundongos *knockout* para AIF1 (AIF1 flox VAV1cre) e do seu respectivo controle (AIF1 flox) foram extraídas e marcadas com anticorpos que representem as populações de monócitos. A ausência de AIF1 reduz em mais de 50% as células precursoras de monócitos e macrófagos (CD11b+CD115+// 18.4 para 8.40). Ademais, ao avaliar a expressão de CD115 foi possível observar um aumento significativo na expressão desse marcador (5.49 para 9.54). Posteriormente ao analisar a presença de monócitos Ly6C low/high com coexpressão para CX3CR1 nessa população (CD11b+CD115+) foi possível observar uma redução na quantidade total de monócitos (92.9 para 82.9) além disso uma diferença significativa na proporção de monócitos sendo os monócitos inflamatórios Ly6C high CX3CR1 high no grupo *knockout*, população não observada no grupo controle. Já no caso da quimiocina CCR2 é observado uma redução significativa nos monócitos Ly6C+ CCR2+ no grupo *knockout* comparado com o grupo controle (89.0 para 61.3).

Vale ressaltar o aumento de células Ly6C+ CCR2- com um aumento de 10x na população knockout (Figura 10).

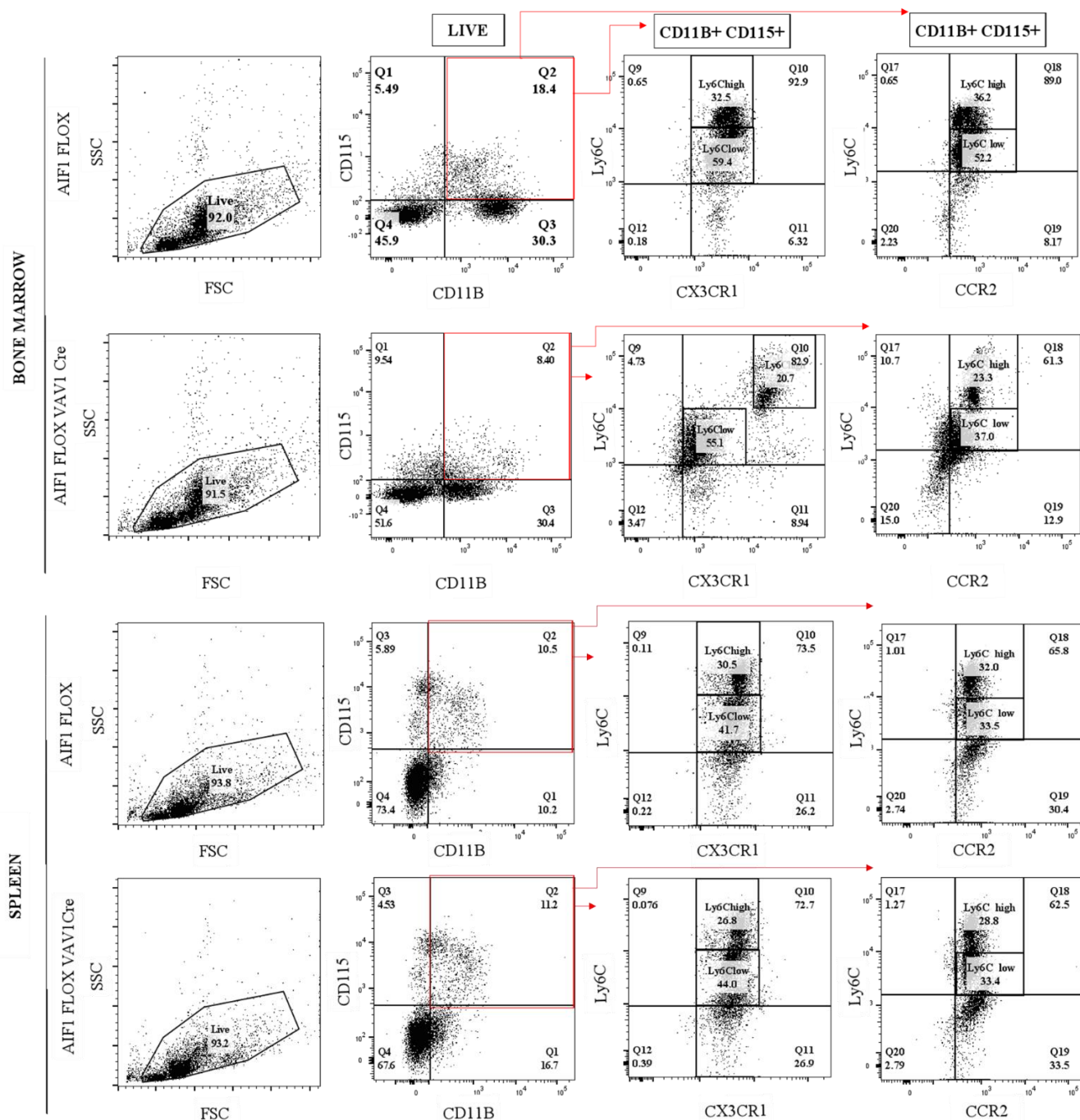


Figura 10. **Deleção condicional do AIF1 em células VAV1+ interfere na frequência de monócitos na medula óssea e no baço.** Células da medula óssea e do baço foram isoladas de camundongos com knockout condicional para o AIF1 e controles, ressuspensas em solução celular e marcadas com anticorpos monoclonais para avaliação do perfil célula de monócitos gerados pela medula óssea. Para o perfil de célula precursora de monócitos e macrófagos foram utilizados o cruzamento da coexpressão de CD11b+CD115+. Nessa população foram avaliadas a população de **monócitos CD11b+CD115+Ly6C+** assim como os seus subtipos celulares como monócitos alternativos ou **antiinflamatórios (CD11b+CD115+Ly6C low)** e monócitos clássicos (**CD11b+CD115+ Ly6C high**). A presença de quimiocinas importantes para sobrevivência celular e migração para o sítio inflamatório dessas células produzidas na medula óssea foram avaliadas com os

marcadores CX3CR1 e CCR2 em ambas as populações de monócitos (CD11b+CD115+ Ly6C low/high). Os dados são representativos de 02 experimento independentes com 01 camundongo em cada grupo experimental.

As células do baço também foram coletadas e dissociadas em uma suspensão única de células e marcadas com os mesmos marcadores para representação do perfil celular de monócitos. Foi possível observar que no grupo knockout há um aumento na população CD11b+ CD115- (10.2 para 16.7) porém não há diferença na população positiva para ambos os marcadores. Além disso, como já esperado não diferenças significativas na população total de monócitos Ly6C + CX3CR1+ ou CCR2+. No entanto há uma discreta diferença com uma redução de monócitos Ly6C high para ambos os marcadores na população com knockout (Figura 10).

5.8. Deleção condicional do AIF1 em células VAV1+ interfere no desenvolvimento de macrófagos na medula óssea e no baço

Células da medula óssea e do baço foram também avaliadas para os marcadores progenitores de macrófagos na medula óssea e nessas células foi avaliado a frequência e distribuição dos subtipos de macrófagos gerados a partir de monócitos da medula óssea. Existe um aumento claro na quantidade de monócitos Ly6C + F4/80- com um aumento de 1,72 para 27,9 no grupo controle e knockout respectivamente. A respeito da distribuição de macrófagos Ly6C high/low é possível observar mesmo padrão de proporção dos subtipos celulares, porém há uma diferença significativa entre as populações com uma redução no número total F4/80+Ly6C+ (92,3 para 61,7) (Figura 11).

Ao avaliar ainda se esse mesmo fenótipo é observado no baço, foi possível observar também um aumento na proporção de células com o perfil CD115+. Posteriormente analisando a população de macrófagos Ly6C+ há uma redução na população total, porém menos pronunciada com o encontrado na medula óssea. Além disso, vale notar que é possível também observar uma redução na proporção de células F4/80 low Ly6C low/high e ainda um aumento na quantidade de células F4/80 high Ly6C low na população knockout comparado com seu controle (Figura 11).

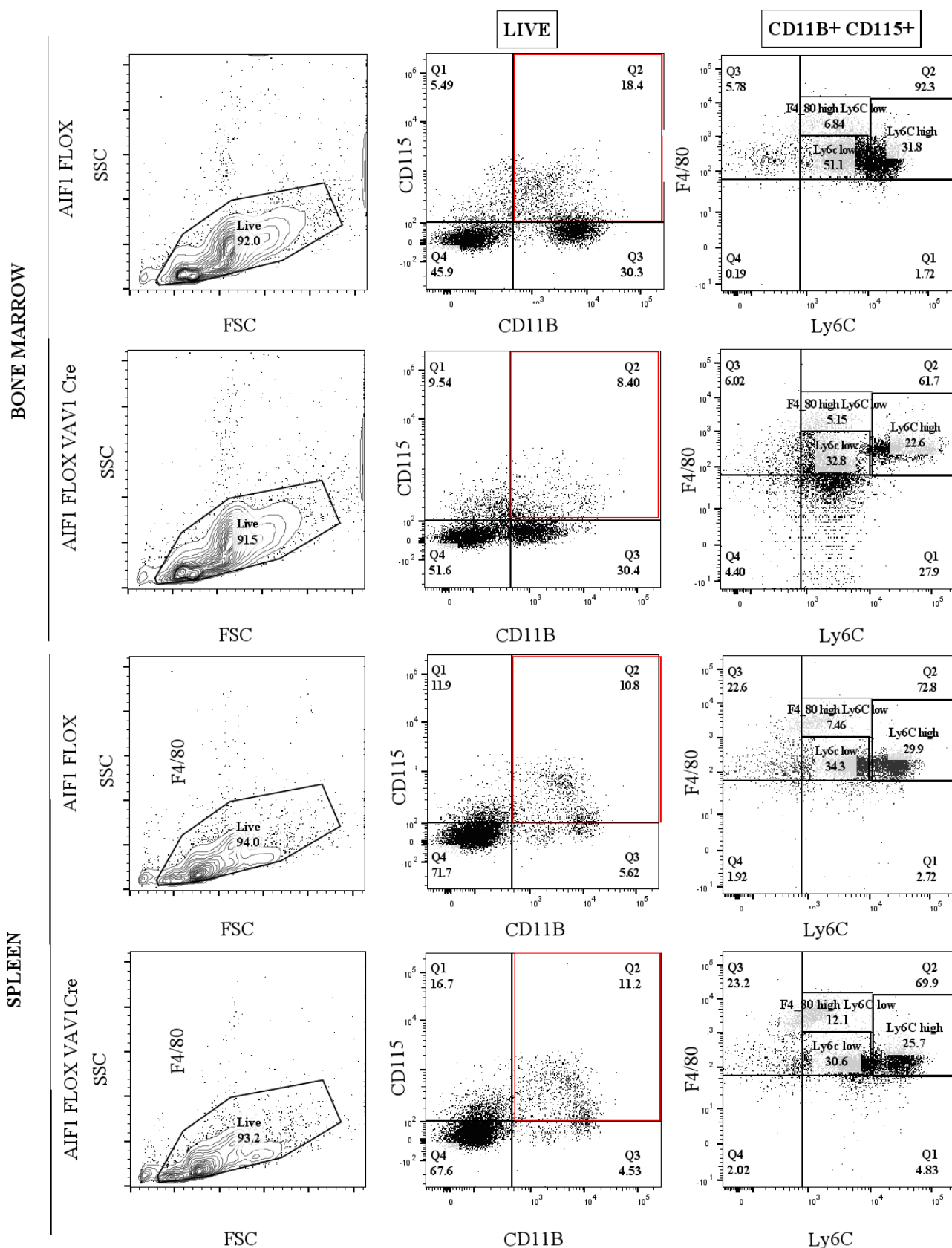


Figura 11. Deleção condicional do gene AIF1 altera a frequências de macrófagos derivados de monócitos na medula óssea e no baço. Células da medula óssea e do baço foram isoladas de camundongos com

knockout condicional para o AIF1 e controles (AIF1 flox VAV1 Cre x AIF1 flox). A solução celular foi então marcada com anticorpos monoclonais para avaliação do perfil célula de macrófagos gerados a partir de monócitos da medula óssea. Para o perfil de célula precursora de monócitos e macrófagos foram utilizados o cruzamento da coexpressão de CD11b+CD115+. Nessa população foram avaliadas a população de **macrófagos Ly6C high (F4/80+ Ly6C high)** e macrófagos do subtipo **Ly6C low (F4/80+ Ly6C low)** tanto na medula óssea quanto no baço. Os dados são representativos de 02 experimento independentes com 01 camundongo em cada grupo experimental.

Ademais, ao analisar com mais detalhes a população de macrófagos no baço é possível observar que não há diferenças nas populações de células F4/80+ MHCII+ assim como nas células F4/80+Ly6C- nas células do baço representaria em condições de homeostase a população de macrófagos residentes como já era esperado. Contudo, ao avaliar na população F4/80+ Ly6C-, o grupo com *knockout* condicional apresenta menos expressão de MHCII. Ademais, avaliando a população de macrófagos que coexpressam a molécula Ly6C é possível observar um aumento na proporção de macrófagos que expressam MHCII no grupo *knockout* (Figura 12).

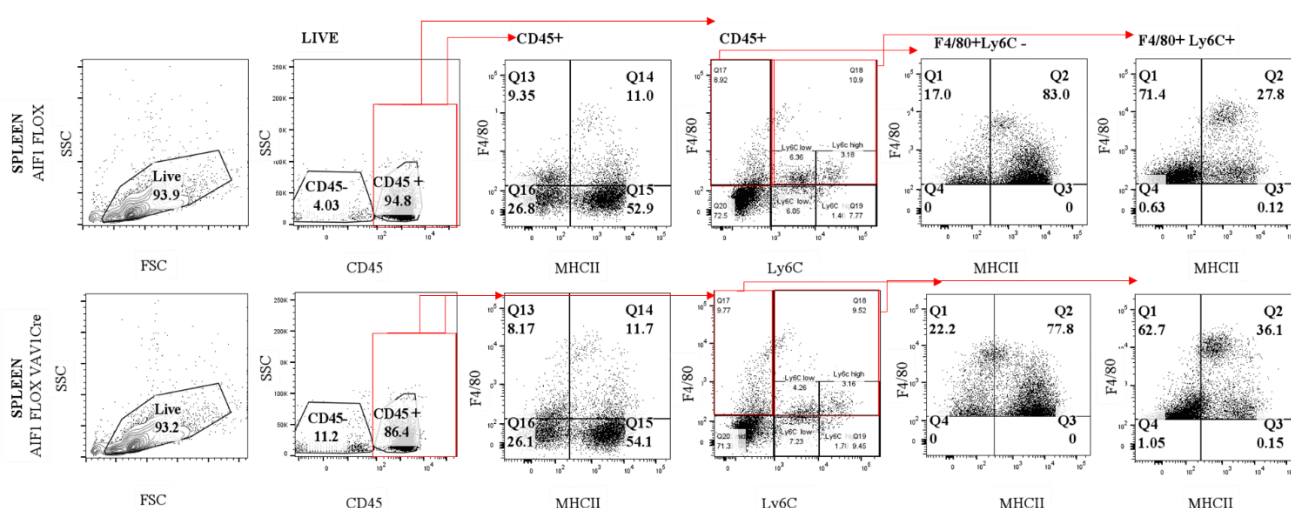


Figura 12. Deleção condicional do gene AIF1 altera a frequências de macrófagos F4/80+ MHCII+ no baço. Células do baço foram isoladas de camundongos com *knockout* condicional para o AIF1 e controles (AIF1 flox VAV1 Cre x AIF1 flox). A solução celular foi então marcada com anticorpos monoclonais para avaliação do perfil celular de macrófagos encontrados no baço. Células leucocitárias foram separadas com a marcação de CD45. Nessa população foram então analisados macrófagos F4/80+ MHCII e macrófagos F4/80+ que coexpressam Ly6C. Posteriormente foi utilizado a avaliação da presença de MHCII no perfil celular de macrófagos encontrados em ambas as populações. Os dados são representativos de 02 experimento independentes com 01 camundongo em cada grupo experimental.

5.9. Presença de polimorfismos genéticos de único polimorfismo do AIF1 pode estar associado a genótipo de resistência à Leishmaniose Visceral.

Foi realizado um estudo de frequência de polimorfismos genéticos em pacientes diagnosticados com LV em comparação com o genótipo de controles endêmicos com teste de Montenegro de reatividade positiva (DTH+) ou reatividade negativa (DTH-) e controles de região endêmica, porém não testados. Os genótipos contendo pelo menos um alelo C nesse polimorfismo foi mais frequente nos pacientes comparados com os controles endêmicos principalmente na condição de heterozigose (C/G) overdominante (Tabela 01)

ASSOCIAÇÃO DO SNP rs3132451 NO GENE *AIF1* COM A LEISHMANIOSE VISCERAL

	Controle não testado		Caso						
	0	%	1	%	OR	lower	upper	p-value	AIC
Codominante									
G/G	94	75.2	57	62.6	1.00			0.12354	295.9
C/G	26	20.8	30	33.0	1.90	1.02	3.54		
C/C	5	4.0	4	4.4	1.32	0.34	5.12		
Dominante									
G/G	94	75.2	57	62.6	1.00			0.04761*	294.1
C/G-C/C	31	24.8	34	37.4	1.81	1.01	3.25		
Recessivo									
G/G-C/G	120	96.0	87	95.6	1.00			0.88601	298.0
C/C	5	4.0	4	4.4	1.10	0.29	4.23		
Overdominante									
G/G-C/C	99	79.2	61	67.0	1.00			0.04487*	294.0
C/G	26	20.8	30	33.0	1.87	1.01	3.46		
log-Additive									
0,1,2	125	57.9	91	42.1	1.52	0.93	2.47	0.09177	295.2

Tabela 01. Associação do SNP rs3132451 no gene *AIF1* com a Leishmaniose Visceral.

No caso da associação dos SNPs rs4711274 e rs2269475, os resultados sugerem que para o SNP rs4711274 o genótipo A/A pode ser associado com um menor risco para a leishmaniose visceral pela análise do modelo codominante e recessivo já que foi mais frequente na população DTH+ (Tabela 02). Já no polimorfismo rs2269475, os resultados sugerem que o genótipo T/T nesse polimorfismo também confere um menor risco de LV já que também foi maior na população DTH+ tanto na análise do modelo recessivo como no modelo codominante. Não houve diferença nas frequências dos polimorfismos de *AIF1* em relação com o grau de gravidade da LV nas associações dos SNPs analisados (dados não demonstrados).

ASSOCIAÇÃO DE PROTEÇÃO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL DOS SNP rs4711274 e rs2269475 NO GENE AIF1

SNP: rs4711274

	Controle (DTH+)		Caso						
	0	%	1	%	OR	lower	upper	p-value	AIC
Codominant									
G/G	18	69.2	64	70.3	1.00			0.0564*	124.2
A/G	5	19.2	26	28.6	1.46	0.49	4.35		
A/A	3	11.5	1	1.1	0.09	0.01	0.96		
Dominant									
G/G	18	69.2	64	70.3	1.00			0.91422	127.9
A/G-A/A	8	30.8	27	29.7	0.95	0.37	2.45		
Recessive									
G/G-A/G	23	88.5	90	98.9	1.00			0.021*	122.7
A/A	3	11.5	1	1.1	0.09	0.01	0.86		
Overdominant									
G/G-A/A	21	80.8	65	71.4	1.00			0.32921	127.0
A/G	5	19.2	26	28.6	1.68	0.57	4.93		
log-Additive									
0,1,2	26	22.2	91	77.8	0.69	0.32	1.48	0.34665	127.1

SNP: rs2269475

	0	%	1	%	OR	lower	upper	p-value	AIC
Codominant									
C/C	18	69.2	65	71.4	1.00			0.0124*	120.2
C/T	5	19.2	26	28.6	1.44	0.48	4.28		
T/T	3	11.5	0	0	0.00	0.00			
Dominant									
C/C	18	69.2	65	71.4	1.00			0.8283	127.9
C/T-T/T	8	30.8	26	28.6	0.90	0.35	2.32		
Recessive									
C/C-C/T	23	88.5	910	100.0	1.00			0.0099*	118.6
T/T	3	11.5	0	0.0	0.00	0.00			
Overdominant									
C/C-T/T	21	80.8	65	71.4	1.00			0.32921	127.0
C/T	5	19.2	26	28.6	1.68	0.57	4.93		
Log-Additive									
0,1,2	26	22.2	91	77.8	0.62	0.28	1.37	0.0124*	126.6

Tabela 02. Associação de proteção para a Leishmaniose Visceral dos SNPs rs4711274 e rs2269475 no gene AIF1

6. DISCUSSÃO

As doenças infecciosas e parasitárias possuem a capacidade de exercer bastante pressão na seleção genética de susceptibilidade ou resistência em uma dada população e os genes que regulam a resposta imune se apresentam como um dos alvos desses parasitos para evasão dessa resposta (FARIA et al., 2015; KWOK; MENTZER; KNIGHT, 2021). Estudos anteriores demonstraram que parasitos *Leishmania* evadem da resposta imune ao induzir diminuição na expressão de marcadores pró-inflamatórios principalmente em macrófagos, principal célula de defesa contra agentes intracelulares (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2021; KUMAR et al., 2018).

Neste estudo a infecção por *L.donovani* *per si* é capaz de reduzir significativamente a expressão do AIF1 em macrófagos tanto *in vivo* quando *in vitro* sendo esse mecanismo associado com a regulação favorável a evasão parasitária à resposta microbicida desta célula porém efeito é revertido ao estimular a superexpressão ectópica do AIF1 e desafiar essas células a infecção por *L.donovani*. Ademais, ao foi confirmado que o AIF1 é expresso em células de perfil de macrófago derivado da medula óssea sob estímulo por MCSF e que silenciando o AIF1 nessas células há uma redução no desenvolvimento de células com perfil CD11b+F4/80+ e ainda há uma elevação da coexpressão da molécula Ly6C low/high no grupo silenciado comparado com o grupo controle.

Ly6C é uma glicoproteína expressa em 50% das células da medula óssea e estudos recentes tem demonstrado que macrófagos derivados da medula óssea podem ser classificados em subtipos heterogêneos de acordo com a coexpressão de Ly6C sugerindo essa molécula como um divisor entre os aos macrófagos derivados de monócitos da medula óssea (Ly6C+) e macrófagos primitivos residentes teciduais que foram gerados durante o período embrionário pelo saco vitelínico (Ly6C neg) (YANG et al., 2019) Alguns estudos classificam os macrófagos derivados de monócitos em dois subtipos celulares, os macrófagos Ly6C high (CD11b high F4/80 high Ly6C high) e os macrófagos Ly6C low (CD11B high F4/80 high Ly6C low). A formação dos macrófagos Ly6C high é dada pelo recrutamento de monócitos clássicos (CCR2+CX3CR1low Ly6Chigh) e esses macrófagos são então convertidos no perfil Ly6C low durante o processo inflamatório. Além disso, os macrófagos Ly6C high foram apresentados com uma maior atividade proinflamatória (LI et al., 2022). Apesar disso, um outro estudo mostra que macrófagos de perfil F4/80+Ly6C high é capaz de incitar o processo inflamatório em modelos de camundongos com colite com potencial tumorigênico sendo estas células uma das principais fontes de IL1 β e TNF α (SHIN et al., 2023). Em contraste, os macrófagos Ly6C low apresentam características associadas à reparação tecidual e antiinflamatória e são supostamente derivados de monócitos não clássicos CD11B+CX3CR1high Ly6Clow. No entanto, é

válido ressaltar que a função desses subtipos celular pode variar de um perfil protetivo ou não a depender principalmente em casos patológicos (LI et al., 2022b).

No contexto da Leishmaniose Visceral, alguns estudos têm revelado que monócitos (Ly6C+ CCR2+ CD11c-) são células mais permissivas à invasão de parasitas de *L. major* e que proporciona um ambiente de rápida proliferação destes parasitas durante a fase aguda da infecção (HEYDE et al., 2018b). Além disso, monócitos inflamatórios (Ly6Chigh Ly6G- CD11b+) servem como um importante reservatório para a *leishmania* já que devido ao seu recrutamento precoce, essas células não apresentam a ativação clássica celular, apresentam baixa ou nenhuma produção de iNOS e TNF α e ainda contribuem para a produção de arginase que auxiliando o crescimento parasitário e evitando sua eliminação (TERRAZAS et al., 2017). Ao utilizar modelo de deleção condicional para o AIF1 em células progenitoras da medula óssea que expressam constitutivamente VAV1, foi possível observar um aumento de monócitos Ly6C+CX3CR1-CCR2- o que pode implicar numa dificuldade na formação de monócitos na ausência de AIF1 na medula óssea. Além disso, a clara diferença na população CX3CR1 no grupo knockout assim como a expressão de CCR2 pode demonstrar efeito importante na redução da sobrevivência dessas células assim como no processo de migração para o tecido inflamatório dependente de CCR2. No baço, apesar de não haver diferenças na quantidade geral da expressão dessas quimiocinas, é possível notar que há um aumento na proporção de células Ly6C low CX3CR1+ em detrimento de uma redução na população Ly6C high CX3CR1+ comparando o grupo com ausência de AIF1 e seu controle.

É válido notar que, apesar de ainda permanecer em esclarecimento, a possibilidade de conversão de macrófagos Ly6C high em macrófagos Ly6C low e que esta conversão pode estar associada a uma perda ou desvio de sinal no microambiente que dificulta a sustentação do perfil Ly6C high instaura a hipótese de um possível envolvimento do AIF1 nesse processo. Tal situação fica ainda mais instigante já que estudos que utilizaram camundongos com deleção global dos fatores de transcrição Nr4a1-/- e Cebp β apresentam uma redução na quantidade de monócitos Ly6C low (HANNA et al., 2012; MILDNER et al., 2017) e nesse estudo o silenciamento do AIF1 em macrófagos derivados da medula óssea *in vitro* apresentou um aumento significativo de Cebp β e apesar de não significativo ainda também foi observado um aumento de Nr4a1 o que pode ser a via de sinalização que na ausência do AIF1 é afetada gerando consequentemente um aumento das células do perfil de macrófagos Ly6C low. Levando em consideração que estudos apontam o perfil de macrófagos F4/80+ Ly6C low com resposta predominantemente antiinflamatória e podendo ser associada a um perfil de resposta de macrófagos M2, no contexto do mecanismo de evasão da

leishmania, a redução da expressão do AIF1 não somente induz a redução da atividade inflamatória como também altera as subpopulações de células geradas.

Pelo lado do mecanismo celular, estudos revelam que a infecção por *L.donovani* interrompe as atividades de sinalização da proteína kinase C (PKC) principalmente por interferir na ligação com cálcio o que foi considerado um defeito modulado pela leishmania para dificultar a ativação e translocação da proteína kinase C em monócitos humanos contribuindo para o estado de infecção crônica (MCNEELY; TURCO, 1987; OLIVIER; BROWNSEY; REINER, 1992). Esse resultado em particular se mostra de suma importância já que o AIF1 tem a capacidade de interagir diretamente com a PKC para junto com fator de transcrição importante na via da NFkB (RelB) e que esta ligação é importante para a diferenciação e função celular nas células mieloides(ELIZONDO et al., 2019).

Nesse estudo, IRF8, ID2, RelB e IRF4 têm expressão diminuída pela ausência de AIF. Estes resultados somados levam ao delineamento de novas investigações a serem realizadas no sentido de avaliar a influência desse gene nas diversas cascatas de sinalização e diferenciação de macrófagos que podem ser resultados essenciais para o controle de doenças intracelulares ou no desenvolvimento de uma imunoterapia associada com a regulação da expressão do AIF1.

Por fim, a análise de polimorfismos de único nucleotídeo no contexto de doenças pode indicar mutações genótípicas que se associam a um desfecho de resistência ou susceptibilidade clínica a doenças. No caso de polimorfismos do AIF1, poucos são os estudos que avaliam o seu efeito em determinado contexto patológico, porém alguns estudos revelam que o SNP rs2259571 C/C foi associado com um genótipo resistente ao tratamento (PAWLIK et al., 2013b); o SNP rs2269475 TT foi significativamente maior nos pacientes com artrite reumatóide sugerindo um genótipo de susceptibilidade a doença(PAWLIK et al., 2008); e o polimorfismo rs2269475 ainda foi relacionado em um outro estudo onde o alelo A estaria associado significativamente em pacientes com esclerose múltipla sistêmica e ainda associado a gravidade da doença na sua forma difusa (OTIENO et al., 2007). Num outro estudo que avaliou polimorfismos de AIF1 associados ao desenvolvimento de Diabetes *Mellitus* tipo 1 na população japonesa não observou diferenças significativas entre e a substituição T-C na posição 20613 no primeiro íntron do gene do AIF1 com o desenvolvimento da doença (NISHIMURA et al., 2003).

Esse é o único estudo que avalia a associação entre polimorfismos do AIF1 na população de pacientes com LV numa região endêmica no nordeste brasileiro. O genótipo G/C do SNP rs3132451 apresentou frequência maior nos pacientes com diagnóstico de LV comparados com os controles endêmicos. Já os polimorfismos rs4711274 e rs2269475 apresentaram uma associação de proteção à LV com maior frequência nos controles endêmicos DTH+. Apesar de não haver associação entre os polimorfismos de AIF1 com relação a gravidade ou não da LV é possível afirmar que mutações em

único nucleotídeo do AIF1 pode ter perfil de proteção ou susceptibilidade a depender do genótipo encontrado.

Ademais, vale ressaltar que o estudo com modelos murinos de deleção condicional via LOXP/Cre ainda se encontra em processo de execução e que o número amostral de experimentos independentes será expandido para posterior publicação. Além disso, o número de controles endêmicos testados com o teste de Montenegro é relativamente baixo o que também há perspectiva de aumentar esse *n* amostral para assim gerar publicação do dado analisado.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados desse estudo é possível concluir que:

- I. A infecção por *L.donovani* induz uma redução significativa na expressão do AIF1 e esse processo leva a uma modulação de citocinas e enzimas importantes da resposta inflamatória sendo uma via importante de escape da resposta microbicida destas células;
- II. A diminuição do AIF1 não somente impacta na modulação da inflamação como também na frequência no desenvolvimento de macrófagos na medula óssea marcado principalmente com redução na população total de macrófagos e aumento da coexpressão dessas células com a molécula Ly6C;
- III. O silenciamento da expressão do AIF1 *in vitro* demonstra relação importante desse gene com a modulação de fatores de transcrição importantes para a resposta inflamatória na via da NFκB e em fatores envolvidos no processo de desenvolvimento de monócitos e macrófagos como o Cebpβ;
- IV. A ausência do AIF1 nas células da medula óssea afeta significativamente a frequência de macrófagos gerados derivados da medula óssea assim como leva a subtipos celulares com direção a um maior desenvolvimento de macrófagos antiinflamatórios o que pode ser essencialmente a chave para a sobrevivência de parasitas como a *Leishmania*.
- V. Polimorfismos do único nucleotídeo do gene AIF1 com genótipos de susceptibilidade ou resistência associados na população de pacientes com diagnóstico de LV comparados aos seus controles em uma área endêmica para a doença confirma a importância desse gene no acometimento de doenças infecciosas e parasitárias como a Leishmanioses devido ao seu caráter principal de modulação inflamatória e no desenvolvimento celular de macrófagos.

8. PERSPECTIVAS

A partir do modelo de camundongo com ausência condicional do AIF1 é possível notar um resultado consistente no fenótipo na ausência do AIF1 o que com análises adicionais de sequenciamento de nova geração (RNA-seq) e análise multiparâmetro por ensaios de PCR em tempo real trazem um potencial de análise aprofundada dos fenótipos afetados pela ausência do AIF1. Além disso, esse estudo faz parte de um estudo maior realizado em colaboração com a Universidade de Minnesota, EUA, e que levará a publicação de no mínimo um artigo científico em revista de conceito A1 até a metade do ano de 2024.

Além disso, espera-se a partir da análise aprofundada da correlação de polimorfismos do AIF1 na população de pacientes com Leishmaniose Visceral a avaliação de possível associação funcional associada ao genótipo afetado e posteriormente também mais uma submissão de artigo científico em revista qualis capes pelo menos B1 já que poucos são os estudos demonstrando o papel desses polimorfismos na Leishmaniose Visceral.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, B. B. Nuclear factor- κ B: The enemy within. **Cancer Cell**, v. 6, n. 3, p. 203–208, 2004.
- AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. Immunotherapy in treatment of leishmaniasis. **Immunology letters**, v. 233, p. 80–86, 1 maio 2021.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, 31 maio 2012.
- ARAÚJO, D. DA C. Análise espacial dos casos humanos de leishmaniose visceral. **Arq. Ciênc. da Saúde**, v. 2, n. 24, p. 71–75, 2017.
- AUTIERI, M. V.; CARBONE, C. J.; EISEN, H. The growth enhancing effects of allograft inflammatory Factor-1 (AIF-1) in VSMC are dose-dependent and mediated by its ability to bind calcium. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 20, n. 2, p. 198, 1 fev. 2001.
- BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nature immunology**, v. 11, n. 10, p. 889–896, out. 2010.
- BRASIL. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. **Ministério da Saúde**, 2017.
- BUATES, S.; MATLASHEWSKI, G. General suppression of macrophage gene expression during *Leishmania donovani* infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 166, n. 5, p. 3416–3422, 1 mar. 2001.
- BUTENKO, S. et al. Transcriptomic Analysis of Monocyte-Derived Non-Phagocytic Macrophages Favors a Role in Limiting Tissue Repair and Fibrosis. **Frontiers in immunology**, v. 11, 31 mar. 2020.
- CABRERA, M. et al. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. **The Journal of experimental medicine**, v. 182, n. 5, p. 1259–1264, 1 nov. 1995.
- CARLIN, L. M. et al. Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. **Cell**, v. 153, n. 2, p. 362–375, 11 abr. 2013a.
- CARLIN, L. M. et al. Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. **Cell**, v. 153, n. 2, p. 362–375, 11 abr. 2013b.
- CARNEIRO, M. B. et al. Regulation of macrophage subsets and cytokine production in leishmaniasis. **Cytokine**, v. 147, 1 nov. 2021.
- CASTELLUCCI, L. et al. IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. **The Journal of infectious diseases**, v. 194, n. 4, p. 519–527, 15 ago. 2006.
- CASTELLUCCI, L. C. et al. Host genetic factors in American cutaneous leishmaniasis: a critical appraisal of studies conducted in an endemic area of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 3, p. 279–288, 27 maio 2014.

CHEN, Z. W. et al. Identification, isolation, and characterization of daintain (allograft inflammatory factor 1), a macrophage polypeptide with effects on insulin secretion and abundantly present in the pancreas of prediabetic BB rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 25, p. 13879–13884, 9 dez. 1997.

CHINNASAMY, P. et al. Increased adipose catecholamine levels and protection from obesity with loss of Allograft Inflammatory Factor-1. **Nature communications**, v. 14, n. 1, 1 dez. 2023.

CHIU, S.; BHARAT, A. Role of monocytes and macrophages in regulating immune response following lung transplantation. **Current opinion in organ transplantation**, v. 21, n. 3, p. 239, 1 jun. 2016.

DE LEON-OLIVA, D. et al. AIF1: Function and Connection with Inflammatory Diseases. **Biology**, v. 12, n. 5, 1 maio 2023.

DEININGER, M. H.; MEYERMANN, R.; SCHLUESENER, H. J. The allograft inflammatory factor-1 family of proteins. **FEBS Letters**, v. 514, n. 2–3, p. 115–121, 13 mar. 2002a.

DEININGER, M. H.; MEYERMANN, R.; SCHLUESENER, H. J. The allograft inflammatory factor-1 family of proteins. **FEBS Letters**, v. 514, n. 2–3, p. 115–121, 13 mar. 2002b.

DEL GALDO, F. et al. Expression of allograft inflammatory factor 1 in tissues from patients with systemic sclerosis and in vitro differential expression of its isoforms in response to transforming growth factor beta. **Arthritis and rheumatism**, v. 54, n. 8, p. 2616–2625, ago. 2006.

DOS SANTOS, P. L. et al. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004375, 27 jan. 2016.

DUNAY, I. R. et al. Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. **Immunity**, v. 29, n. 2, p. 306–317, 15 ago. 2008.

ELIZONDO, D. M. et al. Inhibition of Allograft Inflammatory Factor-1 in Dendritic Cells Restrains CD4⁺ T Cell Effector Responses and Induces CD25⁺Foxp3⁺ T Regulatory Subsets. **Frontiers in immunology**, v. 8, n. NOV, 8 nov. 2017.

ELIZONDO, D. M. et al. Allograft Inflammatory Factor-1 Governs Hematopoietic Stem Cell Differentiation Into cDC1 and Monocyte-Derived Dendritic Cells Through IRF8 and RelB in vitro. **Frontiers in immunology**, v. 10, n. FEB, 2019.

ELIZONDO, D. M. et al. Allograft inflammatory factor-1 in myeloid cells drives autoimmunity in type 1 diabetes. **JCI insight**, v. 5, n. 10, 1 maio 2020.

ENGWERDA, C. R.; ATO, M.; KAYE, P. M. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. **Trends in parasitology**, v. 20, n. 11, p. 524–530, nov. 2004.

FARIA, A. R. et al. Novel recombinant multiepitope proteins for the diagnosis of asymptomatic leishmania infantum-infected dogs. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 1, 2015.

FILARDY, A. A.; PIRES, D. R.; DOSREIS, G. A. Macrophages and neutrophils cooperate in immune responses to Leishmania infection. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 68, n. 11, p. 1863–1870, jun. 2011.

FOGG, D. K. et al. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 311, n. 5757, p. 83–87, 6 jan. 2006.

FRADE, A. F. et al. TGFB1 and IL8 gene polymorphisms and susceptibility to visceral leishmaniasis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 5, p. 912–916, 1 jul. 2011.

FUKASAWA, M. et al. Allograft inflammatory factor-1 released from the cerebral microglia affect several organs in the body. **Journal of Molecular Histology**, v. 54, n. 2, p. 147–156, 1 abr. 2023.

FUKUI, M. et al. Serum allograft inflammatory factor-1 is a novel marker for diabetic nephropathy. **Diabetes research and clinical practice**, v. 97, n. 1, p. 146–150, jul. 2012a.

FUKUI, M. et al. The serum concentration of allograft inflammatory factor-1 is correlated with metabolic parameters in healthy subjects. **Metabolism**, v. 61, n. 7, p. 1021–1025, 1 jul. 2012b.

GEISSMANN, F. et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 327, n. 5966, p. 656–661, 5 fev. 2010a.

GEISSMANN, F. et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 327, n. 5966, p. 656–661, 5 fev. 2010b.

GEISSMANN, F.; JUNG, S.; LITTMAN, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 71–82, 1 jul. 2003.

GINHOUX, F.; GUILLIAMS, M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. **Immunity**, v. 44, n. 3, p. 439–449, 15 mar. 2016.

GINHOUX, F.; JUNG, S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. **Nature Reviews Immunology** 2014 14:6, v. 14, n. 6, p. 392–404, 23 maio 2014.

GOODMAN, J. W.; HODGSON, G. S. Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. **Blood**, v. 19, p. 702–714, 1962.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. 1, p. 23–35, jan. 2003.

GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 593–604, maio 2010.

GOTO, H.; LAULETTA LINDOSO, J. A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infectious disease clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 293–307, jun. 2012.

GÜNTNER, R.; ANDERS, H. J. Interferon-regulatory factors determine macrophage phenotype polarization. **Mediators of inflammation**, v. 2013, 2013.

HANNA, R. N. et al. NR4A1 (Nur77) Deletion Polarizes Macrophages Towards an Inflammatory Phenotype and Increases Atherosclerosis. **Circulation Research**, v. 110, n. 3, p. 416, 2 fev. 2012.

HETTINGER, J. et al. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. **Nature immunology**, v. 14, n. 8, p. 821–830, ago. 2013.

HEYDE, S. et al. CD11c-expressing Ly6C+CCR2+ monocytes constitute a reservoir for efficient Leishmania proliferation and cell-to-cell transmission. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 10, 1 out. 2018a.

HEYDE, S. et al. CD11c-expressing Ly6C+CCR2+ monocytes constitute a reservoir for efficient Leishmania proliferation and cell-to-cell transmission. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 10, 1 out. 2018b.

HILGENDORF, I. et al. Ly-6Chigh monocytes depend on Nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium. **Circulation research**, v. 114, n. 10, p. 1611–1622, 2014.

HIPPÓLITO, D. D. C. DE et al. Gene expression profile of cytokines produced in biopsies from patients with American cutaneous leishmaniasis. **Acta tropica**, v. 189, p. 69–75, 1 jan. 2019.

HUANG, X. et al. Effects of dantrolene/AIF-1 on β cell dysfunction in INS-1 cells. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 75, n. 9, p. 1842–1844, 2011.

IWASAKI, H.; AKASHI, K. Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. **Immunity**, v. 26, n. 6, p. 726–740, 22 jun. 2007.

JAKUBZICK, C. et al. Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. **Immunity**, v. 39, n. 3, p. 599–610, 19 set. 2013.

JOHNSON, K. D. et al. Interferon regulatory factor-8-dependent innate immune alarm senses GATA2 deficiency to alter hematopoietic differentiation and function. **Current opinion in hematology**, v. 30, n. 4, p. 117–123, 1 jul. 2023.

JUX, B. et al. Vav1 regulates MHCII expression in murine resting and activated B cells. **International immunology**, v. 25, n. 5, p. 307–317, maio 2013.

KADOYA, M. et al. Allograft inflammatory factor-1 stimulates chemokine production and induces chemotaxis in human peripheral blood mononuclear cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 448, n. 3, p. 287–291, 6 jun. 2014.

KENKHUIS, B. et al. Co-expression patterns of microglia markers Iba1, TMEM119 and P2RY12 in Alzheimer's disease. **Neurobiology of disease**, v. 167, 1 jun. 2022.

KIM, H. et al. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. **Laboratory animal research**, v. 34, n. 4, p. 147–159, 1 out. 2018.

KIM, H. M. et al. Alveolar macrophages are indispensable for controlling influenza viruses in lungs of pigs. **Journal of virology**, v. 82, n. 9, p. 4265–4274, maio 2008.

KIMURA, M. et al. A critical role for allograft inflammatory factor-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 178, n. 5, p. 3316–3322, 1 mar. 2007.

KNOLL, R.; SCHULTZE, J. L.; SCHULTE-SCHREPPING, J. Monocytes and Macrophages in COVID-19. **Frontiers in immunology**, v. 12, 21 jul. 2021.

KRATOFIL, R. M.; KUBES, P.; DENISET, J. F. Monocyte Conversion During Inflammation and Injury. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 37, n. 1, p. 35–42, 1 jan. 2017.

KUMAR, V. et al. Leishmania donovani Activates Hypoxia Inducible Factor-1 α and miR-210 for Survival in Macrophages by Downregulation of NF- κ B Mediated Pro-inflammatory Immune Response. **Frontiers in microbiology**, v. 9, n. MAR, 8 mar. 2018.

KWOK, A. J.; MENTZER, A.; KNIGHT, J. C. Host genetics and infectious disease: new tools, insights and translational opportunities. **Nature reviews. Genetics**, v. 22, n. 3, p. 137–153, 1 mar. 2021.

LASKIN, D. L. et al. Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 51, p. 267–288, 10 fev. 2011.

LI, Q.; BARRES, B. A. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 18, n. 4, p. 225–242, 1 abr. 2018.

LI, Y. H. et al. Occurrences and Functions of Ly6Chi and Ly6Clo Macrophages in Health and Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 30 maio 2022a.

LI, Y. H. et al. Occurrences and Functions of Ly6Chi and Ly6Clo Macrophages in Health and Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 30 maio 2022b.

LITUMA, P. J. et al. Altered synaptic connectivity and brain function in mice lacking microglial adapter protein Iba1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 46, 16 nov. 2021.

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

LIU, S. et al. Daintain/AIF-1 promotes breast cancer proliferation via activation of the NF- κ B/cyclin D1 pathway and facilitates tumor growth. **Cancer science**, v. 99, n. 5, p. 952–957, maio 2008.

LIU, X. et al. Allograft inflammatory factor 1 is a potential diagnostic, immunological, and prognostic biomarker in pan-cancer. **Aging**, v. 15, n. 7, p. 2582–2609, 2023.

MANZ, M. G. et al. Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 18, p. 11872–11877, 3 set. 2002.

MARTINEZ, F. O. et al. Macrophage activation and polarization. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 13, n. 2, p. 453–461, 2008.

MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 451–483, 2009.

MCNEELY, T. B.; TURCO, S. J. Inhibition of protein kinase C activity by the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 148, n. 2, p. 653–657, 29 out. 1987.

MILDNER, A. et al. Genomic Characterization of Murine Monocytes Reveals C/EBP β Transcription Factor Dependence of Ly6C⁺ Cells. **Immunity**, v. 46, n. 5, p. 849–862.e7, 16 maio 2017.

MITCHELL, A. J.; ROEDIGER, B.; WENINGER, W. Monocyte homeostasis and the plasticity of inflammatory monocytes. **Cellular immunology**, v. 291, n. 1–2, p. 22–31, 1 set. 2014.

NISHIMURA, M. et al. TNF, TNF receptor type 1, and allograft inflammatory factor-1 gene polymorphisms in Japanese patients with type 1 diabetes. **Human Immunology**, v. 64, n. 2, p. 302–309, 1 fev. 2003.

OHSAWA, K. et al. Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. **Journal of Cell Science**, v. 113, n. 17, p. 3073–3084, 1 set. 2000.

OLIVIER, 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 16, p. 7481–7485, 1992.

OTIENO, F. G. et al. Allograft inflammatory factor-1 and tumor necrosis factor single nucleotide polymorphisms in systemic sclerosis. **Tissue antigens**, v. 69, n. 6, p. 583–591, jun. 2007.

PAWLIK, A. et al. Association of allograft inflammatory factor-1 gene polymorphism with rheumatoid arthritis. **Tissue antigens**, v. 72, n. 2, p. 171–175, ago. 2008.

PAWLIK, A. et al. Effect of allograft inflammatory factor-1 gene polymorphisms on rheumatoid arthritis treatment with methotrexate. **Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)**, v. 67, p. 637–642, 2013a.

PAWLIK, A. et al. Effect of allograft inflammatory factor-1 gene polymorphisms on rheumatoid arthritis treatment with methotrexate. **Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)**, v. 67, p. 637–642, 2013b.

PEACOCK, C. S. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature genetics**, v. 39, n. 7, p. 839–847, jul. 2007.

PIOTROWSKA, K. et al. Over-Expression of Allograft Inflammatory Factor-1 (AIF-1) in Patients with Rheumatoid Arthritis. **Biomolecules**, v. 10, n. 7, p. 1–10, 1 jul. 2020.

POLLARD, J. W. Trophic macrophages in development and disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 9, n. 4, p. 259–270, abr. 2009.

RÊGO, F. D. et al. Ecology and Molecular Detection of *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 (Kinetoplastida: Trypanosomatida) in Wild-Caught Sand Flies (Psychodidae: Phlebotominae) Collected in Porto Alegre, Rio Grande do Sul: A New Focus of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **Journal of medical entomology**, v. 56, n. 2, p. 519–525, 25 fev. 2019.

REN, J. et al. Allograft Inflammatory Factor-1 Mediates Macrophage-Induced Impairment of Insulin Signaling in Adipocytes. **Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology**, v. 47, n. 1, p. 403–413, 1 jun. 2018.

RIBEIRO, C. J. N. et al. Space-time risk cluster of visceral leishmaniasis in Brazilian endemic region with high social vulnerability: An ecological time series study. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 1, p. 1–20, 2021.

ROMANO, A. et al. Divergent roles for Ly6C+CCR2+CX3CR1+ inflammatory monocytes during primary or secondary infection of the skin with the intra-phagosomal pathogen *Leishmania major*. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 6, 2017.

ROWLEY, A. H. et al. Allograft Inflammatory Factor-1 Links T-Cell Activation, Interferon Response, and Macrophage Activation in Chronic Kawasaki Disease Arteritis. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 6, n. 3, p. e94–e102, 1 set. 2017a.

ROWLEY, A. H. et al. Allograft Inflammatory Factor-1 Links T-Cell Activation, Interferon Response, and Macrophage Activation in Chronic Kawasaki Disease Arteritis. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 6, n. 3, p. e94–e102, 1 set. 2017b.

SCHNEIDER, C. et al. Alveolar macrophages are essential for protection from respiratory failure and associated morbidity following influenza virus infection. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 4, 2014.

SCHULTZE, J. L.; MASS, E.; SCHLITZER, A. Emerging Principles in Myelopoiesis at Homeostasis and during Infection and Inflammation. **Immunity**, v. 50, n. 2, p. 288–301, 19 fev. 2019.

SCHULZ, C. et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 336, n. 6077, p. 86–90, 6 abr. 2012.

SERBINA, N. V.; PAMER, E. G. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. **Nature immunology**, v. 7, n. 3, p. 311–317, mar. 2006.

SHIN, A. E. et al. F4/80+Ly6Chigh Macrophages Lead to Cell Plasticity and Cancer Initiation in Colitis. **Gastroenterology**, v. 164, n. 4, p. 593–609.e13, 1 abr. 2023.

SILVA, R. L. L. et al. sCD163 levels as a biomarker of disease severity in leprosy and visceral leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 3, 29 mar. 2017.

SINGH, N. et al. Inflammation and cancer. **Annals of African medicine**, v. 18, n. 3, p. 121–126, 1 jul. 2019.

SLIM, F. A. et al. An isoform of AIF1 involved in breast cancer. **Cancer Cell International**, v. 18, n. 1, p. 167, 22 out. 2018.

SOUSA, R. et al. Early suppression of macrophage gene expression by *Leishmania braziliensis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. OCT, 15 out. 2018.

STEIN, M. et al. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. **The Journal of experimental medicine**, v. 176, n. 1, p. 287–292, 1 jul. 1992.

SWIRSKI, F. K. et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. **Science (New York, N.Y.)**, v. 325, n. 5940, p. 612–616, 31 jul. 2009.

TERRAZAS, C. et al. Ly6Chi inflammatory monocytes promote susceptibility to *Leishmania donovani* infection. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

TRIANTAFYLLOU, E. et al. The Role of Monocytes and Macrophages in Acute and Acute-on-Chronic Liver Failure. **Frontiers in immunology**, v. 9, 14 dez. 2018.

UTANS, U. et al. Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1: a novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection. **The Journal of clinical investigation**, v. 95, n. 6, p. 2954–2962, 1995a.

UTANS, U. et al. Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1: a novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection. **The Journal of clinical investigation**, v. 95, n. 6, p. 2954–2962, 1995b.

VAN FURTH, R.; COHN, Z. A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 128, n. 3, p. 415–435, 1968.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral leishmaniasis. **Infectious disease clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 309–322, jun. 2012.

VERAS, P. S. T.; RAMOS, P. I. P.; DE MENEZES, J. P. B. In Search of Biomarkers for Pathogenesis and Control of Leishmaniasis by Global Analyses of *Leishmania*-Infected Macrophages. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, n. SEP, 19 set. 2018.

WATANO, K. et al. Allograft inflammatory factor-1 augments production of interleukin-6, -10 and -12 by a mouse macrophage line. **Immunology**, v. 104, n. 3, p. 307–316, 2001.

WEI, Q. et al. The markers to delineate different phenotypes of macrophages related to metabolic disorders. **Frontiers in immunology**, v. 14, 3 fev. 2023.

WEIRATHER, J. L. et al. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 11, p. 3892–3904, nov. 2011.

WEISSMAN, I. L.; ANDERSON, D. J.; GAGE, F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 17, p. 387–403, 2001.

WHEELER, R. J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The cell cycle of Leishmania: morphogenetic events and their implications for parasite biology. **Molecular microbiology**, v. 79, n. 3, p. 647–662, fev. 2011.

WILKINS-RODRÍGUEZ, A. A. et al. Differential Regulation of l-Arginine Metabolism through Arginase 1 during Infection with Leishmania mexicana Isolates Obtained from Patients with Localized and Diffuse Cutaneous Leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 88, n. 7, 22 jun. 2020.

WILSON, M. E.; STREIT, J. A. Visceral leishmaniasis. **Gastroenterology clinics of North America**, v. 25, n. 3, p. 535–551, 1996.

WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 445–455, 25 abr. 2013a.

WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 445–455, 25 abr. 2013b.

WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 445–455, 25 abr. 2013c.

YANG, Q. et al. Bone marrow-derived Ly6C⁺ macrophages promote ischemia-induced chronic kidney disease. **Cell Death & Disease** 2019 10:4, v. 10, n. 4, p. 1–16, 29 mar. 2019.

YANG, Z. F. et al. Allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) is crucial for the survival and pro-inflammatory activity of macrophages. **International immunology**, v. 17, n. 11, p. 1391–1397, nov. 2005.

YANG, Z. F. et al. Allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) is crucial for the survival and pro-inflammatory activity of macrophages. [s.d.].

ZAKAREYA, Y. et al. Serum allograft inflammatory factor-1 concentration in type 2 diabetes mellitus and its relation to the pathogenesis and progression of diabetic nephropathy. **Egyptian Journal of Obesity, Diabetes and Endocrinology**, v. 2, n. 1, p. 7, 2016.

ZHANG, Q. et al. Expression of Allograft Inflammatory Factor-1 (AIF-1) in Hepatocellular Carcinoma. **Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 24, p. 6218, 7 set. 2018.

ZHAO, Y. Y.; YAN, D. J.; CHEN, Z. W. Role of AIF-1 in the regulation of inflammatory activation and diverse disease processes. **Cellular immunology**, v. 284, n. 1–2, p. 75–83, jul. 2013a.

ZHAO, Y. Y.; YAN, D. J.; CHEN, Z. W. Role of AIF-1 in the regulation of inflammatory activation and diverse disease processes. **Cellular Immunology**, v. 284, n. 1–2, p. 75–83, 1 jul. 2013b.

ZHENG, W. et al. Induction of interferon signaling and allograft inflammatory factor 1 in macrophages in a mouse model of breast cancer metastases. **Wellcome Open Research**, v. 6, p. 52, 23 jun. 2021.

ZHU, Y. P.; THOMAS, G. D.; HEDRICK, C. C. 2014 Jeffrey M. Hoeg Award Lecture: Transcriptional Control of Monocyte Development. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 36, n. 9, p. 1722–1733, 1 set. 2016.