



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

LAÍS LIMA DE OLIVEIRA

**EFEITOS DA TESTOSTERONA NA FUNÇÃO EFETORA DE MACRÓFAGOS
HUMANOS NO MODELO DE INFECÇÃO *IN VITRO* POR *LEISHMANIA*
*AMAZONENSIS***

**ARACAJU
2020**

LAÍS LIMA DE OLIVEIRA

**EFEITOS DA TESTOSTERONA NA FUNÇÃO EFETORA DE MACRÓFAGOS
HUMANOS NO MODELO DE INFECÇÃO *IN VITRO* POR *LEISHMANIA*
*AMAZONENSIS***

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Amélia Maria Ribeiro de Jesus

Co-Orientador: Prof. Dr. Ricardo L. Louzada da Silva

**ARACAJU
2020**

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

O48e	Oliveira, Laís Lima de Efeitos da testosterona na função efetora de macrófagos humanos no modelo de infecção in vitro por <i>Leishmania amazonensis</i> / Laís Lima de Oliveira ; orientadora Amélia Maria Ribeiro de Jesus ; coorientador Ricardo L. Louzada da Silva. – Aracaju, 2020. 49 f. : il. Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2020. 1. Leishmaniose. 2. infecção in vitro por <i>Leishmania amazonensis</i>. 3. Testosterona. 4. Macrófagos. 5. Tratamento da leishmaniose. I. Jesus, Amélia Maria Ribeiro de, orient. II. Silva, Ricardo L. Louzada da, coorient. III. Título. CDU 616.993.161
------	---

LAÍS LIMA DE OLIVEIRA

**EFEITOS DA TESTOSTERONA NA FUNÇÃO EFETORA DE MACRÓFAGOS
HUMANOS NO MODELO DE INFECÇÃO *IN VITRO* POR *LEISHMANIA*
*AMAZONENSIS***

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

Aprovada em: ____/____/____

Prof^a. Dr^a. Amélia Maria Ribeiro de Jesus
Departamento de Medicina- DME
Universidade Federal de Sergipe- UFS
(Orientadora)

1º Examinador
Dr^a. Viviane Correia Campos
Universidade Federal de Sergipe- UFS

2º Examinador
Drº Márcio Bezerra Santos
Departamento de Morforlogia- DMO
Universidade Federal de Sergipe- UFS

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, criador de todas as coisas, que permitiu que tudo isso acontecesse e por sempre me mostrar o caminho certo.

À minha família, que sempre apoia todos os meus sonhos e que não medem esforços para que sejam realizados.

À minha orientadora Profa. Dra. Amélia Maria Ribeiro de Jesus e ao Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida, nossas grandes inspirações, obrigada por acreditar no meu trabalho e por me proporcionar esta oportunidade.

A meu coorientador Prof. Dr. Ricardo Luis Louzada da Silva, por ser meu maior suporte, pela confiança e por sempre estar presente me ajudando em todos os momentos dessa jornada.

Ao Prof. Dr. Diego Moura Tanajura, a quem serei eternamente grata por sempre ter insistido em mim desde o início da graduação e sempre tentar me mostrar o quanto posso ir além.

A todos do LIBM, amigos, professores e funcionários, que sempre estiveram me acompanhando desde as vitórias até as angústias, vocês tornaram o caminho muito mais divertido.

Ao PPGCS e todos professores do programa por todos os ensinamentos repassados e contribuições para o crescimento deste trabalho.

Às agências de fomento que possibilitaram a execução deste projeto.

Enfim, meus sinceros agradecimentos a todos os envolvidos! Muito obrigada!

RESUMO

Efeitos da testosterona na função efetora de macrófagos humanos no modelo de infecção *in vitro* por *Leishmania amazonensis*. OLIVEIRA, L. L. Aracaju, 2020.

Diversos estudos descrevem uma diferença entre os sexos na prevalência de doenças causadas por agentes infecciosos, principalmente agentes intracelulares, sendo o sexo masculino mais acometido por essas doenças. Essa diferença é muitas vezes atribuída a fatores epidemiológicos ligados à maior exposição do homem aos patógenos. Contudo, diante da prévia demonstração da influência de hormônios e seus receptores celulares na resposta imune inata e adaptativa, o interesse em estudos que avaliam a interação do hospedeiro com patógenos e a interferência hormonal na resposta imune é relevante, pois pode explicar essa variação de resposta entre os sexos num contexto mais biológico. Assim, o objetivo deste estudo consistiu em avaliar a influência da testosterona na função efetora de macrófagos humanos, utilizando como modelo a infecção por *Leishmania amazonensis in vitro*. Foram coletadas amostras de sangue de indivíduos saudáveis (n=11) com média de idade de $29,7 \pm 7,21$. As células mononucleares desses indivíduos foram separadas e cultivadas com doses fracionadas da testosterona (de 0nM a 160 nM) até diferenciação completa em macrófagos. Em seguida, foi realizada a infecção *in vitro* com cepa de *Leishmania amazonensis* fluorescente (GFP) e leitura das amostras por citometria de fluxo com análise dos dados do percentual de células infectadas e carga parasitária (pela média da intensidade de fluorescência-MFI). Além disso, foi analisado o perfil fenotípico das células após exposição ou não à testosterona, utilizando-se marcações com anticorpos específicos para moléculas de superfície (CD40 e CD163) e intracelulares (IL4, IL10, IL12 e TNF α), além de análise da expressão gênica (mRNA) por RT-PCR para fatores de transcrição, citocinas e proteínas de sinalização celular (TREM-1, AIF-1, TLR4, IL10, STAT6, SOCS1, SOCS3, IFR4 e IRF5). Foi observado que o tratamento com testosterona (a partir de 80 nM) promove o aumento significativo no percentual de células infectadas. Além disso, o tratamento com testosterona reduziu a expressão de CD40, e induziu um aumento da expressão do mRNA do gene SOCS1 e diminuição do fator de transcrição IFR5, sendo essa uma possível via pela qual a testosterona suprime os mecanismos microbicidas dos macrófagos na infecção por *Leishmania*. Portanto, pode-se afirmar que existe uma influência da interação entre o eixo imuno-endócrino, sendo a via da testosterona um potencial facilitador da infecção por *Leishmania* em macrófagos.

DESCRIPTORIOS: Hormônio. *Leishmania*. Macrófagos. Testosterona.

ABSTRACT

Effects of testosterone on human macrophages effector function using a model of *in vitro* infection for *Leishmania amazonensis*. OLIVEIRA, L. L. Aracaju, 2020.

Several studies describe sex differences in the prevalence of infectious diseases, mainly by intracellular pathogens, with a higher frequency in males. This difference is frequently interpreted as a result of an epidemiological factors, like a higher exposure to men to the pathogens. However, in view of the demonstration of the hormones influence and their cellular receptors on the innate and adaptive immune response, the interest in studies to evaluate host interaction with pathogens and the hormonal interference in immune response is relevant, as it would explain the sexual variation of response to pathogens in a biological context . Thus, in order, the goal of this study was evaluating the influence of testosterone on human macrophage effector function using as a model *in vitro* infection for *Leishmania amazonensis*. Blood samples were collected from healthy individuals (n= 11) with mean age about $29,7 \pm 7,21$. Mononuclear cells from these individuals were fractionated and cultured with increasing doses of testosterone (0 to 160 nM) until macrophage differentiation. Subsequently, *in vitro* infection with a fluorescent *Leishmania amazonensis* strain (GFP) was performed and then samples analysis by flow cytometry to detect the frequency of infected macrophages and parasite load (for median of fluorescence intensity-MFI). In addition, the phenotype profile of this cells were performed after stimulus of testosterone using surface molecules (CD40 and CD163) and intracellular (IL4, IL10, IL12 and TNF α) antibody staining, as well as gene expression (mRNA) analysis by RT-PCR for transcription factors, cytokines and cell signaling proteins (TREM-1, AIF-1, TLR4, IL10, STAT6, SOCS1, SOCS3, IFR4 e IRF5). Testosterone treatment (doses above 80 nM) promotes a significant increase in the percentage of infected cells. Moreover, we observed a decrease on CD40 surface marker and higher expression of mRNA of SOCS1 transcription factor as a decrease in IFR5 mRNA expression, suggesting that testosterone have an effect on *Leishmania* infection, by inducing a suppression of macrophage microbicidal function. Therefore, this data suggests a role of immunoendocrine axis, in particular testosterone, as a potential facilitator of infection in the interaction between the *Leishmania* and macrophages.

DESCRIPTORS: Hormone. *Leishmania*. Macrophages. Testosteron

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 01. Ciclo de transmissão da Leishmaniose	15
Figura 02. Modelo de ativação de macrófagos	19
Figura 03. Efeito de hormônios sexuais frente à infecção bacteriana	23
Figura 04. Fluxograma experimental geral	29
Figura 05. Infecção por Leishmania em células pré-tratadas com testosterona	31
Figura 06. Perfil celular por citometria de fluxo	32
Figura 07. Perfil de expressão gênica de proteínas de sinalização	33
Figura 08. Perfil de expressão gênica	34
Figura 09. Representação do efeito da testosterona na infecção por <i>Leishmania amazonensis</i>	39
Quadro 01. Relação de anticorpos para análise por citometria de fluxo	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LV= Leishmaniose Visceral

LT= Leishmaniose Tegumentar

LCL= Leishmaniose Cutânea Localizada

LD= Leishmaniose Difusa

LCD= Leishmaniose Cutânea Disseminada

LM= Leishmaniose Mucosa

LMC= Leishmaniose Mucocutânea

DTH= *Delayed-type hypersensitivity*, Teste cutâneo de hipersensibilidade tardia;

IDRM= Reação intradérmica de Montenegro

TH1= Resposta T *helper* 1

TH2= Resposta T *helper* 2

M1= Macrófago do tipo 1

M2= Macrófago do tipo 2

TLR4= *Toll Like Receptor* 4, Receptor do tipo Toll 4

GFP= *Green Fluorescent protein*, Proteína Fluorescente Verde

SBF= Soro Bovino Fetal

PBS= *Phosphate-Buffered Saline*, Solução de tampão fosfato-salina

HIV= Vírus da Imunodeficiência Humana

HTLV-1= Vírus linfotrópico da célula humana tipo 1

SOCS= *Suppressor of Cytokine Signalling*, Supressor da sinalização de citocinas

IRF= *Interferon Regulatory Factor*, Fator regulador de Interferon

EROS= *Essential for Reactive Oxygen Species*, Espécies reativas de oxigênio

NO= *Nitric Oxide*, Óxido Nítrico

NF κ B= *Nuclear Factor-kappa B*, Fator Nuclear Kappa-B

MFI= *Median Fluorescent intensity*, Mediana da intensidade de Fluorescência

RT- PCR= *Real Time - Polymerase Chain Reaction*, Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

LPS= Lipopolissacarídeos Bacterianos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1.Leishmanioses.....	13
2.2.Aspectos imunológicos na leishmaniose.....	15
2.3.Diferenciação fenotípica de macrófagos.....	17
2.4.Influência de hormônios no sistema imune.....	20
2.5.Papel da testosterona na resposta imune contra agentes infecciosos.....	21
3. OBJETIVOS.....	24
3.1.Objetivo geral.....	24
3.2.Objetivos específicos.....	24
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	25
4.1.Local de estudo, população de referência, critérios de inclusão e exclusão.....	25
4.2.Isolamento, cultura e diferenciação de monócitos do sangue.....	25
4.3.Estímulo com testosterona.....	26
4.4.Cultura de promastigotas de <i>L.amazonensis</i>	26
4.5.Infecção <i>in vitro</i> de macrófagos com Leishmania.....	26
4.6.Citometria de fluxo.....	27
4.7.Expressão gênica por PCR em tempo real.....	28
4.8.Análise estatística.....	29
4.9.Aspectos éticos.....	29
5. RESULTADOS.....	31
6. DISCUSSÃO.....	35
7. CONCLUSÃO.....	39
8. PERSPECTIVAS.....	40
REFERÊNCIAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma zoonose causada pela infecção com protozoários digenéticos da família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania*. Possui um largo espectro clínico, variando desde formas tegumentares até uma forma visceral, e caracteriza-se como um agravo importante para a saúde pública devido à sua alta prevalência e endemicidade (BRASIL, 2017). Os reservatórios da doença incluem o cão, no caso da forma visceral, e animais silvestres nas formas tegumentares da doença (ORYAN; AKBARI, 2016). É transmitida ao homem a partir do repasto sanguíneo da fêmea infectada do inseto *Lutzomyia longipalpis*, considerado o vetor invertebrado da leishmaniose mais comum no Brasil (LARA-SILVA et al., 2017; SILVA et al., 2014; TORRES-GUERRERO et al., 2017).

Há cerca de 12 a 15 milhões de infectados no mundo, com aproximadamente 30.000 mortes anuais pela leishmaniose. Além disso, estima-se de 700.000 a um milhão de novos casos e um bilhão de pessoas vivendo em áreas consideradas de risco de transmissão da doença (ALVAR et al., 2012; WHO, 2016, 2017a). Ademais, cerca de 96% dos casos registrados de leishmaniose nas Américas ocorrem no Brasil, sendo a região Norte do país responsável pelo maior número de casos de Leishmaniose Tegumentar (LT) (44,7%) e a região Nordeste com mais casos de Leishmaniose Visceral (LV) (48%). Em Sergipe, o município de Aracaju abrange mais de 90% dos casos registrados da forma visceral, podendo então ser classificado como área de transmissão intensa da LV (ARAÚJO, 2017; BRASIL, 2015a; GÓES; JERALDO; OLIVEIRA, 2013; WHO, 2016).

A observação que os homens compreendem o grupo de indivíduos com maior número de casos incidentes das formas da leishmaniose (CAMPOS et al., 2017; MOCK; NACY, 1988; TRAVI et al., 2002; WHO; PAHO, 2019) e que o mesmo fenômeno também é observado na frequência de outras doenças infecciosas, como a hanseníase e tuberculose (BABOOLAL et al., 2009; DE OLIVEIRA et al., 2012), sugere uma possível susceptibilidade maior do sexo masculino à infecção por estes parasitas, porém por vias ainda não tão esclarecidas. Além disso, a presença de receptores hormonais nas células do sistema imune, principalmente nas células da resposta imune inata, induz uma possível regulação do sistema imune por hormônios (BUSKIEWICZ; HUBER; FAIRWEATHER, 2016). Merece destaque também que a testosterona, principal hormônio masculino, é bastante associada à imunossupressão da resposta imune, contudo, ainda não se sabe em quais mecanismos ou vias este hormônio atua para suprimir a resposta imune frente aos

mais diversos agentes infecciosos, dentre eles a *Leishmania* (SCHUURS; VERHEUL, 1990).

Na resposta imune contra a leishmaniose os macrófagos correspondem as principais células de combate ao parasito e, a depender do seu fenótipo de ativação, pode se tornar um local propenso à multiplicação da *Leishmania*, ou pode controlar a infecção (RODRÍGUEZ; WILSON, 2014). O macrófago classicamente ativado (M1), estimulado por citocinas pró-inflamatórias e pela resposta Th1, é o responsável pelo controle da infecção devido sua capacidade de produção de espécies reativas de oxigênio que são os principais ativos no combate a parasitas intracelulares como a *Leishmania*. Já um macrófago (M2), ativado essencialmente por citocinas anti-inflamatórias ou regulatórias (principalmente a interleucina IL-10) e pela resposta Th2, se torna um meio propenso a multiplicação do parasita, pois torna o macrófago um ambiente anérgico e favorece mecanismos de evasão da resposta imune pela *Leishmania*. Inclusive, já vem sendo destacado a capacidade da *Leishmania* de induzir *per si* a modulação do macrófago para um perfil anti-inflamatório de ativação para favorecer sua sobrevivência intracelular (ALEXANDER; BRYSON, 2005).

Ademais, já se sabe que a testosterona é capaz de induzir o aumento na produção ativos antiinflamatórios, principalmente da citocina IL-10 (D'AGOSTINO et al., 1999a; LIVA; VOSKUHL, 2001) e diminuição da expressão de receptores de TLR4 no macrófago, situação que configura uma resposta de característica imunossupressora e que favorece portanto os agentes infecciosos (RETTEW; HUET-HUDSON; MARRIOTT, 2008). Sendo assim, uma possível interferência direta da testosterona nas células do sistema imune tem chamado atenção para o estudo da interação do eixo imune-endócrino no desfecho clínico nas doenças infecciosas e parasitárias.

Portanto, levando em consideração a atual lacuna no conhecimento a respeito da influência dos hormônios sexuais na função de células imunológicas humanas e no desfecho de doenças infecciosas ainda endêmicas como a leishmaniose, este estudo objetiva avaliar os efeitos da testosterona na diferenciação e função microbicida de macrófagos humanos na infecção por *Leishmania in vitro*. Nossa hipótese é que a testosterona aumenta as taxas de infecção por *Leishmania amazonensis* por induzir predominantemente mecanismos de resposta antiinflamatórios no macrófago o que diminui sua capacidade microbicida.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Leishmanioses

A leishmaniose é uma zoonose causada pela infecção por protozoários do gênero *Leishmania*, parasitos intracelulares obrigatórios com tropismo pelas células do sistema fagocítico mononuclear humano (BRASIL, 2017). Por muito tempo considerada uma das doenças negligenciadas em todo o mundo, a leishmaniose ainda se configura como um grande problema de saúde pública devido às altas taxas de incidência e prevalência em todo o mundo (ALVAR et al., 2012; WHO, 2016, 2017a). Além disso, apresenta um amplo espectro clínico e diversidade epidemiológica, a qual vem passando por franca expansão de sua área de transmissão, consequência do grande movimento de urbanização do homem além do crescente desmatamento de áreas florestais (GARCIA et al., 2011). Inúmeras espécies de flebotomíneos vetores estão relacionadas com a transmissão da doença sendo a espécie *Lutzomyia longipalpis*, a principal espécie transmissora no Brasil (BRASIL, 2017).

Existem dois grandes subtipos de apresentação clínica da leishmaniose: as formas tegumentares (LT) e uma forma visceral (LV). As formas tegumentares ainda se subdividem em outro espectro de apresentações clínicas variando desde formas autolimitadas cutâneas a formas disseminadas, estas atingindo também a região mucosa da pele sendo denominadas como: Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), Leishmaniose Difusa (LD), Leishmaniose Cutânea Disseminada (LCD) e Leishmaniose Mucosa (LM) (FOGANHOLI; VANESSA, 2011). Inclusive a LT corresponde a maioria dos casos de leishmaniose com 0,7 a 1,3 milhões de casos novos por ano (ALVAR et al., 2012). Em 2018, dentre os países da América do Sul, o Brasil foi o país com o maior número de casos informados, com 16.432 casos (84%), a maioria na região Norte. A região Nordeste apresentou sozinha 5.152 casos desde o ano de 2011. Em Sergipe, no período de 2010 a 2015, foram registrados 37 casos com um coeficiente de detecção de 0,3 em 2015 (BRASIL, 2015c, 2015d).

Quanto à forma visceral, esta possui caráter crônico, sistêmico e quando não tratada, pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos. Nas Américas, a espécie *Leishmania infantum* é a principal espécie causadora da LV (BRASIL, 2017). Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) revelam que, no ano de 2018, o Brasil apresentou

um número de 3.466 casos reportados de LV (cerca de 97% dos casos nas Américas) e se encontra entre os dez países com o maior número de casos de leishmaniose visceral no mundo (WHO, 2017b). Na década de 90, aproximadamente 90% dos casos notificados de LV ocorreram na Região Nordeste. À medida que a doença se expande para as outras regiões e atinge áreas urbanas e periurbanas, esta situação vem se modificando e, no ano de 2015, a Região Nordeste apresentou 54% do percentual de casos do país, porém ainda com 50% do número de óbitos por LV (BRASIL, 2015b, 2015e). Sergipe concentra cerca de 3,5% dos casos, entretanto apresenta o maior coeficiente de letalidade (16,7) e o quarto maior coeficiente de incidência (2,7) encontrado na região Nordeste no ano de 2015 (ARAÚJO, 2017; OPAS, 2017; WHO; PAHO, 2019).

Apesar da diversidade de espécies e formas clínicas, todas apresentam o mesmo ciclo de transmissão (Figura 01). Inicialmente, insetos vetores infectados ao se alimentar de sangue de animais domésticos e silvestres infectados por leishmaniose, reservatórios naturais do parasito, vão apresentar em seu intestino inúmeras formas denominadas de pró-cíclicas, forma reprodutiva não infectante, e ali permanecem presas na parede do tubo digestivo do vetor. Por fim, as promastigotas pró-cíclicas passam por um processo denominado metaciclogênese, onde deixam de se reproduzir e se tornam infectantes (promastigotas metacíclicas). Durante a metaciclogênese, as promastigotas sofrem inúmeras modificações bioquímicas em sua superfície, perdendo assim sua capacidade de adesão ao epitélio do intestino médio do flebótomo. Como resultado, as promastigotas metacíclicas destacam-se, migram para a faringe e para regiões da cavidade bucal do inseto, de onde elas ficam armazenadas e são transmitidas ao hospedeiro vertebrado, durante o próximo repasto sanguíneo. Após a inoculação, as promastigotas precisam sobreviver aos mecanismos inatos de defesa do hospedeiro. Sendo assim, seu flagelo é internalizado e passa para a forma intracelular amastigota, que apresenta maior resistência ao meio oxidativo intracelular e consequente maior capacidade de evasão dos mecanismos de defesa (BRASIL, 2017). Além disso, vale ressaltar que as mudanças bioquímicas ocorridas durante a metaciclogênese conferem às promastigotas uma resistência aumentada à quebra pelo complemento e substâncias presentes na saliva dos flebotomíneos o que também favorece a infecção (DEY et al., 2018; GIRAUD et al., 2018).

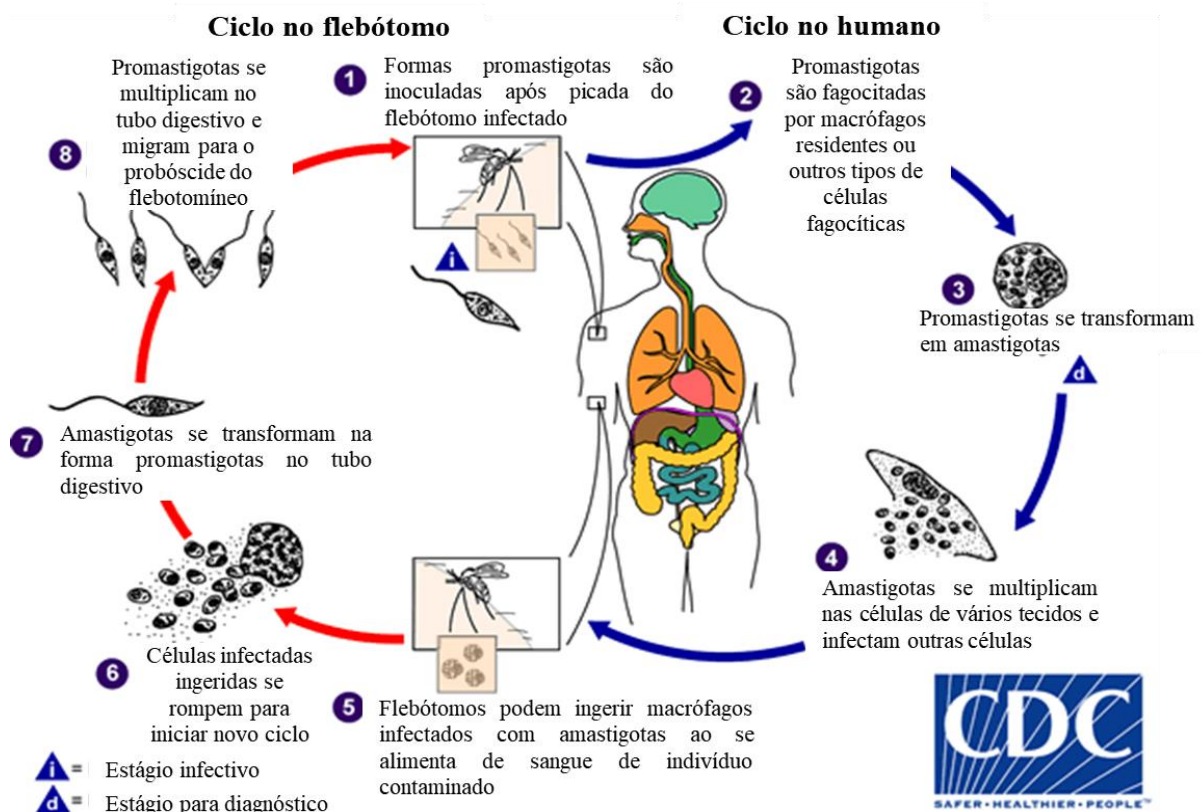


Figura 01. Ciclo de transmissão da Leishmaniose. (Adaptado de CDC <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>)

2.2.Aspectos imunológicos nas Leishmanioses

Desde o início dos estudos envolvendo a imunologia na leishmaniose, muita ênfase vem sendo em macrófagos, devido a sua capacidade microbicida contra a *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). Já é de conhecimento a importância das citocinas do perfil Th1, principalmente IL-12 e IFN- γ , para a ativação de macrófagos do tipo M1 e produção de espécies reativas 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 o controle do parasitismo (DOS SANTOS et al., 2016).

Estudos experimentais em camundongos infectados com diferentes espécies de *Leishmania* *in vitro* e *in vivo* demonstram um aumento da expressão da enzima arginase, importante para a produção de antioxidantes, o que pode regular diretamente o

crescimento e replicação do parasito nas células do sistema imune do hospedeiro sendo também um importante marcador da gravidade da doença (BADIRZADEH et al., 2017).

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). 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 internalização 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).

No meio do espectro, a forma tegumentar (LT) representa a forma clínica mais frequente. Na LT, geralmente a imunidade celular está preservada, o que pode ser verificado pela positividade ao teste cutâneo denominado Reação Intradérmica de Montenegro (IDRM) e de outros testes *in vitro*, tais como avaliação da 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 septonasal, 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 alguns casos de leishmaniose visceral (LV) (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 LC. 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 LC (FARIA et al., 2005). 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, fígado e baço. Além disso, há liberação de diversas citocinas inflamatórias, incluindo TNF- α e IL-6, principais causadoras da febre nesses pacientes, além de citocinas reguladoras e anti-inflamatórias com alta produção de IL-10 e IL-27, que são responsáveis pela supressão da resposta celular específica a antígenos do parasito, caracterizando esta forma como uma das mais graves da leishmaniose e que corresponde as maiores taxas de mortalidade (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012).

2.3.Diferenciação fenotípica de macrófagos

Os macrófagos fazem parte das células primárias do sistema imune e são fundamentais tanto na defesa inicial contra microrganismos intracelulares como na apresentação de antígenos para os linfócitos na produção da imunidade adaptativa. Duas grandes subpopulações de macrófagos são divididas de acordo com o fenótipo de ativação celular: os macrófagos classicamente ativados (M1), estimulados por IFN- γ e LPS, e os macrófagos alternativamente ativados (M2), subdivididos ainda em M2a (após exposição a IL-4 ou IL-13), M2b (imunocomplexos em combinação com IL-1 β ou LPS) e M2c (IL-10, TGF- β ou glicocorticoides) (MÈGE; MEHRAJ; CAPO, 2011).

Macrófagos M1 e M2 possuem perfis distintos de produção de citocinas e quimiocinas, metabolismo e expressão de fatores de transcrição (MANTOVANI et al., 2004; MURRAY et al., 2014; TOMIOKA et al., 2012). Os macrófagos classicamente ativados (M1) promovem a ativação dos linfócitos da linhagem Th1, com a produção de IFN- γ e TNF- α , citocinas que potencializam a produção de reativos de oxigênio e auxiliam portanto a atividade microbicida dos macrófagos fundamental na defesa do hospedeiro contra os agentes intracelulares (MÈGE; MEHRAJ; CAPO, 2011). Já os macrófagos M2 participam principalmente na manutenção da homeostase e na indução resposta imune Th2, contribuindo para a morte de parasitos encapsulados, promoção do crescimento de tumores, reparação e remodelamento tecidual, além de papel imunorregulatório e anti-inflamatório (Figura 02). Este último corresponde a um perfil de macrófago que pode favorecer o crescimento e multiplicação de parasitas intracelulares como no caso da *Leishmania* (GORDON; TAYLOR, 2005; KATAKURA et al., 2004; STUMPO et al., 1999; TOMIOKA et al., 2012).

Após ativados, os macrófagos desempenham um papel fundamental no processo inflamatório em diferentes tecidos (LEE; STARKEY; GORDON, 1985). Vários processos celulares começam após a ativação dos macrófagos, incluindo a produção de enzimas de degradação fagolisossomais (ex: proteases, nucleases, fosfatases, lípases e esterases), ativação do metabolismo oxidativo com produção de superóxido (O₂) e a produção de óxido nítrico (NO) (VAN ASSCHE et al., 2011).

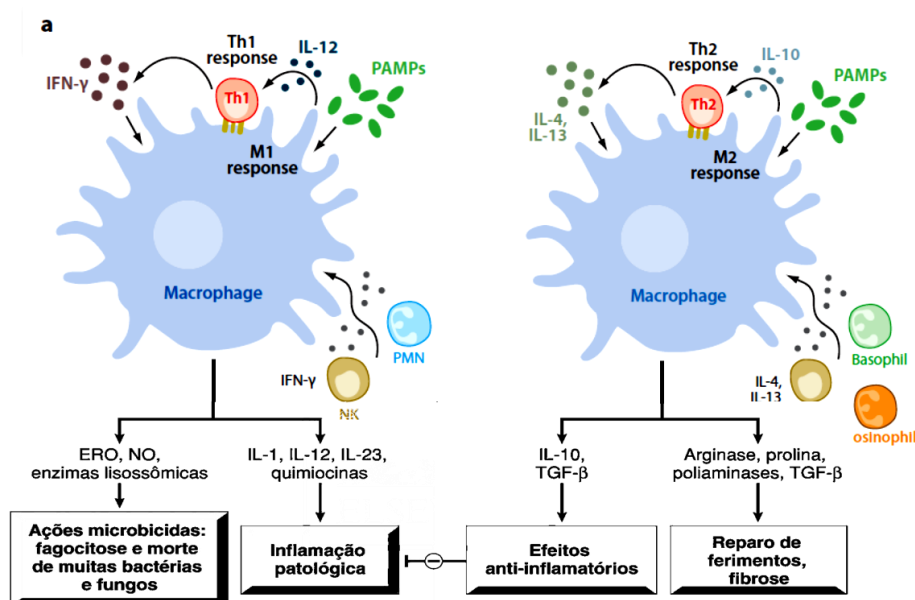


Figura 02. Modelo de ativação de macrófagos M1 e M2 (Adaptado de Martines et al, 2009 e Robbins & Cotran, 2012)

Contudo, inúmeras moléculas supressoras ou de regulação de citocinas podem influenciar na diferenciação e ativação de macrófagos M1/M2. Moléculas expressas na superfície das células do sistema imune inato, como CD40 já foram descritas como coestimulatórias para um perfil de resposta Th1 (SILVA et al., 2017). Já o receptor de hapto-hemoglobina CD163, assim como sua forma solúvel (sCD163), foi descrito como um importante biomarcador da severidade da LV, já que foi encontrado um aumento da sua expressão em pacientes de LV com correlação positiva com a gravidade da doença (SILVA et al., 2017). Vale ressaltar que a ativação de células com estímulos pró-inflamatórios levam ao aumento da expressão de moléculas como o CD40, enquanto que em resposta a um estímulo anti-inflamatório ocorre aumento significativo dos níveis de CD163 (VOGEL et al., 2014). Outro receptor celular encontrado na superfície de células mieloides, o TREM-1 (*Triggering Receptors Expressed on Myeloid Cells*) também apresenta correlação na polarização de macrófagos e sua expressão está condicionada na indução de macrófagos de resposta M1 principalmente com alta expressão de TNF- α (SUBRAMANIAN et al., 2017).

Em mamíferos, uma família de proteínas capazes de suprimir a sinalização de citocinas, chamadas SOCS (*Suppressor Cytokine Signaling*) modulam a diferenciação de macrófagos, direcionando o macrófago para o perfil anti-inflamatório (M2) quando há um aumento da SOCS1 ou a diferenciação para o perfil M1 pelo aumento da SOCS3 (WILSON, 2014; ZHOU et al., 2017). No caso dos fatores de regulação de

interferon, conhecidos como IRF (*Interferon-Regulatory Factors*) seis membros são reconhecidos por exercer influência direta na ativação de macrófagos, porém com destaque para o IRF5 e IRF4 que estão fortemente associados à polarização de macrófagos em M1 e M2 respectivamente (CHISTIakov et al., 2018; SAVITSKY et al., 2010).

Na interação clássica de macrófagos com parasitos do gênero *Leishmania*, o flagelo da forma promastigota exerce papel fundamental na sinalização inicial da resposta dos macrófagos. Essa interação pode desencadear a liberação de fatores intracelulares de sobrevivência do parasito e modulação da capacidade fagocítica do macrófago (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015; ROTUREAU et al., 2009). A diferenciação de formas promastigotas em amastigotas também está associada com a sobrevivência deste parasita no meio intracelular de macrófagos por meio da redução da taxa de crescimento e indução de um estado metabólico caracterizado pela diminuição do influxo e da utilização de glicose e aminoácidos, redução da secreção de ácidos orgânicos e aumento da β -oxidação de ácidos graxos (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015; SAUNDERS et al., 2014). Todo esses processos correspondem a mecanismos adaptativos de evasão do parasita na resposta efetora dos macrófagos e tal situação confere manutenção desta forma biológica ativa mesmo em um nicho intracelular pobre em nutrientes.

2.4. Influência dos hormônios no sistema imune

Desde 1930, tem sido demonstrado a importância da interação entre o eixo endócrino-imune na resolução de doenças infecciosas. Estudos realizados com ratos hipofisectomizados (com deficiência de todos os hormônios pituitários) demonstraram graus de atrofia do timo, confirmando assim as fortes relações dos hormônios pituitários com o sistema imune (SMITH, 1930). Outros estudos também realizados com ratos hipofisectomizados, mostraram que estes animais tinham diferentes compartimentos do sistema imune comprometidos havendo restauração da resposta imune celular e humoral com a administração de hormônio de crescimento (GH) ou prolactina (GALA, 1991). Edwards et al, em 1991, também apresentaram que ratos hipofisectomizados são mais susceptíveis aos efeitos letais da bactéria *Salmonella typhimurium*, devido à inabilidade dos macrófagos tornarem-se ativados (EDWARDS et al., 1991).

O hormônio do crescimento possui a capacidade de induzir a produção do fator de crescimento insulina-símile I (IGF-I), e ambos agem como hormônios anabólicos e moduladores do estresse em muitas células, incluindo as do sistema imune. Evidências da literatura apontam propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias do IGF-I em resposta a microorganismos (RODRIGUES et al., 2011). Estudo realizado por nosso grupo de pesquisa mostra que a adição de IGF-I ao meio cultura aumenta a quantidade de macrófagos infectados mediante desafio com cepa de *Leishmania amazonensis* (BARRIOS et al., 2019).

O hormônio tireoidiano e o cortisol também têm ações bem definidas no sistema imune. Camundongos com hipotireoidismo e com nanismo por mutação no fator de transcrição Pit-1(*Snell-Bagg*) apresentavam depleção de células pré-B, sendo que o tratamento com T4 restaurou os níveis destas células (MONTECINO-RODRIGUEZ et al., 1997). Quanto ao uso de corticoesteróides, estes possuem efeitos anti-inflamatórios e podem desviar a resposta imune adaptativa do tipo Th1 para Th2, através da inibição da produção da IL-12 pelas células dendríticas e macrófagos (AGARWAL; MARSHALL, 2001). Doses mais elevadas de corticóides em linfócitos humanos inibem a proliferação de linfócitos T e induzem apoptose de linfócitos T CD4⁺ periféricos (DOBASHI et al., 2001). Contudo, os efeitos imunossupressores dos glicocorticóides são antagonizados pelas ações do GH e da prolactina, possibilitando a homeostasia imune durante os períodos de doença (DORSHKIND; HORSEMAN, 2000).

Quanto aos hormônios sexuais, há muito tem sido reportado na literatura que o estrógeno pode aumentar a fagocitose por macrófagos, de eritrócitos opsonizados por IgG (FRIEDMAN; NETTL; SCHREIBER, 1985), sendo confirmada a presença de receptores de andrógeno e de estrógeno na superfície celular de macrófagos (KLEIN, 2004). Também foram descritas células da resposta imune que possuem receptores intracelulares para o estradiol (MOR et al., 2003; VAN AGTHOVEN et al., 1994). Além disso, estudos realizados em ratos orquiectomizados mostram maiores chances destes de contrair tireoidite autoimune com diminuição relativa dos casos quando há a administração de testosterona (AHMED; PENHALE, 1982). Já nas mulheres, a prevalência das ações pró-inflamatórias é vantajosa nas situações de infecções porém estas possuem maior risco de doenças autoimunes (STRAUB, 2007).

2.5. Papel da testosterona na resposta imune contra agentes infecciosos

Guerra-Silveira & Abad-Franch (2013), mostraram uma clara predominância do sexo masculino na incidência de tuberculose, leptospirose, meningite meningocócica e hepatite A e na incidência dos diferentes fenótipos clínicos da Hanseníase. Além disso, devido a maior exposição a comportamentos de risco e a condições laborais insalubres, os homens estariam mais propensos ao adoecimento (GUERRA-SILVEIRA; ABAD-FRANCH, 2013). No entanto, em um levantamento dos casos de hanseníase no período de 2005 a 2010, no estado de Sergipe, não houve diferenças no número total de casos nos diferentes sexos, porém houve uma forte associação de formas multibacilares com o sexo masculino (OR 2.9, 95% CI [2.46 a 3.30]; $p < 0.0001$) (DE OLIVEIRA et al., 2013).

Já é de conhecimento que a testosterona é capaz de induzir mecanismos regulatórios a favor de fatores de transcrição pró-inflamatórios como p38 MAP kinase (BENTEN et al., 2004), o que reduz a síntese de citocinas inflamatórias, como o TNF (NF κ -B) (MCKAY; CIDLOWSKI, 1999), altera a liberação de citocinas inflamatórias por macrófagos (ANGELE et al., 1998; KNÖ et al., 2003), reduz atividade de células NK (HOU; WU, 1988) e diminui a capacidade microbicida de neutrófilos humanos (POPP MARIN et al., 2010).

Além disso, estudos vem ressaltando a influência da testosterona em células imunológicas pelo aumento na produção de IL-10 (D'AGOSTINO et al., 1999b; LIVA; VOSKUHL, 2001) e diminuição da expressão de TLR4 (receptor de macrófagos associados à resposta pró-inflamatória), configuração predominante de respostas imunossupressoras (RETTEW; HUET-HUDSON; MARRIOTT, 2008). Já o estrógeno aumenta a resposta imune protetora, aumentando a atividade do interferon-gama (FOX; BOND; PARSLOW, 1991) e promovendo maior citotoxicidade pela produção de IL-1, IL-6 e TNF por células NK (SIRACUSA et al., 2008) além de diminuir a produção de IL-4, IL-10 e TGF- β (SALEM; HOSSAIN; NOMOTO, 2000).

Em geral homens são mais susceptíveis a infecções bacterianas comparado às mulheres, isso devido ao caráter imunossupressor da testosterona em contraponto com o estradiol, que funciona como ativador desse sistema. Frente ao estímulo de infecção por LPS, já é descrito que a testosterona é capaz de induzir uma diminuição da atividade das células NK com produção de citocinas anti-inflamatórias principalmente IL10 e consequente menor produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF α através da inibição da via da NF κ B. A progesterona, principalmente quando altamente expressa durante o período gestacional da mulher, também modula o sistema imune conduzindo uma resposta predominantemente anti-inflamatória principalmente pelo aumento da

expressão da SOCS1 enquanto inibe a produção de $\text{INF}\gamma$ e $\text{TNF}\alpha$. Por outro lado, o estradiol possui seu efeito essencialmente pró-inflamatório, com aumento da atividade de células NK, ativação da via $\text{NF}\kappa\text{B}$ e estímulo à produção de citocinas como $\text{TNF}\alpha$, IL1, IL6, IL17 e IL23, o que confere às mulheres maior controle e resistência à infecção bacteriana (Figura 03) (GARCÍA-GÓMEZ et al., 2013). No entanto, ainda permanece pouco esclarecido o papel da testosterona na função efetora de macrófagos humanos que foram expostos à infecção por *Leishmania*.

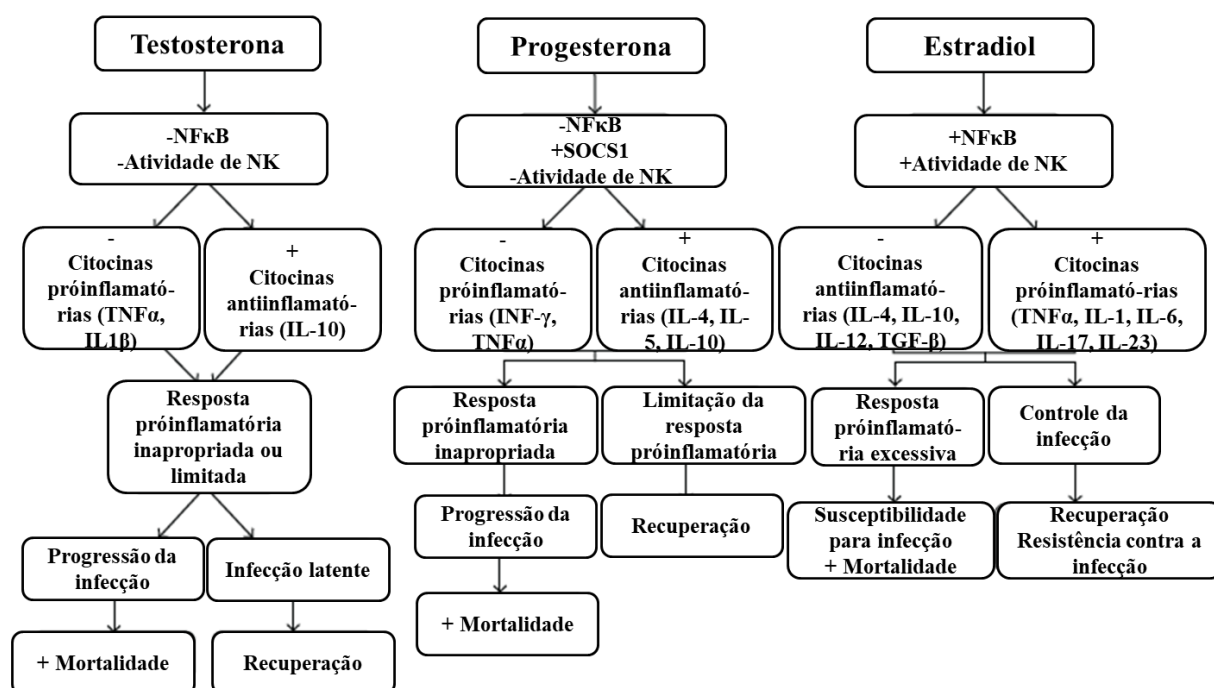


Figura 03. Efeito de hormônios sexuais frente à infecção bacteriana. (Adaptado de GARCÍA-GÓMEZ et al, 2013)

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da testosterona na função efetora de macrófagos em modelo infecção por *Leishmania amazonensis in vitro*

Hipótese: A testosterona possui efeito modulador na sinalização dos macrófagos tornando-os mais susceptíveis à infecção por Leishmania.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Verificar a influência da testosterona na atividade microbicida de macrófagos humanos, *in vitro*, em modelo de infecção por *Leishmania amazonensis*;

Hipótese: Células estimuladas com o hormônio testosterona apresentam maiores taxas de infecção por Leishmania;

- II. Avaliar o perfil de citocinas e moléculas coestimuladoras produzidas por macrófagos estimulados com a testosterona e submetidos à infecção por *Leishmania amazonensis*;

Hipótese: Macrófagos pré-tratados com o hormônio testosterona apresentam uma menor produção de citocinas e marcadores pró-inflamatórios de ativação o que explica o maior parasitismo nestas células;

- III. Identificar o perfil de expressão gênica e vias de sinalização apresentados por células pré-tratadas com o hormônio testosterona infectadas por *Leishmania amazonensis*;

Hipótese: O pré-tratamento de macrófagos com o hormônio testosterona diminui a expressão de moléculas e fatores de transcrição associados ao perfil pró-inflamatório/efetor de resposta.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Local de estudo, população de referência, critérios de inclusão e exclusão

O estudo foi realizado no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LIBM) nas instalações do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe (HU/UFS). Trata-se de um estudo experimental não randomizado com amostragem por conveniência. Foram incluídos 11 indivíduos do sexo masculino ($n= 11$), na faixa etária de 18 a 40 anos e excluídos do estudo pessoas em estado de infecção aguda ou condição clínica que poderiam interferir na resposta do sistema imune, tais como: HIV, HTLV-I, Diabetes *Mellitus*, condições autoimunes diagnosticadas, gestação, vacinação recente, uso de medicamentos imunossupressores recente ou há mais de 15 dias consecutivos (no caso de corticoesteróides) além de indivíduos que estejam em tratamento de reposição hormonal com testosterona ou uso de hormônio do crescimento.

4.2. Isolamento, cultura e diferenciação de monócitos do sangue periférico

Para o isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foi coletada amostra de sangue periférico (30 ml) em material previamente heparinizado e diluído em solução salina estéril a 0,9% na proporção de 1:1. Em seguida, a amostra diluída foi fracionada em tubos contendo 05 mL do reagente Histopaque (Sigma-Aldrich) para cada 10 ml de sangue diluído e centrifugado a 400g de força, por 35 minutos à 25°C, formando diferentes camadas celulares de acordo com o gradiente de densidade. Foi coletada apenas a camada correspondente às células mononucleares, na interface entre o Histopaque e o plasma, as quais foram submetidas a duas lavagens em soro fisiológico 0,9% e centrifugadas na tentativa de preservar somente as células mononucleares. Em câmara de Neubauer, após diluição com solução de Turck, estas células foram contabilizadas e do total de células, $2,5 \times 10^6$ /poço foram semeadas em placas de cultura de 24 poços em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 20% de Soro Bovino Fetal (SBF- Cultilab, Brasil) e solução antimicrobiana (Penicilina + Estreptomicina), a fim de evitar crescimento bacteriano no meio de cultura e consequente ativação indevida das células.

Os monócitos cultivados *in vitro* aderem ao fundo da placa após duas horas em condições adequadas, com estufa à 37°C e CO₂ a 5%. As células não aderentes foram

retiradas após troca do meio de cultura correspondente. Após 24 horas, foi realizada a lavagem dos poços com solução salina estéril, renovando por fim o meio RPMI suplementado. A cultura foi mantida na estufa até a completa diferenciação das células em macrófagos por cinco dias de cultura.

4.3. Estímulo com Testosterona

O estímulo foi realizado utilizando-se solução do hormônio testosterona em acetonitrila (1.0 mg/mL, Testosterone Solution, T-037, Cerillant, Saint Louis, USA). Nesse sentido, as células foram cultivadas com o estímulo de doses fracionadas de testosterona (0, 10, 20, 40, 80 e 160 nM) com reposição do estímulo e troca do meio de cultura a cada dois dias até o final do processo (seis dias) com a infecção destas células por parasitos *Leishmania amazonensis*.

4.4. Cultura de promastigotas de *L. amazonensis*

Foi utilizada a cepa laboratorial de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/73M2269 - modificada geneticamente para a expressão da proteína verde fluorescente –GFP (SILVA et al., 2017) criopreservadas do LIBM (HU/UFS). Os parasitos são mantidos em sua forma promastigota em criotubos a -80°C em solução específica de congelamento (10% DMSO). Após o descongelamento de uma alíquota, as promastigotas são cultivadas em meio de cultura Schneider (GIBCO) suplementado com 10% de SBF, acrescido de Penicilina + Estreptomicina (proporção 1mL:10µL) e Hygromicina (proporção 1mL:5µL) em garrafas para cultura acondicionadas em estufa (24°C). Seu crescimento é acompanhado por 07 dias, período que os parasitos atingem a sua fase mais infectiva (estacionária).

4.5. Infecção *in vitro* de macrófagos com *Leishmania amazonensis*

Após atingido o período de crescimento ideal das formas promastigotas da *Leishmania amazonensis* (fase estacionária) estas foram submetidas à centrifugação para separação das promastigotas vivas que foram diluídas em salina estéril à 0,9% seguindo para a contagem na câmara de Neubauer, por microscópio óptico. A infecção dos macrófagos foi realizada na proporção de 20 promastigotas para cada macrófago (20:1).

Após duas horas de infecção os poços foram lavados duas vezes com salina estéril 0,9% para remoção dos parasitos não internalizados, finalizando com a adição de meio RPMI. Após 18 horas de infecção, foi realizado o descolamento das células aderidas do fundo da placa para posterior leitura e análise por citometria de fluxo.

4.6. Citometria de Fluxo (FACS-CANTO II)

As células foram lavadas com PBS-SBF (2%) e incubadas com anticorpos monoclonais específicos, conjugados com fluorocromos (Biolegend), a 4°C, por 30 minutos protegidas da luz, segundo instruções do fabricante. Após a marcação, as células foram lavadas com PBS-SBF (2%) e fixadas com PBS-Formaldeído (4%) para aquisição dos dados em citômetro de fluxo FACS CANTO II (BD Biosciences) e análise em software especializado FlowJo (Tree Star). Para analisar o fenótipo de superfície dos macrófagos infectados, foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD163-PE, e anti-CD40-APC. Para marcação intracelular foram utilizados anti-TNF- α -PerCP-Cy5.5, anti-IL-12-APC, anti-IL-4- PerCP-Cy5.5 e anti-IL-10-APC (Tabela 01). Os dados da citometria foram apresentados de acordo com a porcentagem de células, a intensidade da mediana de fluorescência (MFI) assim como a razão entre essas duas variáveis considerando a porcentagem de mudança (IMFI “*fold change*”)

Anticorpos de superfície	
Anti-CD40- V510	Proteína coestimulatória associado à ativação de resposta Th1 em macrófagos
Anti-CD163- PE	Receptor de hapto-hemoglobina associado à via alternativa de ativação de macrófagos(M2)
Anticorpos intracelulares	
Anti-TNF α - PECy5.5	Citocina proinflamatória secretada principalmente por macrófagos
Anti-IL10- APC	Fator desativante de macrófagos inibindo a proliferação de resposta Th1
Anti-IL12- APC	Aumenta secreção de IFN γ em macrófagos ativados e induz a via Th1

Anti-IL4- PECy5.5	Possui característica anti-inflamatória e ativa via alternativa de macrófagos (M2)
-------------------	--

Quadro 01. Relação de anticorpos para análise de citometria de fluxo

4.7. Expressão gênica por PCR em tempo real (RT-PCR)

As células nas mesmas condições do experimento analisado por FACS foram expostas ao reagente Trizol (Invitrogen) para extração de mRNA (RNA mensageiro) por meio de protocolo específico sugerido pelo fabricante. Em seguida foi confeccionada molécula de DNA complementar (cDNA) com kit específico contendo a transcriptase reversa (High Capacity- Invitrogen) também seguindo protocolo do fabricante. O cDNA, por ser uma molécula mais estável serve de amostra para a amplificação gênica pela técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) onde por meio do uso de primer e sondas específicas para determinados genes, a partir da ciclagem programadas de temperaturas, pôde-se detectar a expressão relativa desses genes nas amostras estudadas pela metodologia de $\Delta\Delta C_t$. As amostras foram analisadas em equipamento de PCR em tempo real ABI 7500 fast (Thermo-Fisher). Foram analisados genes inerentes tanto uma resposta inflamatória (TREM-1, AIF-1, TLR4, SOCS1 e IRF5) e de resposta anti-inflamatória/regulatória (IL10, STAT6, SOCS3 e IRF4). Todas as sondas utilizadas foram adquiridas da Thermo-Scientific e são certificadas pela empresa para análise com padrão de qualidade garantido (*Best coverage*).

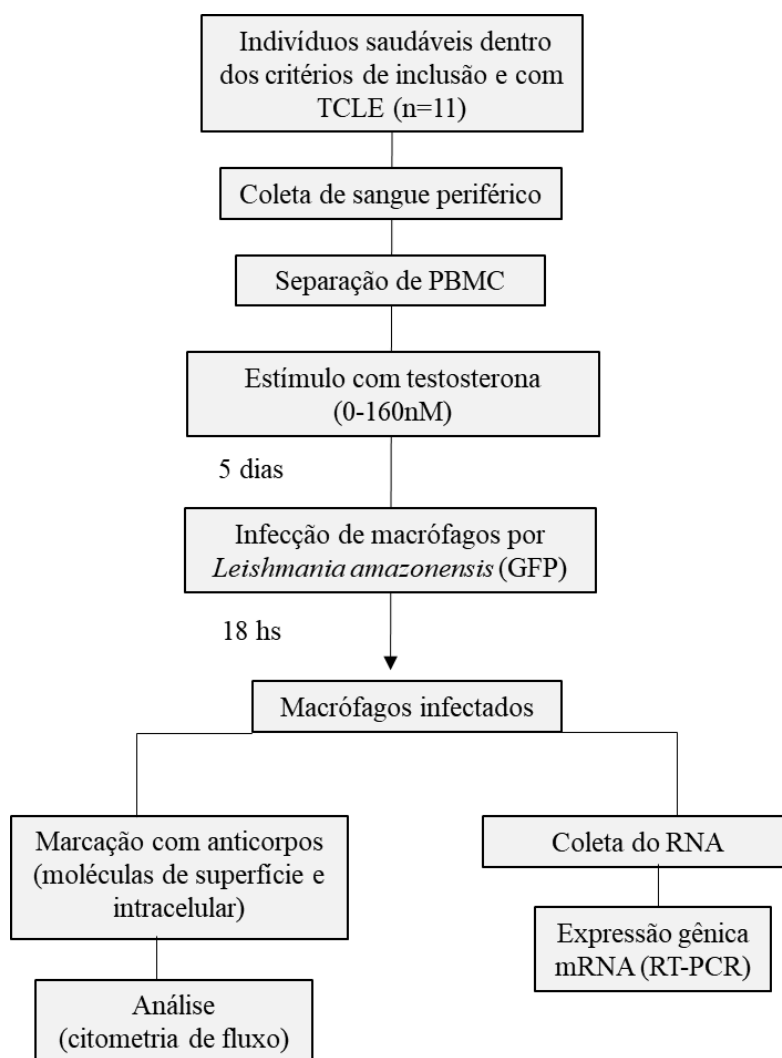


Figura 04. Fluxograma experimental geral.

4.8. Análise estatística

Como teste de normalidade foi utilizado o teste D'Agostino e Pearson. As comparações entre duas condições de tratamento foram analisadas utilizando o teste T de Student (dados com distribuição normal) ou MannWhitney (dados que não obedeceram a distribuição normal). Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prism 7 (Graphpad software, San Diego, CA, USA).

4.9. Aspectos éticos

Este projeto de pesquisa segue as recomendações da Normativa 466/2012 e faz parte de um projeto maior do grupo de pesquisa que já foi aprovado pelo Comitê de Ética

em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe, antes do início de sua execução, **CAAE 0152.0.107.000-07**. Ademais, o presente estudo não proporcionou nenhum grande risco para os sujeitos da pesquisa, além de um pequeno desconforto decorrente de procedimentos simples largamente utilizados na atenção médica aos pacientes, como punção venosa. A punção venosa foi realizada seguindo as recomendações do CDC (Center for Disease Control), utilizando-se equipamento descartável e luvas de proteção. Este procedimento pôde causar dor local e pequena área de equimose, a qual foi evitada por compressão adequada da área de punção e uso de curativo oclusivo. Na ocorrência de equimose, estava previsto o tratamento com Gel anti-inflamatório tópico.

Outro risco potencial do estudo foi o de perda da confidencialidade dos dados. A coordenadora geral do projeto é responsável por guardar com segurança os arquivos físicos (questionários e TCLE), eletrônicos (Banco de dados, resultados brutos) e as amostras do projeto no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Hospital Universitário. O único documento que contém a identificação do paciente é o TCLE, o qual se encontra estocado em local separado dos outros documentos. Assim, nenhum dado clínico, imunológico ou de outra natureza do banco de dados poderá ser associado ao sujeito da pesquisa. As amostras biológicas (soro, sobrenadantes de cultura, DNA ou RNA) dos pacientes são armazenadas no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Hospital Universitário em freezers -20 e -80°C, sob a responsabilidade dos Professores Dra. Amélia Ribeiro de Jesus (Coordenadora do projeto) e Dr. Roque Pacheco de Almeida (Chefe do Laboratório).

5. RESULTADOS

Infecção de macrófagos pré-tratados com testosterona por promastigotas de *Leishmania amazonensis*

Foram recrutados um total de 11 indivíduos do sexo masculino com média de idade de $29,7 \pm 7,21$ anos. Os participantes foram submetidos à coleta de sangue periférico para a separação das células mononucleares. Estas células durante todo o período de diferenciação foram estimuladas com doses gradativas de testosterona e, após a infecção por *L. amazonensis* (GFP) foram analisadas por citometria de fluxo, tanto na porcentagem de células que expressam GFP (indicando a quantidade de células infectadas) quanto na mediana de intensidade de fluorescência (MFI) da GFP como indicador proporcional da taxa de infecção de cada célula (Figura 5A e B).

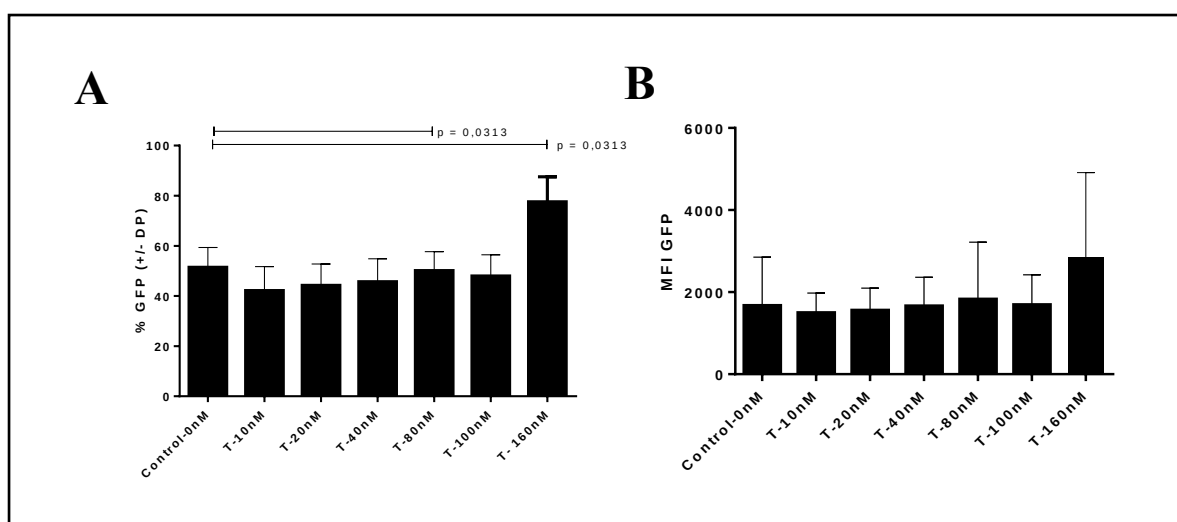


Figura 05. **Infecção por *Leishmania* em células pré-tratadas com testosterona.** Macrófagos estimulados a cada 02 dias com doses fracionadas de testosterona e submetidas à infecção por cepas da *L. amazonensis* (proporção 20:1) por um período de 18 horas de infecção. Estas células foram coletadas para análise por citometria de fluxo sendo demonstrado em (A) a quantificação da porcentagem de células infectadas expressando GFP assim como em (B) a mediana de intensidade de fluorescência (MFI) da molécula GFP (taxa de infecção) nas células infectadas e pré-tratadas com o hormônio. Na primeira barra representa o macrófago infectado sem o estímulo com testosterona (controle) e demais correspondem à infecção por *L. amazonensis* em diferentes concentrações do hormônio testosterona (0, 10, 20, 40, 80, 100 e 160nM), $n = 11$, $*p < 0,05$, teste de Mann Whitney, grupos tratados comparados ao controle.

Foi observado que o pré-tratamento com testosterona aumenta significativamente a quantidade de células infectadas (quantificadas pela expressão de GFP), nas doses de 80 nM

e 160 nM (Figura 5 A). No entanto, não foi observado uma diferença significativa na MFI, na comparação entre as doses utilizadas (Figura 5 B).

Perfil de citocinas produzidas por macrófagos infectados por *Leishmania* com e sem estímulo da testosterona

Macrófagos pré-tratados com testosterona foram submetidos à infecção por *L. amazonensis* e marcados com anticorpos específicos para avaliação dos principais marcadores para macrófagos do tipo de resposta inflamatória (M1) (CD40, IL12 e TNF α) e de resposta anti-inflamatória (CD163, IL10 e IL4) (M2) por citometria de fluxo (Figura 6).

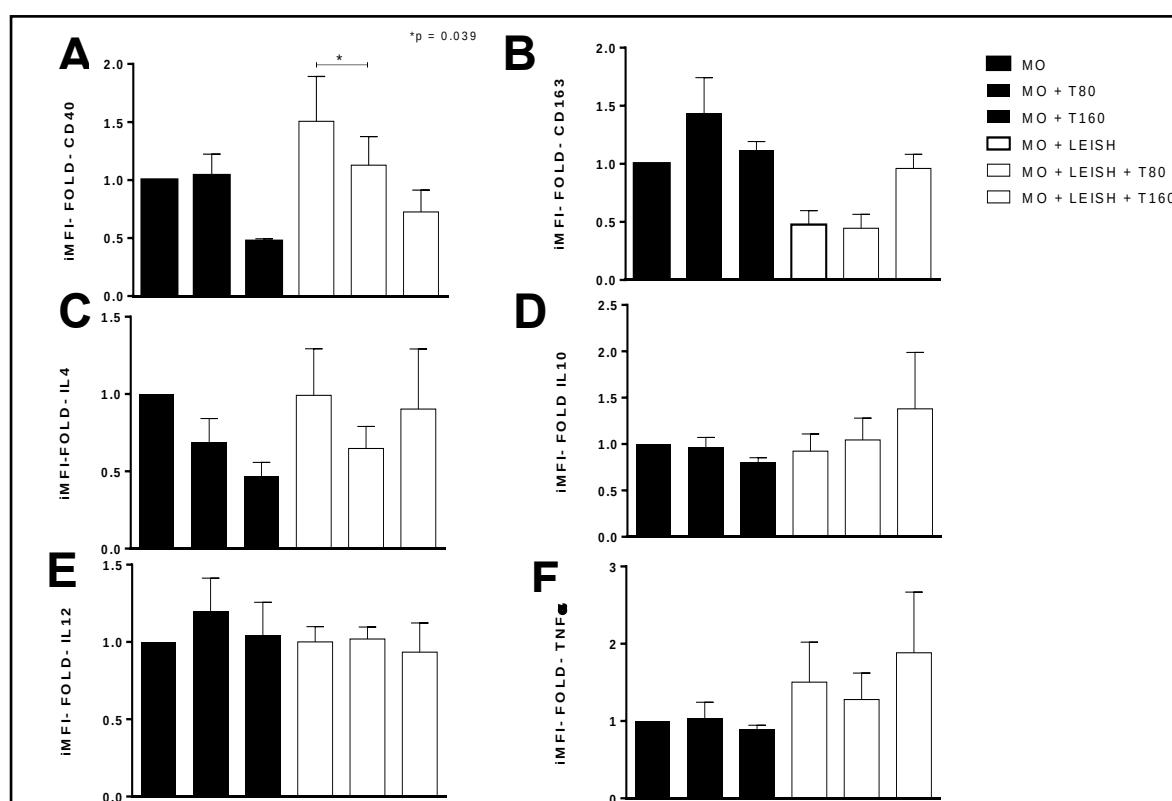


Figura 06. **Perfil celular por citometria de fluxo.** Macrófagos pré-tratados com testosterona e submetidas à infecção por cepas da *L. amazonensis* (proporção 20:1) após 18 horas de infecção foram marcados com anticorpos de superfície (A) CD40 (n=08) e (B) CD163 (n=11) além da citocinas como (C) IL4 (n=6), (D) IL10 (n=5), (E) TNF α (n=5) e (F) IL12 (n=6). A quantificação foi feita pela multiplicação (*iMFI*) da porcentagem de células expressando esses marcadores com a mediana de intensidade de fluorescência (MFI) da respectiva molécula e representados no gráfico por percentual de mudança (*Fold change*) em comparação a um grupo controle, considerado basal. As três primeiras barras representam o macrófago com estímulo da testosterona (0, 80 e 160nM), as demais correspondem à infecção por *L. amazonensis* nas três condições.

Foi observado, portanto, que o pré-tratamento de macrófagos com testosterona induz uma redução significativa ($p=0,03$) na expressão da molécula CD40 principalmente quando

comparado a infecção com e sem pré-tratamento com testosterona. (Figura 6 A). Também foi observado uma tendência no aumento da expressão de CD163 no estímulo da testosterona e na infecção na dose de 160 nM (Figura 6B). Quanto às citocinas antiinflamatórias, apesar de uma possível queda na expressão de IL4 nos macrófagos estimulados com a testosterona, não foi observado um padrão comparado com a infecção (Figura 6C). Contudo há uma tendência no aumento da a IL10 na infecção por *Leishmania* que com o aumento do número de experimentos pode ser confirmado (Figura 6D). Para as demais citocinas não foi observado um padrão comparável de resultados (Figura 6E e 6F).

Análise da expressão gênica em macrófagos tratados com testosterona e infectados por *Leishmania*

A expressão de mRNA de macrófagos infectados e pré-tratados com testosterona (80nM) comparados com o controle (sem hormônios, 0nM), por meio de qPCR mostra a quantificação relativa da expressão de genes de resposta tanto inflamatória quanto anti-inflamatória (Figura 07).

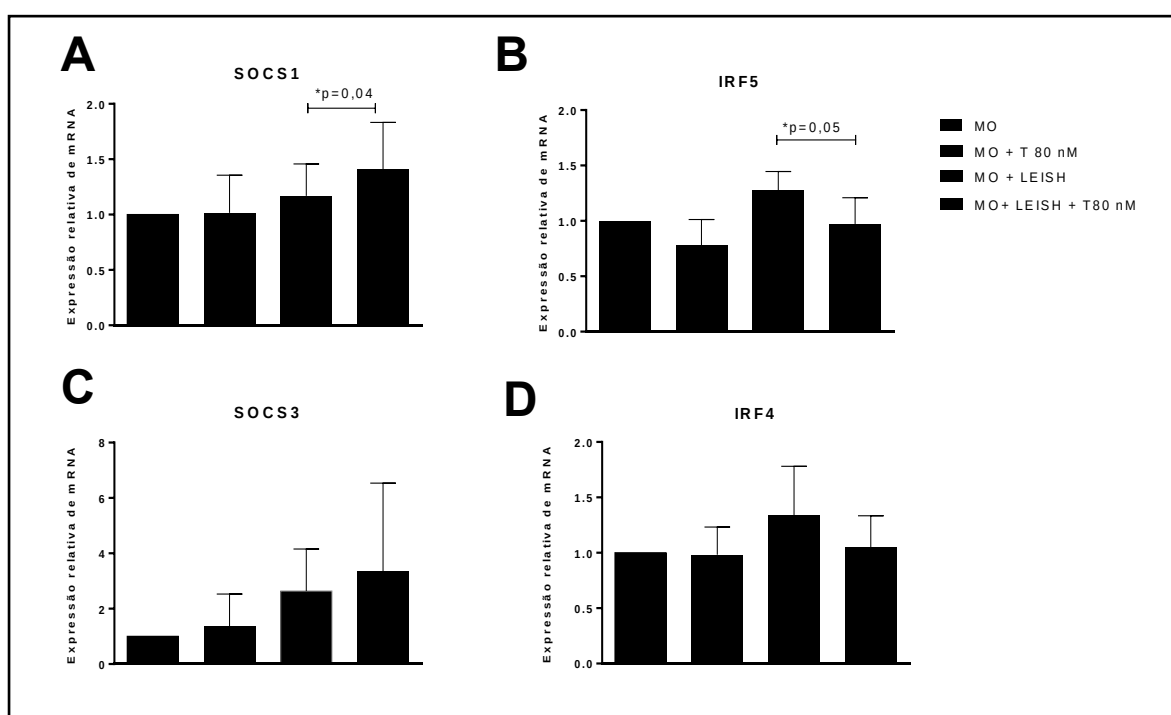


Figura 07. **Perfil de expressão gênica de proteínas de sinalização.** Macrófagos pré-tratados com testosterona (80nM) e submetidas à infecção por cepas da *L.amazonensis* (proporção 20:1) após 18 horas de infecção foi coletado para quantificação relativa de mRNA de fatores de transcrição como (A) SOCS1, (B) IRF5, (C) SOCS3 e (D) IRF4. Na primeira barra representa o macrófago puro (controle), a segunda macrófagos apenas estimulados com 80nM de testosterona e demais correspondem à infecção por *L.amazonensis* nas duas condições, n= 06, valor de p gerado por teste estatístico de Mann Whitney.

Foi observado um aumento significativo da proteína de sinalização SOCS1 ($p=0,04$) com diminuição de fator IFR5 ($p=0,05$) na infecção de macrófagos pré-estimulados com testosterona (Figura 7 A e B). Além disso, apesar de um possível aumento da SOCS3 e diminuição do fator IRF4 também ser observado, principalmente após o estímulo da infecção, resultado não é significativo (Figura 7 C e D).

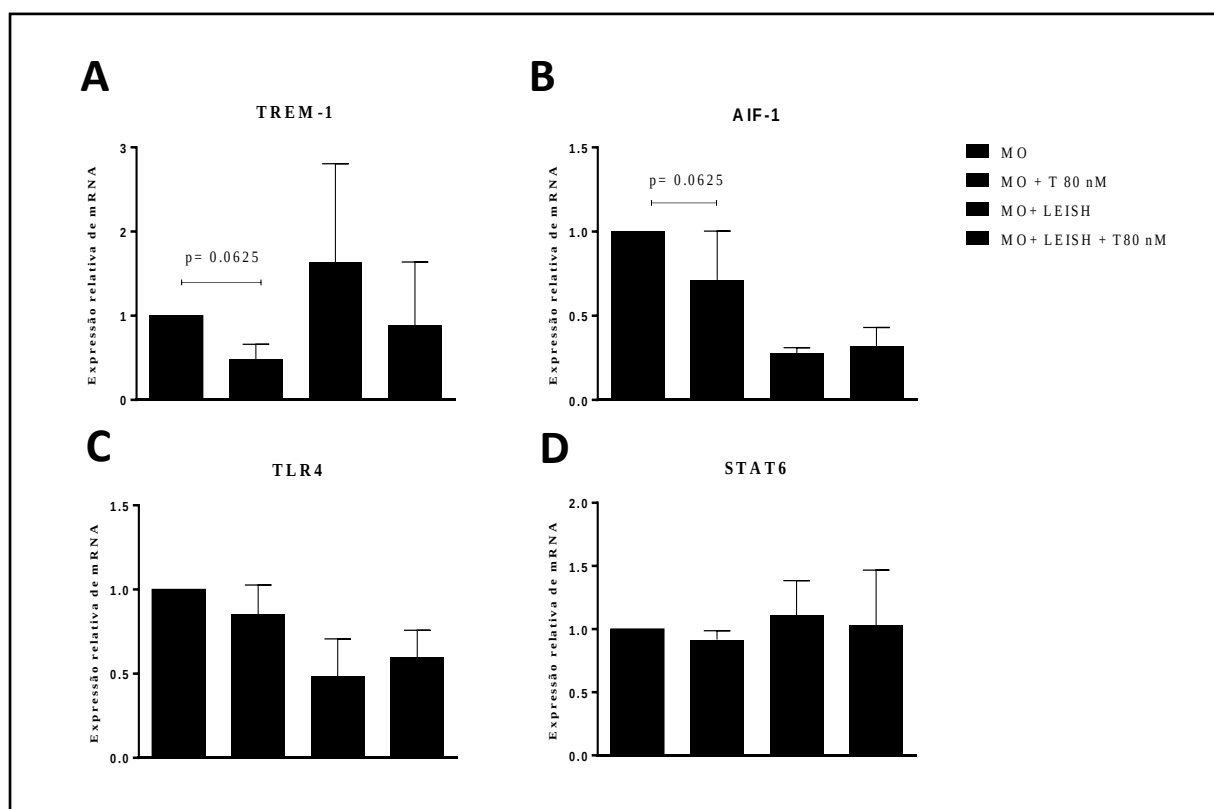


Figura 08. **Perfil de expressão gênica.** Macrófagos pré-tratados com testosterona (80nM) e submetidas à infecção por cepas da *L.amazonensis* (proporção 20:1) após 18 horas de infecção foi coletado para quantificação relativa de mRNA de fatores de transcrição como (A) TREM1, (B) AIF1, (C) TLR4 e (D) STAT6. Na primeira barra representa o macrófago puro (controle), a segunda macrófagos apenas estimulados com 80nM de testosterona e demais correspondem à infecção por *L.amazonensis* nas duas condições, $n = 06$, valor de p gerado por teste estatístico de Mann Whitney.

Outros genes da resposta inflamatória e antiinflamatória de macrófagos analisados foram AIF1, TREM-1, TLR4 e STAT6 (Figura 08). Apesar de não apresentar diferenças significativas entre os grupos foi observado uma tendência da testosterona *per si* causar uma diminuição da expressão de genes associados com a resposta pró-inflamatória em macrófagos como o TREM-1 e AIF-1, que também com o aumento do número de experimentos pode ter sua posição modificada.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo mostra o efeito do tratamento com testosterona em macrófagos humanos no aumento da infecção por *Leishmania amazonensis in vitro*. Além disso, o tratamento com a testosterona potencializou a redução na expressão de CD40 na superfície dos macrófagos, e induziu um aumento da expressão do mRNA do gene SOCS1 e a diminuição do fator de transcrição IFR5, sendo esta, portanto, uma possível via pela qual a testosterona suprime os mecanismos microbicidas dos macrófagos na infecção por *Leishmania*. Assim, pode-se afirmar que a via da testosterona funciona como um potencial facilitador da infecção por *Leishmania* em macrófagos.

A presença de receptores hormonais nas células do sistema imune inato e específico torna estas células capazes de produzir e secretar uma gama de peptídeos e hormônios locais assim como sofrer influência dos mesmos (D'AGOSTINO et al., 1999a; SCHUURS; VERHEUL, 1990). Este fato remete a uma ação do eixo imuno-endócrino na manutenção da homeostase. No entanto, a regulação do sistema imune por hormônios, principalmente na interação com patógenos, ainda não é bem clara.

Diversos estudos descreveram um maior acometimento de homens em doenças causadas por agentes infecciosos, principalmente por agentes intracelulares, incluindo entre elas a leishmaniose (BABOOLAL et al., 2009; MOCK; NACY, 1988; PINZAN et al., 2010a; TRAVI et al., 2002). Estudo realizado no estado de Sergipe, por Campos et. al., em 2017, também relata uma maior frequência de casos de LV em homens principalmente a partir de 15 anos (CAMPOS et al., 2017). Adicionalmente, Oliveira et al., no ano de 2012, descrevem resultado semelhante na comparação entre os sexos nos casos de Hanseníase também no estado de Sergipe, com uma maior frequência de homens apresentando a forma multibacilar da doença (onde há maior proliferação de *M. leprae* em macrófagos e maior disseminação da hanseníase) (DE OLIVEIRA et al., 2012). Apesar desse dimorfismo sexual há muito ser relacionado à fatores comportamentais que insere o homem num grupo de maior fator de risco à exposição de patógenos, tal situação levanta a hipótese que este efeito possa ter uma influência biológica possivelmente por regulação dos hormônios sexuais.

Estudos experimentais têm dado suporte a este efeito da testosterona nas doenças infecciosas. Por exemplo, estudos realizados em modelos de aves de espécie *Lagopus lagopus scoticus* utilizando tratamento com implantes de testosterona e submetendo-os à infecção por um dos principais parasitos que acomete a espécie (o nematódeo *Trichostrongylus tenuis*) observaram que os machos que foram tratados com testosterona

apresentaram significativamente mais infecção pelo parasito comparado aos controles não tratados (MOUGEOT; REDPATH; PIERTNEY, 2006; SEIVWRIGHT et al., 2005). Estudos *in vitro*, utilizando a espécie de *Leishmania donovani* como modelo de infecção, em macrófagos murinos derivados da medula óssea, reafirmam que o tratamento com testosterona aumenta significativamente a infecção por parasitos *Leishmania* (LIU et al., 2005; YIN et al., 1998). Nosso estudo também demonstrou o aumento na quantidade de células infectadas por *Leishmania in vitro* e é o primeiro a relatar o efeito da modulação da testosterona na infecção de macrófagos derivados do sangue periférico humano.

A permanência de parasitos dentro de macrófagos é determinada pelo balanço entre a habilidade da resposta imune em ativar macrófagos infectados e a habilidade dos mecanismos evasivos dos parasitos (MUKBEL et al., 2007) além da influência do próprio microambiente (MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009). Dentre os mecanismos de evasão da *Leishmania* contra a atuação efetora dos macrófagos, as vias hormonais podem tanto favorecer a proliferação do parasita ou até mesmo aumentar sua infectividade (GOTO et al., 1998; HORIKAWA; PENA, 2011; OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005). Os dados do presente estudo sugerem que a testosterona não tem efeito direto na diferenciação dos macrófagos, porém apresenta uma ação potencializadora da infecção por *Leishmania*. Contudo, ainda não está esclarecido se os hormônios atuam aumentando a entrada do parasito nos macrófagos, aumentando sua proliferação, ou se há uma combinação de efeitos sobre o macrófago e o parasito na ativação e diferenciação destes macrófagos interferindo, portanto, no combate contra agentes infecciosos.

A capacidade supressora da testosterona em macrófagos murinos em resposta a endotoxina de lipopolissacarídeos (LPS) foi associada à diminuição da expressão de TLR4, importante receptor para ativação da resposta inflamatória nestas células (RETTEW; HUET-HUDSON; MARRIOTT, 2008). Em outro estudo agora utilizando modelos murinos castrados e tratados com ambos hormônios sexuais (estradiol e testosterona) observaram que, no caso de uma infecção fúngica por *Paracoccidioides brasiliensis*, o tratamento com testosterona induz uma menor produção de INF γ (principal citocina pró-inflamatória no combate a este parasita) e maior produção de IL-10 comparado com o tratamento com o estradiol, que apresenta um efeito protetor em resposta à infecção por este fungo (PINZAN et al., 2010b). No estudo em questão, foi observado uma modulação significativa do pré-tratamento com testosterona na resposta contra a *Leishmania amazonensis* na molécula de superfície CD40, a qual já é descrita como uma molécula associada à resposta pró-inflamatória e que é ativada principalmente pela produção de IFN- γ (WIEHAGEN et al.,

2017). Além disso, apesar de não apresentar significância estatística, foi observado uma tendência no aumento na produção da IL-10 nos macrófagos infectados que foram submetidos ao estímulo da testosterona. O aumento do número de experimentos (principalmente para a marcação das citocinas intracelulares como IL-10 ou dosagem do sobrenadante das culturas) poderiam esclarecer mais informações a respeito dessa influência da testosterona na diferenciação dos macrófagos.

Na última década, vários estudos avaliando fatores genéticos de parasitos e de hospedeiros demonstraram que esta variável está fortemente associada a diferentes formas clínicas, revelando biomarcadores relevantes para a compreensão da patogênese da doença (HIPÓLITO et al., 2019; RÊGO et al., 2019). 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 conseqüentemente favorece a infecção (CACHO TEIXEIRA et al., 2018).

Proteínas de sinalização, como as SOCS (Suppressors Of Cytokines Signaling), atuam induzindo um feedback negativo na sinalização de diversas citocinas. Compreende uma família de proteínas SOCS1-7 e sua expressão está associada à diferenciação da resposta ativação/supressão em macrófagos (WILSON, 2014; ZHOU et al., 2017). Estudos tem demonstrado que a alta proporção da SOCS1 pode ser considerado um marcador de macrófagos do tipo M2 enquanto que a alta expressão de SOCS3 está associado à macrófagos M1 (LIU et al., 2016). Além disso, microRNAs associados à degradação da SOCS1 produzem uma maior resposta inflamatória de macrófagos configurando um maior perfil M1 (MA et al., 2017; ZHANG et al., 2016). No presente estudo, o tratamento das células com testosterona junto a infecção por *Leishmania* foi capaz de induzir o aumento significativo da SOCS1, o que sugere, portanto, o uso desta via para supressão da resposta inflamatória do macrófago.

Outra molécula associada à diferenciação e polarização de macrófagos são os fatores de regulação de interferon (IRF- *Interferon-regulatory factors*). Existe cerca de nove membros descritos da família IRF1-9 porém apenas seis (IRF1-5 e IRF8) estão associados à polarização de macrófagos sendo o IRF5 o principal associado à diferenciação para o macrófago M1 e IRF4 para um macrófago do tipo M2 (CHISTIakov et al., 2018; SAVITSKY et al., 2010). A queda na expressão do IRF5, pode confirmar o efeito supressor da testosterona na infecção por *Leishmania* junto com ativação da SOCS1.

Além disso, outros genes associados à resposta inflamatória/anti-inflamatória foram analisados e apesar de não haver significância estatística, a observação de uma diminuição mais expressiva de moléculas pró-inflamatórias, como no caso do AIF1 e TREM1 nas células pré-tratadas com a testosterona, demonstra um papel importante do hormônio na indução de um macrófago ineficiente para a resposta contra este parasito. No entanto, será necessário um aumento do número de experimentos para trazer mais revelações acerca deste perfil observado.

Merece destaque o estudo realizado por Kumar et. al. ,2018, o qual demonstrou que a *Leishmania donovani* é capaz de induzir a via de sinalização do mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*), que resulta na diminuição da expressão de marcadores para macrófagos do tipo M1 (EROS, NO, iNOS, TNF- α , IL-1 β entre outros) e aumento de marcadores de macrófagos M2 (IL-10, CD163, TGF- β), e que ao inibir a ativação do mTOR, com uso da rapamicina (inibidor seletivo desta via), há uma diminuição da sobrevivência da *Leishmania* nos macrófagos (KUMAR et al., 2018). Portanto, sabendo que a testosterona ativa a via do mTOR em baixas concentrações de testosterona para induzir hipertrofia muscular (BASUALTO-ALARCÓN et al., 2013; WHITE et al., 2013), segue como perspectiva deste estudo analisar se a testosterona também estaria atuando por meio da ativação desta via na infecção de macrófagos humanos infectados por *Leishmania amazonensis in vitro*.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, é possível confirmar a interação entre o eixo imuno-endócrino, sendo a via da testosterona um potencial supressor de macrófagos na resposta contra a infecção por *Leishmania amazonensis in vitro* por meio da modulação da expressão de mRNA de moléculas como SOCS1 e IRF5 e diminuição da expressão de moléculas associadas à resposta pró-inflamatória (principalmente o CD40) tornando assim o macrófago um ambiente favorável a sobrevivência do parasito. Contudo, ainda são necessários mais estudos com vistas na compreensão dos mecanismos da cascata inflamatória que podem estar sendo afetados pela testosterona, como o estudo de outras vias de sinalização associadas ao hormônio, a exemplo da via do mTOR, além da necessidade de analisar também o efeito de bloqueadores do receptor da testosterona (como a flutamida) nos macrófagos frente à infecção por *Leishmania*.

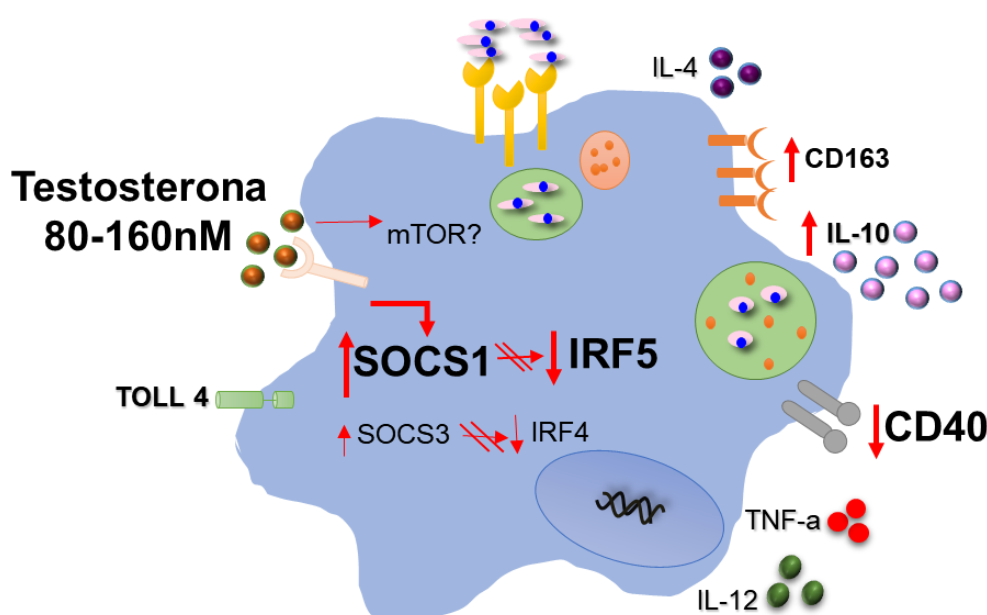


Figura 09. **Representação proposta do efeito da testosterona na infecção por *Leishmania amazonensis in vitro*.** Macrófagos pré-tratados com o hormônio testosterona (80-160 nM) ao ser estimulado com a infecção por *Leishmania amazonensis* induz o aumento significativo da proteína de sinalização SOCS1 e diminuição da expressão de IRF5 culminando numa menor expressão de marcadores pró-inflamatórios principalmente CD40 e tendência no aumento de CD163 e de IL-10 (ambos marcadores antiinflamatórios), tornando o macrófago com resposta ineficiente no combate ao parasito e consequentemente com maiores taxas de infecção. Como proposta segue a investigação da cascata de sinalização da via do mTOR como possível mecanismo afetado pelo hormônio na indução deste efeito no macrófago.

8. PERSPECTIVAS

- 1) Realizar experimentos adicionais utilizando testosterona na dose de 160nM buscando um efeito mais claro nas diferenças nas tendências observadas;
- 2) Dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura, provendo mais informações sobre o efeito do hormônio na supressão/desvio das respostas inflamatórias/antiinflamatórias;
- 3) Avaliação da ativação da cascata do mTOR por RT-PCR;

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, S. K.; MARSHALL, J. D. Dexamethasone promotes type 2 cytokine production primarily through inhibition of type 1 cytokines. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 21, n. 3, p. 147–155, 2001.
- AHMED, S. A.; PENHALE, W. J. The influence of testosterone on the development of autoimmune thyroiditis in thymectomized and irradiated rats. **Clinical and experimental immunology**, v. 48, n. 2, p. 367–74, maio 1982.
- ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. **Immunology Letters**, v. 99, n. 1, p. 17–23, jun. 2005.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLOS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- ANGELE, M. K. et al. **Testosterone and/or low estradiol: Normally required but harmful immunologically for males after trauma-hemorrhage**. Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care. **Anais...**jan. 1998
- ARAÚJO, D. D. C. Análise Espacial Dos Casos Humanos De Leishmaniose Visceral. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 24, n. 2, p. 71, 2017.
- BABOOLAL, S. et al. First insight into Mycobacterium tuberculosis epidemiology and genetic diversity in Trinidad and Tobago. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1911–1914, 1 jun. 2009.
- BADIRZADEH, A. et al. Arginase activity in pathogenic and non- pathogenic species of Leishmania parasites. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 7, p. 1–22, 2017.
- BARRIOS, M. R. et al. Macrophages From Subjects With Isolated GH/IGF-I Deficiency Due to a GHRH Receptor Gene Mutation Are Less Prone to Infection by Leishmania amazonensis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, 30 ago. 2019.
- BASUALTO-ALARCÓN, C. et al. Testosterone signals through mTOR and androgen receptor to induce muscle hypertrophy. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 45, n. 9, p. 1712–1720, set. 2013.
- BENTEN, W. P. M. et al. **Rapid effects of androgens in macrophages**. Steroids. **Anais...**ago. 2004
- BRASIL, M. DA S. Coeficiente de detecção de casos de Leishmaniose Tegumentar por 100.000 habitantes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2015. **Sinan/SVS/MS**, p. 2015, 2015a.
- BRASIL, M. DA S. Casos confirmados de Leishmaniose visceral, Brasil, Grandes regiões e Unidades federativas. 1990 a 2015. Ministério da Saúde. **Sinan/SVS/MS**, p. 0, 2015b.
- BRASIL, M. DA SAÚDE. Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2015*. 2015c.
- BRASIL, M. DA SAÚDE. Coeficiente de detecção de casos de Leishmaniose Tegumentar por 100.000 habitantes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2015. **Sinan/SVS/MS**, p. 2015, 2015d.
- BRASIL, M. DA SAÚDE. Óbitos de Leishmaniose Visceral , Brasil , Grandes Regiões e Unidades Federadas . 2000-2015. **Sinan/SVS/MS**, p. 2015, 2015e.
- BRASIL, M. DA SAÚDE. **Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar**. [s.l.: s.n.].
- BUSKIEWICZ, I. A.; HUBER, S. A.; FAIRWEATHER, D. L. Sex Hormone Receptor Expression in the Immune System. In: **Sex Differences In Physiology**. [s.l.] Elsevier Inc., 2016. p. 45–60.
- CACHO TEIXEIRA, M. et al. Early Suppression of Macrophage Gene Expression by Leishmania braziliensis. 2018.

- CAMPOS, R. et al. Epidemiological aspects and spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in an endemic area in northeastern Brazil. **Geospatial Health**, v. 12, n. 1, 11 maio 2017.
- CHISTIAKOV, D. A. et al. **The impact of interferon-regulatory factors to macrophage differentiation and polarization into M1 and M2** *Immunobiology* Elsevier GmbH, , 1 jan. 2018.
- D'AGOSTINO, P. et al. Sex Hormones Modulate Inflammatory Mediators Produced by Macrophages. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 876, n. 1 NEUROENDOCRIN, p. 426–429, jun. 1999a.
- D'AGOSTINO, P. et al. Sex Hormones Modulate Inflammatory Mediators Produced by Macrophages. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 876, n. 1 NEUROENDOCRIN, p. 426–429, jun. 1999b.
- DE OLIVEIRA, D. T. et al. Neurological disability in leprosy: Incidence and gender association in Sergipe, Brazil. **Geospatial Health**, v. 6, n. 3 SUPPL., p. S125-9, set. 2012.
- DE OLIVEIRA, D. T. et al. Clinical variables associated with leprosy reactions and persistence of physical impairment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 5, p. 600–604, set. 2013.
- DEY, R. et al. Gut Microbes Egested during Bites of Infected Sand Flies Augment Severity of Leishmaniasis via Inflammasome-Derived IL-1 β . **Cell Host and Microbe**, v. 23, n. 1, p. 134–143.e6, 2018.
- DOBASHI, H. et al. Growth hormone restores glucocorticoid-induced T cell suppression. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 15, n. 10, p. 1861–1863, 2001.
- DORSHKIND, K.; HORSEMAN, N. D. The Roles of Prolactin, Growth Hormone, Insulin-Like Growth Factor-I, and Thyroid Hormones in Lymphocyte Development and Function: Insights from Genetic Models of Hormone and Hormone Receptor Deficiency*. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 3, p. 292–312, 1 jun. 2000.
- 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, jan. 2016.
- EDWARDS, C. K. et al. The pituitary gland is required for protection against lethal effects of *Salmonella typhimurium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 6, p. 2274–2277, 1991.
- FARIA, D. R. et al. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 73, n. 12, p. 7853–9, dez. 2005.
- FOGANHOLI, J. N.; VANESSA, Z. Importância da Leishmaniose na Saúde Pública. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 9, n. 17, 2011.
- FOX, H. S.; BOND, B. L.; PARSLow, T. G. Estrogen regulates the IFN- γ promoter. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 146, n. 12, p. 4362–7, 15 jun. 1991.
- FRIEDMAN, D.; NETTL, F.; SCHREIBER, A. D. Effect of estradiol and steroid analogues on the clearance of immunoglobulin G-coated erythrocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 75, n. 1, p. 162–167, 1985.
- GALA, R. R. Prolactin and growth hormone in the regulation of the immune system. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)**, v. 198, n. 1, p. 513–27, out. 1991.
- GARCÍA-GÓMEZ, E. et al. Role of Sex Steroid Hormones in Bacterial-Host Interactions. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.
- GARCIA, L. P. et al. Epidemiologia das doenças negligenciadas no Brasil e gastos federais com medicamentos. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada**, p. 63, 2011.

- GIRAUD, E. et al. **Leishmania proteophosphoglycans regurgitated from infected sand flies accelerate dermal wound repair and exacerbate leishmaniasis via insulin-like growth factor 1-dependent signalling.** [s.l: s.n.]. v. 14
- GÓES, M. A. O.; JERALDO, V. DE L. S.; OLIVEIRA, A. S. Urbanização da leishmaniose visceral: aspectos clínicos e epidemiológicos em Aracaju, Sergipe, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**, v. 9, n. 31, p. 119–126, 26 nov. 2013.
- GORDON, S.; TAYLOR, P. R. **Monocyte and macrophage heterogeneity** *Nature Reviews Immunology*, dez. 2005.
- GOTO, H. et al. Insulin-like growth factor I is a growth-promoting factor for *Leishmania* promastigotes and amastigotes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 22, p. 13211–13216, out. 1998.
- 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.
- GUERRA-SILVEIRA, F.; ABAD-FRANCH, F. Sex Bias in Infectious Disease Epidemiology: Patterns and Processes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 24 abr. 2013.
- 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.
- HORIKAWA, M. M.; PENA, M. S. Apoptose e mimetismo apoptótico em *Leishmania*: estratégias para uma infecção bem sucedida. **Revista da Biologia**, v. 6b, p. 32–37, 2011.
- HOU, J.; WU, F. Z. Effect of sex hormones on NK and ADCC activity of mice. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 10, n. 1, p. 15–22, 1988.
- KATAKURA, T. et al. CCL17 and IL-10 as Effectors That Enable Alternatively Activated Macrophages to Inhibit the Generation of Classically Activated Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 3, p. 1407–1413, 1 fev. 2004.
- KLEIN, S. L. **Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection** *Parasite Immunology*, jun. 2004.
- KNÖ, M. W. et al. Immunomodulatory effects of dehydroepiandrosterone in proestrus female mice after trauma-hemorrhage. **J Appl Physiol**, v. 95, p. 529–535, 2003.
- KUMAR, A. et al. *Leishmania* infection activates host mTOR for its survival by M2 macrophage polarization. **Parasite Immunology**, v. 40, n. 11, p. e12586, 1 nov. 2018.
- LARA-SILVA, F. DE O. et al. Evaluation of chemical spraying and environmental management efficacy in areas with minor previous application of integrated control actions for visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 176, p. 109–113, 2017.
- LEE, S. H.; STARKEY, P. M.; GORDON, S. Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues: Immunohistochemical studies with monoclonal antibody f4/80. **Journal of Experimental Medicine**, v. 161, n. 3, p. 475–489, 1 mar. 1985.
- LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. June, p. 1–8, 2012.
- LIU, L. et al. Modulation of *Leishmania donovani* infection and cell viability by testosterone in bone marrow-derived macrophages: Signaling via surface binding sites. **Steroids**, v. 70, n. 9, p. 604–614, ago. 2005.
- LIU, X. et al. Geraniin Inhibits LPS-Induced THP-1 Macrophages Switching to M1 Phenotype via SOCS1/NF- κ B Pathway. **Inflammation**, v. 39, n. 4, p. 1421–1433, 1 ago. 2016.
- LIVA, S. M.; VOSKUHL, R. R. Testosterone Acts Directly on CD4 + T Lymphocytes to Increase IL-10 Production. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 4, p. 2060–2067, 15 ago. 2001.
- MA, C. et al. Resveratrol upregulates SOCS1 production by lipopolysaccharide-stimulated

- RAW264.7 macrophages by inhibiting miR-155. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 39, n. 1, p. 231–237, 1 jan. 2017.
- MANTOVANI, A. et al. **The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization***Trends in Immunology*, dez. 2004.
- MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 451–483, abr. 2009.
- MCKAY, L. I.; CIDLOWSKI, J. A. **Molecular control of immune/inflammatory responses: Interactions between nuclear factor- κ B and steroid receptor-signaling pathways***Endocrine Reviews*, 1999.
- MÈGE, J. L.; MEHRAJ, V.; CAPO, C. Macrophage polarization and bacterial infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 24, n. 3, p. 230–234, jun. 2011.
- MOCK, B. A.; NACY, C. A. Hormonal modulation of sex differences in resistance to *Leishmania major* systemic infections. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 12, p. 3316–3319, 1988.
- MONTECINO-RODRIGUEZ, E. et al. Primary B cell development is impaired in mice with defects of the pituitary/thyroid axis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 159, n. 6, p. 2712–9, 15 set. 1997.
- MOR, G. et al. Interaction of the Estrogen Receptors with the Fas Ligand Promoter in Human Monocytes. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 1, p. 114–122, 1 jan. 2003.
- MOUGEOT, F.; REDPATH, S. M.; PIERTNEY, S. B. Elevated spring testosterone increases parasite intensity in male red grouse. **Behavioral Ecology**, v. 17, n. 1, p. 117–125, 1 jan. 2006.
- MUKBEL, R. M. et al. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 4, p. 669–675, abr. 2007.
- MURRAY, P. J. et al. **Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines***Immunity* Cell Press, , 17 jul. 2014.
- OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion Mechanisms by Which *Leishmania* Parasites Can Escape the Host Immune Response : a Signaling Point of View
Subversion Mechanisms by Which *Leishmania* Parasites Can Escape the Host Immune Response : a Signaling Point of View. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 2, p. 293–305, 2005.
- OPAS, O. P. DE S. Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas. **Informe de Leishmanioses**, v. 5, p. 1–4, 2017.
- ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 10, p. 925–932, 2016.
- PINZAN, C. F. et al. Immunological Basis for the Gender Differences in Murine *Paracoccidioides brasiliensis* Infection. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, p. e10757, 21 maio 2010a.
- PINZAN, C. F. et al. Immunological Basis for the Gender Differences in Murine *Paracoccidioides brasiliensis* Infection. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, p. e10757, 21 maio 2010b.
- PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. **Leishmania and the macrophage: A multifaceted interaction***Future Microbiology* Future Medicine Ltd., , 1 jan. 2015.
- POPP MARIN, D. et al. Testosterone suppresses oxidative stress in human neutrophils. **Cell Biochemistry and Function**, v. 28, n. 5, p. 394–402, jul. 2010.
- RÊGO, F. D. et al. Molecular variants of *Leishmania* (*Viannia*) *brasilensis* trigger distinct patterns of cytokines and chemokines expression in golden hamster. **Molecular Immunology**, v. 106, p. 36–45, 1 fev. 2019.
- RETTEW, J. A.; HUET-HUDSON, Y. M.; MARRIOTT, I. Testosterone Reduces Macrophage Expression in the Mouse of Toll-Like Receptor 4, a Trigger for Inflammation

- and Innate Immunity. **Biology of Reproduction**, v. 78, n. 3, p. 432–437, 1 mar. 2008.
- RODRIGUES, L. S. et al. Circulating levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I) correlate with disease status in leprosy. **BMC Infectious Diseases**, v. 11, 13 dez. 2011.
- RODRÍGUEZ, N. E.; WILSON, M. E. Eosinophils and mast cells in leishmaniasis. **Immunologic Research**, v. 59, n. 1–3, p. 129–141, ago. 2014.
- ROTUREAU, B. et al. **The flagellum-mitogen-activated protein kinase connection in Trypanosomatids: A key sensory role in parasite signalling and development?** *Cellular Microbiology*, 2009.
- SALEM, M. L.; HOSSAIN, M. S.; NOMOTO, K. Mediation of the immunomodulatory effect of β -estradiol on inflammatory responses by inhibition of recruitment and activation of inflammatory cells and their gene expression of TNF- α and IFN- γ . **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 121, n. 3, p. 235–245, 2000.
- SAUNDERS, E. C. et al. Induction of a Stringent Metabolic Response in Intracellular Stages of *Leishmania mexicana* Leads to Increased Dependence on Mitochondrial Metabolism. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 1, jan. 2014.
- SAVITSKY, D. et al. **Regulation of immunity and oncogenesis by the IRF transcription factor family** *Cancer Immunology, Immunotherapy*, abr. 2010.
- SCHUURS, A. H. W. M.; VERHEUL, H. A. M. **Effects of gender and sex steroids on the immune response** *Journal of Steroid Biochemistry*, 1990.
- SEIVWRIGHT, L. J. et al. Interactions between intrinsic and extrinsic mechanisms in a cyclic species: Testosterone increases parasite infection in red grouse. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 272, n. 1578, p. 2299–2304, 7 nov. 2005.
- SILVA, R. A. et al. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei* in an endemic area for visceral leishmaniasis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 2961, p. 320–327, 2014.
- 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, p. e0005486, 29 mar. 2017.
- SIRACUSA, M. C. et al. 17 β -Estradiol Alters the Activity of Conventional and IFN-Producing Killer Dendritic Cells. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 3, p. 1423–1431, 1 fev. 2008.
- SMITH, P. E. The effect of hypophysectomy upon the involution of the thymus in the rat. **The Anatomical Record**, v. 47, n. 1, p. 119–129, out. 1930.
- STRAUB, R. H. **The complex role of estrogens in inflammation** *Endocrine Reviews*, ago. 2007.
- STUMPO, R. et al. **Alternative activation of macrophage by IL-10**. *Pathobiology. Anais...* S. Karger AG, 1999
- SUBRAMANIAN, S. et al. TREM-1 associated macrophage polarization plays a significant role in inducing insulin resistance in obese population. **Journal of Translational Medicine**, v. 15, n. 1, 28 abr. 2017.
- TOMIOKA, H. et al. **Characteristics of suppressor macrophages induced by mycobacterial and protozoal infections in relation to alternatively activated M2 macrophages** *Clinical and Developmental Immunology*, 2012.
- TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, n. May, p. 750, 2017.
- TRAVI, B. L. et al. Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 5, p. 2288–2296, 2002.
- VAN AGTHOVEN, T. et al. Differential expression of estrogen, progesterone, and epidermal growth factor receptors in normal, benign, and malignant human breast tissues

- using dual staining immunohistochemistry. **The American journal of pathology**, v. 144, n. 6, p. 1238–46, jun. 1994.
- VAN ASSCHE, T. et al. **Leishmania-macrophage interactions: Insights into the redox biology** **Free Radical Biology and Medicine**, 15 jul. 2011.
- VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 309–322, jun. 2012.
- VOGEL, D. Y. S. et al. Human macrophage polarization in vitro: Maturation and activation methods compared. **Immunobiology**, v. 219, n. 9, p. 695–703, 2014.
- 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.
- WHITE, J. P. et al. Testosterone regulation of Akt/mTORC1/FoxO3a signaling in skeletal muscle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 365, n. 2, p. 174–186, 3 jan. 2013.
- WHO, W. H. O. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. **Weekly Epidemiological Record**, n. 83, p. 285–296, 2016.
- WHO, W. H. O. **World Health Organization: data and analysis on leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>.
- WHO, W. H. O. **Number of cases of visceral leishmaniasis reported**. Disponível em: <<http://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISHVNUM?lang=en>>.
- WHO, W. H. O.; PAHO, P. A. H. O. **Epidemiological Report of the Americas**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.paho.org>. Acesso em: 6 fev. 2020.
- WIEHAGEN, K. R. et al. Combination of CD40 agonism and CSF-1R blockade reconditions tumor-associated macrophages and drives potent antitumor immunity. **Cancer Immunology Research**, v. 5, n. 12, p. 1109–1121, 1 dez. 2017.
- WILSON, H. M. **SOCS proteins in macrophage polarization and function** **Frontiers in Immunology** **Frontiers Research Foundation**, , 2014.
- YIN, G. et al. Effect of testosterone on Leishmania donovani infection levels of murine bone marrow derived-macrophages. **Zhongguo ji sheng chong xue yu ji sheng chong bing za zhi = Chinese journal of parasitology & parasitic diseases**, v. 16, n. 4, p. 251–5, 1998.
- ZHANG, Y. et al. Adipocyte-derived microvesicles from obese mice induce M1 macrophage phenotype through secreted miR-155. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 6, p. 505–517, 2016.
- ZHOU, D. et al. SOCS molecules: The growing players in macrophage polarization and function. **Oncotarget**, v. 8, n. 36, p. 60710–60722, 2017.

APÊNDICE A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**Nome do Projeto: Influência da Resposta Imune e Sistema Endócrino na Apresentação Clínica da Hanseníase**

Registro.HU: _____ Nº: ____ - ____

Nome do Paciente: _____

Investigadores: Prof Dr Ricardo Luís Louzada da Silva e Dra Amelia Ribeiro de Jesus, Hospital Universitário Rua Cláudio Batista S.N, Bairro Sanatório, Aracajú,-Brazil., Tel: (79)3218-1805.

No do Projeto:**Convite e Objetivo:**

Você é convidado(a) a participar de um estudo que tem como objetivo entender porque as pessoas têm Hanseníase. Este estudo incluirá pessoas com esta doença que apresentam formas diferentes de feridas na pele. Além das informações deste documento você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico. Caso decida participar do estudo você será solicitado(a) assinar este formulário de consentimento.

Participação voluntária: A sua participação é voluntária. Você pode decidir não participar do estudo em qualquer momento, sem perder os benefícios dos cuidados médicos prestados e de seu tratamento. Caso, após aceite participar, resolva descontinuar sua participação, isto será feito sem qualquer prejuízo para você. Participando ou não do estudo você receberá o medicamento utilizado para o tratamento da Hanseníase.

Finalidade do estudo: Este estudo vai estudar como o seu corpo se defende quando atacado pela bactéria que causa esta doença. Para isto estudaremos o seu sangue e, possivelmente uma parte do exame de biópsia de sua ferida na pele.

Procedimentos: Caso você concorde em participar do estudo, além de ser examinado por um médico clínico, realizar biópsia da lesão e exame de secreção de sua orelha, cotovelos e da mancha para realizar procurar a bactéria que causa a doença, métodos que são necessários para o diagnóstico da doença, você doará sangue para a pesquisa dos mecanismos de defesa do organismo e o seu material genético (DNA) será também estudado. A retirada do pedaço da pele ou da ferida para diagnóstico da sua doença será feita com anestesia para você não sentir dor e parte deste material poderá ser utilizado para os estudos da defesa do seu corpo contra a bactéria que causa a doença. Caso o diagnóstico de Hanseníase não seja confirmado, todo o material obtido para pesquisa será destruído.

Duração do estudo: Após a assinatura do termo de consentimento sua participação no estudo é de 5 anos, a contar do primeiro dia de tratamento, caso você tenha Hanseníase. Periodicamente, você será examinado para determinar a cura da doença ou necessidade de utilização de novo tratamento, que também lhe será fornecido gratuitamente. 32

Confidencialidade: Qualquer informação obtida durante este estudo só será do conhecimento da equipe médica e do órgão que protege o indivíduo em pesquisas (Comitê de ética do Hospital Universitário) Você e qualquer participante desse estudo não será identificado por nome nas publicações dos resultados do estudo. Apenas os representantes do Comitê de Ética em Pesquisa poderão ver sua ficha clínica.

Análises de riscos e benefícios: A retirada de seu sangue e de um pedaço da ferida são feitos se você tiver ferida, ainda antes do tratamento, para confirmar o diagnóstico da doença. Dor leve na retirada de sangue devido à punção com agulha pode ocorrer. Em casos raros a retirada de sangue provoca sangramento ou mancha roxa na pele. Como anestesia local é utilizada, a retirada de um pedaço da ferida não é acompanhada de dor. O tratamento que você receberá é igual ao que todos os pacientes receberão participando ou não do estudo. A participação lhe trará como benefício um acompanhamento clínico mais freqüente. Um médico lhe visitará em sua casa para examinar também sua família. Você deve retornar às consultas médicas regularmente de acordo com marcação de seu cartão do Ambulatório do HU

Retorno de benefícios para o sujeito e para a sociedade: A Hanseníase é relacionada a reação do seu organismo contra a bactéria que causa a doença e o conhecimento destas reações do seu corpo pode contribuir não só para o entendimento da doença como para o aparecimento de novas formas de tratamento ou controle os sintomas e também formas de prevenir a doença.

Custos: Você não terá custos com o tratamento. Você não receberá pagamento por sua participação neste estudo.

Esclarecimentos: Caso você precise de atendimento médico durante o estudo, você pode contactar um dos seguintes Médicos pelo telefone (79)3237-7353: Dra. Amélia Ribeiro de Jesus ou Dr. Roque Almeida. Caso você queira saber alguma coisa sobre seus direitos e de seu filho, como paciente, você pode procurar o Comitê de Ética do Hospital Universitário, cujo endereço encontra-se no início deste consentimento ou pelo telefone (79) 3218-1805.

Consentimento: Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário para guardar.

Assinatura do participante Data Hora

Assinatura do pesquisador Data Hora

Assinatura da testemunha Data Hora

APÊNDICE B- ARTIGO



OPEN ACCESS

Edited by:

 Anabela Cordeiro-de-Silva,
 University of Porto, Portugal

Reviewed by:

 Fátima Ribeiro-Dias,
 Universidade Federal de Goiás, Brazil

 Diego Luis Costa,
 National Institute of Allergy and
 Infectious Diseases
 (NIAID), United States

*Correspondence:

 Amélia M. R. Jesus
 ameliarjesus@igp.usp.br

 † These authors have contributed
 equally to this work and share senior
 authorship

Specialty section:

 This article was submitted to
 Parasites and Host,
 a section of the journal
 Frontiers in Cellular and Infection
 Microbiology

Received: 20 April 2019

Accepted: 16 August 2019

Published: 30 August 2019

Citation:

 Jesus MR, Campos VC, Pires MSA,
 de Oliveira LL, Cazzaniga RA,
 Santos MI, Alves MI, Silva RLL,
 Barreto A, Goto H, Almeida RP,
 Salvador R, Aguiar-Oliveira MH and
 Jesus AMR (2019) Macrophages
 From Subjects With Isolated GH/IGF-I
 Deficiency Due to a GHRH Receptor
 Gene Mutation Are Less Prone to
 Infection by *Leishmania amazonensis*.
 Front. Cell. Infect. Microbiol. 9:277.
 doi: 10.3389/fcimb.2019.00377

Macrophages From Subjects With Isolated GH/IGF-I Deficiency Due to a GHRH Receptor Gene Mutation Are Less Prone to Infection by *Leishmania amazonensis*

 Mônica R. Barros¹, Viviane C. Campos², Natu T. A. Peres^{1,3}, Luis L. de Oliveira¹,
 Rodrigo A. Cazzaniga¹, Márcio B. Santos¹, Munio B. Alves¹, Ricardo L. L. Silva¹,
 Aline Barreto¹, Hiro Goto^{4,5}, Roque P. Almeida¹, Roberto Salvador²,
 Manuel H. Aguiar-Oliveira^{2*} and Amélia M. R. Jesus^{2*}
¹ Division of Immunology and Molecular Biology Laboratory, Federal University of Sergipe, Aracaju, Brazil, ² Division of Endocrinology, Federal University of Sergipe, Aracaju, Brazil, ³ Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁴ Laboratório de Soroprevalência e Imunobiologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ⁵ Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, United States

Isolated growth hormone (GH) deficiency (IGHD) affects approximately 1 in 4,000 to 1 in 10,000 individuals worldwide. We have previously described a large cohort of subjects with IGHD due to a homozygous mutation in the GH releasing hormone (GHRH) receptor gene. These subjects exhibit throughout the life very low levels of GH and its principal mediator, the Insulin Growth Factor-I (IGF-I). The facilitating role of IGF-I in the infection of mouse macrophages by different *Leishmania* strains is well-known. Nevertheless, the role of IGF-I in *Leishmania* infection of human macrophages has not been studied. This study aimed to evaluate the behavior of *Leishmania* infection *in vitro* in macrophages from untreated IGHD subjects. To this end, blood samples were collected from 14 IGHD individuals and 14 age and sex-matched healthy controls. Monocytes were isolated and derived into macrophages and infected with a strain of *Leishmania amazonensis*. In addition, IGF-I was added to culture medium to evaluate its effect on the infection. Cytokines were measured in the culture supernatants. We found that macrophages from IGHD subjects were less prone to *Leishmania* infection compared to GH sufficient controls. Both inflammatory and anti-inflammatory cytokines increase only in the supernatants of the control macrophages. Addition of IGF-I to the culture medium increased infection rates. In conclusion, we demonstrated that IGF-I is crucial for *Leishmania* infection of human macrophages.

Keywords: growth hormone deficiency, insulin growth factor-I deficiency, macrophages, leishmaniasis, phagocytosis, infection, immunology