



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



**ESTUDO DE VIAS DE REGULAÇÃO DA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE
CUTÂNEA CAUSADA POR *L. braziliensis*.**

Maurício Teixeira Nascimento

Tese de Doutorado

Salvador (Bahia), 2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



**ESTUDO DE VIAS DE REGULAÇÃO DA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE
CUTÂNEA CAUSADA POR *L. braziliensis*.**

Discente: Maurício Teixeira Nascimento

Professor-orientador: Dr. Lucas P. de Carvalho

Tese apresentada ao Colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde, da área de concentração em Imunologia e Doenças Infecciosas.

Ficha catalográfica
Bibliotheca Gonçalo Moniz
Sistema Universitário de Bibliotecas
Universidade Federal da Bahia

Nascimento, Maurício Teixeira.

N244 Estudo de vias de regulação da resposta inflamatória em pacientes com
Leishmaniose Cutânea causada por *L. braziliensis* / Maurício Teixeira Nascimento. –
2023.

83, 24, 8 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Pedreira de Carvalho.
Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde,
Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2023.

Inclui anexo.

1. Leishmaniose cutânea. 2. Receptores Notch. 3. Inflamação. I. Carvalho,
Lucas Pedreira de. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina da
Bahia. III. Título.

CDU (1997): 616.928.5

Elaboração (Resolução CFB nº 184/2017):
Ana Lúcia Albano, CRB-5/1784

FONTES DE FINANCIAMENTO

- National Institute of Health – NIH
- Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias em Doenças Tropicais – INCT-DT
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros Titulares:

Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli. Pesquisadora Adjunta do IRR, Fundação Oswaldo Cruz e Professora Adjunta Associada da Universidade de Massachusetts. Atua como vice-coordenadora da regional sudeste da Sociedade Brasileira de Imunologia e como assessora científica da Plataforma de Citometria de Fluxo da Fiocruz-MG. Tem experiência na área de Imunologia, com ênfase em doenças infecciosas e parasitárias, atuando principalmente nos seguintes temas: regulação da resposta imune, subpopulações de células T e monócitos.

Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes. Professor associado da Universidade Federal do Espírito Santo e atua em projetos que vislumbram o impacto da imunosenescência de células T e NK na imunopatogênese da Leishmaniose cutânea humana. Além disso, atua em projetos associados a diferenciação de células residentes de memória e imunoregulação durante a leishmaniose cutânea.

Dra. Valéria de Matos Borges. Professora permanente do Programa de Pós-graduação em Patologia Humana (UFBA/FIOCRUZ), pesquisadora do Instituto Gonçalo Moniz/FIOCRUZ. Tem experiência na área de biomarcadores e biologia celular com ênfase na interação vetor-patógeno-célula hospedeira na infecção por *Leishmania sp.*

Dr. Thiago Marconi de Souza Cardoso. Professor permanente do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, pesquisador do Instituto Gonçalo Moniz/FIOCRUZ e pesquisador associado do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgar Santos/UFBA. Tem experiência na área de Imunologia, com ênfase em Imunologia Celular, atuando principalmente nos seguintes temas: leishmaniose, biomarcadores, células T CD8, exames laboratoriais e infecção.

Dr. Lucas Pedreira de Carvalho. Professor associado de Imunologia da Universidade Federal da Bahia, professor e coordenador do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia e pesquisador do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - FIOCRUZ. Tem experiência na área de Imunologia, com ênfase em Imunologia Aplicada, atuando principalmente nos seguintes temas: leishmaniose, HTLV-1 e hanseníase.

Membro Suplente:

Dr. Augusto Marcelino Pedreira de Carvalho. Professor permanente do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, pesquisador associado do Serviço de Imunologia - HUPES e do Laboratório de Pesquisas Clínicas - FIOCRUZ Bahia. Tem experiência na área de Imunologia e Parasitologia, atuando principalmente nos seguintes temas: Imunopatogênese da leishmaniose tegumentar e resposta imune contra antígenos da saliva de flebotomíneos.

*“Dar o seu melhor não significa ser uma máquina,
significa reconhecer as pequenas conquistas
e ser grato por cada uma delas”.*

Autor desconhecido

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, Maurício e Elizabeth, por todo amor, carinho e dedicação. Por todos os ensinamentos que me ajudaram a chegar até aqui.

A minha amada esposa Daniela, por todo amor, carinho, empatia e paciência. Por se fazer presente em todos os momentos da minha vida, apoiando e incentivando minhas escolhas.

Aos meus amados filhos Benjamim e Miguel, por todas as felicidades que trazem ao meu coração em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos Moisés e Mariana, por todo carinho e amizade. Por estar sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Lucas Pedreira de Carvalho

Deixo aqui meus sinceros agradecimentos por ter acreditado no meu potencial. Pela confiança, suporte e apoio. Pela simplicidade e sabedoria com a qual me ensinou a fazer pesquisa. Tenha minha eterna admiração e gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir a concretização deste trabalho. Dando-me sabedoria, paciência e serenidade para nunca desistir. Por me abençoar todos os dias independente das situações e por ter colocado em meu caminho pessoas maravilhosas que ajudaram nesta realização.

À minha família, por todo carinho e compreensão. Obrigada por sempre acreditarem em mim.

Ao Dr. Edgar Carvalho, pela oportunidade de desenvolver este projeto no LAPEC.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisas Clínicas, Fábio, Camilla, Thiago, e Augusto por todo apoio prestado e pelos bons momentos de dedicação a ciência.

Aos funcionários do Posto de Saúde de Corte de Pedra e a toda equipe que dá suporte clínico na área endêmica.

Aos colegas do programa de pós-graduação, por fazerem esta jornada agradável e enriquecedora.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
 Faculdade de Medicina da Bahia
 Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde
 Largo do Terreiro de Jesus, s/n. Centro Histórico
 40.026-010 Salvador, Bahia, Brasil.
 Tel.: 55 71 3283.5582 | Fax: 55 71 3283.5567
 www.possaude.ufba.br | pos.saude@ufba.br



ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE ARGUIÇÃO E DEFESA DE TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE.

1 Ao décimo quarto dia do mês de novembro de 2023, no horário das 14:00 horas, nas dependências
 2 da Fundação Oswaldo Cruz, **FIOCRUZ**, deu-se início à sessão pública para arguição e defesa da
 3 tese intitulada “Estudo de vias de regulação da resposta inflamatória em pacientes com
 4 leishmaniose cutânea causada por *Leishmania braziliensis*” apresentada pelo pós-graduando
 5 **Maurício Teixeira Nascimento**. A Comissão Examinadora aprovada pelo Colegiado do Programa
 6 de Pós-graduação em Ciências da Saúde, conforme o que estabelecem o Regulamento Geral dos
 7 Cursos de Pós-Graduação da Universidade Federal da Bahia e o Regimento do Programa de Pós-
 8 graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Bahia, foi composta por: Prof. Dr.
 9 Lucas Pedreira de Carvalho, Doutorado em Patologia Humana/UFBA, Professor Adjunto/UFBA
 10 (Orientador/ Presidente); Prof. Dr. Thiago Marconi de Souza Cardoso, Doutor em
 11 Imunologia/UFBA, Professor Permanente PPgCS/ Pesquisador FIOCRUZ-BA; Profa. Dra. Valéria
 12 de Matos Borges, Doutorado em Ciências Biológicas/UFRJ, Pesquisador FIOCRUZ-BA; Prof. Dr.
 13 Daniel Claudio de Oliveira Gomes, Doutor em Ciências Biológicas/UFRJ, Professor
 14 Associado/ UFES; Profa. Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli, Doutora em Bioquímica e
 15 Imunologia/UFMG, Professora Adjunta Associada da Universidade de Massachusetts,
 16 Pesquisadora FIOCRUZ-MG e o Prof. Dr. Augusto Marcelino Pedreira de Carvalho, Doutor em
 17 Ciências da Saúde/ UFBA, Professor Permanente PPgCS/ Pesquisador FIOCRUZ (Suplente). Após
 18 a apresentação da tese, a Comissão Examinadora realizou a arguição que foi respondida
 19 Satisfatoriamente (satisfatoriamente ou insatisfatoriamente) pelo doutorando. A tese
 20 apresentada foi considerada Aprovada (aprovada ou reprovada). E, para constar do
 21 processo de conclusão de curso e de colação de grau¹, a Comissão Examinadora lavrou a presente
 22 Ata que é assinada por todos os seus membros. A Comissão Examinadora aprova a tese:
 23 Com recomendações que devem ser incorporadas à versão final da tese.
 24 Sem recomendações de modificações da versão final.
 25 Será dado prazo máximo de 60 (sessenta) dias para entrega da versão final de modo a ser concluído o
 26 processo de outorga do título de doutor.

27 Assinaturas dos Membros da Banca Examinadora:

28 Lucas Pedreira de Carvalho Lucas Pedreira de Carvalho (Presidente/orientador)
 29 Thiago Marconi de Souza Cardoso Thiago Marconi de Souza Cardoso
 30 Valéria de Matos Borges Valéria de Matos Borges
 31 Daniel Claudio de Oliveira Gomes Daniel Claudio de Oliveira Gomes
 32 Lis Ribeiro do Valle Antonelli Lis Ribeiro do Valle Antonelli
 33 Augusto Marcelino P. de Carvalho Augusto Marcelino Pedreira de Carvalho (Suplente)
 34

35
 36 Ata Aprovada na Sessão do dia 14/11/2023
 37

38 ¹ A emissão do diploma e do histórico escolar está condicionada à entrega, na Secretaria Acadêmica do Programa de
 39 Pós-graduação em Ciências da Saúde, via e-mail, do PDF da versão final da tese, com aprovação do orientador, dos
 40 metadados, e do cadastro da tese pelo discente no Repositório Institucional da UFBA, no prazo máximo de 60 dias.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Faculdade de Medicina da Bahia
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde
Largo do Terreiro de Jesus, s/n. Centro Histórico
40.026-010 Salvador, Bahia, Brasil.
Tel.: 55 71 3283.5582 | Fax: 55 71 3283.5567
www.possaude.ufba.br | pos.saude@ufba.br



MAURICIO TEIXEIRA NASCIMENTO

Estudo de vias de regulação da resposta inflamatória em pacientes com leishmaniose cutânea causada por *Leishmania braziliensis*.

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em: 14/11/2023

Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente



LUCAS PEDREIRA DE CARVALHO

Data: 13/05/2024 09:04:14-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Lucas Pedreira de Carvalho

Doutorado em Patologia Humana/UFBA

Professor Adjunto/UFBA (Orientador/ Presidente)

Thiago Marconi de Souza Cardoso
Pesquisador em Saúde Pública
IGM – FioCruz Bahia
SIAPE: 1585634

Prof. Dr. Thiago Marconi de Souza Cardoso

Doutorado em Imunologia/UFBA

Professor Permanente PPgCS/ Pesquisador FIOCRUZ-BA

Profa. Dra. Valéria de Matos Borges

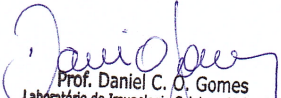
Doutorado em Ciências Biológicas/UFRJ

Pesquisador FIOCRUZ-BA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Faculdade de Medicina da Bahia
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde
Largo do Terreiro de Jesus, s/n. Centro Histórico
40.026-010 Salvador, Bahia, Brasil.
Tel.: 55 71 3283.5582 | Fax: 55 71 3283.5567
www.possaude.ufba.br | pos.saude@ufba.br




Prof. Daniel C. O. Gomes
Laboratório de Imunologia Celular e Molecular
Núcleo de Doenças Infecciosas
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Prof. Dr. Daniel Claudio de Oliveira Gomes
Doutor em Ciências Biológicas/UFRJ
Professor Associado/ UFES

Documento assinado digitalmente



LIS RIBEIRO DO VALLE ANTONELLI

Data: 27/04/2024 16:01:02-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli
Doutora em Bioquímica e Imunologia/UFMG
Professora Adjunta Associada da Universidade de Massachusetts
Pesquisadora FIOCRUZ-MG.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
I. RESUMO	14
II. OBJETIVOS	15
III. INTRODUÇÃO	16
IV. METODOLOGIA	22
V. ARTIGO 1	23
VI. ARTIGO 2	31
VII. ARTIGO 3	42
VIII. DISCUSSÃO	52
IX. PROPOSTA DE ESTUDO	67
X. CONCLUSÃO	69
XI. SUMMARY	70
XII. REFERÊNCIAS	71
XIII. ANEXO I	83

INDICE DE FIGURAS

Artigo 1

Figure 1 - CL patients exhibit high abundance of components of gamma-secretase complex and inflammatory response genes expression in active lesions.

Figure 2 - Non-selective gamma-secretase inhibitor (DAPT) decreases inflammatory-associated proteins production from CL patients in response to *Leishmania* antigens.

Figure 3 - The neutralization of Notch 1 receptor increase production of proinflammatory cytokines from CL patients.

Figure 4 - Selective gamma-secretase inhibitor (JLK6) decreases pro-inflammatory cytokine production from CL patients.

Figure 5 - JLK6 downregulates pro-inflammatory cytokines production by lesion cells from CL patients.

Figure 6 - JLK6 does not affect *L. braziliensis* killing by monocytes from healthy subjects after 72 hours.

Artigo 2

Figure 1 - STRING protein–protein interaction (PPI) network.

Figure 2 – Pioglitazone downregulates immune response induced by TLR2 and TLR4 activation.

Figure 3 – Pioglitazone downregulates the production of inflammatory mediators induced by *SLA*.

Figure 4 – Blockage of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) abrogates pioglitazone-mediated downregulation of inflammatory mediators induced by *SLA*.

Figure 5 – Pioglitazone has cytotoxic effects in *Leishmania braziliensis* parasites.

Figure 6 - Pioglitazone does not interfere in *Leishmania braziliensis*-induced reactive oxygen species (ROS) production.

Figure 7 - Pioglitazone down-regulates the production of inflammatory mediators in cells from CL lesions.

Artigo 3

Figure 1 - High expression of PGE2 pathway components is observed in active CL lesions.

Figure 2 – Increased PTGS2 gene expression at the lesion site is associated with parasite load and clinical outcome.

Figure 3 – High frequency of COX-2⁺ cells at the lesion site is associated with parasite load, disease severity and therapeutic failure.

Figure 4 – PGE2 production in active lesions correlates with disease severity.

Figure 5 – High levels of PGE2 in macrophages infected with *L. braziliensis* correlate with treatment duration.

Figure 6 - Ability of PGE2 to alter macrophages cytokine production.

Figure 7 - Neutralization of COX-2 increases *L. braziliensis* killing by macrophages obtained from CL patients.

Figure 8 - Neutralization of COX-2 in lesion cells decreases production of IL-1 β , TNF and IL-10.

Supplementary figure 1 - IL-10 disables the microbicidal function of macrophages.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IFN- γ	Interferon-gamma
TNF	Fator de Crescimento Tumoral
IL	Interleucina
MMP9	Matrix Metalloproteinase 9 (Matriz Metalloproteinase 9)
LPS	Lipopolissacárido
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
Th1	Type 1 helper cells (Células auxiliaadoras do tipo 1)
CD8	Cluster of Differentiation 8 (grupo de diferenciação 8)
CD4	Cluster of Differentiation 4 (grupo de diferenciação 4)
PGE2	Prostaglandina E2
COX-2	Ciclooxigenase 2
SLA	Soluble Leishmania Antigen (antígeno solúvel de <i>Leishmania</i>)
TLR2	Toll Like Receptor 2 (receptor do tipo toll 2)
TLR4	Toll Like Receptor 4 (receptor do tipo toll 4)
NF- κ B	Nuclear Factor Kappa B (Fator Nuclear Kappa B)
IS	Indivíduos Sadios
LC	Leishmaniose Cutânea
LM	Leishmaniose Mucosa
LD	Leishmaniose Disseminada
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
AINE	Anti-inflamatório não esteroide
PPAR- γ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ (Receptor γ ativado por proliferador de peroxossoma)
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio

I.RESUMO

ESTUDO DE VIAS DE REGULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR *L. braziliensis*.

Pacientes com leishmaniose cutânea (LC) apresentam resposta inflamatória exacerbada associada a danos teciduais e desenvolvimento de úlceras. Nos últimos anos, foram observadas taxas mais elevadas de falha terapêutica ao antimoniatto pentavalente, mas a razão subjacente permanece pouco compreendida. Nossa hipótese é que pacientes com LC apresentem uma diminuição dos mecanismos regulatórios, permitindo assim que a inflamação perdure e a úlcera se desenvolva. Os objetivos do presente estudo foi avaliar o papel da sinalização Notch, ativação do PPAR- γ pela pioglitazona e as funções da PGE2 na resposta inflamatória de pacientes com LC causada por *L. braziliensis*. Nós inicialmente descobrimos que a sinalização via receptor Notch 1 protege os pacientes com LC contra a resposta inflamatória patológica, enquanto o composto JLK6, um inibidor seletivo da gama-secretase que não interfere na sinalização de Notch, demonstrou diminuir a resposta inflamatória *in vitro*, sem alterar a carga parasitária nos monócitos após 72 horas. Posteriormente, mostramos que ativação do PPAR- γ pela pioglitazona, alterou o perfil dos monócitos para M2, diminuiu a resposta inflamatória sem afetar a morte da *L. braziliensis* por monócitos de pacientes com LC. Por fim, descobrimos que o aumento da COX-2/PGE2 está associado à gravidade da doença e à falha terapêutica na LC. Além disso, a neutralização da COX-2 pelo NS398, um AINE seletivo, aumentou a capacidade dos macrófagos em matar a *L. braziliensis*, diminuindo assim a produção de citocinas inflamatórias. Juntos esses achados revelam as vantagens de inibir o complexo gamma-secretase com o composto JLK6 sem interferir na sinalização Notch, ativar o PPAR- γ com a pioglitazona e inibir a síntese de PGE2 por meio da neutralização da COX-2 com composto NS398. Tornando esses três compostos fortes candidatos à terapia adjuvante da LC.

Palavras chave: Leishmaniose cutânea; *L. braziliensis*; inflamação; falha terapêutica; Notch; Pioglitazona; PGE2; PPAR- γ

II. OBJETIVOS

II.1 GERAL

Identificar possíveis vias de regulação da resposta inflamatória em pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*.

II.2 ESPECÍFICOS

- 1.** Avaliar a influência da sinalização Notch na regulação da resposta inflamatória de pacientes com leishmaniose cutânea.
- 2.** Avaliar o papel da Pioglitazona na regulação da resposta inflamatória de pacientes com leishmaniose cutânea via sinalização do PPAR- γ .
- 3.** Avaliar o papel da PGE2 na sobrevivência da *L. braziliensis* e resposta inflamatória de pacientes com leishmaniose cutânea

III. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitida ao homem através da picada de flebótomos fêmeas do gênero *Lutzumya* infectados com este parasito, sendo caracterizada pelo surgimento de lesões ulcerativas que acometem a pele e as mucosas (Desjeux, 1996). Números alarmantes de LTA tem foram observados no último ano no Brasil, onde cerca de 12.878 casos de LTA foram notificados, sendo que dentre as macrorregião do país, a região Nordeste apresentou o segundo maior número de notificações (2.965 casos) e o estado da Bahia foi o segundo estado com o maior número de casos desta região (801 casos) (Brasil, 2022). Dentre as espécies transmissoras da LTA no Brasil, destaca-se a *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* como principal agente etiológico, além disso, a região de Corte de Pedra, localizada no sudeste do estado da Bahia tem sido considerada uma área endêmica para transmissão desta espécie (Brasil, 2017; Jirmanus et al., 2012).

A infecção por *L. braziliensis*, pode causar um amplo espectro de manifestações clínicas inflamatórias e na região de Corte de Pedra são observadas três formas clínicas: A leishmaniose cutânea, caracterizada por uma ou mais lesões ulceradas com bordas elevadas e fundo granulomatoso; A leishmaniose mucosa onde é observado o comprometimento da mucosa nasal e orofaríngea, o que pode favorecer o surgimento de problemas respiratórios bacterianas secundárias; A leishmaniose disseminada, caracterizada por múltiplas lesões papulosas, acneiformes e ulceradas localizadas ao longo do corpo.

(Llanos Cuentas et al., 1984; Castés et al., 1984; Costa et al., 1986; Bittencourt e Barral, 1991; Carvalho et al., 1994; Lessa et al., 2002; Turetz et al., 2002; Guimarães, et al., 2008 Brasil, 2017). Embora, a LM seja considerada a forma mais agressiva e a LD uma forma emergente da LTA, a LC é a forma mais comum da doença representando cerca de 90% dos casos da LTA na Bahia (Jirmanus et al., 2012; Brasil, 2017; SINAN, 2023). Além disso, cerca de 50-70% dos pacientes com LC, apresentam insucesso a terapia com antimoniato pentavalente, o que torna essa forma clínica alvo de interesse de estudo (Unger et al., 2009; Machado et al., 2010; Ponte-Sucre et al., 2017; Lago et al., 2018).

As lesões de pacientes com LC são compostas predominantemente por linfócitos, macrófagos, plasmócitos, poucos parasitos e um intenso processo inflamatório com elevados níveis de citocinas inflamatórias, como TNF, IL-1 β e IL-6 (Llanos Cuentas et al, 1984; Bittencourt e Barral 1991; Saldanha et al., 2017; Carvalho et al., 2019; Passos et al., 2015; Campos et al., 2020). Embora, a resposta inflamatória seja necessária para o controle e eliminação do parasito, a produção exagerada e mal modulada de mediadores inflamatórios causa danos nos tecidos, contribuindo para surgimento de úlceras cutâneas e falha terapêutica (Ribeiro-de-Jesus et al, 1998; Antonelli et al, 2005; Giudice et al, 2012; Carvalho et al., 2012; Passos et al., 2015; Santos et al, 2018; Amorim et al, 2019). Portanto, uma maior compreensão da imunopatologia da LC é de suma importância para que novos tratamentos possam ser desenvolvidos.

Durante a LC é observada uma forte resposta Th1 que está associada a defesa contra o parasito (Follador et al., 2002; Santos Cda et al., 2013), porém evidências substanciais têm demonstrado que as células T CD8 e NK são uma das principais células que conduzem na imunopatologia no local da lesão. A resposta citotóxica gerada através da produção de granzima B por células T CD8 e NK, além de causar danos no tecido, induzem a resposta inflamatória por fagócitos mononucleares (Faria et al., 2009; Santos Cda et al., 2013; Novais et al., 2013; Cardoso et al., 2014; Novais et al., 2017; Amorim et al., 2019; Campos et al., 2020). Os fagócitos mononucleares, por sua vez, são uma importante linha de defesa contra a *Leishmania* na LC, devido a sua capacidade em produzir espécies reativas de oxigênio (ERO) que são nocivas ao parasito (Giudice et al., 2012; Carneiro et al., 2016). Contudo essas células produzem altos níveis de citocinas inflamatórias como TNF e IL-1 β que estão associadas com a gravidade da doença e progressão da doença (Passos et al., 2015; Santos et al., 2018; Franca et al., 2021). É importante ressaltar que em humanos, nem TNF e nem a IL-1 β demonstraram participar da morte do parasito, tornando a regulação negativa dessas citocinas uma abordagem atraente para a terapia adjuvante da LC. Outro fato importante é que os mecanismos que regulam a resposta inflamatória parecem estar diminuídos na LC, sendo observados baixos níveis de IL-10, uma importante citocina regulatória (Bacellar et al., 2002). Desta forma é de extrema importância a descoberta de moléculas e mecanismos que regulem a resposta inflamatória sem afetar a capacidade dos fagócitos mononucleares em destruir a *Leishmania*.

A via de sinalização mediada por receptores Notch controla uma série de funções celulares em mamíferos, incluindo destino celular, produção de citocinas, ativação e proliferação celular (Washburn et al., 1997; Robey et al., 1996; Amsen et al., 2004; Tanigaki et al., 2004). A sinalização Notch ocorre através da ligação de ligantes do tipo Delta ou Jagged aos receptores Notch que são então clivados pelo complexo gama-secretase, após clivado, o domínio intracelular Notch (NICD) transloca-se para o núcleo celular onde se liga ao ativador transcricional mastermind e outros coativadores, ativando a transcrição de genes alvo da sinalização Notch, a exemplo dos genes *HES* e *HEY* (Andersson et al., 2011). A contribuição da sinalização Notch para a ativação de células mononucleares e de células T, bem como para a secreção de citocinas já é bem conhecida (Washburn et al., 1997; Robey et al., 1996; Weijzen et al., 2002; Amsen et al., 2004; Tanigaki et al., 2004; Palaga et al., 2008; Song et al., 2008; Monsalve et al., 2009). Interessantemente, pacientes com LC que tiveram uma má resposta ao tratamento padrão, exibiram uma elevada expressão receptores do tipo Notch e ligantes Delta no local das lesões (Rodrigues et al., 2011). Este fato, chama a atenção para uma possível participação dessa sinalização na resposta inflamatória de pacientes com LC.

Enquanto a interação célula-célula é necessária para a sinalização Notch, moléculas sintéticas e oriundas do metabolismo lipídico desempenham um importante papel na regulação da resposta inflamatória, resistência ou susceptibilidade a infecção por *Leishmania* (Lonardoni et al., 1994; Morato et al., 2014; Brito et al., 2014; Novais et al., 2017; Malta-Santos et al., 2017; Bonyek-Silva et al., 2020).

Neste contexto, drogas antidiabéticas demonstraram serem capazes de regular a resposta inflamatória induzida pela *Leishmania* (Lima et al, 2017; Carvalho et al., 2020). Rosiglitazona e Pioglitazona são drogas da família das tiazolidinedionas (TZDs) que funcionam como sensibilizadores da insulina em tecidos periféricos e hepáticos, além de participarem da regulação da resposta imune por meio da sinalização do receptor gama ativado por proliferador de peroxossoma gama (PPAR- γ). O PPAR- γ é um receptor nuclear expresso em vários tipos de células da resposta imune (Ex.: monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos), e são capazes de regular fatores de transcrição, tais como o fator nuclear kappa B (NF- κ B), através do mecanismo denominado trans-repressão dependente de ligante (Aronoff et al, 2000; Ricote 2007; Bouhlef et al, 2007; Wang et al, 2014; Zhu et al, 2016).

Apesar de já terem sido mostradas as contribuições da Rosiglitazona na modulação negativa da produção de citocinas inflamatórias induzidas por lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania*, (Lima et al., 2017), o uso desta droga *in vivo* apresentou efeitos adversos no sistema cardiovascular, o que implicou em processo de suspensão e revisão (Xu et al., 2021). Neste contexto, a pioglitazone tornou-se uma alternativa terapêutica neste período. No entanto, nenhum estudo foi conduzido para compreender os efeitos da ativação do PPAR- γ pela pioglitazona e seus possíveis efeitos anti-inflamatórios, principalmente na LC humana.

Recentemente foi demonstrado que o aumento da carga parasitária no local da lesão de pacientes com LC está associada à produção descontrolada de uma variedade de moléculas inflamatórias que contribuem para o dano tecidual e falha terapêutica (Amorim et al., 2019).

Desta maneira, uma maior atenção, no entanto, tem sido dada as moléculas que favoreçam a sobrevivência ou morte do parasito.

A PGE2 é um eicosanoide inflamatório derivado do metabolismo do ácido araquidônico (AA) pelas duas isoformas da ciclooxigenase, a isoforma constitutiva COX-1 e a isoforma induzida COX-2. A atividade da PGE2 na resposta imune inata é criticamente dependente da sua interação com um dos seus quatro receptores prostanóides que estão acoplados à proteína G (EP1-4). A ativação do receptor EP1 pela PGE2 aumenta o acúmulo intracelular de cálcio, enquanto a ativação dos receptores EP2 e EP4 induz a produção de adenilato ciclase e cAMP, por sua vez, a ativação do EP3 diminui a formação de cAMP (Hata e Breyer 2004; Sugimoto e Narumiya 2007; Kalinski, 2012). Curiosamente, o aumento de PGE2 e cAMP induziu à ativação de proteínas quinases e diminuição da produção de ERO por fagócitos mononucleares, a favorecendo a persistência e sobrevivência dos patógenos (Serezani et al., 2007; Saha et al., 2014). Apesar de já ter sido mostrado um importante papel da PGE2 na sobrevivência de diversas espécies de *Leishmania*, ainda não está claro o papel dessa molécula na LC causada por *L. braziliensis*.

IV. METODOLOGIA

Este manuscrito foi construído com base na normatização de teses do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia - PPgCS/UFBA que encontra-se no Anexo I.

V. ARTIGO 1










Inhibition of gamma-secretase activity without
interfering in Notch signalling decreases
inflammatory response in patients with
cutaneous leishmaniasis

Emerging Microbes & Infections

2021, VOL. 10 1932608 (8 pages)

<https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1932608>

Inhibition of gamma-secretase activity without interfering in Notch signalling decreases inflammatory response in patients with cutaneous leishmaniasis

Maurício T. Nascimento ^{a,b,*}, Mônica Franca ^{c,*}, Augusto M. Carvalho ^a, Camila F. Amorim ^d, Fábio Peixoto ^a, Daniel Beiting ^d, Phillip Scott ^d, Edgar M. Carvalho ^{a,b,e} and Lucas P. Carvalho ^{a,b,c,e}

^aLaboratório de Pesquisas Clínicas; Instituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Salvador, Brazil; ^bServiço de Imunologia, Complexo Hospitalar Prof. Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil; ^cInstituto de Ciências e Saúde Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil; ^dDepartment of Pathobiology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA; ^eInstituto Nacional de Ciências e Tecnologia-Doenças Tropicais, Salvador, Brazil

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis (CL) patients present an exacerbated inflammatory response associated with tissue damage and ulcer development. Increasing numbers of patients have exhibited treatment failure, which remains not well understood. We hypothesized that adjuvant anti-inflammatory therapy would benefit CL patients. The aim of the present study was to investigate the contribution of Notch signalling and gamma-secretase activity to the inflammatory response observed in CL patients. Notch signalling is a molecular signalling pathway conserved among animal species. Gamma-secretase forms a complex of proteins that, among other pathways, modulates Notch signalling and immune response. We found that Notch 1 cell receptor signalling protects against the pathologic inflammatory response, and JLK6, a gamma-secretase inhibitor that does not interfere with Notch signalling, was shown to decrease the *in-vitro* inflammatory response in CL. Our data suggest that JLK6 may serve as an adjuvant treatment for CL patients.

ARTICLE HISTORY Received 18 March 2021; Revised 14 May 2021; Accepted 16 May 2021

KEYWORDS Cutaneous leishmaniasis; Notch signalling; cytokines; inflammatory response; *Leishmania braziliensis*

Introduction

Leishmania braziliensis infection may lead to the development of cutaneous leishmaniasis (CL), the most prevalent clinical form of tegumentary leishmaniasis. CL lesions are characterized by an intense inflammatory infiltrate, high levels of pro-inflammatory cytokines TNF and IL-1 β , and few parasites [1–6]. The exacerbated inflammatory response observed in these individuals is associated with ulcer development and disease progression [2,3,5,7]. Therapeutic failure in CL remains high, spanning from 30% to 70%, depending on the medication used for treatment and phase of the disease [8–11]. Thus, the search for novel adjuvant therapies, e.g. drugs that decrease inflammation without interfering in parasitic burden, is crucial.

The contribution of cytokines TNF and IL-1 β in tissue damage arising from tegumentary leishmaniasis has been well-described [4,5,12,13]. The use of Pentoxifylline, a drug that decreases TNF production, as adjuvant therapy for mucosal leishmaniasis patients, the most severe form of tegumentary leishmaniasis, was observed to reduce time to healing and treatment relapse [14]. Recently, studies have documented the

association of high levels of IL-1 β with CL severity, and reported decreased levels upon cure [5,12,15,16]. Importantly, in humans, neither TNF nor IL-1 β have been shown to participate in parasite killing, making the down-regulation of these cytokines an attractive approach for adjuvant therapy in tegumentary leishmaniasis, especially considering high reported rates of therapeutic failure [5].

The well-conserved signalling pathway mediated by Notch receptors controls a range of cell functions in mammals, including cell fate, cytokine production, cell activation and proliferation [17–20]. Notch signalling takes place through the binding of ligands, Delta-like or Jagged, to Notch receptors, which are then cleaved by the gamma-secretase protease complex. The Notch intracellular domain (NICD) translocates to the nucleus, binds to the mastermind transcriptional activator and other co-activators, and induces the transcription of Notch target genes [21]. Interestingly, some gamma-secretase inhibitors, such as JLK6, were not found to influence Notch signalling, unveiling a non-canonical Notch signalling pathway not dependent on gamma-secretase activity [22]. The

CONTACT Lucas P. Carvalho  carvalho76@gmail.com  Instituto Gonçalo Moniz - IGM. Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal – Salvador, Bahia, 40296-710, Brazil

*Authors contributed equally to this work

© 2021 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

contribution of Notch signalling to mononuclear and T cell activation, as well as cytokine secretion, is well known [17–20,23–26]. Using an *L. major*-resistant mouse model of CL, it was documented that Notch 1 and 2 signalling is essential for IFN- γ secretion by CD4+ T cells in addition to parasite killing; however, the influence of this signalling on the secretion of pro-inflammatory cytokines was not investigated [27]. The expression of Notch receptors and Delta-like ligands was increased in CL lesions, particularly in patients that responded poorly to treatment, suggesting a role for Notch signalling in the promotion of an inflammatory response against CL [28]. To date, no functional analysis has been performed in human CL in an attempt to address the contribution of Notch signalling or gamma-secretase activity with respect to pro-inflammatory cytokine production, disease expression and parasite killing. To investigate this, we recruited CL patients and performed *in vitro* functional studies. Our results show that the expression of presenilin, a protein present in the gamma-secretase complex, was increased in CL lesions, and that the *in vitro* blockade of gamma-secretase activity decreased the inflammatory response without interfering in the parasite burden of mononuclear phagocytes.

Materials and methods

Subjects

This cross-sectional study was approved by the Institutional Review Board of the Professor Edgard Santos University Hospital Complex (HUPES-UFBA) (protocol no. 25/12) and the Brazilian Commission of Ethics in Research (612.907). All subjects provided written informed consent. This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and subsequent revisions. A total of 36 CL patients were recruited from an area endemic for leishmaniasis – Corte de Pedra, Bahia-Brazil. All patients included had no mucosal disease or diabetes mellitus. Pregnant women, patients older than 60 and younger than 18 years old were also excluded. Diagnostic criteria consisted of the presence of an ulcerated skin lesion, with no evidence of mucosal involvement, and the detection of *L. braziliensis* DNA by PCR. The control group consisted of 5 healthy subjects (HS), living in a non-endemic area of the same state, without any reported exposure to *Leishmania*. All CL patients underwent clinical evaluations prior to beginning treatment.

RNA Sequencing

Unbiased RNA sequencing was performed on CL lesion and healthy subjects skin by our group, as previously described [29]. Raw sequence data is available

on the Gene Expression Omnibus (GEO, accession # GSE127831).

Parasite cultures

An isolate of *L. braziliensis* (MHOM/BR/LTCP11245) was obtained from a skin lesion of a CL patient and identified as *L. braziliensis* by multilocus enzyme electrophoresis [30]. Following isolation, parasites were cryopreserved in frozen nitrogen until use. The parasites selected for this study were not previously passaged in liquid culture medium. After selection, parasites were expanded in Schneider's medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1% L-Glutamine, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 μ g/mL) (Thermo fisher scientific, NY, USA).

Soluble Leishmania Antigen (SLA)

SLA was prepared from an isolate of *L. braziliensis* as previously described [31]. Briefly, promastigotes were re-suspended in lysing solution (Tris, HCL, EDTA and leupeptin), immersed in liquid nitrogen, and subsequently thawed at 37°C. After the freeze-thaw procedure, parasites were sonicated and then centrifuged at 14,000 \times g. The supernatant was filtered and assayed for protein concentrations, tested for endotoxins using the Limulus amoebocyte lysate test (Thermo fisher scientific, NY, USA), and used at a concentration of 5 μ g/ml.

Peripheral blood mononuclear cell cultures and biopsies

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from heparinized venous blood by Ficoll-Paque (GE Healthcare, Chicago, IL) gradient centrifugation (1450 RPM). After washing in saline, cell concentrations were adjusted to 3×10^6 cells in 1 ml of RPMI-1640 (Thermo fisher scientific, NY, USA) supplemented with 10% FBS (Thermo fisher scientific, NY, USA), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 μ g/mL) (Thermo fisher scientific, NY, USA). PBMCs were dispensed into 24-well plates and incubated at 37°C under 5% CO₂ for 72 h in the presence or absence of SLA (5 μ g/ml), anti-Notch-1 (20 μ g/ml) (Thermo fisher scientific, NY, USA), anti-Notch-3 (20 μ g/ml), DAPT (20 μ M) and JLK6 (20 μ M) (R&D Systems, Minneapolis, MS, USA). To determine cellular toxicity of gamma-secretase inhibitors (DAPT or JLK6), we performed a cell viability assay, MTT, and the concentration of 20 μ M showed not to be toxic to PBMC.

Biopsies from *L. braziliensis*-infected patients and HS were performed using a 4-mm punch and cultured in complete RPMI media at 37°C, 5% CO₂ for 72 h in

the presence or absence of JLK6 (20 μ M) (R&D Systems, Minneapolis, MS, USA). Supernatants were collected from PBMC and biopsy cultures and stored at -70°C until the time of cytokine quantification by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MS, USA), in accordance with manufacturer instructions. Non-stimulated cells did not produce relevant amounts of cytokines. Results are expressed in pg/ml.

Monocyte cultures

Monocytes were purified from PBMCs by negative selection using MACS columns (Miltenyi Biotec, CA, USA). Monocyte were prepared following a method previously described by our laboratory to yield a purity of 99%, then characterized by flow cytometry as $\text{CD14}^+\text{CD3}^-\text{CD19}^-$ [32]. Briefly, PBMCs were separated using a Ficoll-Paque (GE Healthcare, Chicago, IL) gradient, placed in 24-well plates at the concentration of 5 million PBMCs/well in 1 mL of RPMI 1640 supplemented with 10% human AB serum plus penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and after 5 h of incubation at 37°C , 5% CO_2 , monocytes were separated by adherence to plastic. Next, cells infected or not with *L. braziliensis* (MOI 5:1), and stimulated or not with 20 μM of JLK6, RPMI-1640 (Thermo fisher scientific, NY, USA) supplemented with 10% FBS (Thermo fisher scientific, NY, USA), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Thermo fisher scientific, NY, USA) at incubation times of 37°C , 5% CO_2 for 2, 48 or 72 h. At each time point, infection rate and parasite burden were evaluated by optical microscopy.

Results

Gamma-secretase activity induces the cleavage of Notch receptors, which activates the Notch signalling pathway. To investigate the participation of Notch signalling components in CL we assessed unbiased gene expression in lesions from CL patients and HS. Our results show that the expression of genes involved in gamma-secretase activity, as *APH1A*, *APH1B*, *GSAP*, *NCSTN*, *PSENE1*, *PSENE2*, and *PSENE3*, as well as those involved in inflammation (*NFKB1*, *NFKB2*, *RELA*, *TNF*, *IL6*, *IL1B*, *IL10*, *CXCL9*, and *GZMB*) and regulation of immune response, IL-10, were increased in CL lesion when compared to healthy skin (Figure 1(a)). The expression of most of genes involved in gamma-secretase activity positively correlated with genes involved in inflammation (Figure 1 (b)).

To investigate the role of gamma-secretase activity in Notch signalling, we stimulated PBMCs cultures from CL patients with SLA in the presence of DAPT, a gamma-secretase and Notch signalling inhibitor, and then assessed levels of molecules

associated with inflammation in CL (IL-6, IL-1 β , TNF, CXCL9, granzyme B, and IFN- γ), and the regulatory cytokine IL-10. Inhibition of gamma-secretase activity by the non-selective inhibitor DAPT was observed to decrease the production of CXCL9 and IL-10 in PBMC cultures from CL patients (Figure 2).

Signalling through Notch-1 in macrophages increases the production of proinflammatory cytokines by these cells and Notch-3 is known to be up-regulated in inflammatory macrophages [23,33]. To examine the role of Notch-1 and -3 in the immune response against CL, we stimulated PBMCs from CL patients with SLA in the presence of Notch-1 and -3 neutralizing antibodies. While the neutralization of Notch-1 and -3 was not shown to effect TNF and granzyme B production, surprisingly, the blockade of Notch-1 increased SLA-induced IL-6, IL-1 β and IL-10, and decreased CXCL9 production (Figure 3). These findings suggest that Notch-1 signalling inhibits the production of IL-1 β and IL-6 in PBMCs, which would confer a benefit to CL patients. These results were unexpected, since available literature data show that signalling through Notch 1 receptor increases pro-inflammatory response by macrophages [23].

Notch signalling can also occur in the absence of gamma-secretase activity. As the inhibition of gamma-secretase produced an opposite effect than Notch-1 and -3 on the production of proinflammatory cytokines, we chose to employ a gamma-secretase inhibitor (JLK6) that does not interfere with Notch signalling [22]. Accordingly, PBMCs stimulated with JLK6 produced lower levels of SLA-induced TNF, IL-1 β , IL-10, CXCL9 and granzyme B (Figure 4). To investigate the anti-inflammatory effects of JLK6 in lesion environment, we cultured cells from CL patients' lesions in presence of JLK6. Our results show that inhibition of gamma-secretase activity with JLK6 decreased levels of IL-6, IL-1 β , granzyme B and IL-10 in cultures of lesion cells (Figure 5).

Considering that the observed decreases in pro-inflammatory cytokines may favour pathogen growth, monocyte were infected with *L. braziliensis* and stimulated or not with JLK6 to investigate the ability of these cells to kill *L. braziliensis in vitro*. The addition of JLK6 increased parasite numbers at 48 h after infection, but did not affect the number of *Leishmania* killed by human macrophages after 48 h (Figure 6).

Discussion

Therapeutic failure rates are high in *L. braziliensis* transmission areas, reaching up to 70% depending on the clinical form of disease [9,10]. Since *L. braziliensis*-infected patients develop an exacerbated inflammatory response that leads to tissue damage, adjuvant therapy designed to decrease inflammation is desirable. For instance, patients with

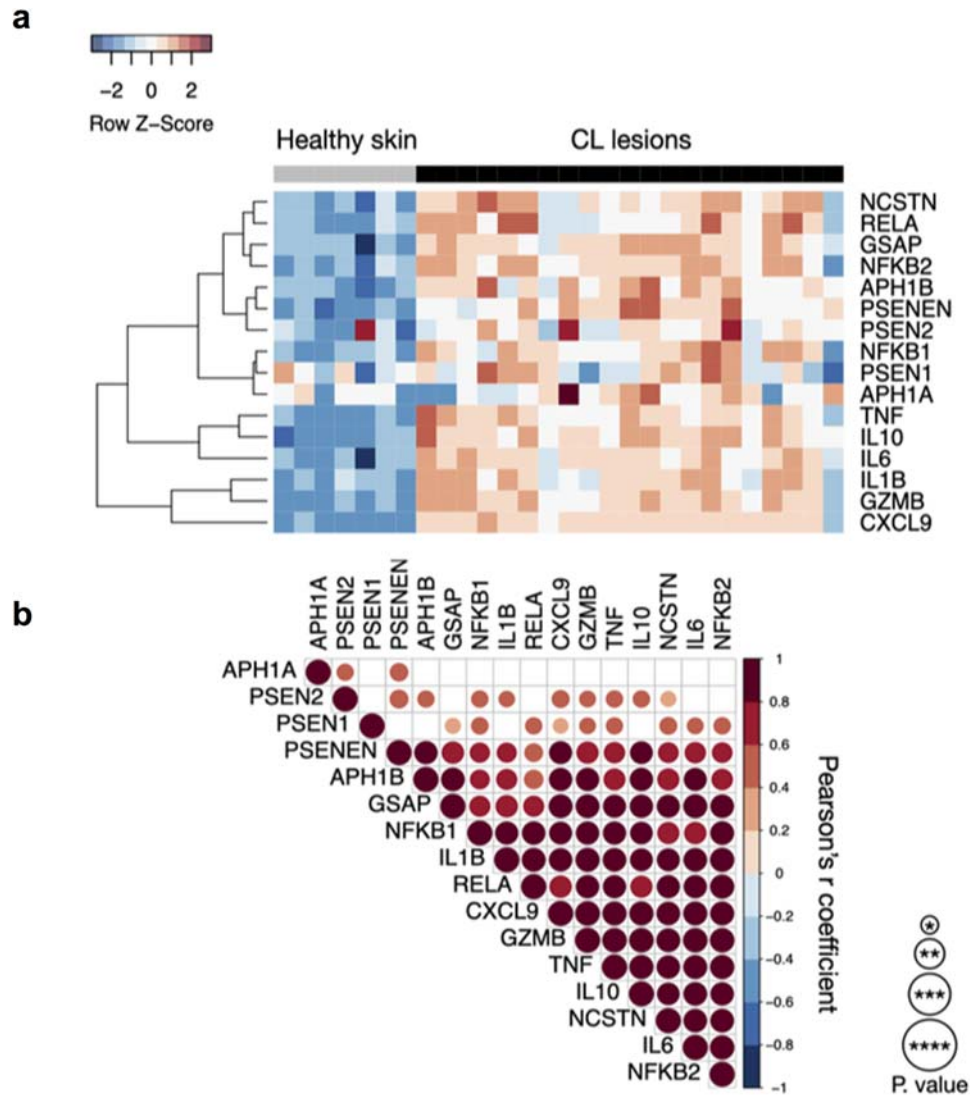


Figure 1. CL patients exhibit high abundance of components of gamma-secretase complex and inflammatory response genes expression in active lesions. (A) Unbiased RNASeq was performed on skin from 7 Healthy Subjects and lesion from 21 CL patients. Heatmap columns and rows represent each individual and gene, respectively. Heatmap colour reflects z-scores of gene abundance across samples. (B) Gene expression from gamma-secretase complex correlates with the inflammatory response in active lesions. Data from RNASeq (21 CL lesions) was used for correlation matrix between components of gamma-secretase complex and *NFKB1*, *NFKB2*, *RELA*, *TNF*, *IL6*, *IL1B*, *IL10*, *CXCL9*, and *GZMB* genes. Pearson's test was used for correlation statistical analysis and *p* value is represented according to the size of the circles.; **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 and *****P* < 0.0001.

mucosal leishmaniasis, the most inflammatory form of tegumentary leishmaniasis, benefit from the adjuvant treatment with pentoxifylline, a drug that down-regulates TNF production [14]. Interestingly, the use of pentoxifylline in combination with pentavalent antimony did not decrease time to cure or relapses in CL, suggesting that inflammatory mediators other than TNF may also play important in disease outcome [34]. Signalling through Notch receptors controls a variety of immunological process, as cell proliferation, CD4 T cell fate, macrophage activation and cytokines production [17,18,20,21,25–27]. Thus, interfering in Notch signalling as therapeutic approach may not be trivial since broad effects may be expected. Our current work investigated the role of Notch signalling on the production of inflammatory mediators in PBMCs and lesion cells from CL patients and found

that JLK6, a gamma-secretase inhibitor, efficiently decreased the observed inflammatory response.

Signalling through Notch 1 in macrophages increases the production of proinflammatory cytokines by these cells [23]. A main finding of our work is that while the blockade of Notch 1 increased proinflammatory cytokine production, the inhibition of gamma-secretase activity by JLK6, a serine protease known to inhibit γ -secretase activity of other substrates but not of Notch, led to decreased levels of inflammatory mediators in cells cultures, supporting the notion that Notch receptor signalling is indeed beneficial to CL patients. It is already known that the Gamma-secretase complex interacts with a variety of substrates, including Notch signalling, and that the JLK6 compound does not directly inhibit the presenilin-dependent gamma-secretase complex; however, the

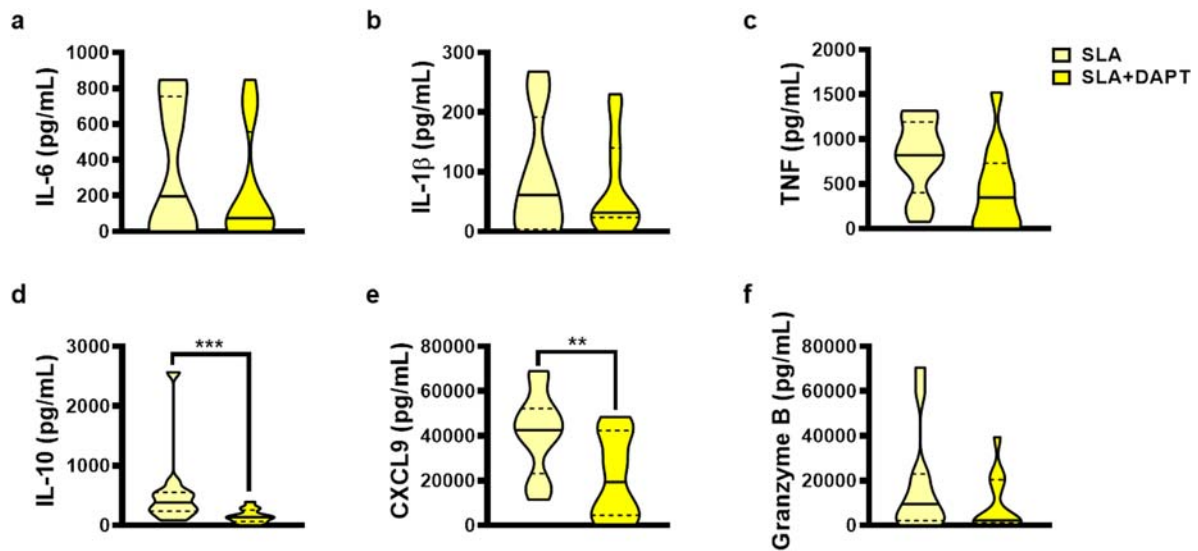


Figure 2. Non-selective gamma-secretase inhibitor (DAPT) decreases inflammatory-associated proteins production from CL patients in response to *Leishmania* antigens. PBMC from CL patients ($n=12$) were cultured in presence or absence of SLA (5 $\mu\text{g/mL}$) and DAPT (20 μM) for 72 h. The levels of IL-6, IL-1 β , TNF, IL-10, CXCL9, and granzyme B were determined in culture supernatants, by ELISA. The black line on the violin plot represents the percentile 50th and the dashed lines, 25th and 75th percentiles, respectively. Statistical analyses were performed using the Wilcoxon test $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$.

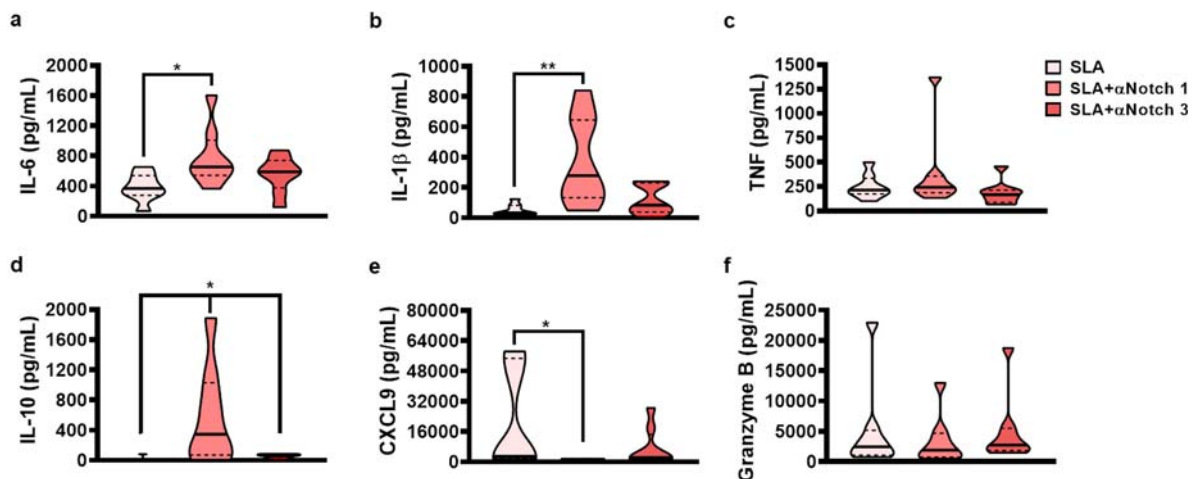


Figure 3. The neutralization of Notch 1 receptor increase production of proinflammatory cytokines from CL patients. PBMC from CL patients ($n=8$) were cultured in presence or absence of SLA (5 $\mu\text{g/mL}$), anti-Notch 1 (20 $\mu\text{g/mL}$) and anti-Notch 3 (20 $\mu\text{g/mL}$) for 72 h. The levels of IL-6, IL-1 β , TNF, IL-10, CXCL9, and granzyme B were determined in culture supernatants, by ELISA. The black line on the violin plot represents the percentile 50th and the dashed lines, 25th and 75th percentiles, respectively. Statistical analyses were performed using the Wilcoxon test $*P < 0.05$ and $**P < 0.01$.

underlying mechanism behind the action of JLK6 is not completely understood. Gamma-secretase inhibitors have been tested in clinical trials. While in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma the use of Gamma-secretase inhibitor was well tolerated, in Alzheimer patients used to decrease the production of Amyloid Beta precursor protein, which is involved in the pathogenesis of this disease, problems with tolerability and side effects have been reported [35,36]. Since most clinical trials have shown that the systemic administration of gamma-secretase inhibitors is associated with severe side effects, mainly in the

intestinal tract, the use of a topical formulation of JLK6 treatment would be a safer option in the case of CL.

Among the desired effects of JLK6 on the immune response of CL patients, a decrease in the production of granzyme B was observed. Cytotoxicity has been shown to contribute to the pathogenesis of CL, and granzyme B, produced mainly by NK cells and CD8 $^{+}$ T lymphocytes, was previously shown to induce the production of proinflammatory cytokines in CL patients [12,37]. Moreover, we observed discrepancies in the ability of JLK6 to

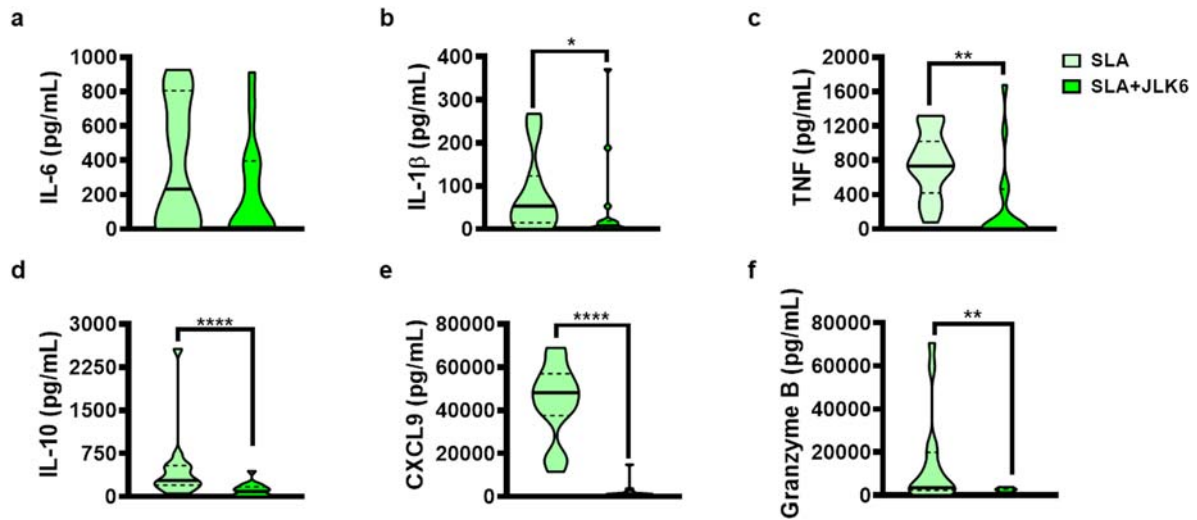


Figure 4. Selective gamma-secretase inhibitor (JLK6) decreases pro-inflammatory cytokine production from CL patients. PBMC from CL patients ($n = 15$) were cultured in presence or absence of SLA (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and JLK6 (20 μM) for 72 h. The levels of IL-6, IL-1 β , TNF, IL-10, CXCL9, and granzyme B were determined in culture supernatants, by ELISA. The black line on the violin plot represents the percentile 50th and the dashed lines, 25th and 75th percentiles, respectively. Statistical analyses were performed using the Wilcoxon test * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and **** $P < 0.0001$.

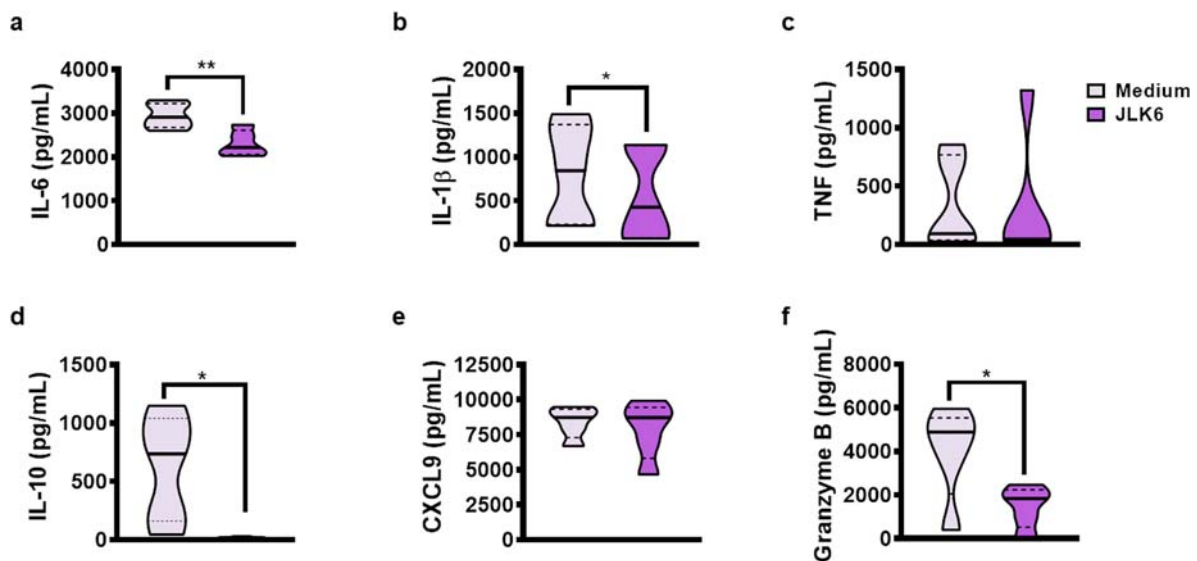


Figure 5. JLK6 downregulates pro-inflammatory cytokines production by lesion cells from CL patients. *L. braziliensis* lesions skin biopsies from CL patients ($n = 5$) were cultured in presence or absence of JLK6 (20 μM) for 72 h. The levels of IL-6, IL-1 β , TNF, IL-10, CXCL9 and granzyme B were determined in culture supernatants, by ELISA. The black line on the violin plot represents the percentile 50th and the dashed lines, 25th and 75th percentiles, respectively. Statistical analyses were performed using the Wilcoxon test * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

modulate immune response in PBMCs versus cells from lesion (e.g. CXCL9 and TNF). These differences may be due to different cell number, composition and state of activation of these cells between both sites. Also, since these individuals have open skin lesions, it cannot be ruled out the interference of other pathogens (i.e. bacteria) in the immune response at lesion site. Finally, the presence of the regulatory cytokine, IL-10, allows parasite multiplication within macrophages [38]. Here the use of JLK6 in *Leishmania*-infected monocyte-derived

macrophages decreased IL-10 levels, what may improve parasite killing. However, at time point of 48 h after infection we observed increase in parasite numbers within macrophages. Future studies will be performed to investigate the effects of JLK6 in reactive oxygen species (ROS) overtime, as it has been shown that ROS production is an important mechanism to kill *Leishmania* in human macrophages [39]. Altogether, these data show that decreasing inflammatory response with JLK6 does not affect the ability of macrophage to kill *Leishmania in-vitro*.

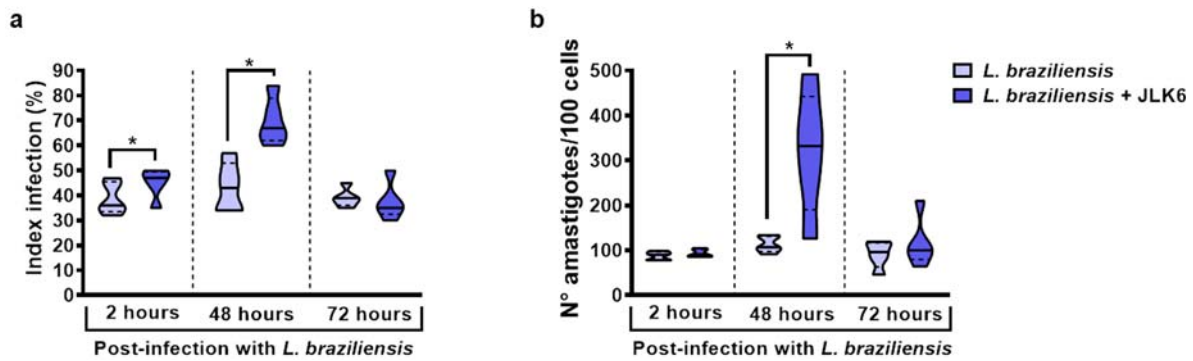


Figure 6. JLK6 does not affect *L. braziliensis* killing by monocytes from healthy subjects after 72 h. Monocytes from HS ($n = 5$) were infected with *L. braziliensis* in stationary phase (ratio 5:1) and cultured in presence or absence of JLK6 (20 μ M) for 2, 48 and 72 h. (A) Frequency of infected cells. (B) Number of *Leishmania* amastigotes/100 monocytes. The black line on the violin plot represents the percentile 50th and the dashed lines represent the 25th and 75th percentiles, respectively. Statistical analyses were performed using the Paired t test * $P < 0.05$.

In conclusion our current work document the advantage of blocking gamma-secretase activity without interfering in Notch signalling, making JLK6 a good candidate for adjuvant CL immunotherapy.

Acknowledgements

We thank Andris K. Walter for English language revision and manuscript copyediting assistance, and Cristiano Franco for secretarial assistance.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author (s).

Funding

This work was supported by National Institutes of Health [AI 094577].

Data availability statement

These data is available at <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.13382723.v1>

ORCID

Maurício T. Nascimento <http://orcid.org/0000-0002-3791-8048>
 Mônica Franca <http://orcid.org/0000-0001-5164-0735>
 Augusto M. Carvalho <http://orcid.org/0000-0002-8031-4805>
 Camila F. Amorim <http://orcid.org/0000-0001-8249-7265>
 Fábio Peixoto <http://orcid.org/0000-0003-3804-8192>
 Daniel Beiting <http://orcid.org/0000-0002-2865-4589>
 Phillip Scott <http://orcid.org/0000-0001-8732-0653>
 Edgar M. Carvalho <http://orcid.org/0000-0002-2697-8002>
 Lucas P. Carvalho <http://orcid.org/0000-0001-5033-1666>

References

- [1] Bittencourt AL, Barral A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991 Jan–Mar;86(1):51–56.
- [2] Carvalho LP, Passos S, Bacellar O, et al. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunol.* 2007 May;29(5):251–258.
- [3] Carvalho LP, Passos S, Schrieffer A, et al. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front Immunol.* 2012;3:301.
- [4] Passos S, Carvalho LP, Costa RS, et al. Intermediate monocytes contribute to pathologic immune response in *Leishmania braziliensis* infections. *J Infect Dis.* 2015 Jan 15;211(2):274–282.
- [5] Santos D, Campos TM, Saldanha M, et al. IL-1beta production by intermediate monocytes is associated with immunopathology in cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol.* 2018 May;138(5):1107–1115.
- [6] Saldanha MG, Queiroz A, Machado PRL, et al. Characterization of the histopathologic features in patients in the early and late phases of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2017 Mar;96(3):645–652.
- [7] Campos TM, Costa R, Passos S, et al. Cytotoxic activity in cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017 Nov;112(11):733–740.
- [8] Costa RS, Carvalho LP, Campos TM, et al. Early cutaneous leishmaniasis patients infected with *Leishmania braziliensis* express increased inflammatory responses after antimony therapy. *J Infect Dis.* 2018 Feb 14;217(5):840–850.
- [9] Machado P, Araujo C, Da Silva AT, et al. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. *Clin Infect Dis.* 2002 Jun 15;34(12):E69–E73.
- [10] Unger A, O'Neal S, Machado PR, et al. Association of treatment of American cutaneous leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 Apr;80(4):574–579.
- [11] Wolf Nassif P, Mello TFPDE, Navasconi TR, et al. Safety and efficacy of current alternatives in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: a systematic review. *Parasitology.* 2017 Jul;144(8):995–1004.

- [12] Novais FO, Carvalho AM, Clark ML, et al. CD8+ t cell cytotoxicity mediates pathology in the skin by inflammasome activation and IL-1 β production. *PLoS Pathog.* 2017 Feb;13(2):e1006196.
- [13] Novais FO, Carvalho LP, Passos S, et al. Genomic profiling of human *Leishmania braziliensis* lesions identifies transcriptional modules associated with cutaneous immunopathology. *J Invest Dermatol.* 2015 Jan;135(1):94–101.
- [14] Lessa HA, Machado P, Lima F, et al. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Aug;65(2):87–89.
- [15] Carvalho AM, Novais FO, Paixao CS, et al. Glyburide, a NLRP3 inhibitor, decreases inflammatory response and is a candidate to reduce pathology in *Leishmania braziliensis* infection. *J Invest Dermatol.* 2020 Jan;140(1):246–249e2.
- [16] Charmoy M, Hurrell BP, Romano A, et al. The Nlrp3 inflammasome, IL-1 β , and neutrophil recruitment are required for susceptibility to a nonhealing strain of leishmania major in C57BL/6 mice. *Eur J Immunol.* 2016 Apr;46(4):897–911.
- [17] Amsen D, Blander JM, Lee GR, et al. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell.* 2004 May 14;117(4):515–526.
- [18] Robey E, Chang D, Itano A, et al. An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages. *Cell.* 1996 Nov 1;87(3):483–492.
- [19] Tanigaki K, Tsuji M, Yamamoto N, et al. Regulation of alphabeta/gammadelta T cell lineage commitment and peripheral T cell responses by Notch/RBP-J signaling. *Immunity.* 2004 May;20(5):611–622.
- [20] Washburn T, Schweighoffer E, Gridley T, et al. Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision. *Cell.* 1997 Mar 21;88(6):833–843.
- [21] Andersson ER, Sandberg R, Lendahl U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development.* 2011 Sep;138(17):3593–3612.
- [22] Petit A, Bihel F, Alves da Costa C, et al. New protease inhibitors prevent gamma-secretase-mediated production of A β 40/42 without affecting Notch cleavage. *Nat Cell Biol.* 2001 May;3(5):507–511.
- [23] Monsalve E, Ruiz-Garcia A, Baladron V, et al. Notch1 upregulates LPS-induced macrophage activation by increasing NF-kappaB activity. *Eur J Immunol.* 2009 Sep;39(9):2556–2570.
- [24] Palaga T, Buranaruk C, Rengpipat S, et al. Notch signaling is activated by TLR stimulation and regulates macrophage functions. *Eur J Immunol.* 2008 Jan;38(1):174–183.
- [25] Song LL, Peng Y, Yun J, et al. Notch-1 associates with IKK α and regulates IKK activity in cervical cancer cells. *Oncogene.* 2008 Oct 2;27(44):5833–5844.
- [26] Weijzen S, Velders MP, Elmishad AG, et al. The Notch ligand jagged-1 is able to induce maturation of monocyte-derived human dendritic cells. *J Immunol.* 2002 Oct 15;169(8):4273–4278.
- [27] Auderset F, Coutaz M, Tacchini-Cottier F. The role of Notch in the differentiation of CD4(+) T helper cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2012;360:115–134.
- [28] Rodrigues KM, Oliveira MP, Maretti-Mira AC, et al. Influence of the Notch system in the therapeutic response of American tegumentary leishmaniasis. *Br J Dermatol.* 2011 Jun;164(6):1228–1234.
- [29] Amorim CF, Novais FO, Nguyen BT, et al. Variable gene expression and parasite load predict treatment outcome in cutaneous leishmaniasis. *Sci Transl Med.* 2019 Nov 20;11(519):1–9.
- [30] Cupolillo E, Grimaldi G, Jr., Momen H. A general classification of new world leishmania using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg.* 1994 Mar;50(3):296–311.
- [31] Teixeira R, Reed SG, Badaro R, et al. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1986 Jan;35(1):79–85.
- [32] Giudice A, Vendrame C, Bezerra C, et al. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *BMC Infect Dis.* 2012 Mar 29;12:75.
- [33] López-López S, Monsalve EM, Romero de Ávila MJ, et al. NOTCH3 signaling is essential for NF- κ B activation in TLR-activated macrophages. *Sci Rep.* 2020 Sep 9;10(1):14839.
- [34] Brito G, Dourado M, Guimarães LH, et al. Oral pentoxifylline associated with pentavalent antimony: a randomized trial for cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2017 May;96(5):1155–1159.
- [35] Mikulca JA, Nguyen V, Gajdosik DA, et al. Potential novel targets for Alzheimer pharmacotherapy: II. update on secretase inhibitors and related approaches. *J Clin Pharm Ther.* 2014 Feb;39(1):25–37.
- [36] Toyn JH, Ahljanian MK. Interpreting Alzheimer's disease clinical trials in light of the effects on amyloid- β . *Alzheimers Res Ther.* 2014;6(2):14.
- [37] Campos TM, Novais FO, Saldanha M, et al. Granzyme B produced by natural killer cells enhances inflammatory response and contributes to the immunopathology of cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2020 Mar 2;221(6):973–982.
- [38] Kane MM, Mosser DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol.* 2001 Jan 15;166(2):1141–1147.
- [39] Novais FO, Nguyen BT, Beiting DP, et al. Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. *J Infect Dis.* 2014 Apr 15;209(8):1288–1296.

VI. ARTIGO 2

Pioglitazone, a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Agonist, Downregulates the Inflammatory Response in Cutaneous Leishmaniasis Patients Without Interfering in *Leishmania braziliensis* Killing by Monocytes

Frontiers in Cellular and Infection Microbiology

2022, VOL. 12, 884237 (11 pages)

doi: 10.3389/fcimb.2022.884237



Pioglitazone, a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Agonist, Downregulates the Inflammatory Response in Cutaneous Leishmaniasis Patients Without Interfering in *Leishmania braziliensis* Killing by Monocytes

OPEN ACCESS

Edited by:

Ricardo Goncalves,
Universidade Federal de Minas Gerais,
Brazil

Reviewed by:

Mary Wilson,
The University of Iowa, United States
Alessandra Marcia da Fonseca-
Martins,
Federal University of Rio de Janeiro,
Brazil

*Correspondence:

Lucas P. Carvalho
carvalho76@gmail.com

Specialty section:

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

Received: 25 February 2022

Accepted: 13 June 2022

Published: 14 July 2022

Citation:

Nascimento MT, Cordeiro RSO,
Abreu C, Santos CP, Peixoto F,
Duarte GA, Cardoso T, de Oliveira CI,
Carvalho EM and Carvalho LP (2022)
Pioglitazone, a Peroxisome
Proliferator-Activated Receptor- γ
Agonist, Downregulates the
Inflammatory Response in Cutaneous
Leishmaniasis Patients Without
Interfering in *Leishmania braziliensis*
Killing by Monocytes.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 12:884237.
doi: 10.3389/fcimb.2022.884237

Maurício T. Nascimento^{1,2,3}, Ravena S. O. Cordeiro¹, Cayo Abreu¹, Camila P. Santos^{1,3}, Fábio Peixoto^{1,3}, Gabriela A. Duarte⁴, Thiago Cardoso^{1,2}, Camila I. de Oliveira^{3,4,5}, Edgar M. Carvalho^{1,2,3,5} and Lucas P. Carvalho^{1,2,3,5*}

¹ Laboratório de Pesquisas Clínicas, Instituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Salvador, Brazil, ² Serviço de Imunologia, Complexo Hospitalar Prof. Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil, ³ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil, ⁴ Laboratório de Enfermidades Infecciosas Transmitidas por Vetores, Instituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Salvador, Brazil, ⁵ Ministério de Ciências e Tecnologia, Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia-Doenças Tropicais, Salvador, Brazil

Patients with cutaneous leishmaniasis (CL) due to *Leishmania braziliensis* infection have an exacerbated inflammatory response associated with tissue damage and ulcer development. An increase in the rate of patients who fail therapy with pentavalent antimony has been documented. An adjuvant therapy with an anti-inflammatory drug with the potential of *Leishmania* killing would benefit CL patients. The aim of the present study was to investigate the contribution of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) activation by pioglitazone in the regulation of the inflammatory response and *L. braziliensis* killing by monocytes. Pioglitazone is an oral drug used in the treatment of diabetes, and its main mechanism of action is through the activation of PPAR- γ , which is expressed in many cell types of the immune response. We found that activation of PPAR- γ by pioglitazone decreases the inflammatory response in CL patients without affecting *L. braziliensis* killing by monocytes. Our data suggest that pioglitazone may serve as an adjunctive treatment for CL caused by *L. braziliensis*.

Keywords: cutaneous leishmaniasis (CL), PPAR- γ , pioglitazone, inflammation, monocytes

INTRODUCTION

Infection by *Leishmania braziliensis* causes a clinical spectrum of diseases in which cutaneous leishmaniasis (CL) is the most prevalent clinical form. CL lesions present an intense inflammatory infiltrate with the predominance of lymphocytes, mononuclear phagocytes, and a few parasites (Bittencourt and Barral, 1991; Saldanha et al., 2017). Although the inflammatory response is necessary

to control parasite replication, an exaggerated production of pro-inflammatory cytokines induces tissue damage and the development of skin ulcers (Ribeiro-de-Jesus et al., 1998; Bacellar et al., 2002; Antonelli et al., 2005; Carvalho et al., 2007; Carvalho et al., 2012; Giudice et al., 2012; Novais et al., 2015; Santos et al., 2018; Amorim et al., 2019; Carvalho et al., 2020). In areas of *L. braziliensis* transmission, the use of pentavalent antimonial (Sb^V) is the first drug of choice. However, an elevated rate of therapeutic failure rates has been reported, reaching 70% depending on the clinical form. Moreover, patients in the pre-ulcerative phase of the disease, as well as elderly subjects, are more likely to fail Sb^V therapy (Machado et al., 2002; Unger et al., 2009; Lago et al., 2018; Costa et al., 2018). Thus, the discovery of pharmacologic and immunological targets to decrease inflammation and parasite replication is highly important.

Previous studies have shown that the association between Sb^V and immunomodulatory drugs is beneficial for CL patients. The use of topical granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) in association with standard doses (20 mg/kg/20 days) of Sb^V decreased healing time in refractory CL patients (Almeida et al., 1999). Pentoxifylline, a drug that decreases TNF production, associated with Sb^V was also more effective in the treatment of mucosal leishmaniasis patients when compared to Sb^V alone (Lessa et al., 2001; Machado et al., 2007).

Recently, studies have shown the possibility of using antidiabetic drugs to regulate the immune response in various types of inflammatory diseases such as CL (Carvalho et al., 2020), multiple sclerosis and metabolic syndrome (Negrotto and Mauricio, 2016), psoriasis (Singh and Anil, 2016), and diverticulitis (Freckelton et al., 2017). Pioglitazone and rosiglitazone are antidiabetic drugs from the family of thiazolidinediones (TZDs) that function as insulin sensitizers in peripheral and hepatic tissues by activating nuclear peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ). PPAR- γ is a nuclear receptor expressed in several cell types of the immune response (e.g., monocytes, macrophages, dendritic cells, and lymphocytes), and signaling through PPAR- γ can regulate transcription factors such as nuclear factor kappa B (NF- κ B) through ligand-dependent trans-repression mechanism (Aronoff et al., 2000; Ricote and Glass, 2007; Bouhrel et al., 2007; Wang et al., 2014; Zhu et al., 2016). The contribution of rosiglitazone and pioglitazone in the activation of PPAR- γ skews monocytes and macrophages to an M2 profile with enhanced anti-inflammatory properties (Bouhrel et al., 2007). Moreover, rosiglitazone activates PPAR- γ in murine bone marrow-derived macrophages, decreasing the production of pro-inflammatory cytokines in response to *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) (Lima et al., 2017). To date, the benefits of pioglitazone in the modulation of the inflammatory response and enhancement of parasite killing have not been evaluated in human CL.

Classically activated monocytes/macrophages produce pro-inflammatory soluble factors such as TNF, IL-1 β , IL-6, and MMP9, while the alternative activation induces the expression of CD163, playing a pivotal role in wound healing (Porcheray

et al., 2005; Giudice et al., 2012; Campos et al., 2014; Passos et al., 2015; Santos et al., 2018; Kasuya et al., 2018; Kim et al., 2019). CD163 is a haptoglobin-hemoglobin scavenger receptor present in monocytes/macrophages, and it is associated with the resolution of inflammation and the production of anti-inflammatory cytokines (Zwadlo et al., 1987; Högger et al., 1998; Kristiansen et al., 2001; Porcheray et al., 2005). The soluble form of CD163 (sCD163), however, is associated with inflammation, and sCD163 levels are increased in many inflammatory diseases (Kusi et al., 2008; Hassan et al., 2016; Endo et al., 2016; Silva et al., 2017; Nielsen et al., 2021). In this article, we show for the first time that exposure to pioglitazone skews monocytes from CL patients toward the alternative activation profile by decreasing the production of TNF, IL-1 β , IL-6, MMP9, and sCD163, while it does not interfere in *Leishmania* killing. These findings suggest that pioglitazone is a strong candidate for adjuvant therapy in CL patients.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

This study was approved by the Institutional Review Board of the College of Medicine of Bahia (protocol no. 2.471.185) and the Brazilian Commission of Ethics in Research (2.512.434). All subjects provided written informed consent. This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and subsequent revisions. Fifteen CL patients were recruited from an endemic area of leishmaniasis—Corte de Pedra, Bahia-Brazil. Diagnostic criteria consisted of the presence of an ulcerated skin lesion, with no evidence of mucosal involvement, and the detection of *L. braziliensis* DNA by PCR (Cupolillo et al., 1994; Medzhitov and Janeway, 2000). A control group consisted of twelve healthy subjects (HSs) living in a non-endemic area of the same state without any reported exposure to *Leishmania*. All CL patients underwent clinical evaluations prior to the beginning of treatment.

Parasite Cultures

An isolate of *L. braziliensis* (MHOM/BR/LTSCP11245) was obtained from a skin lesion of a CL patient and identified as *L. braziliensis* by multilocus enzyme electrophoresis (Polari et al., 2019; Nascimento et al., 2021). Following isolation, parasites were cryopreserved in frozen nitrogen until use. Parasites were thawed and expanded in culture only once for this study. After selection, parasites were expanded in Schneider's medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine, penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 μ g/ml) (Thermo Fisher Scientific, New York, NY, USA). *Leishmania* parasites in the stationary phase were used.

Soluble *Leishmania* Antigen

Soluble *Leishmania* antigen (SLA) was prepared from an isolate of *L. braziliensis* as previously described (Reed 1986). Briefly, promastigotes were resuspended in lysis solution (Tris, HCL,

EDTA, and leupeptin), immersed in liquid nitrogen, and subsequently thawed at 37°C. After the freeze–thaw cycle, parasites were sonicated and then centrifuged at 14,000 × g. The supernatant was filtered, and protein concentration and endotoxin levels (Limulus lysate test (Fisher Scientific, NY, USA)) were determined. The acceptable endotoxin concentration was 0 EU/ml. SLA was employed at 5 µg/ml in all assays.

Peripheral Blood Mononuclear Cell and Biopsy Cultures

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from heparinized venous blood by Ficoll-Paque (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) gradient centrifugation. After being washed in saline, the cells' concentration was adjusted to 3 × 10⁶ cells in 1 ml of RPMI-1640 (low glucose) (Thermo Fisher Scientific, NY, USA) supplemented with 10% FBS, penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 µg/ml) (Thermo Fisher Scientific, NY, USA). PBMCs were dispensed into 24-well plates and incubated at 37°C under 5% CO₂ for 24 h in the presence or absence of SLA (5 µg/ml), lipopolysaccharide (LPS) (10 ng/ml), Pam3Cys (100 ng/ml), pioglitazone (1 µM) (Sigma-Aldrich), or GW9662 (10 µM) (Sigma-Aldrich).

CL patients and HSs were submitted to tissue biopsy using a 4-mm punch. Biopsied material was cultured in complete RPMI medium (low glucose) at 37°C and 5% CO₂ for 72 h in the presence or absence of pioglitazone (1 µM) (Sigma-Aldrich). Cell culture and biopsy culture supernatants were collected and stored at –70°C until use. Cytokine levels were quantified by ELISA, and DNA levels (double stranded) were measured using a spectrophotometer. DNA extracted from the biopsy of patient CL was used as a positive control.

Monocyte Cultures and *In Vitro* Infection

Monocytes were purified from PBMCs by negative selection using MACS columns (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA). Monocytes were prepared following a method previously described by our laboratory to yield a purity of 99% and identified by flow cytometry as CD14+CD3–CD19– (Giudice et al., 2012). Briefly, monocytes (2.5 × 10⁶/ml) were maintained in RPMI-1640 (low glucose) (Thermo Fisher Scientific, NY, USA) supplemented with 10% FBS (Thermo Fisher Scientific, NY, USA), penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 µg/ml). After being washed, cells were infected with *L. braziliensis* (5:1) in the presence of pioglitazone (1 µM) at 37°C, 5% CO₂. After 4 h, non-internalized parasites were removed by washing, and cells were incubated for 24 h. Parasite load was evaluated by optical microscopy, following H&E staining, by 3 different observers at 4 and 24 h post-infection.

Cytokine Quantification

TNF, IL-6, IL-10 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), IL-1β, MMP9, and sCD163 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) levels were determined by ELISA using commercial kits, following the manufacturers' instructions. Results are expressed in pg/ml.

In Silico Analysis

DrugBank v5 (<https://go.drugbank.com/>) was used to obtain the pharmacokinetics and pharmacodynamics information of pioglitazone (time to half-life 24 h). Protein–protein interaction (PPI) network analysis and Gene Ontology (GO) enrichment were performed using STRING v11.0 (<https://string-db.org/>). All interaction networks were limited to *Homo sapiens* species, and a minimum confidence score (high confidence: 0.700) was used for the interactions. The interaction networks that presented PPI enrichment p-value <0.05 were considered significant.

Oxidative Burst Quantification

To evaluate the reactive oxygen species (ROS), 1 × 10⁶ monocytes (HSs) were treated with dihydrorhodamine-123 (DHR) at 10 ng/ml (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) for 10 min. After that, cells were infected with *L. braziliensis* (5:1 ratio) for 24 h and then stained with anti-CD14 and anti-MHC-II fluorochrome-conjugated antibodies. The mean fluorescence intensity (MFI) of DHR in the cells was assessed by flow cytometry, and data were analyzed through FlowJo®.

Cell Viability

PBMCs were isolated from heparinized venous blood by Ficoll-Paque (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) gradient centrifugation. After being washed in saline, the cells' concentration was adjusted to 3 × 10⁶ cells/ml of RPMI-1640 (low glucose) (Thermo Fisher Scientific, NY, USA) supplemented with 10% FBS, penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 µg/ml) (Thermo Fisher Scientific, NY, USA). PBMCs were dispensed into 24-well plates and incubated at 37°C under 5% CO₂ for 24 h in the presence or absence of pioglitazone (1 µM) (Sigma-Aldrich). Monocytes were obtained as previously described. Briefly, 10 × 10⁶ PBMCs was dispensed into 6-well plates and maintained in RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific, NY, USA) supplemented with 10% FBS (Thermo Fisher Scientific, NY, USA), penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 µg/ml). Next, cells were washed two times with saline and maintained in RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific, NY, USA) supplemented with 10% FBS (Thermo Fisher Scientific, NY, USA), penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 µg/ml) for 24 h in the presence or absence of pioglitazone (1 µM).

Cell viability was determined by MTT. Briefly, 0.5 mg of Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Sigma-Aldrich) was added to 3 × 10⁶ cells, and cells were incubated for 4 h in the dark. The reaction was stopped, and the formazan salt crystals were solubilized by adding 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich). Next, the samples and blanks were transferred to 96-well flat-bottomed plates and read in a spectrophotometer at 570 nm. As a positive control, 3% paraformaldehyde (PFA) (Sigma-Aldrich) was used in all experiments.

Statistical Analysis

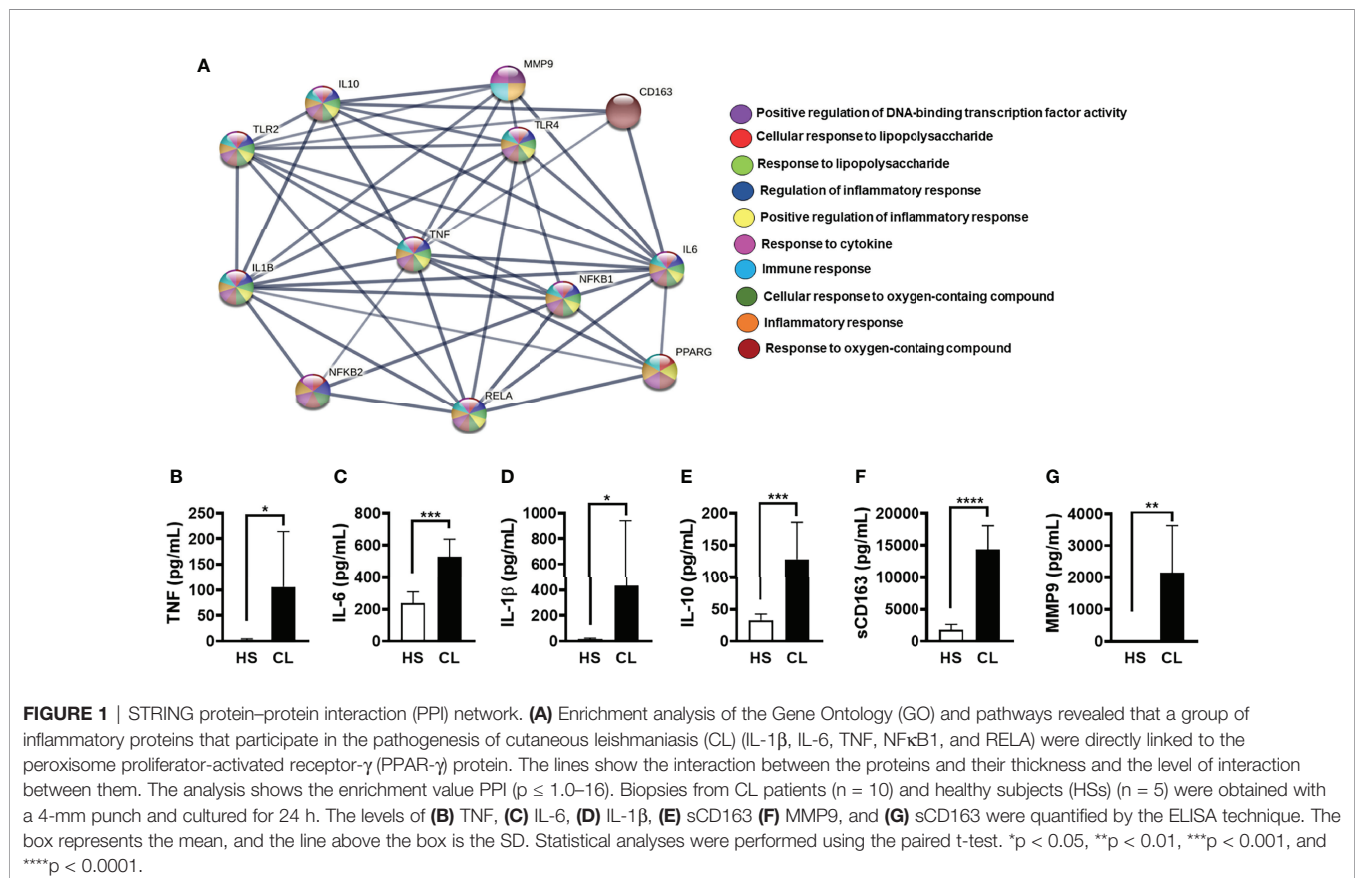
All data obtained in *in vitro* assays were statistically analyzed using GraphPad Prism v8. All the results are shown as mean and SD. The paired t-test was used to compare two dependent continuous variables, whereas three or more dependent continuous variables were compared by the ANOVA test. The results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

RESULTS

To investigate potentially relevant interactions of PPAR- γ , we performed a confidence analysis (high confidence 0.700) based on a PPI network, which allowed us to choose inputs (proteins) in addition to providing enrichment pathways (GO) of the generated interaction network. Briefly, we chose 12 proteins (TNF, IL-6, IL-1 β , IL-10, MMP9, CD163, TLR2, TLR4, NF κ B1, NF κ B2, RELA, and PPAR γ) that are known to induce or downregulate the inflammatory response. We then identified five proteins (RELA, NF κ B1, IL-1 β , TNF, and IL-6) that directly interact with the nuclear receptor PPAR- γ . Furthermore, GO enrichment analysis showed that PPAR- γ is related to the following biological processes: upregulation of DNA-binding transcription factor activity, cellular response to LPS, inflammatory response, immune response, response to cytokine, and positive regulation of inflammatory response

(**Figure 1A**). Although it is useful to identify general functional categories, protein network analysis and GO enrichment may be biased since an arbitrary selection of proteins can be used as the input. Therefore, we evaluated the ability of cells from biopsied CL lesions to produce TNF, IL-6, IL-1 β , IL-10, sCD163, and MMP9. As expected, lesion cells produced higher levels of these mediators when compared to cells biopsied from HSs (**Figures 1B–G**). These findings suggest that PPAR- γ activation may be a key target to regulate the inflammatory response, characteristic of CL lesions.

Drug toxicity represents a major problem in the discovery of new therapeutic targets. In this way, we investigated whether pioglitazone could interfere with the viability of human cells through the MTT assay. We observed that pioglitazone did not alter the viability of PBMCs or monocytes (**Supplementary Figure 1**). To confirm that pioglitazone does not interfere with cell death, we measured DNA levels in the supernatants of cells obtained from HS biopsies and CL patients' biopsies treated or not with pioglitazone. We observed that the CL lesion biopsies treated with pioglitazone did not differ in the amount of DNA when compared to the HS tissue. Furthermore, we observed that in CL lesion tissue, there is a >100-fold increase in the amount of DNA when compared to HS tissue (**Supplementary Figure 2**). It is important to emphasize that in CL lesions, there is a wide variety of dead cells (e.g., immune cells, bacteria, and parasites), which could possibly explain these results. Together, these results show that pioglitazone has no toxic effects in cells of CL patients.



The signaling initiated by TLRs results in the NF- κ B activation, cytokine production, and CD163 cleavage leading to the release of its soluble form (sCD163) (Medzhitov and Janeway, 2000). To test whether pioglitazone could interfere with NF- κ B activation, we stimulated PBMCs from HSs with pioglitazone in the presence of LPS and Pam3Cys to induce TLR4 and TLR2 activation, respectively. Next, we assessed the levels of TNF, IL-6, IL-1 β , IL-10, MMP9, and sCD163 produced. The presence of pioglitazone decreased the LPS-induced production of TNF, IL-6, IL-1 β , IL-10, MMP9, and sCD163. Pam3Cys-activated monocytes also produced lower levels of TNF, IL-6, IL-10, MMP9, and sCD163 levels (Figure 2). These results suggest that PPAR- γ activation by pioglitazone inhibits NF- κ B signaling, possibly regulating the inflammatory response.

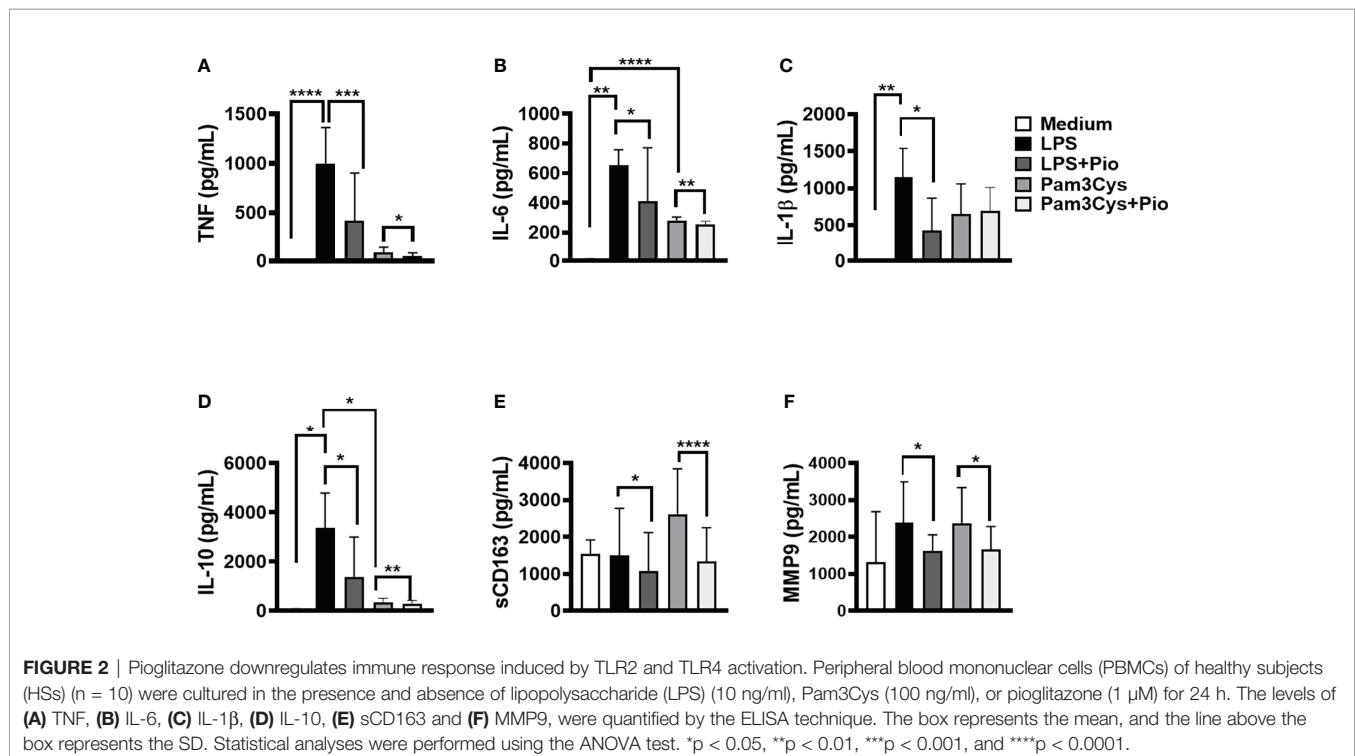
Recently, we showed that *L. braziliensis* induces the expression of TLR4 and TLR2 and the production of inflammatory cytokines by monocytes from CL patients (Polari et al., 2019). To test the hypothesis that pioglitazone can interfere in NF- κ B signaling, thus decreasing the production of inflammatory cytokines, we stimulated PBMCs from CL patients with SLA, in the presence of pioglitazone. In the presence of SLA, pioglitazone-treated cells produced less TNF, IL-6, IL-1 β , MMP9, and sCD163 but to our surprise did not alter IL-10 levels (Figure 3). These findings indicate that exposure to pioglitazone downmodulates the secretion of inflammatory mediators by monocytes from CL patients independently of IL-10.

Pioglitazone can reduce TLR2 and TLR4 expression in human monocytes, blocking NF- κ B activation and cytokine production (Dasu et al., 2009; Kutsenko et al., 2012). To investigate whether pioglitazone affects SLA-stimulated PBMCs

through PPAR- γ , we blocked PPAR- γ signaling with a selective and irreversible inhibitor and later stimulated these cells with SLA and pioglitazone (Figure 4). Our findings show that the downmodulation of inflammatory cytokine production by pioglitazone is completely dependent on PPAR- γ activity.

Strong anti-inflammatory responses may contribute to the establishment of *Leishmania* infection (Malta-Santos et al., 2017). To investigate whether pioglitazone plays a role in *Leishmania* infection and survival, we first infected human monocytes in the presence or not of pioglitazone. Surprisingly, in the presence of pioglitazone, the percentage of infected cells was not altered after 4 or 24 h (Figure 5A). However, we observed a significantly reduced number of intracellular amastigotes at both time-points (Figure 5B). We also investigated whether pioglitazone could have a direct effect on the *Leishmania* killing. Pioglitazone considerably reduced the viability of *L. braziliensis* promastigotes (Figure 5C). These results suggest that PPAR- γ signaling is not directly involved in parasite entry, but, rather, pioglitazone has directly leishmanicidal activity and kills *Leishmania* parasites through PPAR- γ signaling.

ROS production has been shown to be the main mechanism of *Leishmania* killing by human mononuclear phagocytes (Novais et al., 2014; Carneiro et al., 2016). To test whether pioglitazone interfered in ROS production, we infected monocytes with *Leishmania* in the presence and absence of pioglitazone and measured ROS levels. We did not observe a difference in ROS production comparing pioglitazone-treated and untreated *Leishmania*-infected monocytes (Figure 6). This result confirms that pioglitazone does not activate macrophages to kill *Leishmania*.



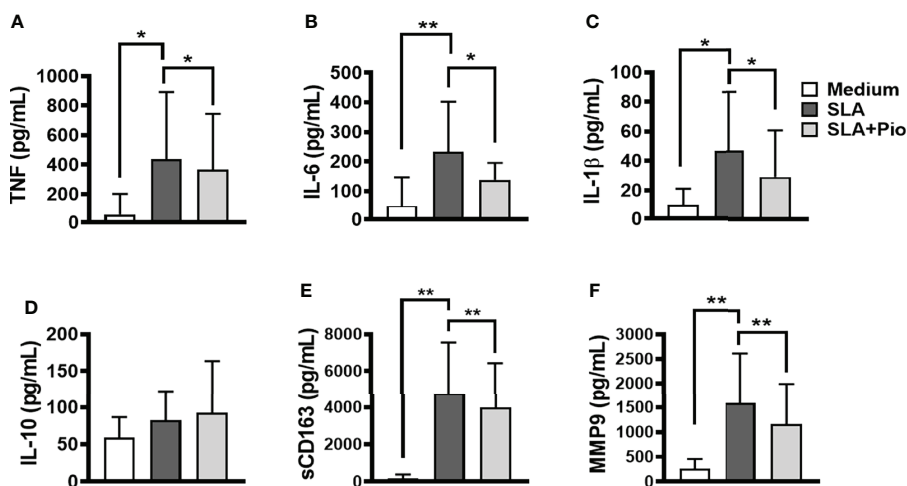


FIGURE 3 | Pioglitazone downregulates the production of inflammatory mediators induced by SLA. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from cutaneous leishmaniasis (CL) ($n = 15$) were cultured in the presence or absence of soluble *Leishmania* antigen (SLA) ($5 \mu\text{g/ml}$) or pioglitazone ($1 \mu\text{M}$) for 24 h. The levels of **(A)** TNF, **(B)** IL-6, **(C)** IL-1 β , **(D)** IL-10, **(E)** sCD163 and **(F)** MMP9, were quantified by the ELISA technique. The box represents the mean, and the line above the box is the SD. Statistical analyses were performed using the ANOVA test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

Monocytes are circulating cells in the peripheral blood that migrate CL lesions contributing to inflammation (Passos et al., 2015). Therefore, we evaluated whether exposure to pioglitazone can decrease the production of inflammatory cytokine production while maintaining the resolving phenotype characteristics of monocytes in cells from the lesion. Similar to the observations with PBMCs, we found that pioglitazone downregulated the production of TNF, IL-1 β , and sCD163 but did not modify the production of IL-6 and IL-10 (Figure 7). These results show that pioglitazone exposure decreases inflammatory responses and may benefit CL patients.

DISCUSSION

In the last years, therapeutic failure rates in areas of *L. braziliensis* transmission have increased, reaching 70% depending on the clinical form and phase of the disease (Machado et al., 2002; Unger et al., 2009; Lago et al., 2018; Costa et al., 2018). Individuals infected with *L. braziliensis* develop an exaggerated inflammatory response that causes tissue damage leading to the appearance of skin ulcers (Ribeiro-de-Jesus et al., 1998; Bacellar et al., 2002; Antonelli et al., 2005; Campos et al., 2014; Novais et al., 2015; Passos et al., 2015; Santos et al., 2018; Amorim et al., 2019). Thus, the development of adjuvant therapies that can modulate the inflammatory response is desirable. Indeed,

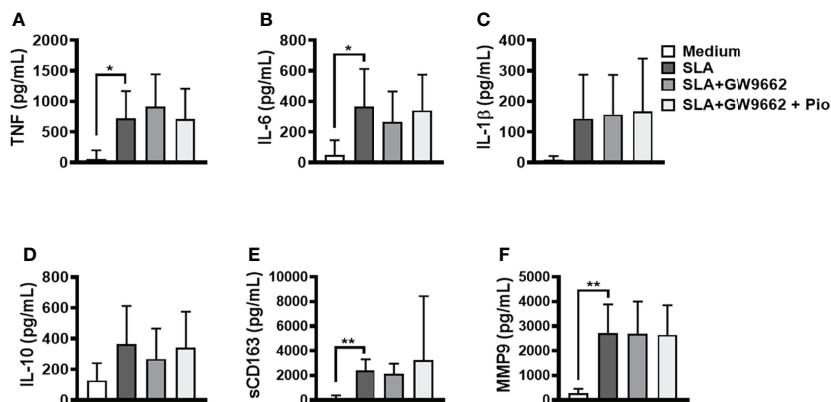


FIGURE 4 | Blockage of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) abrogates pioglitazone-mediated downregulation of inflammatory mediators induced by SLA. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from cutaneous leishmaniasis (CL) ($n = 11$) were cultured in the presence of GW9662 ($10 \mu\text{M}$) for 1 h and next stimulated with soluble *Leishmania* antigen (SLA) ($5 \mu\text{g/ml}$) or pioglitazone ($1 \mu\text{M}$) for 24 h. The levels of **(A)** TNF, **(B)** IL-6, **(C)** IL-1 β , **(D)** IL-10, **(E)** sCD163 and **(F)** MMP9, were quantified by the ELISA technique. The box represents the mean, and the line above the box is the SD. Statistical analyses were performed using the ANOVA test.

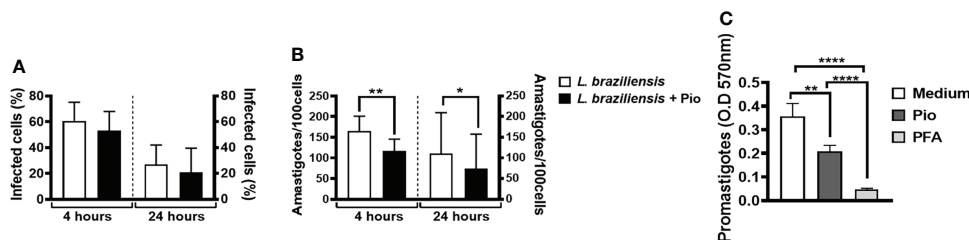


FIGURE 5 | Pioglitazone has cytotoxic effects in *Leishmania braziliensis* parasites. Monocytes from healthy subjects (HSs) ($n = 12$) were cultured for 4 or 24 h in the presence or absence of *L. braziliensis* (5:1) and pioglitazone (1 μ M). **(A)** The infection rate and **(B)** the number of amastigotes were determined by 3 different observers using optical microscopy. **(C)** *L. braziliensis* ($n = 6$) were cultured in the presence or absence of pioglitazone (1 μ M) or paraformaldehyde (PFA) (3%) for 24 h. **(C)** OD of promastigotes form. The box represents the mean, and the line above the box is the SD. Statistical analyses were performed using the ANOVA test. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

patients with mucosal leishmaniasis, the most inflammatory and severe form of tegumentary leishmaniasis, benefit from adjuvant therapy with pentoxifylline, a drug that decreases TNF production (Lessa et al., 2001). However, in CL patients, adjuvant therapy with pentoxifylline has not been shown to be effective, as it does not reduce healing time, suggesting that other molecules may be participating in the immunopathogenesis of CL (Brito et al., 2014). Pioglitazone is an oral drug used in the treatment of diabetes, and its main mechanism of action is to induce PPAR- γ . In this study, we investigated the effect of PPAR- γ activation by pioglitazone with regard to cytokine production by cells from CL patients. We found that exposure to pioglitazone downregulates the inflammatory response and does not interfere with the ability of monocytes to kill *L. braziliensis*.

Monocytes/macrophages secrete inflammatory mediators participating in the pathogenesis of CL. The activation profile and functions of these cells are affected by different cytokines, microbial products, and anti-inflammatory drugs. Thus, cytokines such as IFN- γ and TNF as well as LPS induce a "classic" activation profile (M1), whereas cytokines such as IL-4, IL-13, and IL-10 and the dexamethasone corticoid induce an "alternative" activation profile (M2) (Porcheray et al., 2005). In

CL, a strong inflammatory response is observed, with high levels of IL-6, TNF, IL-1 β , MMP9, and low levels of regulatory cytokines such as IL-10 (Bacellar et al., 2002; Campos et al., 2014; Passos et al., 2015; Santos et al., 2018; Carvalho et al., 2020), suggesting that mononuclear phagocytes are mostly classically activated (M1). Furthermore, it is important to emphasize that CL patients have a high frequency of intermediate monocytes (inflammatory monocytes, CD14+CD16+), a group of cells that show increased expression of TLR2/TLR4 and are the main source of inflammatory mediators such as TNF, IL-1 β , and MMP9 (Campos et al., 2014; Passos et al., 2015; Santos et al., 2018; Polari et al., 2019). Here we show that the proinflammatory response (TNF, IL-6, IL-1 β , MMP9, and sCD163), probably induced by the activation of TLR2 and TLR4 in human monocytes, is decreased when PPAR- γ is activated by pioglitazone. It has been documented that pioglitazone decreased the expression of MYD88, TLR2, TLR4, and NF κ B1 (Dasu, 2009; Dana, 2019; Dana, 2020). These results support the notion that pioglitazone can interfere with NF- κ B signaling favoring an environment where alternatively activated monocytes predominate, thus contributing to the modulation of the exacerbated inflammatory response observed in CL patients.

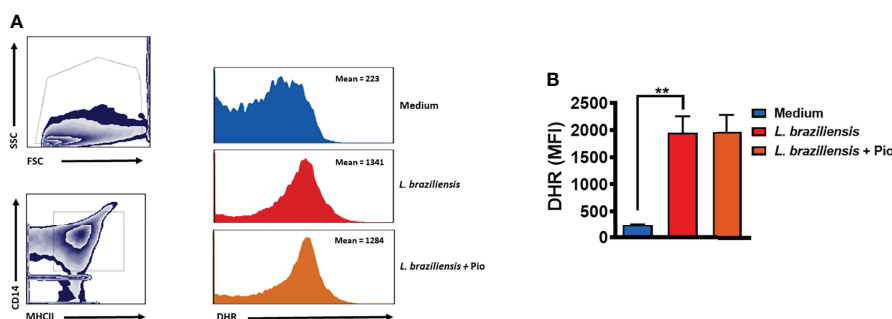


FIGURE 6 | Pioglitazone does not interfere in *Leishmania braziliensis*-induced reactive oxygen species (ROS) production. Monocytes from healthy subjects (HSs) ($n = 5$) were treated with dihydrorhodamine-123 (DHR) at 10 ng/ml for 10 min and cultured for 24 h in the presence or absence of *L. braziliensis* (5:1) and pioglitazone (1 μ M). Cells were stained with anti-CD14 and anti-MHC-II fluorochrome-conjugated antibodies. The mean fluorescence intensity (MFI) of the cells was assessed by flow cytometry. **(A)** Gate strategy representative plots and histograms. **(B)** Mean and SD from 5 HS. Statistical analyses were performed using the ANOVA t-test. * $p < 0.05$.

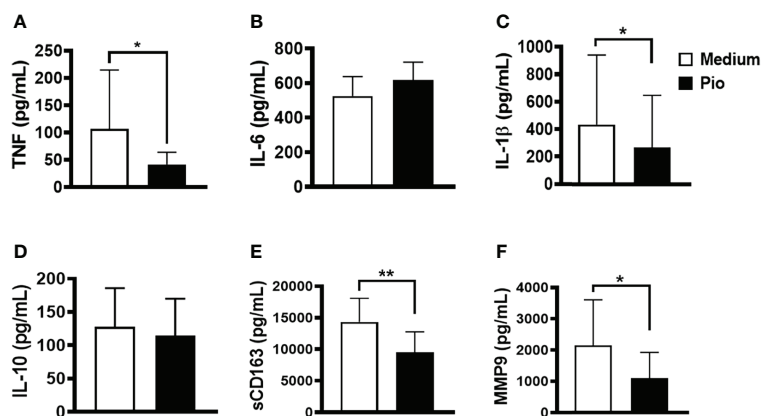


FIGURE 7 | Pioglitazone down-regulates the production of inflammatory mediators in cells from CL lesions. Biopsies from CL patients (n=10) and HS (n= 5) were obtained with a 4mm punch and cultured for 24 hours. The levels of **(A)** TNF, **(B)** IL-6, **(C)** IL-1 β , **(D)** IL-10, **(E)** sCD163 and **(F)** MMP9 were quantified by the ELISA technique. The box represents the mean and the line above the box the standard deviation. Statistical analyses were performed using the Paired t test *P < 0.05.

Alternately activated monocytes/macrophages decrease the inflammatory response by producing regulatory cytokines such as IL-10 (Sulahian et al., 2000; Porcheray et al., 2005). Furthermore, these cells are involved in debris clearance, tissue remodeling, and repair (Gordon, 2003; Xu et al., 2006; Gordon and Martinez, 2010; Sapudom et al., 2021). An important finding of our work was that activation of PPAR- γ by pioglitazone not only decreased the release of inflammatory mediators (TNF, IL-6, IL-1 β , MMP9, and sCD163) but also maintained IL-10 production by PBMCs and by cells from lesion tissue of *L. braziliensis*-infected patients. The lack of effect of pioglitazone regarding IL-10 levels in SLA-stimulated PBMCs and lesion cells is somehow different from the results observed in LPS- and Pam3Cys-stimulated cells, where pioglitazone reduced IL-10 levels. The most likely explanation for this disparity is that *Leishmania* infection may induce cell types other than monocytes/macrophages to produce IL-10. Interestingly, although no decrease in IL-10 was detected, we found a lower parasite load in monocytes between 4 and 24 h of infection in the presence of pioglitazone. We thus evaluated whether pioglitazone treatment would interfere with ROS quantification. Pioglitazone also did not interfere in ROS production within infected monocytes. It has been shown that alternatively activated macrophages can produce ROS (Nandakumar et al., 2017), especially in the presence of exogenous PPAR- γ agonists (Lefèvre et al., 2010). Those observations caught our attention, as ROS production is the main mechanism that human monocytes/macrophages use to kill *L. braziliensis* (Novais et al., 2014; Carneiro et al., 2016). Also, the fact that a lower parasite load was observed 4 h after infection, in the presence of pioglitazone, indicates that this drug may interfere with direct *Leishmania* viability. Indeed, we found that pioglitazone significantly decreased the viability of *L. braziliensis in vitro*. Further studies will be carried out to investigate the mechanisms by which pioglitazone interferes with the viability of *Leishmania* during its interaction with monocytes.

Regarding the effects observed during the use of pioglitazone, it has been mainly reported that it increases insulin sensitivity, interference with lipid homeostasis, and regulation of the inflammatory response. Thus, many efforts have been made in the development of formulations for the topical use of pioglitazone (Silva-Abreu et al., 2017; Nair et al., 2019; Rojewska et al., 2020), opening new expectations for the treatment of skin diseases such as CL. Indeed, patients with psoriasis treated with topical pioglitazone had a decreased severity in disease score (Mittal et al., 2009; Singh and Anil, 2016). Therefore, the use of a topical formulation of pioglitazone would avoid systemic effects and would be a safer option in the case of CL. Altogether, our data show that PPAR- γ signaling induced by pioglitazone decreases the inflammatory response in CL patients without monocyte killing of *L. braziliensis*. In conclusion, our current work documents the advantage of activating PPAR- γ with pioglitazone, making it a good candidate for adjuvant CL immunotherapy.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found in the article/**Supplementary Material**.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Institutional Review Board of the College of Medicine of Bahia (protocol no. 2.471.185) and the Brazilian Commission of Ethics in Research (2.512.434). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed have made a substantial, direct, and intellectual contribution to the work and approved it for publication.

FUNDING

This work was supported by the National Institutes of Health AI136862 and CAPES.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Cristiano Franco and Aline Souza for secretarial assistance.

REFERENCES

- Almeida, R., D'oliveira, A. Jr., Machado, P., Bacellar, O., Ko, A. I., De Jesus, A. R., et al. (1999). Randomized, Double-Blind Study of Stibogluconate Plus Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor Versus Stibogluconate Alone in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 180 (5), 1735–1737. doi: 10.1086/315082
- Amorim, C. F., Novais, F. O., Nguyen, B. T., Mistic, A. M., Carvalho, L. P., Carvalho, E. M., et al. (2019). Variable Gene Expression and Parasite Load Predict Treatment Outcome in Cutaneous Leishmaniasis. *Sci. Trans. Med.* 11, 519.
- Antonelli, L. R., Dutra, W. O., Almeida, R. P., Bacellar, O., Carvalho, E. M., and Gollob, K. J. (2005). Activated Inflammatory T Cells Correlate With Lesion Size in Human Cutaneous Leishmaniasis. *Immunol. Lett.* 101 (2), 226–230. doi: 10.1016/j.imlet.2005.06.004
- Aronoff, S., Rosenblatt, S., Braithwaite, S., Egan, J. W., Mathisen, A. L., and Schneider, R. L. (2000). Pioglitazone Hydrochloride Monotherapy Improves Glycemic Control in the Treatment of Patients With Type 2 Diabetes: A 6-Month Randomized Placebo-Controlled Dose-Response Study. The Pioglitazone 001 Study Group. *Diabetes Care* 23 (11), 1605–1611. doi: 10.2337/diacare.23.11.1605
- Bacellar, O., Lessa, H., Schriefer, A., Machado, P., Ribeiro de Jesus, A., Dutra, W. O., et al. (2002). Up-Regulation of Th1-Type Responses in Mucosal Leishmaniasis Patients. *Infect. Immun.* 70, 6734–6740. doi: 10.1128/IAI.70.12.6734-6740.2002
- Bittencourt, A. L., and Barral, A. (1991). Evaluation of the Histopathological Classifications of American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 86, 51–565. doi: 10.1590/S0074-02761991000100009
- Bouhleh, M. A., Derudas, B., Rigamonti, E., Dievart, R., Brozek, J., Haulon, S., et al. (2007). Pparγ Activation Primes Human Monocytes Into Alternative M2 Macrophages With Anti-Inflammatory Properties. *Cell Metab.* 6 (2), 137–143. doi: 10.1016/j.cmet.2007.06.010
- Brito, G., Dourado, M., Polari, L., Celestino, D., Carvalho, L. P., Queiroz, A., et al. (2014). Clinical and Immunological Outcome in Cutaneous Leishmaniasis Patients Treated With Pentoxifylline. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 90 (4), 617–620. doi: 10.4269/ajtmh.12-0729
- Campos, T. M., Passos, S. T., Novais, F. O., Beiting, D. P., Costa, R. S., Queiroz, A., et al. (2014). Matrix Metalloproteinase 9 Production by Monocytes is Enhanced by TNF and Participates in the Pathology of Human Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (11), e3282. doi: 10.1371/journal.pntd.0003282
- Carneiro, P. P., Conceicao, J., Macedo, M., Magalhaes, V., Carvalho, E. M., and Bacellar, O. (2016). The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania Braziliensis* by Monocytes From Patients With Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS One* 11, e0148084. doi: 10.1371/journal.pone.0148084

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.884237/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | Pioglitazone effect on PBMCs viability. PBMC and monocytes from HS (n=7) were cultured in the presence or absence of pioglitazone (1 μM) or PFA (3%) for 24 hours. Cells were treated within 0.5 mg/mL of Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide for 4 hours. The optical density (O.D) was assessed by read in a spectrophotometer at 570nm. **(A)** O.D of PBMC, **(B)** O.D of monocytes. The box represents the mean and the line above the box the standard deviation. Statistical analyses were performed using the ANOVA test ***P < 0.001 and ****P < 0.0001.

Supplementary Figure 2 | Effects of pioglitazone on the death of tissue-derived cells. Biopsies from HS (n=5) and CL lesions (n=10) were obtained with a 4mm punch and cultured in the presence or absence of pioglitazone (1 μM) for 24 hours. Purified DNA of CL lesion was used as positive control. The levels of dsDNA were quantified using a spectrophotometer. The box represents the mean and the line above the box the standard deviation. Statistical analyses were performed using the ANOVA test *P < 0.05 and **P < 0.01.

- Carvalho, A. M., Novais, F. O., Paixao, C. S., De Oliveira, C. I., Machado, P. R. L., Carvalho, L. P., et al. (2020). Glyburide, a NLRP3 Inhibitor, Decreases Inflammatory Response and is a Candidate to Reduce Pathology in Leishmania Braziliensis Infection. *J. Invest. Dermatol.* 140 (1), 246–249.e242. doi: 10.1016/j.jid.2019.05.025
- Carvalho, L. P., Passos, S., Bacellar, O., Lessa, M., Almeida, R. P., Magalhaes, A., et al. (2007). Differential Immune Regulation of Activated T Cells Between Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis as a Model for Pathogenesis. *Parasite Immunol.* 29 (5), 251–258. doi: 10.1111/j.1365-3024.2007.00940.x
- Carvalho, L. P., Passos, S., Schriefer, A., and Carvalho, E. M. (2012). Protective and Pathologic Immune Responses in Human Tegumentary Leishmaniasis. *Front. Immunol.* 3, 301. doi: 10.3389/fimmu.2012.00301
- Costa, R. S., Carvalho, L. P., Campos, T. M., Magalhaes, A. S., Passos, S. T., Schriefer, A., et al. (2018). Early Cutaneous Leishmaniasis Patients Infected With *Leishmania Braziliensis* Express Increased Inflammatory Responses After Antimony Therapy. *J. Infect. Dis.* 217 (5), 840–850. doi: 10.1093/infdis/jix627
- Cupulillo, E., Grimaldi, G. Jr, and Momen, H. (1994). A General Classification of New World *Leishmania* Using Numerical Zymotaxonomy. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 50 (3), 296–311. doi: 10.4269/ajtmh.1994.50.296
- Dana, N., Vaseghi, G., and Haghjooy Javanmard, S. (2019). PPAR Gamma Agonist, Pioglitazone, Suppresses Melanoma Cancer in Mice by Inhibiting TLR4 Signaling. *J Pharm Pharm Sci* 22, 418–23.
- Dana, N., Vaseghi, G., and Haghjooy Javanmard, S. (2020). Activation of PPARgamma Inhibits TLR4 Signal Transduction Pathway in Melanoma Cancer in Vitro. *Adv Pharm Bull* 10, 458–63.
- Dasu, M. R., Park, S., Devaraj, S., and Jialal, I. (2009). Pioglitazone Inhibits Toll-Like Receptor Expression and Activity in Human Monocytes and Db/Db Mice. *Endocrinology* 150 (8), 3457–3464. doi: 10.1210/en.2008-1757
- Endo, N., Tsuboi, N., Furuhashi, K., Shi, Y., Du, Q., Abe, T., et al. (2016). Urinary Soluble CD163 Level Reflects Glomerular Inflammation in Human Lupus Nephritis. *Nephrol. Dialysis Transplant.* 31 (12), 2023–2033. doi: 10.1093/ndt/gfw214
- Freckelton, J., et al. (2017). Metformin Use in Diabetics With Diverticular Disease is Associated With Reduced Incidence of Diverticulitis. *Scandinavian J. Gastroenterol.* 52 (9), 969–972. doi: 10.1080/00365521.2017.1325930
- Giudice, A., Vendrame, C., Bezerra, C., Carvalho, L. P., Delavechia, T., Carvalho, E. M., et al. (2012). Macrophages Participate in Host Protection and the Disease Pathology Associated With *Leishmania Braziliensis* Infection. *BMC Infect. Dis.* 12, 75. doi: 10.1186/1471-2334-12-75
- Gordon, S. (2003). Alternative Activation of Macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 3 (1), 23–35. doi: 10.1038/nri978
- Gordon, S., and Martinez, F. O. (2010). Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity* 32 (5), 593–604. doi: 10.1016/j.immuni.2010.05.007

- Hassan, W. A., Baraka, E. A., Elnady, B. M., Gouda, T. M., and Fouad, N. (2016). Serum Soluble CD163 and its Association With Various Disease Parameters in Patients With Systemic Sclerosis. *Eur. J. Rheumatol.* 3 (3), 95–100. doi: 10.5152/eurjrheum.2016.15088
- Högger, P., Dreier, J., Droste, A., Buck, F., and Sorg, C. (1998). Identification of the Integral Membrane Protein RM3/1 on Human Monocytes as a Glucocorticoid-Inducible Member of the Scavenger Receptor Cysteine-Rich Family (CD163). *J. Immunol.* 161, 1883–1890.
- Kasuya, A., Ito, T., and Tokura, Y. (2018). M2 Macrophages Promote Wound-Induced Hair Neogenesis. *J. Dermatol. Sci.* 91, 250–255. doi: 10.1016/j.jdermsci.2018.05.004
- Kim, H., Wang, S. Y., Kwak, G., Yang, Y., Kwon, I. C., and Kim, S. H. (2019). Exosome-Guided Phenotypic Switch of M1 to M2 Macrophages for Cutaneous Wound Healing. *Advanced Sci. (Weinheim Baden-Wuerttemberg Germany)* 6, 1900513. doi: 10.1002/advs.201900513
- Kristiansen, M., Graversen, J. H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H. J., Law, S. K., et al. (2001). Identification of the Haemoglobin Scavenger Receptor. *Nature* 409 (6817), 198–201. doi: 10.1038/35051594
- Kusi, K. A., Gyan, B. A., Goka, B. Q., Dodoo, D., Obeng-Adjei, G., Troye-Blomberg, M., et al. (2008). Levels of Soluble CD163 and Severity of Malaria in Children in Ghana. *Clin. Vaccine Immunol.* 15 (9), 1456–1460. doi: 10.1128/CVI.00506-07
- Kutsenko, N. L., Vesnina, L. E., and Kaidashev, I. P. (2012). Pioglitazone, an Activator of PPAR-Gamma, Reduces the Expression of kB Nuclear Factor and Inhibits Apoptosis in Mononuclear Cells of Peripheral Blood *In Vitro*. *FiziolohichnyiZhurnal (Kiev Ukraine: 1994)* 58 (2), 33–38. doi: 10.15407/fz58.02.033
- Lago, A. S. D., Nascimento, M., Carvalho, A. M., Lago, N., Silva, J., Queiroz, J. R., et al. (2018). The Elderly Respond to Antimony Therapy for Cutaneous Leishmaniasis Similarly to Young Patients But Have Severe Adverse Reactions. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 98 (5), 1317–1324. doi: 10.4269/ajtmh.17-0736
- Lefèvre, L., Gales, A., Olganier, D., Bernad, J., Perez, L., Burcelin, R., et al. (2010). Pparγ Ligands Switched High Fat Diet-Induced Macrophage M2b Polarization Toward M2a Thereby Improving Intestinal Candida Elimination. *PLoS One* 5 (9), e12828. doi: 10.1371/journal.pone.0012828
- Lessa, H. A., Machado, P., Lima, F., Cruz, A. A., Bacellar, O., Guerreiro, J., et al. (2001). Successful Treatment of Refractory Mucosal Leishmaniasis With Pentoxifylline Plus Antimony. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65 (2), 87–89. doi: 10.4269/ajtmh.2001.65.87
- Lima, J., Araujo-Santos, T., Lazaro-Souza, M., Carneiro, A. B., Ibraim, I. C., Jesus-Santos, F. H., et al. (2017). Leishmania Infantum Lipophosphoglycan Induced-Prostaglandin E 2 Production in Association With PPAR-γ Expression via Activation of Toll Like Receptors-1 and 2. *Sci. Rep.* 7 (1), 14321. doi: 10.1038/s41598-017-14229-8
- Machado, P., Araujo, C., Da Silva, A. T., Almeida, R. P., D'oliveira, A. Jr, Bittencourt, A., et al. (2002). Failure of Early Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in Preventing the Development of an Ulcer. *Clin. Infect. Dis.* 34 (12), e69–e73. doi: 10.1086/340526
- Machado, P. R., Lessa, H., Lessa, M., Guimaraes, L. H., Bang, H., Ho, J. L., et al. (2007). Oral Pentoxifylline Combined With Pentavalent Antimony: A Randomized Trial for Mucosal Leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* 44 (6), 788–793. doi: 10.1086/511643
- Malta-Santos, H., Andrade, B. B., Zanette, D. L., Costa, J. M., Bozza, P. T., Bandeira-Melo, C., et al. (2017). Resolvin D1 Drives Establishment of Leishmania Amazonensis Infection. *Sci. Rep.* 7, 46363. doi: 10.1038/srep46363
- Medzhitov, R., and Janeway, C. Jr. (2000). The Toll Receptor Family and Microbial Recognition. *Trends Microbiol.* 8 (10), 452–456. doi: 10.1016/S0966-842X(00)01845-X
- Mittal, R., Malhotra, S., Pandhi, P., Kaur, I., and Dogra, S. (2009). Efficacy and Safety of Combination Acitretin and Pioglitazone Therapy in Patients With Moderate to Severe Chronic Plaque-Type Psoriasis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Arch. Dermatol.* 145, 387–393. doi: 10.1001/archdermatol.2009.5
- Nair, A. B., Gupta, S., Al-Dhubiab, B. E., Jacob, S., Shinu, P., Shah, J., et al. (2019). Effective Therapeutic Delivery and Bioavailability Enhancement of Pioglitazone Using Drug in Adhesive Transdermal Patch. *Pharmaceutics.* 11 (7), 359. doi: 10.3390/pharmaceutics11070359
- Nandakumar, V., Hebrink, D., Jenson, P., Kottom, T., and Limper, A. H. (2017). Differential Macrophage Polarization From Pneumocystis in Immunocompetent and Immunosuppressed Hosts: Potential Adjunctive Therapy During Pneumonia. *Infect Immun.* 85 (3), e00939–e00916. doi: 10.1128/IAI.00939-16
- Nascimento, M. T., Franca, M., Carvalho, A. M., Amorim, C. F., Peixoto, F., Beiting, D., et al. (2021). Inhibition of Gamma-Secretase Activity Without Interfering in Notch Signalling Decreases Inflammatory Response in Patients With Cutaneous Leishmaniasis. *Emerg Microbes Infect* 10 (1), 1219–1226. doi: 10.1080/22221751.2021.1932608
- Negrotto, L., and Mauricio, F. (2016). Farez, and Jorge Correale. Immunologic Effects of Metformin and Pioglitazone Treatment on Metabolic Syndrome and Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol.* 73 (5), 520–528.
- Nielsen, A. J., Nielsen, M. C., Birn, H., Ivarsen, P., Moller, H. J., and Hviid, C. V. B. (2021). Urine Soluble CD163 (Scd163) as Biomarker in Glomerulonephritis: Stability, Reference Interval and Diagnostic Performance. *Clin. Chem. Lab. Med. (CCLM)* 59 (4), 701–709. doi: 10.1515/cclm-2020-0466
- Novais, F. O., Nguyen, B. T., Beiting, D. P., Carvalho, L. P., Glennie, N. D., et al. (2014). Human Classical Monocytes Control the Intracellular Stage of Leishmania Braziliensis by Reactive Oxygen Species. *J. Infect. Dis.* 209 (8), 1288–1296. doi: 10.1093/infdis/jiu013
- Novais, F. O., Carvalho, L. P., Passos, S., Roos, D. S., Carvalho, E. M., Scott, P., et al. (2015). Genomic Profiling of Human Leishmania Braziliensis Lesions Identifies Transcriptional Modules Associated With Cutaneous Immunopathology. *J. Invest. Dermatol.* 135 (1), 94–101. doi: 10.1038/jid.2014.305
- Passos, S., Carvalho, L. P., Costa, R. S., Campos, T. M., Novais, F. O., Magalhaes, A., et al. (2015). Intermediate Monocytes Contribute to Pathologic Immune Response in Leishmania Braziliensis Infections. *J. Infect. Dis.* 211 (2), 274–282. doi: 10.1093/infdis/jiu439
- Polari, L. P., Carneiro, P. P., Macedo, M., Machado, P. R. L., Scott, P., Carvalho, E. M., et al. (2019). Leishmania Braziliensis Infection Enhances Toll-Like Receptors 2 and 4 Expression and Triggers TNF-α and IL-10 Production in Human Cutaneous Leishmaniasis. *Front. Cell. Infection Microbiol.* 9, 1205. doi: 10.3389/fcimb.2019.00120
- Porcheray, F., Viaud, S., Rimaniol, A.C., Leone, C., Samah, B., Dereuddre-Bosquet, N., et al. (2005). Macrophage Activation Switching: An Asset for the Resolution of Inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* 142 (3), 481–489. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02934.x
- Reed, S. G., Badaro, R., Masur, H., Carvalho, E. M., Lorencio, R., Lisboa, A., et al. (1986). Selection of a Skin Test Antigen for American Visceral Leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35 (1), 79–85. doi: 10.4269/ajtmh.1986.35.79
- Ribeiro-de-Jesus, A., Almeida, R. P., Lessa, H., Bacellar, O., and Carvalho, E. M. (1998). Cytokine Profile and Pathology in Human Leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31 (1), 143–148. doi: 10.1590/S0100-879X1998000100020
- Ricote, M., and Glass, C. K. (2007). PPARs and Molecular Mechanisms of Transrepression. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Mol Cell Biol. Lipids* 1771 (8), 926–935. doi: 10.1016/j.bbali.2007.02.013
- Rojewska, A., Karewicz, A., Karnas, K., Wolski, K., Zając, M., Kamiński, K., et al. (2020). Pioglitazone-Loaded Nanostructured Hybrid Material for Skin Ulcer Treatment. *Mater (Basel)* 13 (9), 2050. doi: 10.3390/ma13092050
- Saldanha, M. G., Queiroz, A., Machado, P.R.L., De Carvalho, L.P., Scott, P., De Carvalho Filho, E.M., et al. (2017). Characterization of the Histopathologic Features in Patients in the Early and Late Phases of Cutaneous Leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 96 (3), 645–52. doi: 10.4269/ajtmh.16-0539
- Santos, D., Campos, T. M., Saldanha, M., Oliveira, S. C., Nascimento, M., Zamboni, D. S., et al. (2018). IL-1β Production by Intermediate Monocytes is Associated With Immunopathology in Cutaneous Leishmaniasis. *J. Invest. Dermatol.* 138 (5), 1107–1115. doi: 10.1016/j.jid.2017.11.029
- Sapudom, J., Karaman, S., Mohamed, W. K. E., Garcia-Sabate, A., Quartey, B. C., Teo, J. C. M., et al. (2021). 3d *In Vitro* M2 Macrophage Model to Mimic Modulation of Tissue Repair. *NPJ Regen Med.* 6 (1), 83. doi: 10.1038/s41536-021-00193-5
- Silva-Abreu, M., Espinoza, L. C., Rodriguez-Lagunas, M. J., Fabrega, M. J., Espina, M., Garcia, M. L., et al. (2017). Human Skin Permeation Studies With Pparγ Agonist to Improve Its Permeability and Efficacy in Inflammatory Processes. *Int. J. Mol. Sci.* 18 (12), 2548. doi: 10.3390/ijms18122548


- Silva, R. L., Santos, M. B., Almeida, P.L., Barros, T. S., Magalhaes, L., Cazzaniga, R. A., et al. (2017). Scd163 Levels as a Biomarker of Disease Severity in Leprosy and Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11 (3), e0005486. doi: 10.1371/journal.pntd.0005486
- Singh, S., and Anil, B. (2016). Randomized Placebo Control Study of Insulin Sensitizers (Metformin and Pioglitazone) in Psoriasis Patients With Metabolic Syndrome (Topical Treatment Cohort). *BMC Dermatol.* 16 (1), 1–11. doi: 10.1186/s12895-016-0049-y
- Sulahian, T. H., Hogger, P., Wahner, A. E., Wardwell, K., Goulding, N. J., Sorg, C., et al. (2000). Human Monocytes Express CD163, Which is Upregulated by IL-10 and Identical to P155. *Cytokine* 12 (9), 1312–1321. doi: 10.1006/cyto.2000.0720
- Unger, A., O'neal, S., Machado, P. R., Guimaraes, L. H., Morgan, D. J., Schriefer, A., et al. (2009). Association of Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis Prior to Ulcer Development With High Rate of Failure in Northeastern Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80 (4), 574. doi: 10.4269/ajtmh.2009.80.574
- Wang, L., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Blunder, M., Liu, X., Malainer, C., et al. (2014). Natural Product Agonists of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (Ppar γ): A Review. *Biochem. Pharmacol.* 92 (1), 73–89. doi: 10.1016/j.bcp.2014.07.018
- Xu, W., Roos, A., Schlagwein, N., Woltman, A. M., Daha, M. R., and Van Kooten, C. (2006). IL-10-Producing Macrophages Preferentially Clear Early Apoptotic Cells. *Blood* 107 (12), 4930–4937. doi: 10.1182/blood-2005-10-4144
- Zhu, W., Yan, H., Li, S., Nie, W., Fan, F., and Zhu, J.. (2016). PPAR- γ Agonist Pioglitazone Regulates Dendritic Cells Immunogenicity Mediated by DC-SIGN via the MAPK and NF- κ b Pathways. *Int. Immunopharmacol.* 41, 24–34. doi: 10.1016/j.intimp.2016.09.028
- Zwadlo, G., Voegeli, R., Schulze Osthoff, K., and Sorg, C. (1987). A Monoclonal Antibody to a Novel Differentiation Antigen on Human Macrophages Associated With the Down-Regulatory Phase of the Inflammatory Process. *Pathobiology* 55 (6), 295–304. doi: 10.1159/000163432
- Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.
- Copyright © 2022 Nascimento, Cordeiro, Abreu, Santos, Peixoto, Duarte, Cardoso, de Oliveira, Carvalho and Carvalho. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

VII. ARTIGO 3

**Prostaglandin E2 contributes to *L. braziliensis*
survival and therapeutic failure in cutaneous
leishmaniasis**

Emerging Microbes & Infections
2023, VOL. 12, 2261565 (9 pages)
<https://doi.org/10.1080/22221751.2023.2261565>

Prostaglandin E2 contributes to *L. braziliensis* survival and therapeutic failure in cutaneous leishmaniasis

Maurício T. Nascimento ^{a,b,c}, Débora L. Viana ^a, Fábio C. Peixoto ^{a,c}, Sérgio M. Arruda ^d, Edgar M. Carvalho ^{a,b,c,e} and Lucas P. Carvalho ^{a,b,c,e}

^aLaboratório de Pesquisas Clínicas, LAPEC, Instituto Gonçalo Moniz – Fiocruz, Salvador, Brazil; ^bServiço de Imunologia, SIM, Complexo Universitário Professor Edgar Santos, COM-HUPES, Salvador, Brazil; ^cPrograma de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, PPGCS, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil; ^dLaboratório Avançado de Saúde Pública, LASP, Instituto Gonçalo Moniz – Fiocruz, Salvador, Brazil; ^eInstituto de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais, INCT-DT, Salvador, Brazil

ABSTRACT

Patients with cutaneous leishmaniasis (CL) present an exacerbated inflammatory response associated with tissue damage and ulcer development. In recent years, higher rates of failure to pentavalent antimoniate therapy have been observed, yet the underlying reason remains poorly understood. We hypothesize that the eicosanoid PGE2 favours the establishment of infection by *L. braziliensis*, which contributes to therapeutic failure. The aim of the present study was to investigate the influence of PGE2 on the survival of *L. braziliensis* in macrophages and rates of therapeutic failure in CL patients. PGE2, an eicosanoid derived from the metabolism of arachidonic acid by the COX-2 enzyme, plays several roles in immune response. We found that increased PGE2 decreases the microbicidal function of macrophages and is associated with disease severity and therapeutic failure. Additionally, the neutralization of COX-2 by NS398, a selective NSAID, increases the ability of macrophages to kill *L. braziliensis* and protects against the pathological inflammatory response. Our data suggest that NS398 may serve as an adjunct treatment for CL patients.

ARTICLE HISTORY Received 27 June 2023; Revised 11 September 2023; Accepted 17 September 2023

KEYWORDS Cutaneous leishmaniasis; PGE2; therapeutic failure; *L. braziliensis*; inflammation

Introduction


Cutaneous leishmaniasis (CL), an infectious disease caused by parasites of the genus *Leishmania*, results in the appearance of one or more skin ulcers, and represents a major public health problem worldwide [1,2]. In Brazil, Corte de Pedra, a town located in the southeastern region of the state of Bahia, is considered an important area of *L. braziliensis* transmission, with an alarming incidence of CL reaching 1000 cases/year in recent years [3]. In areas endemic for *L. braziliensis*, Glucantime[®] is the drug of first choice, yet effectiveness varies as around 70% of patients in the pre-ulcerative phase exhibit therapeutic failure [4,5]. The development of specific and effective treatments require a more robust understanding of the pathogenesis of CL caused by *L. braziliensis*.

The course of CL is characterized by an intense inflammatory reaction with a marked predominance of lymphocytes and mononuclear phagocytes [1,6]. Although the inflammatory response is extremely necessary to control parasite replication, the exaggerated production of inflammatory cytokines can cause

tissue damage and contribute to the emergence of ulcers that typify this disease [7]. Mononuclear phagocytes, one of the main cell types harbouring *Leishmania*, produce inflammatory cytokines, such as TNF and IL-1 β , which participate in tissue damage and the development of ulcers [8–11].

PGE2 is an inflammatory eicosanoid derived from the metabolism of arachidonic acid (AA) by two isoforms of cyclooxygenase, the constitutive isoform COX-1 and COX-2, the induced isoform [12], which are produced by several cell types (e.g. neutrophils and macrophages). The activity of PGE2 in innate immune responses is critically dependent on interaction with one of its four prostanoid receptors which are coupled to G protein (EP1-4). The activation of the EP1 receptor by PGE2 increases intracellular calcium accumulation, while the activation of EP2 and EP4 receptors induces the production of adenylate cyclase and cAMP; in turn, the activation of EP3 decreases cAMP formation [13–15]. Increases in PGE2 and cAMP leads to the activation of protein kinases and decreased microbicidal activity of mononuclear phagocytes [16,17]. The aim of the present

CONTACT Lucas P. Carvalho  carvalho76@gmail.com

 Supplemental data for this article can be accessed online at <https://doi.org/10.1080/22221751.2023.2261565>.

© 2023 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group, on behalf of Shanghai Shangyixun Cultural Communication Co., Ltd This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The terms on which this article has been published allow the posting of the Accepted Manuscript in a repository by the author(s) or with their consent.

study was to investigate the role of PGE2 in *L. braziliensis* infection and elucidate its participation in the exacerbated inflammatory response observed in CL patients.

Our results demonstrate the increased expression of genes *PTGS2*, *PTGER1*, *PTGER2* and *PTGER4* in active CL lesions. In addition, the expression of *PTGS2* and COX-2 protein was further associated with parasite load, disease severity and failure to therapy. Finally, we found high levels of PGE2 in the cells of CL lesions, which positively correlated with higher numbers of lesions. The neutralization of COX-2 in the cells obtained from lesions decreased the levels of TNF, IL-1 β and IL-10 *in vitro*. Surprisingly, the neutralization of COX-2 was found to increase the killing of *L. braziliensis* by macrophages.

Materials and methods

Ethics statement

The present study was approved by the Institutional Review Board of the Federal University of the State of Bahia (CEP-UFBA, protocol number 2.471.185) and the Brazilian National Commission for Ethics in Research (CONEP protocol number 2.512.434). All included individuals were adult volunteers who provided written informed consent. All procedures described herein were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

Patient sample

Patients with CL were diagnosed based on the presence of a typical skin ulcer associated with PCR positive for *L. braziliensis* DNA as well as a positive intradermal skin test for *Leishmania*. All patients were treated with Glucantime[®] (Sanofi-Aventis) at the dosage of 20 mg/kg/day intravenously for 20 days. At day 90, patients were reevaluated for lesion resolution. Cure was defined as total re-epithelialization of cutaneous lesions. Patients with lesions that remained active at day 90 were considered to have failed treatment and were submitted to a subsequent round of Glucantime[®]. All immunological analyses were performed prior to the initiation of drug therapy.

In silico analysis

Data samples were downloaded from GSE127831 [18] and labelled according to the informed metadata (21 samples infected by *L. braziliensis* before treatment, and 7 uninfected endemic controls), as well as transcripts of *L. braziliensis* sequenced by RNA-seq. Heat map and fold change illustrations were constructed using Multi Experiment Viewer (MeV).

In situ analysis

Skin biopsies (11 samples infected by *L. braziliensis* before treatment and 8 uninfected endemic controls) were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Embedded tissue was cut into 2- μ m thick sections, deparaffinized, and rehydrated. Antigen retrieval was performed using 1:100 Trilogy[™] solution (Cell Marque) at 96°C. Peroxidase activity was blocked with 3% hydrogen peroxide for 10 min, while non-specific antibody binding was blocked by the addition of serum-free protein (Dako) for 10 min. Slides were incubated for 2 h with the following antibodies: Rabbit polyclonal to COX2/Cyclooxygenase 2 (1:250) (ABCAM); Peroxidase Kit and Rabbit mouse/horse-radish peroxidase KP500 (Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA); Additionally, histological sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) for parasite load quantification. In each field, the number of positive cells and amastigotes were quantified using the semiautomatic counting tool of ImageJ 1.48v software (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Parasite cultures

L. braziliensis (MHOM/BR/LTCP11245) was isolated from a skin lesion of a CL patient, and confirmed as *L. braziliensis* by multilocus enzyme electrophoresis [19]. The parasites selected for this study were not previously passaged in liquid culture medium. Following selection, parasites were expanded in Schneider's medium (Sigma) supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum, penicillin 100 UI/mL, and streptomycin 100 μ g/mL (Gibco).

Human macrophage cultures and L. braziliensis infection

Monocyte-derived macrophages from CL patients were prepared following a previously described method [8] to yield macrophages 99% characterized by flow cytometry as CD14-positive, CD3-negative and CD19-negative. After differentiation, cells were infected with stationary phase *L. braziliensis* promastigotes at a 5:1 ratio for 2 h; uninfected macrophages were used as controls. Following incubation, cells were infected with *L. braziliensis* and cultured in the presence or absence of NS398 (100 μ M) (Sigma, St. Louis, MO), PGE2 10 ng/mL or rIL-10 (0.5, 1, 2 ng/mL) (R&D Systems, Minneapolis, MN USA) for 2, 48 or 72 h. After each time point, the infection rate and parasitic load were evaluated by three different observers using microscopy.

Skin fragment cultures

Biopsies of the active CL lesion and healthy skin were performed using a 4 mm punch. Fragments were

dispensed in tubes containing 1 mL of RPMI-1640 (Gibco) supplemented with 10% FBS (Gibco), 100UI/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin and incubated at 37°C, 5% CO₂ for 72 h in the presence or absence of NS398 100 µM (Sigma, St. Louis, MO).

Determination of cytokine and eicosanoid levels

Levels of PGE₂, IL-6, IL-1β, TNF and IL-10 (R&D Systems, Minneapolis, MN USA) were evaluated in culture supernatants by competitive or sandwich ELISA technique. All assays were performed following the manufacturer's protocol. For PGE₂, a competitive ELISA was performed, and for TNF, IL-6, IL-1β and IL-10, sandwich ELISA was performed.

Statistical analysis

The Mann–Whitney test and/or unpaired *t*-test were used for comparisons between two independent continuous variables. Wilcoxon's *U* test and/or the Paired *t*-test were used for continuous dependent variables, while log-rank (Mantel–Cox) testing was used for survival analysis and Spearman's and/or Pearson's tests were used to establish correlations. All analyses were performed using GraphPad Prism v8, and results presenting a *P*-value <0.05 were considered statistically significant.

Results

To better understand the components of the PGE₂ pathway present at the sites of CL lesions, previously published gene expression data was re-analysed [18]. The new analysis revealed increased expression of *PTGS2*, *PTGER1*, *PTGER2* and *PTGER4*, genes involved in the PGE₂ pathway, in CL lesions, whereas expression levels of *PTGER3* were decreased in comparison to healthy skin (Figure 1A). These results suggest that elevated expression of COX-2 (*PTGS2*) and EP1, EP2 and EP4 receptors (*PTGER1*, *PTGER2*

and *PTGER4*) may be a trigger for *L. braziliensis* survival and increased inflammatory response.

PGE₂ has been described as an important eicosanoid related to *Leishmania* infection susceptibility in murine models [17,20]. To evaluate whether increased *PTGS2* gene expression at lesion sites of patients with CL could be involved in parasitic load and clinical outcome, we attempted to establish correlations between the number of *L. braziliensis* transcripts found in active CL lesions and *PTGS2* gene expression. Next, utilizing mean *PTGS2* expression as a cut-off point, we distinguished between patients with high or low expression, and then analysed respective parasite loads and patient clinical outcomes. A positive correlation was observed between *PTGS2* gene transcripts and parasitic load (Figure 2A). In addition, we found that patients with high *PTGS2* gene expression exhibited higher parasitic load than those with lower gene expression (Figure 2B). To test whether increases in *PTGS2* gene expression could be associated with therapeutic failure, a Kaplan–Meier survival analysis was performed in both high expression and low expression groups, revealing an association between therapeutic failure and increased *PTGS2* gene expression (Figure 2C). These results reinforce the hypothesis that increased *PTGS2* gene expression at the lesion site may be an important host factor involved in the establishment of *L. braziliensis* infection that may consequently lead to therapeutic failure.

To confirm that increased COX-2 expression at the lesion site may be involved in *L. braziliensis* survival, we evaluated the relationship between COX-2⁺ cell frequency at the lesion site and parasite load as well as clinical outcome. A high frequency of COX-2⁺ cells were found at lesion sites compared to healthy skin (Figure 3D). In addition, we observed that patients who failed Sb^v therapy presented higher frequencies of COX-2⁺ cells (compared to those who exhibited lesion healing) (Figure 3E). Finally, we identified that a higher frequency of COX-2⁺ cells positively correlated with amastigote numbers (Figure 3F) and quantity of lesions (Figure 3G).

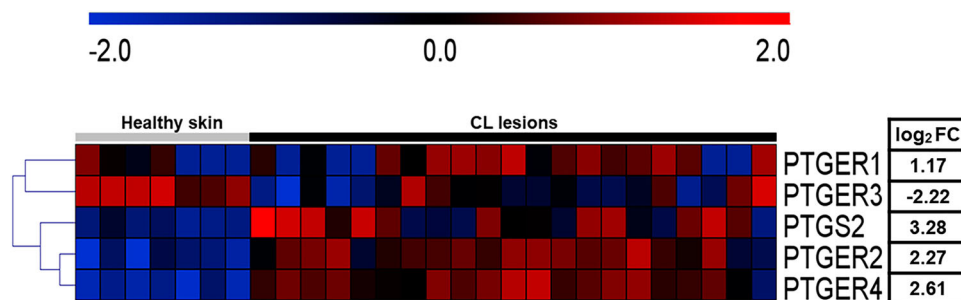


Figure 1. High expression of PGE₂ pathway components is observed in active CL lesions. Unbiased RNAseq was performed on skin samples from 7 healthy subjects and lesions from 21 CL patients. Heatmap columns and rows representative of individuals and genes, respectively. Heatmap colour reflects raw z-scores of gene abundance across samples.

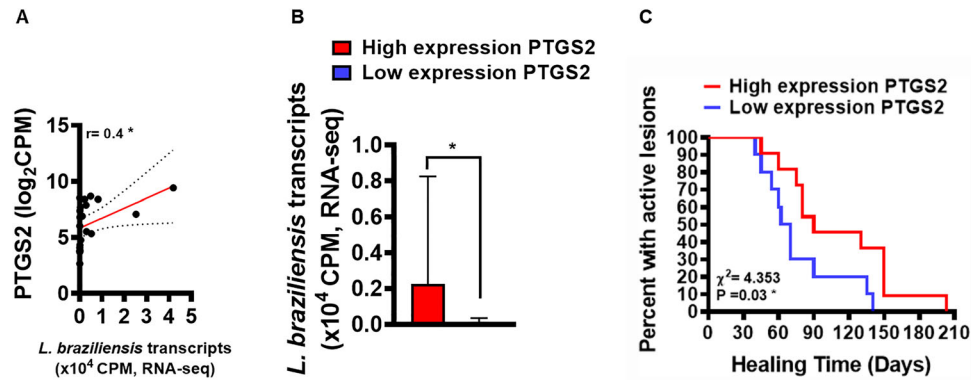


Figure 2. Increased PTGS2 gene expression at the lesion site is associated with parasite load and clinical outcome. RNAseq data (from 21 lesions) was used to investigate correlations between gene *PTGS2* and number of *L. braziliensis* transcripts. The mean expression of *PTGS2* was used as a cut-off point to determine high or low expression. *L. braziliensis* transcript number presented as median and interquartile range, with red bar indicating the group with high expression from *PTGS2* and blue bar low expression. Statistical analysis performed using Pearson's testing for correlations (A); the Mann-Whitney test was used for comparing parasite load in groups with high and low PTGS2 expression (B); Kaplan-Meier survival analysis of groups with respect to therapeutic failure (C) * $P < 0.05$.

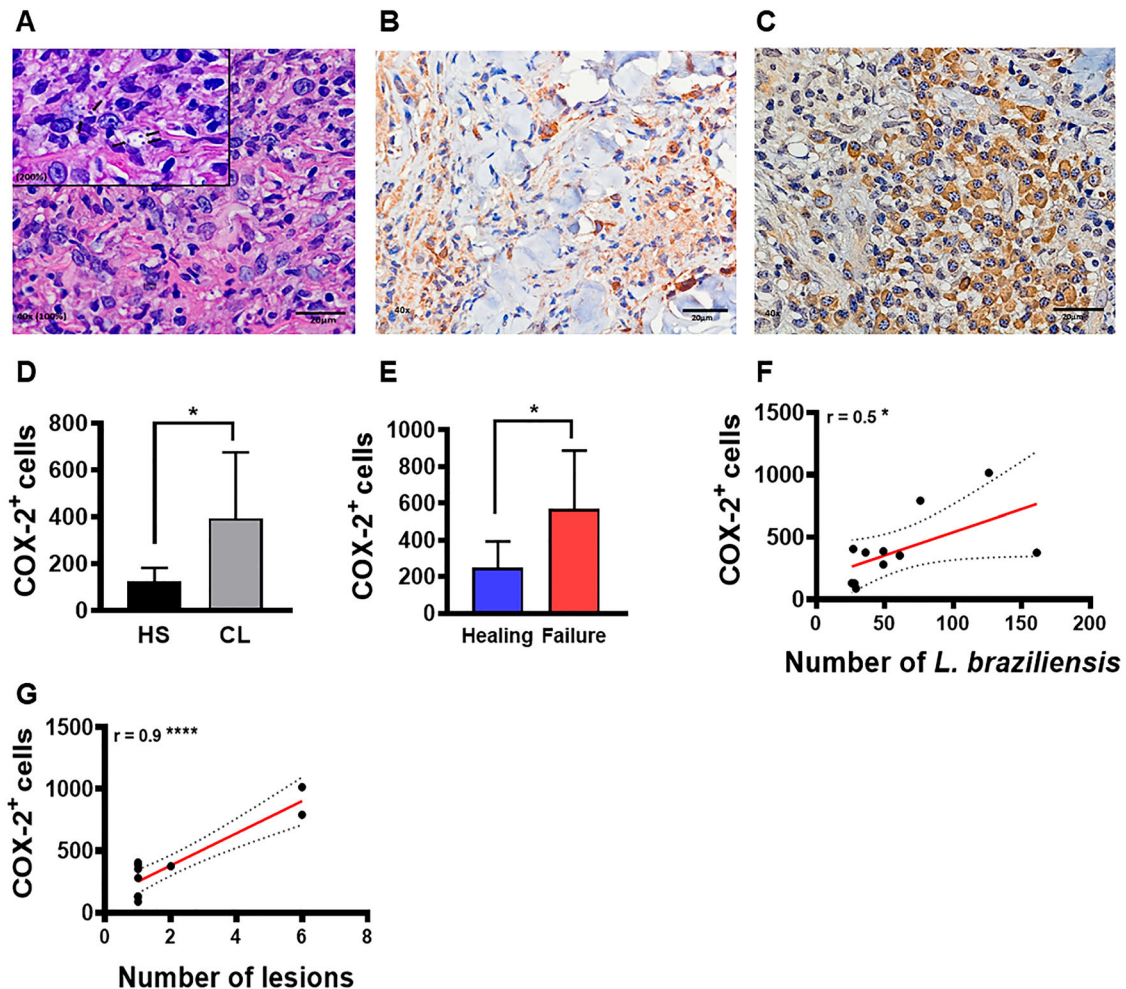


Figure 3. High frequency of COX-2⁺ cells at the lesion site is associated with parasite load, disease severity and therapeutic failure. Lesion biopsies from CL patients ($n = 11$) and skin samples from healthy subjects ($n = 8$) were obtained using a 4 mm punch. Black arrows indicate the presence of *L. braziliensis* amastigotes in CL lesions (A), cells immunostained with polyclonal antibody anti-COX2 in healthy skin (B) and CL lesions (C), respectively. COX-2⁺ cell frequency presented as mean and standard deviation: black bar indicates healthy skin while grey bar represents CL lesions (D). Blue bar indicates patients that evolved to cure, while the red bar patients those that failed therapy (E) Correlation between number of amastigotes and frequency of COX-2⁺ cells (F), and correlation between number of lesions and frequency of COX-2⁺ cells (G). Statistical analysis performed using the Unpaired t-test to compare COX-2⁺ frequency, with Pearson's testing used for correlation analysis; * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$.

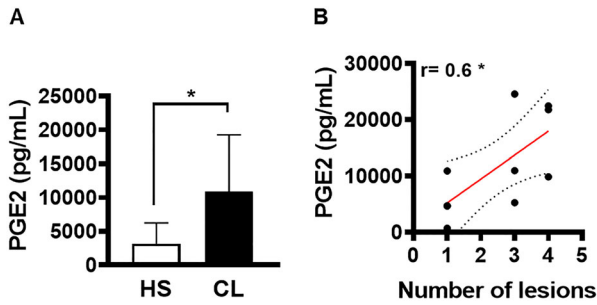


Figure 4. PGE2 production in active lesions correlates with disease severity. Lesion biopsies from CL patients ($n = 11$) and skin samples from healthy subjects ($n = 8$) were obtained using a 4 mm punch and cultured for 72 h. PGE2 levels were determined in culture supernatants by ELISA. (A) Levels of PGE2 presented as mean and standard deviation. (B) Correlation between number of lesions and PGE2 levels. Statistical analysis performed using the Unpaired t-test to compare PGE2 levels, while Pearson's testing was used for correlation analysis; $*P < 0.05$.

It was previously shown that patients who fail therapy present high parasitic load [18]. In an attempt to identify the mechanisms that favour the establishment of infection, we evaluated the ability of cells residing in active CL lesions to produce PGE2. First, we investigated whether PGE2 was produced at active lesion sites of CL patients. Compared to healthy skin, we observed high levels of PGE2 production by cells residing in CL lesions (Figure 4A). Next, we endeavored to determine whether the high production of PGE2 was associated with disease severity, and found a positive correlation between PGE2 levels and the number of lesions (Figure 4B).

An elevated frequency of macrophages has been identified in the inflammatory infiltrate of CL lesions [6]. These cells are extremely important for the effective control of parasitic load [8]. We investigated the ability of these cells to produce PGE2 following *L. braziliensis* infection, as well as the role of this eicosanoid in the pathogenesis of CL. We identified low PGE2 production by macrophages at 2 h after *L. braziliensis* infection, which increased significantly at 48 h post-infection; however, the difference observed at 72 h post-infection was not statistically significant compared to 48 h (Figure 5A). In addition, at 48 h post-infection, increased levels of PGE2 were found to positively correlate with the number of rounds of Glucantime® (Figure 5C).

Previous studies have reported that increased PGE2 induces the production of IL-1 β in macrophages [21,22]. To test whether PGE2 influences the production of these cytokines, we enriched cultures of uninfected macrophages from CL patients with PGE2 to evaluate levels of TNF, IL-1 β , IL-6 and IL-10. Interestingly, we observed that the enrichment of macrophage cultures with PGE2 did not affect inflammatory cytokine production (Figure 6A–C); however,

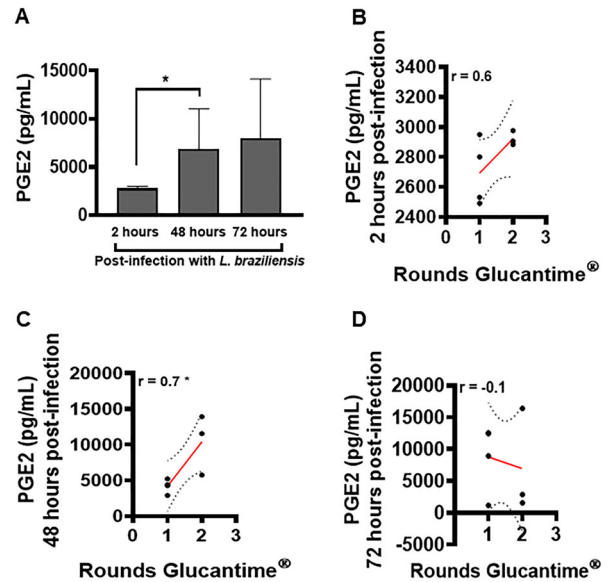


Figure 5. High levels of PGE2 in macrophages infected with *L. braziliensis* correlate with treatment duration. Monocyte-derived macrophages obtained from CL patients ($n = 7$) were infected with stationary-phase *L. braziliensis* (5:1) and cultured for 2, 48 or 72 h. PGE2 levels were determined in culture supernatants by ELISA. (A) PGE2 levels presented as mean and standard deviation. (B) Correlation between rounds of Glucantime® and PGE2 levels. Statistical analysis performed using the Unpaired t-test to compare the PGE2 levels, while Pearson's testing was used for correlation analysis between lesion number and PGE2 levels; $*P < 0.05$.

by way of an unclear mechanism, PGE2 did induce the production of IL-10 (Figure 6D). To investigate whether the amount of IL-10 induced by PGE2 had an effect on the ability of macrophages to kill *Leishmania*, we then infected macrophages from CL patients and enriched the cultures with increasing

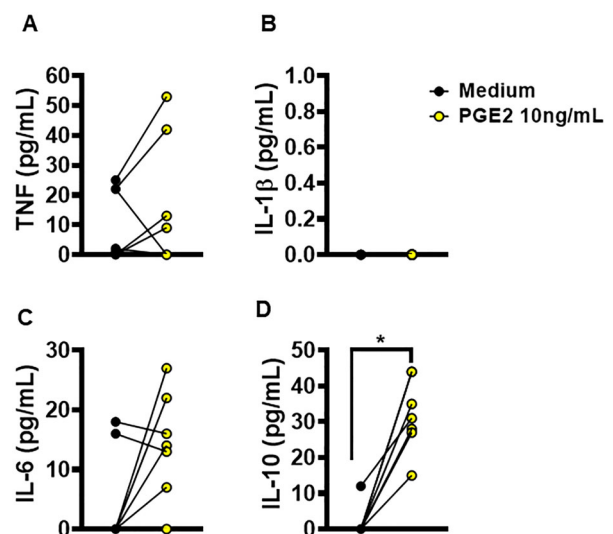


Figure 6. Ability of PGE2 to alter macrophages cytokine production. Monocyte-derived macrophages from HS ($n = 5$) were cultured in the presence or absence of PGE2 (10 ng/mL) for 72 h. The levels of (A) TNF, (B) IL-1 β , (C) IL-6 and (D) IL-10 were determined in culture supernatants by ELISA. Statistical analysis performed using the Wilcoxon test; $*P < 0.05$.

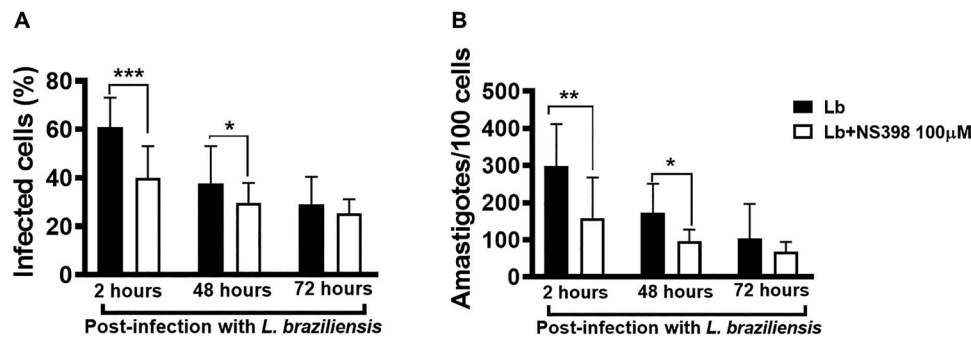


Figure 7. Neutralization of COX-2 increases *L. braziliensis* killing by macrophages obtained from CL patients. Monocyte-derived macrophages from CL patients ($n = 7$) were infected with stationary-phase *L. braziliensis* (5:1) and cultured in the presence or absence of NS398 (100 μ M), a selective COX-2 inhibitor, for 2, 48 or 72 h. (A) Frequency of infected cells. (B) Number of amastigotes per 100 macrophages. Results presented as mean and standard deviation, with black bars indicating macrophages infected with *L. braziliensis*, and white bars macrophages infected with *L. braziliensis* treated with NS398. Statistical analysis performed using the Paired t-test; * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$.

doses of rIL-10. We found that increases in IL-10 impeded the ability of macrophages to kill *L. braziliensis*, thereby allowing parasites to proliferate (supplementary Figure 1). It follows that the inhibition of PGE2 synthesis may represent a promising strategy for in the control of inflammatory response and infection by *L. braziliensis* *in vitro*.

Lesions with high parasitic load exhibit a more intense inflammatory response observed to contribute to tissue damage and therapeutic failure [18]. NS398 is a COX-2 selective NSAID that was shown to be effective in controlling *L. infantum* infection *in vivo* [23]. Thus, we investigated whether the inhibition of COX-2 would exert any effect on macrophage infection by *L. braziliensis*. We found that COX-2 inhibition via NS398 decreased both the number of infected cells and the number of amastigotes at both 2 and 48 h after infection (Figure 7A,B). Regarding immune response, we observed that the treatment of cells residing in CL lesion sites with NS398 resulted in decreased TNF, IL-1 β and IL-10 levels, yet no change in IL-6 was observed after 72 h of culture (Figure 8A–D), which suggests that other cells, i.e. not macrophages, are the producers of this cytokine. These results serve to indicate the benefits of neutralizing COX-2 in cells infected with *L. braziliensis*.

Discussion

Increasing rates of failure to drug therapy have been observed in patients with CL over the years [4,5,24,25]. Host factors and parasite burden have been associated with the development of skin ulcers and failure to Glucantime[®] therapy in areas of high *L. braziliensis* transmission [18]. It follows that the identification of factors and mechanisms responsible for the disproportionate immune response observed in *Leishmania* infection, as well as those favouring the establishment of parasite persistence, remain extremely important. Lipid mediators are molecules with suspected involvement in resistance

or susceptibility to pathogens in a range of infections [16,26–29]. PGE2, an inflammatory eicosanoid derived from the metabolism of arachidonic acid by COX enzymes, is known to contribute to the survival of various species of *Leishmania*, including *L. amazonensis*, *L. donovani* and *L. infantum* [17,20,23]. However, the roles played by COX-2 and PGE2 in CL immunopathogenesis arising from *L. braziliensis* infection have yet to be elucidated. The present study represents the first attempt to determine associations between COX-2 and PGE2 with respect to *L. braziliensis* survival, treatment failure and disease severity.

The activation of the EP2 receptor by PGE2 induces the production of cAMP, a molecule that decreases the production of oxygen derivatives [16,30,31], molecules relevant to the control of *Leishmania* proliferation [32]. It has been documented that increased

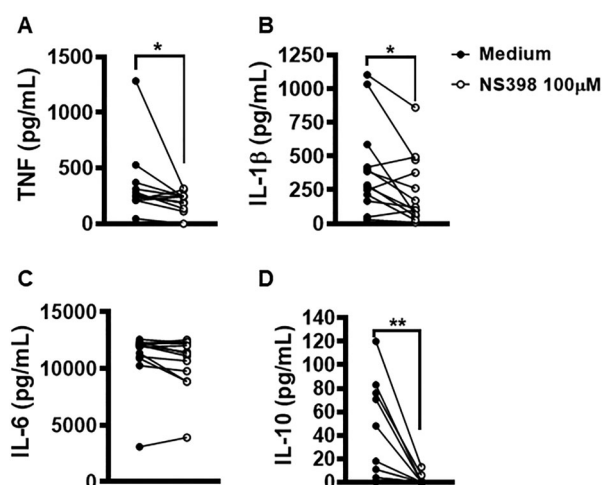


Figure 8. Neutralization of COX-2 in lesion cells decreases production of IL-1 β , TNF and IL-10. Skin lesion biopsies from CL patients ($n = 13$) were obtained using a 4 mm punch and cultured for 72 h. Levels of (A) TNF, (B) IL-1 β , (C) IL-6 and (D) IL-10 were determined in culture supernatants by ELISA. Statistical analysis performed using Wilcoxon's test; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.005$.

COX-2 and EP2 gene expression in lesions from patients with cutaneous and diffuse leishmaniasis caused by *L. amazonensis* was associated with parasite survival [33]. Concordantly, we also identified increased expression of the genes encoding COX-2 and the EP2 receptor in the lesions of CL patients in comparison to healthy skin, which suggests that the COX-2/EP2 axis may be a crucial element in the survival and replication of *L. braziliensis*, as well as in therapeutic failure. Here, our results also show that, during the course of *L. braziliensis* infection, increased levels of COX-2 correlated positively with parasite load in the lesions of patients with CL. It is known that increased parasite load at the lesion site is associated with the uncontrolled production of a variety of inflammatory molecules (e.g. IL-1 β) that contribute to tissue damage and, consequently, lead to therapeutic failure [6,18]. Our results additionally show that patients with high expression of the COX-2 gene failed therapy more frequently and presented greater numbers of lesions than those with low COX-2 gene expression. Moreover, we identified a strong correlation between the number of lesions and COX-2/PGE2 production, suggesting that increases in these molecules may be a contributing factor in disease severity. It is important to emphasize that patients with disseminated leishmaniasis, an emerging form of American Tegumentary Leishmaniasis (ATL), present multiple skin lesions and produce high levels of PGE2 [34]. Consequently, the data reported herein support the notion that exaggerated PGE2 production at lesion sites may be a key factor in parasite dissemination as well as the severity of disease.

The innate host immune response mediated by macrophages and neutrophils represents an important line of defence against parasites, due to the ability of these cells to produce ROS, molecules harmful to *Leishmania* spp. [8,27,32,35]. However, at the lesion sites of CL patients, low numbers of neutrophils in addition to a dense infiltrate containing macrophages have been documented [1,6]. Accordingly, we investigated the ability of macrophages to produce PGE2, as well as the role of this inflammatory eicosanoid in the context of *L. braziliensis* infection. It was previously demonstrated that macrophages from CL patients are capable of producing high levels of PGE2 in the first hours of infection by *L. braziliensis* [36]. Here we found that, following the internalization of *L. braziliensis* in macrophages, PGE production increased, reaching a peak at 48 h post-infection. We also observed that the levels of PGE2 at this timepoint positively correlated with the number of rounds of Glucantime[®], which reinforces the involvement of this eicosanoid in therapeutic failure.

The inhibition of PGE2 synthesis through the use of NSAIDs, both those selective and non-selective for COX enzymes, has been shown to be effective in

controlling infection by several species of *Leishmania in vitro* and *in vivo* [17,20,23]. However, it is important to emphasize that non-selective NSAIDs can interfere with pathways other than those involving COXs, and may provoke alterations in different physiological environments. Thus, our protocol employed the first selective NSAID described for COX-2 [37], which was applied to macrophages infected with *L. braziliensis* and cells from CL lesions. Our results indicate that the inhibition of COX-2 via NS398 decreased the numbers of amastigotes per macrophage, which stands in agreement with the findings from other studies involving other species of *Leishmania* and different NSAIDs [17,23]. An important result obtained in the current study was that although the neutralization of COX-2 in cells residing in CL lesions led to decreases in the secretion of cytokines TNF, IL-1 β and IL-10, the addition of PGE2 in cultures of non-infected macrophages did not exert any effects on TNF, IL-1 β and IL-6 production. To our surprise, we also found that exogenous PGE2 induced IL-10 production by non-infected macrophages. IL-10 is a well-described cytokine known to down modulate inflammatory responses [24,38], thus favouring parasite multiplication within macrophages [39]. However, the low concentration of IL-10 produced by infected macrophages is not capable of regulating the inflammatory response triggered during *L. braziliensis* infection. Even though PGE2 was able to increase IL-10 production in uninfected macrophages, the levels produced were apparently insufficient to regulate the inflammatory response observed during infection. Finally, we found that even at low concentrations IL-10 is capable of disabling the microbicidal functions of macrophages, thus favouring parasite proliferation. Together, these data show suggest that COX-2 enzyme inhibition using selective NSAIDs increases the ability of macrophages to kill *Leishmania*, thus attenuating inflammatory response.

In conclusion, the present study documents the advantages of inhibiting COX-2 with a selective NSAID, suggesting the role of NS398 as a promising candidate for adjuvant CL therapy.

Acknowledgements

We thank Andris K. Walter for English language revision and manuscript copyediting assistance, and Cristiano Franco for secretarial assistance.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

This work was supported by National Institutes of Health [AI149456 and AI136862].

ORCID

Maurício T. Nascimento  <http://orcid.org/0000-0002-3791-8048>

Débora L. Viana  <http://orcid.org/0000-0003-2342-1935>

Fábio C. Peixoto  <http://orcid.org/0000-0003-3804-8192>

Sérgio M. Arruda  <http://orcid.org/0000-0002-3071-6339>

Edgar M. Carvalho  <http://orcid.org/0000-0002-2697-8002>

Lucas P. Carvalho  <http://orcid.org/0000-0001-5033-1666>

References

- [1] Bittencourt AL, Barral A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991;86(1):51–56. doi:10.1590/S0074-02761991000100009
- [2] WHO. Expert Committee on the Control of the Leishmaniases & World Health Organization. Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. World Health Organization. Geneva, 22–26 March 2010.
- [3] Jirmanus L, Glesby MJ, Guimarães LH, et al. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;86(3):426–433. doi:10.4269/ajtmh.2012.11-0378
- [4] Unger A, O’Neal S, Machado PR, et al. Association of treatment of American cutaneous leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;80(4):574–579. doi:10.4269/ajtmh.2009.80.574
- [5] Machado PR, Ampuero J, Guimarães LH, et al. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(12):e912. doi:10.1371/journal.pntd.0000912
- [6] Saldanha MG, Queiroz A, Machado PRL, et al. Characterization of the histopathologic features in patients in the early and late phases of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;96(3):645–652.
- [7] Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, et al. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas.* 1998;31(1):143–148. doi:10.1590/S0100-879X1998000100020
- [8] Giudice A, Vendrame C, Bezerra C, et al. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *leishmania braziliensis* infection. *BMC Infect Dis.* 2012;12:75.
- [9] Passos S, Carvalho LP, Costa RS, et al. Intermediate monocytes contribute to pathologic immune response in *leishmania braziliensis* infections. *J Infect Dis.* 2015;211(2):274–282. doi:10.1093/infdis/jiu439
- [10] Santos D, Campos TM, Saldanha M, et al. IL-1 β Production by intermediate monocytes Is associated with immunopathology in cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol.* 2018;138(5):1107–1115. doi:10.1016/j.jid.2017.11.029
- [11] Carvalho AM, Novais FO, Paixão CS, et al. Glyburide, a NLRP3 inhibitor, decreases inflammatory response and Is a candidate to reduce pathology in *leishmania braziliensis* infection. *J Invest Dermatol.* 2020;140(1):246–9.e2. doi:10.1016/j.jid.2019.05.025
- [12] Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *science (New York, NY).* 2001;294(5548):1871–1875. doi:10.1126/science.294.5548.1871
- [13] Hata AN, Breyer RM. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther.* 2004;103(2):147–166. doi:10.1016/j.pharmthera.2004.06.003
- [14] Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem.* 2007;282(16):11613–7. doi:10.1074/jbc.R600038200
- [15] Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol.* 2012;188(1):21–28. doi:10.4049/jimmunol.1101029
- [16] Serezani CH, Chung J, Ballinger MN, et al. Prostaglandin E2 suppresses bacterial killing in alveolar macrophages by inhibiting NADPH oxidase. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007;37(5):562–570. doi:10.1165/rcmb.2007-0153OC
- [17] Saha A, Biswas A, Srivastav S, et al. Prostaglandin E2 negatively regulates the production of inflammatory cytokines/chemokines and IL-17 in visceral leishmaniasis. *J Immunol.* 2014;193(5):2330–2339. doi:10.4049/jimmunol.1400399
- [18] Amorim CF, Novais FO, Nguyen BT, et al. Variable gene expression and parasite load predict treatment outcome in cutaneous leishmaniasis. *Sci Transl Med.* 2019;11(519). doi:10.1126/scitranslmed.aax4204
- [19] Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H. A general classification of New world *leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;50(3):296–311. doi:10.4269/ajtmh.1994.50.296
- [20] Lonardoní MV, Barbieri CL, Russo M, et al. Modulation of *leishmania (L.) amazonensis* growth in cultured mouse macrophages by prostaglandins and platelet activating factor. *Mediat Inflamm.* 1994;3(2):137–141. doi:10.1155/S0962935194000177
- [21] Sheppe AEF, Kummari E, Walker A, et al. PGE2 augments inflammasome activation and M1 polarization in macrophages infected with *salmonella typhimurium* and *yersinia enterocolitica*. *Front Microbiol.* 2018;9:2447. doi:10.3389/fmicb.2018.02447
- [22] Zoccal KF, Sorgi CA, Hori JI, et al. Opposing roles of LT β 4 and PGE2 in regulating the inflammasome-dependent scorpion venom-induced mortality. *Nat Commun.* 2016;7:10760. doi:10.1038/ncomms10760
- [23] Araújo-Santos T, Prates DB, França-Costa J, et al. Prostaglandin E2/leukotriene B4 balance induced by *lutzomyia longipalpis* saliva favors *leishmania infantum* infection. *Parasit Vectors.* 2014;7(1):1–8.
- [24] Lago ASD, Nascimento M, Carvalho AM, et al. The elderly respond to antimony therapy for cutaneous leishmaniasis similarly to young patients but have severe adverse reactions. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;98(5):1317–1324. doi:10.4269/ajtmh.17-0736
- [25] Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin JC, et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(12):e0006052. doi:10.1371/journal.pntd.0006052
- [26] Secatto A, Rodrigues LC, Serezani CH, et al. 5-Lipoxygenase deficiency impairs innate and adaptive immune responses during fungal infection. *PloS one.* 2012;7(3):e31701. doi:10.1371/journal.pone.0031701
- [27] Tavares N, Afonso L, Suarez M, et al. Degranulating neutrophils promote leukotriene B4 production by infected macrophages To kill *leishmania amazonensis*

- parasites. *J Immunol.* 2016;196(4):1865–1873. doi:10.4049/jimmunol.1502224
- [28] Morato CI, da Silva IA, Borges AF, et al. Essential role of leukotriene B4 on leishmania (viannia) braziliensis killing by human macrophages. *Microbes Infect.* 2014;16(11):945–953. doi:10.1016/j.micinf.2014.08.015
- [29] Harbour DA, Blyth WA, Hill TJ. Prostaglandins enhance spread of herpes simplex virus in cell cultures. *J Gen Virol.* 1978;41(1):87–95. doi:10.1099/0022-1317-41-1-87
- [30] Ottonello L, Morone MP, Dapino P, et al. Cyclic AMP-elevating agents down-regulate the oxidative burst induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in adherent neutrophils. *Clin Exp Immunol.* 1995;101(3):502–506. doi:10.1111/j.1365-2249.1995.tb03141.x
- [31] Lin P, Welch EJ, Gao XP, et al. Lysophosphatidylcholine modulates neutrophil oxidant production through elevation of cyclic AMP. *J Immunol.* 2005;174(5):2981–2989. doi:10.4049/jimmunol.174.5.2981
- [32] Carneiro PP, Conceição J, Macedo M, et al. The role of nitric oxide and reactive oxygen species in the killing of leishmania braziliensis by monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis. *PloS one.* 2016;11(2):e0148084. doi:10.1371/journal.pone.0148084
- [33] França-Costa J, Van Weyenbergh J, Boaventura VS, et al. Arginase I, polyamine, and prostaglandin E2 pathways suppress the inflammatory response and contribute to diffuse cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2015;211(3):426–435. doi:10.1093/infdis/jiu455
- [34] Oliveira WN, Dórea AS, Carneiro PP, et al. The influence of infection by different leishmania (viannia) braziliensis isolates on the pathogenesis of disseminated leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:740278. doi:10.3389/fcimb.2021.740278
- [35] Conceição J, Davis R, Carneiro PP, et al. Characterization of neutrophil function in human cutaneous leishmaniasis caused by leishmania braziliensis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(5):e0004715. doi:10.1371/journal.pntd.0004715
- [36] Bonyek-Silva I, Nunes S, Santos RL, et al. Unbalanced production of LTB(4)/PGE(2) driven by diabetes increases susceptibility to cutaneous leishmaniasis. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):1275–1286. doi:10.1080/22221751.2020.1773744
- [37] Futaki N, Takahashi S, Yokoyama M, et al. NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity in vitro. *Prostaglandins.* 1994;47(1):55–59. doi:10.1016/0090-6980(94)90074-4
- [38] Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun.* 2002;70(12):6734–6740. doi:10.1128/IAI.70.12.6734-6740.2002
- [39] Kane MM, Mosser DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol.* 2001;166(2):1141–1147. doi:10.4049/jimmunol.166.2.1141

VIII. DISCUSSÃO

Durante os processos infecciosos, a inflamação é de extrema importância para eliminação de patógenos, mas a exarcebação desse processo causa danos nos tecidos. Fatores do hospedeiro e carga parasitária têm sido associado ao desenvolvimento de úlceras cutâneas e falha na terapia com antimoniato pentavalente em áreas de alta transmissão de *L. braziliensis* (Amorim et al., 2019). Diversas evidências ao longo dos anos têm se acumulado sobre o dano tecidual e surgimento da úlcera leishmaniótica proveniente do exacerbado processo inflamatório na LC (Ribeiro-de-Jesus et al., 1998; Passos et al., 2014; Campos et al., 2014; Santos et al., 2017; Novais et al., 2017; Amorim et al., 2019; Carvalho et al., 2020; Novais; Campos et al., 2020; Cardoso et al., 2021). Primeiro foi demonstrado que a resposta Th1 está associada a defesa contra *Leishmania*, mas a produção exagerada de IFN- γ pode induzir a produção de citocinas inflamatórias (Ribeiro-de-Jesus et al., 1998, Oliveira et al., 2014). Segundo, células T CD8+ e NK conduzem uma resposta citotóxica na tentativa de destruir células infectadas com *Leishmania*, mas acabam secretando granzima B de forma elevada, resultando na ativação de células adjacentes e produção de citocinas inflamatórias, principalmente por fagócitos mononucleares (Novais et al., 2017; Campos et al., 2020; Cardoso et al., 2021). Por fim, os monócitos e macrófagos representam uma das principais linhas de defesa contra a *Leishmania*, porém são a principal fonte das citocinas inflamatórias TNF, IL-1 β e MMP9 na LC (Passos et al., 2014; Campos et al., 2014; Santos et al., 2017). É importante ressaltar que pacientes com LC exibem baixos níveis da citocina regulatória IL-10 (Bacellar et al., 2002).

Portanto, pacientes infectados por *L. braziliensis* desenvolvem uma resposta imune mal modulada que permite a exacerbação do processo inflamatório e surgimento da úlcera típica da doença.

Neste contexto, diversos esforços tem sido feito na busca da identificação de moléculas e mecanismos que regulem a resposta imune na LC. Estudos prévios demonstraram que a associação entre o antimoniato pentavalente e drogas imunomoduladoras é benéfico para pacientes com LC. O uso tópico do fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) em associação com doses padrão do antimoniato pentavalente, diminuiu o tempo de cicatrização em pacientes com LC refratária (Almeida et al., 1999). A pentoxifilina, um medicamento que diminui a produção de TNF, associada ao antimoniato pentavalente também foi mais eficaz no tratamento de pacientes com leishmaniose mucosa quando comparada ao antimoniato pentavalente isolado (Lessa et al., 2001; Machado et al., 2007), porém essa combinação não diminuiu o tempo de cura na LC (Brito et al., 2014), sugerindo que outros mediadores inflamatórios além do TNF também podem estar envolvidos no desfecho da LC.

A sinalização por meio dos receptores Notch controla uma variedade de processos imunológicos, como proliferação celular, destino de células T CD4, ativação de macrófagos e produção de citocinas (Washburn et al., 1997; Robey et al., 1996; Amsen et al., 2004; Tanigaki et al., 2004). Usando um modelo de LC em camundongos resistentes a *L. major*, foi documentado que a sinalização Notch 1 e 2 é essencial para a

secreção de IFN- γ pelas células T CD4⁺ (Auderset et al., 2012). Adicionalmente, a sinalização através do Notch 1 aumentou a produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos (Monsalve et al., 2009). Curiosamente, pacientes com LC que responderam mal ao tratamento apresentaram aumento da expressão do receptor Notch 1 e de ligantes do tipo Delta nas lesões, sugerindo um papel para a sinalização Notch na promoção da resposta inflamatória (Rodrigues et al., 2011)

No presente trabalho, nós documentamos que expressão de genes envolvidos na atividade da gama-secretase, como: *APH1A*, *APH1B*, *GSAP*, *NCSTN*, *PSENE1*, *PSENE2* e *PSENE3*, bem como genes envolvidos na inflamação (*NFKB1*, *NFKB2*, *RELA*, *TNF*, *IL6*, *IL1B*, *CXCL9* e *GZMB*) e regulação da resposta imune, *IL10*, estavam aumentados nas lesões de pacientes com LC quando comparada à pele saudável. Adicionalmente, observamos que a maioria dos genes envolvidos na atividade da gama-secretase estavam correlacionados positivamente com os genes da inflamação, indicando também um possível papel da gama-secretase na resposta inflamatória. Portanto, investigamos o papel da gama-secretase na sinalização Notch por meio de um ensaio funcional utilizando um inibidor da gama-secretase não seletivo a inibição não seletiva da gama-secretase, diminuiu os níveis de IL-10 e CXCL9 induzidos por SLA.

Como foi descrito que a sinalização através de Notch 1 aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e sabe-se que Notch 3 é regulado positivamente em macrófagos inflamatórios (Monsalve et al., 2009; López-López et al., 2020).

Nós bloqueamos os receptores Notch 1 e 3 com anticorpos neutralizantes e descobrimos que a neutralização de Notch 1 em CMSP de pacientes estimuladas com SLA aumentou a produção da IL-6, IL-1 β , IL-10 e diminuiu a produção de CXCL9, porém nenhum efeito foi observado após o bloqueio de Notch 3. Esses resultados foram inesperados uma vez que a literatura mostra que a sinalização por meio de Notch 1 induz a resposta inflamatória por macrófagos. Contudo, esses achados sugerem que a gama-secretase pode ser um elemento importante para a produção de citocinas inflamatórias.

Desta forma, optamos por empregar um inibidor seletivo da gama-secretase (JLK6) e que não interfere na sinalização Notch (Petit et al., 2001). Nossos resultados confirmaram a nossa hipótese, uma vez que JLK6 diminuiu a produção de TNF, IL-1 β , IL-10, CXCL9 e granzima B por CMSP de pacientes com LC estimulados com SLA, mas de forma curiosa, as células das lesões tratadas com JLK6 produziram níveis menores apenas de IL-6, IL-1 β , IL-10 e granzima B. Essas diferenças na produção de mediadores inflamatórios e regulatórios podem ser devido a diferentes números de células, composição e estado de ativação dessas células entre os dois locais avaliados. Além disso, como esses indivíduos apresentam lesões cutâneas não se pode descartar a interferência de outros patógenos, como bactérias, na resposta imune no local da lesão.

Embora tenhamos observado efeitos anti-inflamatórios com o uso do JLK6 em culturas de CMSP e em células das lesões de pacientes com LC, o tratamento de monócitos infectados com esta droga, aumentou o número de parasitos dentro destas células após 48 horas de cultura, porém esse número foi reduzido após 72 horas.

Dessa forma, estudos futuros serão realizados para investigar os efeitos do JLK6 na produção de ERO ao longo do tempo, pois foi demonstrado que a produção de ERO é um importante mecanismo para matar a *L. braziliensis* através dos fagócitos mononucleares (Novais et al., 2014; Carneiro et al., 2016). Juntos nossos resultados sugerem que a sinalização Notch é benéfica para a regulação da resposta imune da LC e interferir na sinalização Notch como abordagem terapêutica pode não ser uma boa alternativa, uma vez que efeitos indesejados podem ocorrer.

Contudo, os inibidores da gama-secretase já foram testados em ensaios clínicos. Enquanto na leucemia/linfoma linfoblástica aguda de células T, o uso do inibidor da gama-secretase foi bem tolerado, uso deste inibidor em pacientes com Alzheimer foi utilizado para diminuir a produção da proteína precursora Amiloide Beta, molécula que está envolvida na patogênese desta doença, problemas de tolerabilidade e efeitos colaterais foram relatados (Mikulca et al., 2014; Toyn e Ahlijanian 2014). Devido a maioria dos ensaios clínicos terem demonstrado que a administração sistêmica de inibidores da gama-secretase estão associados a efeitos colaterais graves, principalmente no trato intestinal, o uso de uma formulação tópica com o JLK6 seria uma opção mais segura no caso da LC.

Interessantemente, alguns estudos mostraram a possibilidade do uso de medicamentos antidiabéticos para regular a resposta imune em diversos tipos de doenças inflamatórias como esclerose múltipla e síndrome metabólica (Negrotto et al., 2016), psoríase (Singh e Bhansali, 2016), diverticulite (Freckelton et al., 2017) e

mais recentemente na LC causada por *L. braziliensis* (Carvalho et al., 2020). Desta forma, expandimos os nossos olhares para uma classe de medicamentos que agem ativando o receptor nuclear gama ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR- γ) e consequentemente modulando a resposta inflamatória, as tiazolidinedionas (TZD) (Aronoff et al., 2000; Ricote, 2007; Bouhlef et al., 2007; Wang et al., 2014; Zhu et al., 2016; Lima et al., 2017). Os efeitos anti-inflamatórios desencadeados pelas TZD são em parte devido a sua capacidade em alterar o perfil dos fagócitos mononucleares de um perfil M1 (inflamatório) para M2 (alternativo/anti-inflamatório) (Bouhlef et al., 2007). Nesse sentido, a rosiglitazona mostrou-se eficaz no controle da resposta inflamatória *in vitro* com uma redução significativa nos níveis de TNF, IL-6, IL-12, PGE2 e CCL2 por macrófagos murinos estimulados com LPG de *Leishmania*, curiosamente os níveis de IL-10 não foram alterados. Essa última observação, chamou a nossa atenção, uma vez que pacientes com LC produzem níveis muito baixos desta citocina regulatória (Bacellar et al., 2002), sugerindo que a ativação do PPAR- γ pela rosiglitazona poderia ser uma via alternativa para a regulação da resposta inflamatória de pacientes com LC. No entanto, por problemas de reações adversas apresentados pela rosiglitazona, optamos por não utilizá-la e explorarmos o papel da pioglitazona na resposta imune de pacientes com LC.

Como a toxicidade de medicamentos representa um grande problema na descoberta de novos alvos terapêuticos. Nós avaliamos inicialmente a viabilidade celular após exposição a pioglitazona na concentração de 1 μ M e descobrimos que a concentração

testada não apresentou nenhum risco tóxico para as CMSP humanas. Em seguida utilizamos uma rede de interação proteína-proteína usando como entradas proteínas que são conhecidas por induzir ou regular negativamente a resposta inflamatória (TNF, IL-6, IL-1 β , IL-10, MMP9, CD163, TLR2, TLR4, NF κ B1, NF κ B2, RELA e PPARG). Para nossa surpresa, descobrimos que todas as proteínas testadas estavam correlacionadas direta ou indiretamente com o PPAR- γ , além disso, o enriquecimento da via GO, mostrou que o PPAR- γ poderia estar envolvido na resposta celular contra LPS, regulação positiva de citocinas, resposta imune, resposta inflamatória e regulação positiva da atividade do fator de transcrição de ligação ao DNA. Embora seja útil identificar categorias funcionais gerais, a análise da rede proteica e o enriquecimento GO podem ser tendenciosos, uma vez que uma seleção arbitrária de proteínas pode ser usada como entrada. Portanto, mostramos que as células das lesões de LC produzem níveis mais elevados de TNF, IL-6, IL-1 β , MMP9, IL-10 e sCD163 quando comparadas às células da pele sadia, sugerindo que essas células estão classicamente ativadas para o perfil M1 e que a ativação do PPAR- γ pode distorcer os fagócitos mononucleares para o perfil alternativo (M2) e ser um alvo chave para regular a resposta inflamatória, característica das lesões da LC.

A sinalização iniciada por TLR2 e TLR4 resulta na ativação do NF- κ B, produção de citocinas e clivagem do CD163 (marcador de monócitos/macrófagos M2), levando à liberação de sua forma solúvel (sCD163 - marcador de monócitos/macrófagos M1) (Medzhitov e Janeway, 2000). Recentemente, foi demonstrado que a *L. braziliensis* e que proteínas solúveis do parasito (SLA) são capazes de aumentar a

expressão de TLR2 e TLR4, levando a produção de citocinas inflamatórias e regulatórias (Polari et al., 2019; Carneiro et al., 2021). Estudos anteriores também mostraram que a pioglitazona é capaz de modular a expressão de TLR2 e TLR4 (Dasu et al., 2009; Kutsenko et al., 2012). Dessa forma, investigamos se a ativação do PPAR- γ pela pioglitazona poderia modular a produção das citocinas TNF, IL-6, IL-1 β , MMP9 e IL-10 sem induzir a liberação da forma solúvel do CD163 em monócitos humanos estimulados com agonistas do TLR2 (Pam3Cys), TLR4 (LPS) ou SLA. Inicialmente, descobrimos que a pioglitazona foi capaz de reduzir a produção TNF, IL-6, IL-1 β , MMP9, IL-10 e sCD163 induzida por LPS ou Pam3Cys. Em seguida, observamos que as CMSP expostas a pioglitazona e estimuladas com SLA produziram níveis menores de TNF, IL-6, IL-1 β , MMP9 e sCD163, mas de forma interessante, os níveis de IL-10 não foram alterados. De forma similar, as células da lesão de pacientes infectados com *L. braziliensis* e tratadas com pioglitazona tiveram os níveis de TNF, IL-1 β , MMP9 e sCD163 reduzidos, novamente observamos que os níveis de IL-10 não foram alterados. Estes resultados indicam que a pioglitazona modula negativamente a secreção de mediadores inflamatórios por monócitos/macrófagos de pacientes com LC, independentemente da IL-10. A falta de efeito da pioglitazona em relação aos níveis de IL-10 em CMSP estimuladas por SLA e células da lesão é de alguma forma diferente dos resultados observados em células estimuladas por LPS e Pam3Cys, onde a pioglitazona reduziu os níveis de IL-10. A explicação mais provável para esta disparidade é que a infecção por *L. braziliensis* pode induzir outros tipos de células além dos monócitos/macrófagos a produzirem IL-10.

Monócitos / macrófagos ativados alternadamente diminuem a resposta inflamatória ao produzirem citocinas reguladoras como a IL-10 (Sulahian et al., 2000; Porcheray et al., 2005). Além disso, essas células estão envolvidas na eliminação de detritos, remodelação e reparo de tecidos (Gordon, 2003 ; Xu et al., 2006 ; Gordon e Martinez, 2010; Sapudom et al., 2021). Para confirmar que o efeitos anti-inflamatório e estado alternativo dos monócitos tratados com pioglitazona são dependentes da ativação do PPAR- γ , nós bloqueamos PPAR- γ com um inibidor seletivo e irreversível e posteriormente estimulamos essas células com SLA e pioglitazona.

Nossos resultados mostraram que os efeitos da pioglitazona foram anulados na ausência do PPAR- γ , mostrando que a ativação alternativa dos monócitos e modulação negativa da produção de citocinas inflamatórias pela pioglitazona é de fato completamente dependente da atividade do PPAR- γ . Já se sabe que fortes respostas anti-inflamatórias podem contribuir para o estabelecimento da infecção *por Leishmania* (Malta-Santos et al., 2017) e devido aos nossos resultados mostrarem uma grande capacidade da pioglitazona em modular a resposta inflamatória via PPAR- γ . Nós investigamos o papel da ativação deste receptor nuclear pela pioglitazona nos monócitos infectados com a *L. braziliensis*. Curiosamente, encontramos uma menor carga parasitária nos monócitos infectados entre 4 e 24 horas de infecção na presença da pioglitazona. Essas observações chamaram nossa atenção, pois a produção de ERO é o principal mecanismo que os monócitos/macrófagos humanos utilizam para destruir a *L. braziliensis* (Novais et al., 2014; Carneiro et al., 2016). Além disso, macrófagos ativados alterna-

tivamente também podem produzir ERO (Nandakumar et al., 2017), especialmente na presença de agonistas exógenos do PPAR- γ (Lefèvre et al., 2010). Para nossa surpresa, a pioglitazona não alterou a produção de ERO nos monócitos infectados, mas ao avaliarmos a viabilidade da *L. braziliensis in vitro*, descobrimos que a exposição do parasito a pioglitazona diminui significativamente a sua viabilidade, o que justifica em parte as observações das reduções da carga parasitária. Contudo, novos estudos serão realizados para compreender melhor, os mecanismos utilizados pela pioglitazona na viabilidade da *Leishmania* durante sua interação com os monócitos.

Como a pioglitazona é uma droga oral indicada para tratamento da diabetes (Singh et al., 2023), muitos esforços têm sido feito no desenvolvimento de formulações para uso tópico da pioglitazona (Silva-Abreu et al., 2017 ; Nair et al., 2019 ; Rojewska et al., 2020). Neste sentido, pacientes com psoríase tratados com pioglitazona tópica tiveram uma diminuição no score da gravidade da doença (Mittal et al., 2009 ; Singh e Bhansali, 2016). Portanto, o uso de uma formulação tópica de pioglitazona evitaria efeitos sistêmicos e seria uma opção mais segura no caso de LC. Em suma, nossos dados mostraram que a sinalização do PPAR- γ induzida pela pioglitazona diminui a resposta inflamatória em pacientes com LC sem afetar morte da *L. braziliensis* por monócitos humanos.

Monócitos são células circulantes no sangue periférico que migram para as os locais de inflamação e infecção, onde se diferenciam em macrófagos e desempenham um papel importante na apresentação de antígenos, produção de citocinas e morte da *Leishmania* (Passos et al., 2015, Giudice et al., 2012; Léon et al., 2007;

Novais et al., 2014; Carneiro et al., 2016). Recentemente, foi mostrado que pacientes com LC que falharam a terapia com antimoniato pentavalente, apresentavam elevada carga parasitária e forte resposta inflamatória no local da lesão (Amorim et al., 2019). Desta maneira, moléculas que desabilitam a atividade leishmanicida dos macrófagos favorecendo a sobrevivência do parasito tem sido alvo de estudos. Sabe-se que a PGE2 é um eicosanóide inflamatório derivado do metabolismo do ácido araquidônico pelas enzimas COXs que contribui para a sobrevivência de várias espécies de *Leishmania*, incluindo *L. amazonensis*, *L. donovani* e *L. infantum* (Saha et al., 2014; Lonardoní et al., 1994; Araújo-Santos et al., 2014).

Foi demonstrado anteriormente que pacientes com leishmaniose cutânea e difusa causada por *L. amazonensis* exibem elevada expressão dos genes da COX-2 (*PTGS2*) e do receptor EP2 (*PTGER2*) no local da lesão estando associada a sobrevivência do parasito (França-Costa et al., 2015) e mais recentemente foi demonstrado que pacientes infectados com *L. braziliensis* apresentam elevada expressão dos genes *PTGS2*, *PTGER2* e *PTGER4* no local da lesão (França-Costa et al., 2016; Malta-Santos et al., 2020). É importante ressaltar que a sinalização da PGE2 por meio do receptor EP2 e EP4 é bem conhecida por induzir a produção de cAMP, uma molécula que diminui a produção de ERO (Otonelo et al., 1995; Lin et al., 2005; Serezani et al., 2007). Embora, já tenha sido demonstrado que pacientes com LC causada por *L. braziliensis* tenham a expressão genes *PTGER2*, *PTGER4* e *PTGS2* aumentados no local das lesões, nós

aprofundamos o olhar para a funcionalidade desta enzima e do seu metabolito lipídico nas lesões de pacientes com LC. Concordantemente com as observações anteriores (França-Costa et al., 2016; Malta-Santos et al., 2020), também identificamos que os genes que codificam a COX-2 e o receptor EP2 estavam aumentados nas lesões de pacientes com LC em comparação com a pele saudável. Adicionalmente, observamos que pacientes com alta expressão do gene da COX-2 possuíam maior carga parasitária e levaram mais tempo para curar quando comparados aos pacientes que exibiram baixa expressão do gene da COX-2. Estes resultados reforçam a hipótese de que o aumento da expressão do gene *PTGS2* no local da lesão pode ser um importante fator do hospedeiro envolvido no estabelecimento da infecção por *L. braziliensis* e conseqüentemente falha terapêutica.

Para confirmar essa hipótese, avaliamos a frequência de células que expressavam a enzima COX-2, número de amastigotas e níveis de PGE2 nas lesões de pacientes com LC e pele sadia. Nós descobrimos que as lesões de pacientes com LC apresentavam um denso infiltrado de células positivas para COX-2, principalmente naqueles indivíduos que falharam a terapia, além de altos níveis de PGE2 que por sua vez, correlacionaram-se positivamente com o número de parasitos e lesões. Estes achados sugerem que aumento de COX-2/PGE2 nos locais das lesões de pacientes com LC pode ser um fator que contribui para a disseminação do parasito e gravidade da doença. De fato, pacientes com leishmaniose disseminada, uma forma emergente da leishmaniose tegumentar americana (LTA),

apresentam múltiplas lesões cutâneas e produzem altos níveis de PGE2 (Oliveira et al., 2021), o que suporta a nossa hipótese.

A resposta imune inata mediada por macrófagos e neutrófilos representam uma importante linha de defesa contra parasitas intracelulares, devido à capacidade destas células em produzir ERO (Giudice et al., 2012; Tavares et al., 2016; Carneiro et al., 2016; Conceição et al., 2016) além disso, essas células são importantes fontes de produção de PGE2 (Lonardoní et al., 1994; Saha et al., 2014; Araújo-Santos et al., 2014; Tavares et al., 2016; Bonyek-Silva et al., 2020). Enquanto uma alta frequência de macrófagos tem sido descrita por compor o infiltrado inflamatório das lesões de pacientes com LC, um baixo número de neutrófilos tem sido observado nesses locais (Bittencourt e Barral 1991; Saldanha et al., 2017). Em adição, macrófagos infectados com *L. braziliensis* produzem altos níveis de PGE2 logo nas primeiras horas de infecção (Bonyek-Silva et al., 2020). Neste trabalho, descobrimos que após 2 horas da internalização da *L. braziliensis* nos macrófagos, essas células começam a produzir níveis relativamente altos de PGE2, sendo observado o seu maior pico após 48 horas de infecção. Observamos também que os níveis de PGE2 neste momento de pico correlacionaram-se positivamente com o número de ciclos de antimoniato pentavalente que estes pacientes necessitaram fazer para alcançarem a cura, o que reforça o envolvimento deste eicosanoide na falha terapêutica.

Monócitos e macrófagos são as principais fontes celulares produtoras de IL-1 β na LC (Santos et al., 2017) e estudos anteriores apontaram a PGE2 como uma molécula indutora da produção desta citocina inflamatória (Zoccal et al., 2016; Sheppe et al., 2018). Dessa forma, avaliamos a capacidade da PGE2 exógena em induzir a produção de TNF, IL-1 β , IL-6 e IL-10 em macrófagos humanos não infectados. Nossos dados mostraram que a PGE2 não é capaz de induzir a produção de citocinas inflamatórias, mas por um mecanismo pouco compreendido, induziu uma maior liberação de IL-10. A IL-10 é uma citocina bem descrita por modular negativamente as respostas inflamatórias (Lago et al., 2018; Bacellar et al., 2002), favorecendo assim a multiplicação do parasita dentro dos macrófagos (Kane e Mosser, 2001). Contudo, os níveis induzidos pela PGE2 em macrófagos não infectados foram muito baixo e aparentemente insuficiente para regular a resposta inflamatória, observada durante a infecção pela *L. brazilensis*. Portanto, investigamos se baixas concentrações de IL-10 poderia afetar a capacidade dos macrófagos em destruir a *Leishmania*. Dessa forma, infectamos macrófagos de pacientes com LC e enriquecemos as culturas com doses crescentes de rIL-10. Descobrimos que mesmo em concentrações baixas de rIL-10, os macrófagos tiveram sua habilidade leishmanicida afetada, permitindo assim a proliferação dos parasitos. Nossos resultados sugerem que a inibição da síntese da PGE2 pode representar uma estratégia promissora para o controle da resposta inflamatória e da infecção por *L. braziliensis in vitro*.

Os efeitos da inibição da COX com AINEs seletivos e não seletivos demonstram ser eficientes no controle da infecção por diversas espécies de *Leishmania in vitro* e *in vivo* (Lonardoni et al., 1994; Saha et al., 2014; Araújo-Santos et al., 2014). Contudo, a escolha de um AINE não seletivo pode interferir em outras vias não desejadas e provocar alterações em diferentes ambientes fisiológicos. Assim, optamos por utilizar, o primeiro AINE seletivo descrito para COX-2 o composto NS398 (Futaki et al., 1994) e que mostrou ser eficiente no controle da infecção por *L. infantum in vivo* (Araújo-Santos et al., 2014). Deste modo, infectamos macrófagos com *L. braziliensis* e em seguida inibimos a COX-2 com o composto NS398. Nós descobrimos que as células infectadas e tratadas com NS398 apresentaram um menor número de amastigotas por macrófago, o que está de acordo com os achados de outros estudos envolvendo outras espécies de *Leishmania* e diferentes AINEs (Saha et al., 2014; Araújo-Santos et al., 2014).

Como lesões com alta carga parasitária exibem uma resposta inflamatória mais intensa podendo contribuir para o dano tecidual e falha terapêutica (Amorim et al., 2019). Investigamos se a inibição da COX-2 nas células das lesões de pacientes com LC poderia também modular a resposta inflamatória. Para nossa surpresa, observamos que as células das lesões tratadas com o composto NS398 produziram níveis menores de TNF, IL-10 e IL-1 β . Juntos, nossos dados sugerem que a inibição da enzima COX-2 usando um AINE seletivo aumenta a capacidade dos macrófagos de matar a *Leishmania*, atenuando assim a resposta inflamatória.

IX. CONCLUSÃO

1 – A sinalização por meio do receptor Notch 1 é benéfica para regulação da resposta inflamatória de pacientes LC;

2 – A inibição da gamma-secretase com o composto JLK6 mostrou-se eficaz no controle da resposta inflamatória diminuindo os níveis de TNF, IL-6, IL-1 β , granzima B e IL-10 sem afetar a capacidade dos monócitos em matar a *L. braziliensis*;

3 – A ativação do PPAR- γ pela pioglitazona diminuiu a produção das citocinas inflamatórias TNF, IL-6, IL-1 β por monócitos/macrófagos;

3 – A ativação do PPAR- γ pela pioglitazona induziu a ativação alternativa dos monócitos

4 – A pioglitazona não afetou a capacidade dos monócitos em produzir ERO e matar a *L. braziliensis*;

5 - A pioglitazona diminuiu a viabilidade de promastigotas *in vitro*;

6 – O aumento da COX-2/PGE2 nas lesões de pacientes LC está associada a carga parasitária, gravidade da doença e falha terapêutica;

7 – A PGE2 não induz a resposta inflamatória na LC;

8 – A neutralização da COX-2 aumentou a morte da *L. braziliensis* por macrófagos de pacientes LC;

9 – A neutralização da COX-2 diminuiu a produção de TNF, IL-1 β e IL-10 pelas células das lesões de paciente LC;

Juntos nossos resultados, mostram as vantagens em ativar o PPAR- γ com a pioglitazona, inibir a gama-secretase com o JLK6 e inibir a COX-2 com NS398 para regular a resposta inflamatória sem afetar a capacidade dos monócitos/macrófagos em matar a *L. braziliensis*. Além disso, este trabalho mostrou que esses 3 compostos apresentam efeitos imunomoduladores e são fortes candidatos a terapia adjuvante da LC.

X. PROPOSTA DE ESTUDO

A resposta inflamatória contra a *L. braziliensis* é extremamente importante, mas a produção exacerbada de citocinas e eicosanoides inflamatórios contribuem para o dano tecidual e falha terapêutica. Moléculas que regulam a resposta inflamatória sem afetar a capacidade dos fagócitos mononucleares de destruir a *L. braziliensis* é extremamente atraente para a terapia adjuvante da LC. Com o intuito de avançar na compreensão da regulação da resposta inflamatória e contribuir na diminuição da falha terapêutica da LC, nossa proposta será realizar 3 ensaios clínicos pilotos com as substâncias aqui descobertas. Dessa forma, associaremos formulações tópicas ao tratamento padrão da LC (antimoniato pentavalente) conforme preconizado pelo Ministério da Saúde.

Nosso primeiro objetivo será determinar eficácia da pioglitazona tópica associada ao antimoniato pentavalente venoso. Convidaremos a participar deste estudo piloto 20 pacientes com LC (amostra de conveniência) que serão randomizados e inseridos em dois grupos:

Grupo 1 - Pioglitazona tópica 1 μ M (aplicação 1 vez ao dia) + antimoniato pentavalente (20mg/kg/dia EV) – 10 pacientes LC

Grupo 2 - Antimoniato pentavalente (20mg/kg/dia EV) – 10 pacientes LC.

Critérios de cura:

Cura inicial – Cicatrização total após 30 dias de tratamento

Cura final - Cicatrização total após 60 dias de tratamento

Nosso segundo objetivo será determinar a eficácia do AINE NS398 tópico associado ao antimoniato pentavalente venoso. Convidaremos a participar deste estudo piloto 20 pacientes com LC (amostra de conveniência) que serão randomizados e inseridos em dois grupos:

Grupo 1 – NS398 tópica 100µM (aplicação 2 vezes ao dia) + antimoniato pentavalente (20mg/kg/dia EV) – 10 pacientes LC

Grupo 2 - Antimoniato pentavalente (20mg/kg/dia EV) – 10 pacientes LC.

Critérios de cura:

Cura inicial – Cicatrização total após 30 dias de tratamento

Cura final - Cicatrização total após 60 dias de tratamento

Nosso terceiro e último objetivo será determinar a eficácia do JLK6 tópico associado ao antimoniato pentavalente venoso. Convidaremos a participar deste estudo piloto 20 pacientes com LC (amostra de conveniência) que serão randomizados e inseridos em dois grupos:

Grupo 1 – JLK6 tópica 20µM (aplicação 1 vez ao dia) + antimoniato pentavalente (20mg/kg/dia EV) – 10 pacientes LC

Grupo 2 - Antimoniato pentavalente (20mg/kg/dia EV) – 10 pacientes LC.

Critérios de cura:

Cura inicial – Cicatrização total após 30 dias de tratamento

Cura final - Cicatrização total após 60 dias de tratamento

XI. SUMMARY

STUDY OF PATHWAYS OF REGULATION OF THE INFLAMMATORY RESPONSE IN PATIENTS WITH CUTANEOUS LEISHMANIASIS CAUSED BY *L. braziliensis*.

Patients with cutaneous leishmaniasis (CL) present an exacerbated inflammatory response associated with tissue damage and the development of ulcers. In recent years, higher rates of treatment failure with pentavalent antimoniate have been observed, but the underlying reason remains poorly understood. Our hypothesis is that patients with CL present a decrease in regulatory mechanisms, thus allowing inflammation to persist and ulcers to develop. The objectives of the present study were to evaluate the role of Notch signaling, activation of PPAR- γ by pioglitazone and the functions of PGE2 in the inflammatory response of patients with CL caused by *L. braziliensis*. We initially discovered that signaling via the Notch 1 receptor protects patients with CL against the pathological inflammatory response, while the compound JLK6, a selective gamma-secretase inhibitor that does not interfere with Notch signaling, has been shown to decrease the inflammatory response in vitro, without change the parasite load in monocytes after 72 hours. Subsequently, we showed that activation of PPAR- γ by pioglitazone changed the profile of monocytes to M2, decreasing the inflammatory response without affecting the killing of *L. braziliensis* by monocytes from patients with CL. Finally, we found that increased COX-2/PGE2 is associated with disease severity and treatment failure in CL. Furthermore, neutralization of COX-2 by NS398, a selective NSAID, increased the ability of macrophages to kill *L. braziliensis*, thus decreasing the production of inflammatory cytokines. Together, these findings reveal the advantages of inhibiting the gamma-secretase complex with the compound JLK6 without interfering with Notch signaling, activating PPAR- γ with pioglitazone and inhibiting the synthesis of PGE2 through neutralization of COX-2 with the compound NS398. Making these three compounds strong candidates for adjuvant therapy for CL.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis; *L. braziliensis*; inflammation; therapeutic failure; Notch; Pioglitazone; PGE2; PPAR- γ

XII. REFERÊNCIAS

Almeida R, D'Oliveira A Jr, Machado P, Bacellar O, Ko AI, de Jesus AR, Mobashery N, Brito Santos J, Carvalho EM. Randomized, double-blind study of stibogluconate plus human granulocyte macrophage colony-stimulating factor versus stibogluconate alone in the treatment of cutaneous Leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1999 Nov;180(5):1735-7. doi: 10.1086/315082. PMID: 10515844.

Amorim CF, Novais FO, Nguyen BT, Misic AM, Carvalho LP, Carvalho EM, Beiting DP, Scott P. Variable gene expression and parasite load predict treatment outcome in cutaneous leishmaniasis. *Sci Transl Med.* 2019 Nov 20;11(519):eaax4204. doi: 10.1126/scitranslmed.aax4204. PMID: 31748229; PMCID: PMC7068779.

Amsen D, Blander JM, Lee GR, Tanigaki K, Honjo T, Flavell RA. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell.* 2004 May 14;117(4):515-26. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00451-9. PMID: 15137944.

Andersson ER, Sandberg R, Lendahl U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development.* 2011 Sep;138(17):3593-612. doi: 10.1242/dev.063610. PMID: 21828089.

Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM, Gollob KJ. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett.* 2005 Nov 15;101(2):226-30. doi: 10.1016/j.imlet.2005.06.004. PMID: 16083969.

Araújo-Santos T, Prates DB, França-Costa J, Luz NF, Andrade BB, Miranda JC, Brodskyn CI, Barral A, Bozza PT, Borges VM. Prostaglandin E2/leukotriene B4 balance induced by *Lutzomyia longipalpis* saliva favors *Leishmania infantum* infection. *Parasit Vectors.* 2014 Dec 20;7:601. doi: 10.1186/s13071-014-0601-8. PMID: 25526785; PMCID: PMC4282730.

Aronoff S, Rosenblatt S, Braithwaite S, Egan JW, Mathisen AL, Schneider RL. Pioglitazone hydrochloride monotherapy improves glycemic control in the treatment of patients with type 2 diabetes: a 6-month randomized placebo-controlled dose-response study. The Pioglitazone 001 Study Group. *Diabetes Care.* 2000 Nov;23(11):1605-11. doi: 10.2337/diacare.23.11.1605. PMID: 11092281.

Auderset F, Coutaz M, Tacchini-Cottier F. The role of Notch in the differentiation of CD4⁺ T helper cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2012;360:115-34. doi: 10.1007/82_2012_227. PMID: 22653552.

Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun.* 2002 Dec;70(12):6734-40. doi: 10.1128/IAI.70.12.6734-6740.2002. PMID: 12438348; PMCID: PMC132996.

Bittencourt AL, Barral A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1991 Jan-Mar;86(1):51-6. doi: 10.1590/s0074-02761991000100009. Erratum in: *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991 Jul-Sep;86(3):following 378. PMID: 1842401.

Bonyek-Silva I, Nunes S, Santos RL, Lima FR, Lago A, Silva J, Carvalho LP, Arruda SM, Serezani HC, Carvalho EM, Brodskyn CI, Tavares NM. Unbalanced production of LTB4/PGE2 driven by diabetes increases susceptibility to cutaneous leishmaniasis. *Emerg Microbes Infect*. 2020 Dec;9(1):1275-1286. doi: 10.1080/22221751.2020.1773744. PMID: 32525457; PMCID: PMC7473187.

Bouhlef MA, Derudas B, Rigamonti E, Dièvert R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab*. 2007 Aug;6(2):137-43. doi: 10.1016/j.cmet.2007.06.010. PMID: 17681149.

Brasil, 2017. http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf

Brasil, 2023. <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt/situacao-epidemiologica/arquivos/lt-casos.pdf>

SINAN, 2023. https://www.saude.ba.gov.br/wpcontent/uploads/2017/11/boletimLeishTegumentar_No01_maio2023-1.pdf

Brito G, Dourado M, Polari L, Celestino D, Carvalho LP, Queiroz A, Carvalho EM, Machado PR, Passos S. Clinical and immunological outcome in cutaneous leishmaniasis patients treated with pentoxifylline. *Am J Trop Med Hyg*. 2014 Apr;90(4):617-20. doi: 10.4269/ajtmh.12-0729. Epub 2014 Feb 24. PMID: 24567316; PMCID: PMC3973503.

Campos TM, Passos ST, Novais FO, Beiting DP, Costa RS, Queiroz A, Mosser D, Scott P, Carvalho EM, Carvalho LP. Matrix metalloproteinase 9 production by monocytes is enhanced by TNF and participates in the pathology of human cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Nov 13;8(11):e3282. doi: 10.1371/journal.pntd.0003282. PMID: 25393535; PMCID: PMC4230914.

Campos TM, Novais FO, Saldanha M, Costa R, Lordelo M, Celestino D, Sampaio C, Tavares N, Arruda S, Machado P, Brodskyn C, Scott P, Carvalho EM, Carvalho LP. Granzyme B Produced by Natural Killer Cells Enhances Inflammatory Response and Contributes to the Immunopathology of Cutaneous Leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2020 Mar 2;221(6):973-982. doi: 10.1093/infdis/jiz538. PMID: 31748808; PMCID: PMC7050991.

Cardoso TM, Machado Á, Costa DL, Carvalho LP, Queiroz A, Machado P, Scott P, Carvalho EM, Bacellar O. Protective and pathological functions of CD8+ T cells in *Leishmania braziliensis* infection. *Infect Immun*. 2015 Mar;83(3):898-906. doi: 10.1128/IAI.02404-14. Epub 2014 Dec 22. PMID: 25534940; PMCID: PMC4333467.

Cardoso TM, Lima JB, Bonyek-Silva Í, Nunes S, Feijó D, Almeida H, Silva J, Barral A, Boaventura V, Borges VM, Zamboni DS, Pedreira de Carvalho L, Carvalho EM, Tavares NM, Brodskyn C. Inflammasome Activation by CD8+ T Cells from Patients with Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* in the Immunopathogenesis of the Disease. *J Invest Dermatol*. 2021 Jan;141(1):209-213.e2. doi: 10.1016/j.jid.2020.05.106. Epub 2020 Jun 13. PMID: 32544477.

Carneiro PP, Conceição J, Macedo M, Magalhães V, Carvalho EM, Bacellar O. The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS One*. 2016 Feb 3;11(2):e0148084. doi: 10.1371/journal.pone.0148084. PMID: 26840253; PMCID: PMC4739692.

Carneiro PP, Dórea AS, Oliveira WN, Guimarães LH, Brodskyn C, Carvalho EM, Bacellar O. Blockade of TLR2 and TLR4 Attenuates Inflammatory Response and Parasite Load in Cutaneous Leishmaniasis. *Front Immunol*. 2021 Oct 6;12:706510. doi: 10.3389/fimmu.2021.706510. PMID: 34691019; PMCID: PMC8526941.

Carvalho AM, Novais FO, Paixão CS, de Oliveira CI, Machado PRL, Carvalho LP, Scott P, Carvalho EM. Glyburide, a NLRP3 Inhibitor, Decreases Inflammatory Response and Is a Candidate to Reduce Pathology in *Leishmania braziliensis* Infection. *J Invest Dermatol*. 2020 Jan;140(1):246-249.e2. doi: 10.1016/j.jid.2019.05.025. Epub 2019 Jun 25. PMID: 31252034; PMCID: PMC7851844.

Carvalho LP, Passos S, Schriefer A, Carvalho EM. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front Immunol*. 2012 Oct 4;3:301. doi: 10.3389/fimmu.2012.00301. PMID: 23060880; PMCID: PMC3463898.

Castés M, Agnelli A, Rondón AJ. Mechanisms associated with immunoregulation in human American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*. 1984 Aug;57(2):279-86. PMID: 6467674; PMCID: PMC1536102.

Conceição J, Davis R, Carneiro PP, Giudice A, Muniz AC, Wilson ME, Carvalho EM, Bacellar O. Characterization of Neutrophil Function in Human Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 May 11;10(5):e0004715. doi: 10.1371/journal.pntd.0004715. PMID: 27167379; PMCID: PMC4864077.

Costa JM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Netto EM, Carvalho EM, Barral A, Rosa AC, Cuba CC, Magalhães AV, Barreto AC. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *J Trop Med Hyg*. 1986 Dec;89(6):319-23. PMID: 3806749.

Dasu MR, Park S, Devaraj S, Jialal I. Pioglitazone inhibits Toll-like receptor expression and activity in human monocytes and db/db mice. *Endocrinology*. 2009 Aug;150(8):3457-64. doi: 10.1210/en.2008-1757. Epub 2009 Apr 23. PMID: 19389833; PMCID: PMC2717888.

Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol*. 1996 Sep-Oct;14(5):417-23. doi: 10.1016/0738-081x(96)00057-0. PMID: 8889319.

Faria DR, Souza PE, Durães FV, Carvalho EM, Gollob KJ, Machado PR, Dutra WO. Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2009 Aug;31(8):432-9. doi: 10.1111/j.1365-3024.2009.01125.x. PMID: 19646207; PMCID: PMC2764276.

França-Costa J, Van Weyenbergh J, Boaventura VS, Luz NF, Malta-Santos H, Oliveira MC, Santos de Campos DC, Saldanha AC, dos-Santos WL, Bozza PT, Barral-Netto M, Barral A, Costa JM, Borges VM. Arginase I, polyamine, and prostaglandin E2 pathways suppress the inflammatory response and contribute to diffuse cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2015 Feb 1;211(3):426-35. doi: 10.1093/infdis/jiu455. Epub 2014 Aug 14. Erratum in: *J Infect Dis*. 2016 Jan 15;213(2):327. PMID: 25124926.

França-Costa J, Andrade BB, Khouri R, Van Weyenbergh J, Malta-Santos H, da Silva Santos C, Brodyskn CI, Costa JM, Barral A, Bozza PT, Boaventura V, Borges VM. Differential Expression of the Eicosanoid Pathway in Patients With Localized or Mucosal Cutaneous Leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2016 Apr 1;213(7):1143-7. doi: 10.1093/infdis/jiv548. Epub 2015 Nov 17. PMID: 26582954.

Freckelton J, Evans JA, Croagh D, Moore GT. Metformin use in diabetics with diverticular disease is associated with reduced incidence of diverticulitis. *Scand J Gastroenterol*. 2017 Sep;52(9):969-972. doi: 10.1080/00365521.2017.1325930. Epub 2017 May 14. PMID: 28503973.

Follador I, Araújo C, Bacellar O, Araújo CB, Carvalho LP, Almeida RP, Carvalho EM. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin Infect Dis*. 2002 Jun 1;34(11):E54-8. doi: 10.1086/340261. Epub 2002 May 7. PMID: 12015707.

Futaki N, Takahashi S, Yokoyama M, Arai I, Higuchi S, Otomo S. NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity in vitro. *Prostaglandins*. 1994 Jan;47(1):55-9. doi: 10.1016/0090-6980(94)90074-4. PMID: 8140262.

Giudice A, Vendrame C, Bezerra C, Carvalho LP, Delavechia T, Carvalho EM, Bacellar O. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *BMC Infect Dis*. 2012 Mar 29;12:75. doi: 10.1186/1471-2334-12-75. PMID: 22458474; PMCID: PMC3373377.

Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003 Jan;3(1):23-35. doi: 10.1038/nri978. PMID: 12511873.

Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 2010 May 28;32(5):593-604. doi: 10.1016/j.immuni.2010.05.007. PMID: 20510870.

GUIMARÃES, Luiz Henrique et al. Aspectos clínicos da leishmaniose tegumentar. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 74, n. 1, 2008.

Hata AN, Breyer RM. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther*. 2004 Aug;103(2):147-66. doi: 10.1016/j.pharmthera.2004.06.003. PMID: 15369681.

Jirmanus L, Glesby MJ, Guimarães LH, Lago E, Rosa ME, Machado PR, Carvalho EM. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *Am J Trop Med Hyg*. 2012 Mar;86(3):426-33. doi: 10.4269/ajtmh.2012.11-0378. PMID: 22403312; PMCID: PMC3284357.

Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol*. 2012 Jan 1;188(1):21-8. doi: 10.4049/jimmunol.1101029. PMID: 22187483; PMCID: PMC3249979.

Kane MM, Mosser DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol*. 2001 Jan 15;166(2):1141-7. doi: 10.4049/jimmunol.166.2.1141. PMID: 11145695.

Kutsenko NL, Vesnina LE, Kaïdashev IP. [Pioglitazone, an activator of PPAR-gamma, reduces the expression of kB nuclear factor and inhibits apoptosis in mononuclear cells of peripheral blood in vitro]. *Fiziol Zh (1994)*. 2012;58(2):33-8. Ukrainian. PMID: 22873050.

Lago ASD, Nascimento M, Carvalho AM, Lago N, Silva J, Queiroz JR, Carvalho LP, Schriefer A, Wilson M, Machado P, Carvalho EM. The Elderly Respond to Antimony Therapy for Cutaneous Leishmaniasis Similarly to Young Patients but Have Severe Adverse Reactions. *Am J Trop Med Hyg*. 2018 May;98(5):1317-1324. doi: 10.4269/ajtmh.17-0736. Epub 2018 Mar 22. PMID: 29582733; PMCID: PMC5953371.

Llanos Cuentas EA, Cuba CC, Barreto AC, Marsden PD. Clinical characteristics of human *Leishmania braziliensis braziliensis* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1984;78(6):845-6. doi: 10.1016/0035-9203(84)90043-9. PMID: 6533860.

Lefèvre L, Galès A, Olaghier D, Bernad J, Perez L, Burcelin R, Valentin A, Auwerx J, Pipy B, Coste A. PPAR γ ligands switched high fat diet-induced macrophage M2b polarization toward M2a thereby improving intestinal *Candida* elimination. *PLoS One*. 2010 Sep 20;5(9):e12828. doi: 10.1371/journal.pone.0012828. PMID: 20877467; PMCID: PMC2942900.

León B, López-Bravo M, Ardavín C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity*. 2007 Apr;26(4):519-31. doi: 10.1016/j.immuni.2007.01.017. Epub 2007 Apr 5. PMID: 17412618.

Lessa HA, Machado P, Lima F, Cruz AA, Bacellar O, Guerreiro J, Carvalho EM. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg*. 2001 Aug;65(2):87-9. doi: 10.4269/ajtmh.2001.65.87. PMID: 11508396.

Lima JB, Araújo-Santos T, Lázaro-Souza M, Carneiro AB, Ibraim IC, Jesus-Santos FH, Luz NF, Pontes SM, Entringer PF, Descoteaux A, Bozza PT, Soares RP, Borges VM. *Leishmania infantum* lipophosphoglycan induced-Prostaglandin E2 production in association with PPAR- γ expression via activation of Toll like receptors-1 and 2. *Sci Rep*. 2017 Oct 30;7(1):14321. doi: 10.1038/s41598-017-14229-8. PMID: 29084985; PMCID: PMC5662570.

Lin P, Welch EJ, Gao XP, Malik AB, Ye RD. Lysophosphatidylcholine modulates neutrophil oxidant production through elevation of cyclic AMP. *J Immunol*. 2005 Mar 1;174(5):2981-9. doi: 10.4049/jimmunol.174.5.2981. PMID: 15728511.
Lonardon MV, Barbieri CL, Russo M, Jancar S. Modulation of *Leishmania (L.) amazonensis* Growth in Cultured Mouse Macrophages by Prostaglandins and Platelet Activating Factor. *Mediators Inflamm*. 1994;3(2):137-41. doi: 10.1155/S0962935194000177. PMID: 18472932; PMCID: PMC2367026.

López-López S, Monsalve EM, Romero de Ávila MJ, González-Gómez J, Hernández de León N, Ruiz-Marcos F, Baladrón V, Nueda ML, García-León MJ, Screpanti I, Felli MP, Laborda J, García-Ramírez JJ, Díaz-Guerra MJM. NOTCH3 signaling is essential for NF- κ B activation in TLR-activated macrophages. *Sci Rep*. 2020 Sep 9;10(1):14839. doi: 10.1038/s41598-020-71810-4. PMID: 32908186; PMCID: PMC7481794.

Machado PR, Ampuero J, Guimarães LH, Villasboas L, Rocha AT, Schriefer A, Sousa RS, Talhari A, Penna G, Carvalho EM. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 Dec 21;4(12):e912. doi: 10.1371/journal.pntd.0000912. PMID: 21200420; PMCID: PMC3006132.

Machado PR, Lessa H, Lessa M, Guimarães LH, Bang H, Ho JL, Carvalho EM. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 2007 Mar 15;44(6):788-93. doi: 10.1086/511643. Epub 2007 Feb 2. PMID: 17304449.

Malta-Santos H, Andrade BB, Zanette DL, Costa JM, Bozza PT, Bandeira-Melo C, Barral A, França-Costa J, Borges VM. Resolvin D1 drives establishment of *Leishmania amazonensis* infection. *Sci Rep*. 2017 Apr 10;7:46363. doi: 10.1038/srep46363. PMID: 28393908; PMCID: PMC5385529.

Malta-Santos H, Fukutani KF, Sorgi CA, Queiroz ATL, Nardini V, Silva J, Lago A, Carvalho LP, Machado PLR, Bozza PT, França-Costa J, Faccioli LH, Carvalho EM, Andrade BB, Borges VM. Multi-omic Analyses of Plasma Cytokines, Lipidomics, and Transcriptomics Distinguish Treatment Outcomes in Cutaneous Leishmaniasis. *iScience*. 2020 Nov 23;23(12):101840. doi: 10.1016/j.isci.2020.101840. PMID: 33313489; PMCID: PMC7721649.

Medzhitov R, Janeway C Jr. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol*. 2000 Oct;8(10):452-6. doi: 10.1016/s0966-842x(00)01845-x. PMID: 11044679.

Mikulca JA, Nguyen V, Gajdosik DA, Teklu SG, Giunta EA, Lessa EA, Tran CH, Terak EC, Raffa RB. Potential novel targets for Alzheimer pharmacotherapy: II. Update on secretase inhibitors and related approaches. *J Clin Pharm Ther*. 2014 Feb;39(1):25-37. doi: 10.1111/jcpt.12112. Epub 2013 Dec 8. PMID: 24313554.

Mittal R, Malhotra S, Pandhi P, Kaur I, Dogra S. Efficacy and safety of combination Acitretin and Pioglitazone therapy in patients with moderate to severe chronic plaque-type psoriasis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Arch Dermatol*. 2009 Apr;145(4):387-93. doi: 10.1001/archdermatol.2009.5. PMID: 19380660.

Monsalve E, Ruiz-García A, Baladrón V, Ruiz-Hidalgo MJ, Sánchez-Solana B, Rivero S, García-Ramírez JJ, Rubio A, Laborda J, Díaz-Guerra MJ. Notch1 upregulates LPS-induced macrophage activation by increasing NF-kappaB activity. *Eur J Immunol*. 2009 Sep;39(9):2556-70. doi: 10.1002/eji.200838722. PMID: 19662631.

Morato CI, da Silva IA Jr, Borges AF, Dorta ML, Oliveira MA, Jancar S, Serezani CH, Ribeiro-Dias F. Essential role of leukotriene B4 on *Leishmania (Viannia) braziliensis* killing by human macrophages. *Microbes Infect*. 2014 Nov;16(11):945-53. doi: 10.1016/j.micinf.2014.08.015. Epub 2014 Sep 6. PMID: 25195516.

Nair AB, Gupta S, Al-Dhubiab BE, Jacob S, Shinu P, Shah J, Morsy MA, SreeHarsha N, Attimarad M, Venugopala KN, Akrawi SH. Effective Therapeutic Delivery and Bioavailability Enhancement of Pioglitazone Using Drug in Adhesive Transdermal Patch. *Pharmaceutics*. 2019 Jul 23;11(7):359. doi: 10.3390/pharmaceutics11070359. PMID: 31340601; PMCID: PMC6681070.

Nandakumar V, Hebrink D, Jenson P, Kottom T, Limper AH. Differential Macrophage Polarization from *Pneumocystis* in Immunocompetent and Immunosuppressed Hosts: Potential Adjunctive Therapy during Pneumonia. *Infect Immun*. 2017 Feb 23;85(3):e00939-16. doi: 10.1128/IAI.00939-16. PMID: 27993972; PMCID: PMC5328482.

Negrotto L, Farez MF, Correale J. Immunologic Effects of Metformin and Pioglitazone Treatment on Metabolic Syndrome and Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol*. 2016 May 1;73(5):520-8. doi: 10.1001/jamaneurol.2015.4807. PMID: 26953870.

Novais FO, Nguyen BT, Beiting DP, Carvalho LP, Glennie ND, Passos S, Carvalho EM, Scott P. Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. *J Infect Dis.* 2014 Apr 15;209(8):1288-96. doi: 10.1093/infdis/jiu013. Epub 2014 Jan 7. PMID: 24403561; PMCID: PMC3969552.

Novais FO, Carvalho LP, Graff JW, Beiting DP, Ruthel G, Roos DS, Betts MR, Goldschmidt MH, Wilson ME, de Oliveira CI, Scott P. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. *PLoS Pathog.* 2013;9(7):e1003504. doi: 10.1371/journal.ppat.1003504. Epub 2013 Jul 18. PMID: 23874205; PMCID: PMC3715507.

Novais FO, Carvalho AM, Clark ML, Carvalho LP, Beiting DP, Brodsky IE, Carvalho EM, Scott P. CD8+ T cell cytotoxicity mediates pathology in the skin by inflammasome activation and IL-1 β production. *PLoS Pathog.* 2017 Feb 13;13(2):e1006196. doi: 10.1371/journal.ppat.1006196. PMID: 28192528; PMCID: PMC5325592.

Oliveira WN, Ribeiro LE, Schrieffer A, Machado P, Carvalho EM, Bacellar O. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine.* 2014 Apr;66(2):127-32. doi: 10.1016/j.cyto.2013.12.016. Epub 2014 Jan 30. PMID: 24485388; PMCID: PMC4047562.

Oliveira WN, Dórea AS, Carneiro PP, Nascimento MT, Carvalho LP, Machado PRL, Schrieffer A, Bacellar O, Carvalho EM. The Influence of Infection by Different *Leishmania (Viannia) braziliensis* Isolates on the Pathogenesis of Disseminated Leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Sep 10;11:740278. doi: 10.3389/fcimb.2021.740278. PMID: 34568099; PMCID: PMC8462778.

Ottonello L, Morone MP, Dapino P, Dallegri F. Cyclic AMP-elevating agents down-regulate the oxidative burst induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in adherent neutrophils. *Clin Exp Immunol.* 1995 Sep;101(3):502-6. doi: 10.1111/j.1365-2249.1995.tb03141.x. PMID: 7664497; PMCID: PMC1553242.

Saha A, Biswas A, Srivastav S, Mukherjee M, Das PK, Ukil A. Prostaglandin E2 negatively regulates the production of inflammatory cytokines/chemokines and IL-17 in visceral leishmaniasis. *J Immunol.* 2014 Sep 1;193(5):2330-9. doi: 10.4049/jimmunol.1400399. Epub 2014 Jul 21. PMID: 25049356.

Palaga T, Buranaruk C, Rengpipat S, Fauq AH, Golde TE, Kaufmann SH, Osborne BA. Notch signaling is activated by TLR stimulation and regulates macrophage functions. *Eur J Immunol.* 2008 Jan;38(1):174-83. doi: 10.1002/eji.200636999. PMID: 18085664.

Passos S, Carvalho LP, Costa RS, Campos TM, Novais FO, Magalhães A, Machado PR, Beiting D, Mosser D, Carvalho EM, Scott P. Intermediate monocytes contribute to pathologic immune response in *Leishmania braziliensis* infections. *J Infect Dis.* 2015 Jan 15;211(2):274-82. doi: 10.1093/infdis/jiu439. Epub 2014 Aug 19. PMID: 25139016; PMCID: PMC4334833.

Petit A, Bihel F, Alvès da Costa C, Pourquoié O, Checler F, Kraus JL. New protease inhibitors prevent gamma-secretase-mediated production of Abeta40/42 without affecting Notch cleavage. *Nat Cell Biol.* 2001 May;3(5):507-11. doi: 10.1038/35074581. PMID: 11331880.

Polari LP, Carneiro PP, Macedo M, Machado PRL, Scott P, Carvalho EM, Bacellar O. Leishmania braziliensis Infection Enhances Toll-Like Receptors 2 and 4 Expression and Triggers TNF- α and IL-10 Production in Human Cutaneous Leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019 May 2;9:120. doi: 10.3389/fcimb.2019.00120. PMID: 31119102; PMCID: PMC6507514.

Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin JC, Barrett MP, López-Vélez R, García-Hernández R, Pountain AW, Mwenechanya R, Papadopoulou B. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017 Dec 14;11(12):e0006052. doi: 10.1371/journal.pntd.0006052. PMID: 29240765; PMCID: PMC5730103.

Porcheray F, Viaud S, Rimaniol AC, Léone C, Samah B, Dereuddre-Bosquet N, Dormont D, Gras G. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol.* 2005 Dec;142(3):481-9. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02934.x. PMID: 16297160; PMCID: PMC1809537.

Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 1998 Jan;31(1):143-8. doi: 10.1590/s0100-879x1998000100020. PMID: 9686192.

Ricote M, Glass CK. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Aug;1771(8):926-35. doi: 10.1016/j.bbali.2007.02.013. Epub 2007 Mar 12. PMID: 17433773; PMCID: PMC1986735.

Robey E, Chang D, Itano A, Cado D, Alexander H, Lans D, Weinmaster G, Salmon P. An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages. *Cell.* 1996 Nov 1;87(3):483-92. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81368-9. PMID: 8898201.

Rodrigues KM, Oliveira MP, Maretti-Mira AC, Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Silva L, Soares DA, Dolci EL, Perico RA, Pirmez C. Influence of the Notch system in the therapeutic response of American tegumentary leishmaniasis. *Br J Dermatol.* 2011 Jun;164(6):1228-34. doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10240.x. Epub 2011 May 17. PMID: 21299543.

Rojewska A, Karewicz A, Karnas K, Wolski K, Zając M, Kamiński K, Szczubiałka K, Zapotoczny S, Nowakowska M. Pioglitazone-Loaded Nanostructured Hybrid Material for Skin Ulcer Treatment. *Materials (Basel).* 2020 Apr 28;13(9):2050. doi: 10.3390/ma13092050. PMID: 32353948; PMCID: PMC7254360.

Saldanha MG, Queiroz A, Machado PRL, de Carvalho LP, Scott P, de Carvalho Filho EM, Arruda S. Characterization of the Histopathologic Features in Patients in the Early and Late Phases of Cutaneous Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.*

2017 Mar;96(3):645-652. doi: 10.4269/ajtmh.16-0539. Epub 2017 Apr 6. PMID: 28115669; PMCID: PMC5361539.

Santos Cda S, Boaventura V, Ribeiro Cardoso C, Tavares N, Lordelo MJ, Noronha A, Costa J, Borges VM, de Oliveira CI, Van Weyenbergh J, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn CI. CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFN γ (+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol.* 2013 Jun;133(6):1533-40. doi: 10.1038/jid.2013.4. Epub 2013 Jan 15. Erratum in: *J Invest Dermatol.* 2014 Nov;134(11):2850. PMID: 23321919; PMCID: PMC3667352.

Santos D, Campos TM, Saldanha M, Oliveira SC, Nascimento M, Zamboni DS, Machado PR, Arruda S, Scott P, Carvalho EM, Carvalho LP. IL-1 β Production by Intermediate Monocytes Is Associated with Immunopathology in Cutaneous Leishmaniasis. *J Invest Dermatol.* 2018 May;138(5):1107-1115. doi: 10.1016/j.jid.2017.11.029. Epub 2017 Dec 12. PMID: 29246797; PMCID: PMC5912958.

Sapudom J, Karaman S, Mohamed WKE, Garcia-Sabaté A, Quartey BC, Teo JCM. 3D in vitro M2 macrophage model to mimic modulation of tissue repair. *NPJ Regen Med.* 2021 Nov 30;6(1):83. doi: 10.1038/s41536-021-00193-5. PMID: 34848722; PMCID: PMC8633361.

Serezani CH, Chung J, Ballinger MN, Moore BB, Aronoff DM, Peters-Golden M. Prostaglandin E2 suppresses bacterial killing in alveolar macrophages by inhibiting NADPH oxidase. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007 Nov;37(5):562-70. doi: 10.1165/rcmb.2007-0153OC. Epub 2007 Jun 21. PMID: 17585108; PMCID: PMC2048683.

Sheppe AEF, Kummari E, Walker A, Richards A, Hui WW, Lee JH, Mangum L, Borazjani A, Ross MK, Edelmann MJ. PGE2 Augments Inflammasome Activation and M1 Polarization in Macrophages Infected With *Salmonella* Typhimurium and *Yersinia enterocolitica*. *Front Microbiol.* 2018 Oct 31;9:2447. doi: 10.3389/fmicb.2018.02447. PMID: 30429830; PMCID: PMC6220063.

Silva-Abreu M, Espinoza LC, Rodríguez-Lagunas MJ, Fábrega MJ, Espina M, García ML, Calpena AC. Human Skin Permeation Studies with PPAR γ Agonist to Improve Its Permeability and Efficacy in Inflammatory Processes. *Int J Mol Sci.* 2017 Nov 28;18(12):2548. doi: 10.3390/ijms18122548. PMID: 29182532; PMCID: PMC5751151.

Singh G, Can AS, Correa R. Pioglitazone. 2023 Jul 4. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. PMID: 31335007.

Singh S, Bhansali A. Randomized placebo control study of insulin sensitizers (Metformin and Pioglitazone) in psoriasis patients with metabolic syndrome (Topical Treatment Cohort). *BMC Dermatol.* 2016 Aug 17;16(1):12. doi: 10.1186/s12895-016-0049-y. PMID: 27531132; PMCID: PMC4987981.

Song LL, Peng Y, Yun J, Rizzo P, Chaturvedi V, Weijzen S, Kast WM, Stone PJ, Santos L, Loreda A, Lendahl U, Sonenshein G, Osborne B, Qin JZ, Pannuti A, Nickoloff BJ, Miele L. Notch-1 associates with IKK α and regulates IKK activity in cervical cancer cells. *Oncogene*. 2008 Oct 2;27(44):5833-44. doi: 10.1038/onc.2008.190. Epub 2008 Jun 16. PMID: 18560356.

Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem*. 2007 Apr 20;282(16):11613-7. doi: 10.1074/jbc.R600038200. Epub 2007 Feb 28. PMID: 17329241.

Sulahian TH, Högger P, Wahner AE, Wardwell K, Goulding NJ, Sorg C, Droste A, Stehling M, Wallace PK, Morganelli PM, Guyre PM. Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. *Cytokine*. 2000 Sep;12(9):1312-21. doi: 10.1006/cyto.2000.0720. PMID: 10975989.

Tanigaki K, Tsuji M, Yamamoto N, Han H, Tsukada J, Inoue H, Kubo M, Honjo T. Regulation of alphabeta/gammadelta T cell lineage commitment and peripheral T cell responses by Notch/RBP-J signaling. *Immunity*. 2004 May;20(5):611-22. doi: 10.1016/s1074-7613(04)00109-8. PMID: 15142529.

Tavares N, Afonso L, Suarez M, Ampuero M, Prates DB, Araújo-Santos T, Barral-Netto M, DosReis GA, Borges VM, Brodskyn C. Degranulating Neutrophils Promote Leukotriene B4 Production by Infected Macrophages To Kill *Leishmania amazonensis* Parasites. *J Immunol*. 2016 Feb 15;196(4):1865-73. doi: 10.4049/jimmunol.1502224. Epub 2016 Jan 22. PMID: 26800873.

Toyn JH, Ahlijanian MK. Interpreting Alzheimer's disease clinical trials in light of the effects on amyloid- β . *Alzheimers Res Ther*. 2014 Mar 12;6(2):14. doi: 10.1186/alzrt244. PMID: 25031632; PMCID: PMC4014014.

Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD Jr, Carvalho EM. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis*. 2002 Dec 15;186(12):1829-34. doi: 10.1086/345772. Epub 2002 Nov 19. PMID: 12447770.

Unger A, O'Neal S, Machado PR, Guimarães LH, Morgan DJ, Schriefer A, Bacellar O, Glesby MJ, Carvalho EM. Association of treatment of American cutaneous leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2009 Apr;80(4):574-9. PMID: 19346378; PMCID: PMC3557504.

Wang L, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Blunder M, Liu X, Malainer C, Blazevic T, Schwaiger S, Rollinger JM, Heiss EH, Schuster D, Kopp B, Bauer R, Stuppner H, Dirsch VM, Atanasov AG. Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): a review. *Biochem Pharmacol*. 2014 Nov 1;92(1):73-89. doi: 10.1016/j.bcp.2014.07.018. Epub 2014 Jul 30. PMID: 25083916; PMCID: PMC4212005.

Washburn T, Schweighoffer E, Gridley T, Chang D, Fowlkes BJ, Cado D, Robey E. Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision. *Cell*. 1997 Mar 21;88(6):833-43. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81929-7. PMID: 9118226.

Weijzen S, Velders MP, Elmishad AG, Bacon PE, Panella JR, Nickoloff BJ, Miele L, Kast WM. The Notch ligand Jagged-1 is able to induce maturation of monocyte-derived human dendritic cells. *J Immunol*. 2002 Oct 15;169(8):4273-8. doi: 10.4049/jimmunol.169.8.4273. PMID: 12370358.

Xu W, Roos A, Schlagwein N, Woltman AM, Daha MR, van Kooten C. IL-10-producing macrophages preferentially clear early apoptotic cells. *Blood*. 2006 Jun 15;107(12):4930-7. doi: 10.1182/blood-2005-10-4144. Epub 2006 Feb 23. PMID: 16497970.

Xu B, Xing A, Li S. The forgotten type 2 diabetes mellitus medicine: rosiglitazone. *Diabetol Int*. 2021 Jun 29;13(1):49-65. doi: 10.1007/s13340-021-00519-0. PMID: 35059243; PMCID: PMC8733070.



Zhu W, Yan H, Li S, Nie W, Fan F, Zhu J. PPAR- γ agonist pioglitazone regulates dendritic cells immunogenicity mediated by DC-SIGN via the MAPK and NF- κ B pathways. *Int Immunopharmacol*. 2016 Dec;41:24-34. doi: 10.1016/j.intimp.2016.09.028. Epub 2016 Oct 25. PMID: 27792919.

Zoccal KF, Sorgi CA, Hori JI, Paula-Silva FW, Arantes EC, Serezani CH, Zamboni DS, Faccioli LH. Opposing roles of LTB4 and PGE2 in regulating the inflammasome-dependent scorpion venom-induced mortality. *Nat Commun*. 2016 Feb 23;7:10760. doi: 10.1038/ncomms10760. PMID: 26907476; PMCID: PMC4766425.

Franca et al., The Leishmania antigen-specific pro-inflammatory response in cutaneous leishmaniasis is linked to disease progression but not to the therapeutic failure of pentavalent antimonials. *Microbes and infection* vol. 23,9-10 (2021): 104866. doi:10.1016/j.micinf.2021.104866

XII.ANEXO

ANEXO 1. Normatização de teses PPgCS

	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA - FMB Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde Largo do Terreiro de Jesus – Pelourinho Tel.: (71) 3283-5582 FAX: (71) 3283-5567 www.possaude.ufba.br E-mail: pos.saude@ufba.br</p>	
---	---	---

NORMATIZAÇÃO PARA APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÕES E TESES¹

Salvador (Bahia), Abril de 2010
(1ª versão)

¹ Baseada na 7ª revisão, de Abril de 2005, preparada pelo Prof. José Tavares-Neto para o Programa de Pós-graduação em Medicina e Saúde (PPgMS), da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, revisada pela Profa. Cristiana Nascimento de Carvalho em Abril de 2010, aprovada pelo Colegiado em 16 de abril de 2010.

INTRODUÇÃO

Este roteiro tem o objetivo de orientar o pós-graduando na elaboração da Dissertação e Tese, respectivamente, trabalho de conclusão do Curso de Mestrado e de Doutorado.

O Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPgCS) tem critérios próprios sobre número e características de artigos a serem apensos na Dissertação ou na Tese. Esses artigos, anexos a Dissertação ou Tese, devem ser publicados em periódicos com corpo editorial e com reconhecido grau de impacto científico, sendo o mínimo desse também estabelecido pelo Colegiado do PPgCS (vide Portaria 003/2010).

Os artigos, citados no parágrafo anterior, devem ter sido realizados durante o período de matrícula no PPgCS (mestrado ou doutorado), atendendo os objetivos dos respectivos Projetos de Dissertação ou Tese, não **sendo considerados** trabalhos publicados ou aceitos para publicação em períodos anteriores ou mesmo durante outros cursos de Pós-graduação, inclusive *stricto sensu*. Para o curso de Doutorado, deverá ser o doutorando necessariamente primeiro autor de um dos artigos (vide Portaria 003/2010).

A defesa deve consistir em apresentação oral com duração de até 30 (trinta) minutos (mínimo 20 minutos), seguida de argüição, em que cada membro da banca pode agüir por até 10 (dez) minutos, tendo o candidato direito a 20 (minutos) para responder a cada examinador.

É sempre recomendável consultar, formalmente, a Coordenação do PPgCS em caso de alguma dúvida sobre o formato final do trabalho de conclusão.

Lembretes:

1. preferencialmente, pelo menos até antes da impressão final, escreva a minuta do trabalho de conclusão com espaço duplo e fonte de tamanho 12 ou 14, utilizando papel reciclável. O espaço duplo facilita as correções do seu Professor-orientador ou dos membros da Comissão Examinadora;
2. verifique a exequibilidade, com seu Professor-orientador, de solicitar pedido de auxílio à pesquisa a Fundação de Amparo a Pesquisa da Bahia (FAPESB), ao CNPq e/ou outras agências de fomento.

I. CAPA

USO OBRIGATÓRIO: DISSERTAÇÃO, TESE.

Exemplo (página seguinte)

A capa de Dissertação ou Tese deve ser em papel couchê branco, letras de cor preta e com as seguintes **dimensões**: (a) 21,1 cm de largura e 29,8 cm de comprimento (dimensões da folha A4).

Na capa de Trabalho de Conclusão (Dissertação ou Tese), devem constar as seguintes informações (*vide* exemplo):

- ✓ Instituições e brasões heráldicos da UFBA e da FMB;
- ✓ Título: deve ser conciso e capaz de conduzir o leitor a prever o objetivo principal do estudo;
- ✓ Nome do Pós-graduando (como prefere ser citado?) No exemplo, o **nome completo** é Manoel Eugênio de Oliveira Köetzel Neto, mas o autor preferiu o registro de somente **Manoel Köetzel Neto**, como usado mais modernamente;
- ✓ Assinalar se Dissertação de Mestrado ou Tese de Doutorado;
- ✓ (rodapé): Salvador (Bahia), ANO.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE



ESTUDO CASO-CONTROLE ...

Manoel Köetzel Neto

Dissertação de Mestrado

Salvador (Bahia), 2005

CURIOSIDADES



O Brasão de Armas da Universidade Federal da Bahia¹ foi criado em 1956, pelo Frei Beneditino Paulo Lachenmayer com o lema *Virtute spiritus* (pela força da mente), com os seguintes elementos: escudo com dois ramos de três folhas de oliveira (atributo de Minerva, representando a paz e a vitória) e insígnas por três tochas, dispostas em pala acesas ao natural, representando a essência alimentadora da luz.



A arma heráldica da Faculdade de Medicina da Bahia tem “escudo esquartelado: I e IV de azul, fendido de prata com corte de dois ramos de oliveira; II e III, de verde, um esculápio serpentífero, de ouro. Lema: *Sanare atque servare*. Comentário: os quartéis fendidos aludem à Universidade, a qual se incorporou como a mais antiga Faculdade do Brasil - prerrogativa indicada na data de sua fundação; o esculápio é o símbolo universal da Medicina - que esta Casa ensina, consoante os propósitos expressos no seu lema”. V. Hugo C. Lopes – esse brasão foi ofertado a FMB em 1962, pela Turma de 1937 por ocasião do 25º ano da Formatura.

(1) FONTE: Boaventura EM. Pela força da mente. O brasão de armas da Universidade Federal da Bahia. *Universitas* 40: 19-27, 1991.

II. LOMBADA (ou Dorso)

USO OBRIGATÓRIO: DISSERTAÇÃO e TESE

A lombada ou dorso da capa deve conter as seguintes informações: Nome do Pós-graduando, título do trabalho e ano. **Exemplo:**

Manoel Köetzel Neto. ESTUDO CASO-CONTROLE..., 2005.

III. FICHA CATALOGRÁFICA

USO OBRIGATÓRIO: Dissertação, Tese

LOCALIZAÇÃO: contra-capas (verso da capa). Elementos da Ficha (a ficha deve ser colocada dentro de um quadro, preferencialmente na parte inferior da página, como no exemplo abaixo). **RECOMENDAÇÃO:** consulte o Bibliotecário do HUPES/UFBA, FMB ou Biblioteca Central da UFBA.

1ª linha: Número de Cutter/*(Último sobrenome, Nome do autor)

2ª linha e seguintes:(Título do trabalho)/(Nome completo do Autor. -(Cidade): (Letras iniciais do nome, último sobrenome), (ano).

Em outra linha: (número de páginas iniciais numeradas com algarismos romanos**), (número de páginas numeradas com algarismos arábicos, seguido de p.) (ESPAÇO) il. (se o trabalho tem ilustrações, fotos, ou desenhos).

Na linha seguinte: Dissertação (ou Tese) (Mestrado em Ciências da Saúde, área de concentração em ... (ou Doutorado em Ciências da Saúde, área de concentração em ...), Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.

Na linha seguinte: Palavras-chaves: (até quatro). 1. ...; 2. ...; 3. ...; 4. ...; 5. Título (não registre o título do trabalho).

Na linha seguinte (recuado para a direita): CDU: (***)

(*) N° de Cutter/*: seguido de dois espaços; (**) Exemplo: vii, 187p. il. (significado: sete páginas iniciais numeradas com algarismos romanos seguidas de 187 páginas em algarismos arábicos e o trabalho tem ilustrações); (***) CDU (números da Classificação Decimal Universal).

T231 Tavares-Neto, José

Marcadores sorológicos das hepatites B e C em residentes de área endêmica da esquistossomose mansônica/José Tavares-Neto – Salvador: J.

Tavares-Neto, 1997.

Viii, 264p.: il.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório do Concurso de Livre-Docência em Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Esquistossomose mansônica; 2. Hepatite B; 3. Hepatite C; 4. *Schistosoma mansoni*. I. Título.

CDU: 616.995.122

616.36-002

IV. PRIMEIRA PÁGINA

USO OBRIGATÓRIO: Dissertação, Tese.

Numeração da página: algarismo romano (iii ou III, sendo Dissertação ou Tese, considerando que a CAPA corresponde à página i ou I* e a FICHA CATALOGRÁFICA ocupe a página ii ou II ou, como mais próprio, o verso da capa [página i]).

(* na capa não deve constar o número (i ou I)

Exemplo: *vide* elementos na página seguinte.

ATENÇÃO: o nome do Pós-graduando deve ser assinalado do mesmo modo nos itens I, II, III e IV.

V. COMISSÃO EXAMINADORA

USO OBRIGATÓRIO: Dissertação, Tese

NUMERAÇÃO: algarismo romano

Nome dos Membros titulares e suplentes

Exemplo:

COMISSAO EXAMINADORA

Membros Titulares: (três para Mestrado e cinco para Doutorado)

. Rafael Tuma (Presidente), Professor titular de Cardiologia da Faculdade de Medicina da Universidade

. Antônio Garrafa (Professor-orientador), Professor adjunto-doutor, Livre Docente de Bioquímica da Faculdade de Farmácia ...

Membros Suplentes: (o Professor-orientador, se Dissertação; ou dois suplentes, sendo um deles o Professor-orientador, no caso de Tese)

. Carlos Peixoto, Professor adjunto-doutor da Faculdade de Biologia ...



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE



(TÍTULO DO TRABALHO)

(NOME DO PÓS-GRADUANDO)

Professor-orientador: NOME (sem citar:
titulação, ocupação, Prof. ou Dr., etc.).

Dissertação (ou **Tese**) apresentada ao Colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do grau de Mestre (ou **Doutor**) em Ciências da Saúde, da área de concentração em ...

Salvador (Bahia), ano.

VI. PÁGINA DO FRONTISPÍCIO

USO OPCIONAL: Dissertação, Tese

Numeração: algarismo romano

Usada para fazer alguma citação de Autor conhecido ou frase de domínio público.
EXEMPLO:

Cada um tem sua raridade: selo, flor, dente de elefante. Uns têm até felicidade! Eu tenho...
(extraído do poema "Retrato Falante", de **Cecília Meireles**, 1961)

VII. DEDICATÓRIA

USO OPCIONAL: Dissertação, Tese

NUMERAÇÃO: algarismo romano

Preferencialmente, no canto inferior direito da página e recuado para a esquerda.

VIII. EQUIPE (ver item XI)

USO RECOMENDÁVEL: Na Dissertação ou Tese a equipe é citada em Agradecimentos (vide adiante), com citação do nome por extenso de cada membro.

Exemplo:

- Soraia de Araújo e Silva, Mestre e Doutora do Instituto de ...
- Albano Luiz de Sattler, Estudante de Medicina (matrícula 090811996), do PET-Medicina

Observação: a participação de alunos de Curso de Graduação e/ou de Técnicos sem título de Mestre é considerada como aspecto positivo do trabalho de conclusão (Dissertação ou Tese).

IX. INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES (ver item XI)

USO RECOMENDÁVEL: Na Dissertação ou Tese as Instituições são citadas em Agradecimentos (vide adiante).

Exemplo:

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

- Faculdade de Medicina da Bahia
- Escola de Agronomia
- Instituto de Saúde Coletiva

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

X. FONTES DE FINANCIAMENTO

USO RECOMENDÁVEL: Dissertação, Tese.

NUMERAÇÃO: algarismo romano

Exemplo:

Fontes de Financiamento:

1. Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB);
2. Projeto CNPq No.... /2001;
3. Bolsa de Estudo da CAPES

XI. AGRADECIMENTOS

USO RECOMENDÁVEL: Dissertação, Tese

NUMERAÇÃO: algarismo romano

ATENÇÃO: em trabalho científico, os agradecimentos devem ser restritos aos colaboradores (diretos ou indiretos) e as instituições, mas de modo sóbrio. **Evite** citar Colaboradores referindo-os pelo **apelido ou somente pelo prenome**. Deus, Orixás, Santos, e Familiares, se agradecidos, cabem em Dedicatória.

XII. ÍNDICE OU SUMÁRIO

USO OBRIGATÓRIO: Dissertação, Tese.

NUMERAÇÃO: algarismos **arábicos** (este é o primeiro capítulo onde a página é numerada com algarismo arábico, como **todos** os capítulos seguintes).

O número da página deve ser citado à direita de cada item ou tópico, exemplo:

ÍNDICE

Índice de tabelas	5
Índice de gráficos	7
Índice de figuras	8
I. Resumo	9
II. Introdução	10
III. Revisão da Literatura	12
III.1. O vírus da hepatite B (VHB)	14
III.1.1. Distribuição dos genótipos	18
III.2. Epidemiologia	22
...	
IV. Metodologia do Estudo	56
V. Artigo 1	72
...	
XII. Anexos	184

XIII. ÍNDICES (tabelas, gráficos, figuras, quadros e siglas)

USO OBRIGATÓRIO: Dissertação, Tese, quando houver **cinco** (5) ou mais elementos a serem citados. O índice também pode ser conjunto, separando-os por grupos, quando não houver muitos (mais de 10) elementos a serem citados.

O número da página deve ser registrado à direita. Após número da tabela, gráfico ou figura colocar ponto (.). **Exemplo de modelo conjunto:**

ÍNDICE DE FIGURA, GRÁFICO E TABELAS

FIGURA

FIGURA I. Curva de sobrevida em casos de leptospirose ... em ... 45

GRÁFICO

GRÁFICO I. Proporção dos pacientes	89
---	----

TABELAS

TABELA I. Indicadores de Desenvolvimento Humano (IDH) no Estado da Bahia	20
TABELA II. Casos de leptospirose atendidos no Hospital Couto Maia, de 1990 a 1999	51
TABELA 1. Distribuição dos pacientes por forma clínica	67

ATENÇÃO:

1. Utilize com cautela siglas em títulos de Tabelas, Figuras e Quadros e somente quando for estritamente necessário e sempre citando no rodapé qual o significado daquela sigla. No texto, adote a sistemática de antes da primeira citação de alguma sigla fazer referência ao nome completo (por extenso);
2. Os elementos gráficos (tabela, quadro, histograma, etc.) devem ser auto-explicativos e, portanto, o entendimento deve dispensar a leitura do texto;
3. Esses elementos gráficos seguem a seguinte regra da Estatística Descritiva: tabela ou quadro dispensa gráfico, mas o inverso nem sempre é verdadeiro, especialmente se o gráfico não dispõe dos números observados;
4. Ao utilizar o **índice** de siglas ou abreviaturas, não inclua símbolos, siglas ou abreviaturas de domínio internacional (cm, dl, H₂O, etc.);
5. Figuras, Gráficos, Quadros, Tabelas, etc., citados na Introdução e Revisão da Literatura **devem ser numerados com algarismos romanos, ao contrário dos referidos em Resultados**. (do Artigo ou do capítulo “Resultados gerais”);
6. Se houver mais de um artigo no trabalho de conclusão, e sendo a numeração seqüencial em cada um deles, haverá, por exemplo, duas tabelas com número 1. Nesse caso, no índice das tabelas fazer a distinção do seguinte modo:

Artigo 1

TABELA 1. Peso e altura nas crianças examinadas de Cavunge (Ipecaetá, Bahia)	67
--	----

Artigo 2

TABELA 1. Crianças portadoras de AgHBs em Cavunge (Bahia)	104
---	-----

7. Também, se houver o capítulo “Resultados Gerais” com citação de tabelas numeradas em algarismo arábico fazer distinção semelhante à descrita acima.

XIV. RESUMO

USO OBRIGATÓRIO: Dissertação, Tese.

NÚMERO DE PÁGINAS: uma (1) página, preferencialmente com até 350 palavras ou 2.400 caracteres. Para isto é recomendável não utilizar parágrafos, destacando os itens em negrito ou sublinhado (v. abaixo) e alinhando as margens direita e esquerda. Lembre-se, no entanto, que alguns bancos de dados somente aceitam resumos (Tese ou Dissertação) com até 250 palavras.

Exemplo:

(Título do trabalho, com todas as letras MAIÚSCULAS). (Breve período introdutório). (Objetivo: assinale a pergunta principal). (Desenho do estudo). (Material e Métodos). (Resultados: cite os mais relevantes, em resposta à pergunta principal). (Conclusões principais).

Palavras-chaves: (as mesmas da ficha catalográfica e do “summary” ou “abstract”, e observando a mesma ordem); este elemento inicia-se na linha seguinte a do parágrafo final das conclusões. Todas as palavras-chaves devem ser numeradas, separando-as por ponto e vírgula (;). Exemplo: 1. ... ; 2. ... ; 3. ... ; 4. ... ; 5.

ATENÇÃO: as palavras-chaves NÃO são do autor, mas extraídas daquelas registradas do DeCS que é o vocabulário estruturado e trilingue, criado pela Biblioteca Regional de Medicina (BIREME, Organização Pan-Americana de Saúde): <http://decs.bvs.br>.

XV. OBJETIVOS

USO OBRIGATÓRIO: Dissertação, Tese.

Cada objetivo deve ser descrito em uma ou duas sentenças; recomenda-se destacar o objetivo principal do(s) secundário(s), os quais devem ser numerados com algarismos arábicos.

Exemplo:

PRINCIPAL (ou GERAL)

Verificar a participação dos suínos na cadeia epidemiológica da hidatidose pelo *Echinococcus vogeli*.

SECUNDÁRIOS

1. Descrever os achados histopatológicos dos cistos observados nos fígados de suínos;
2. Comparar os achados em suínos dos observados nas pacas (*Cunnilus paca*) abatidas nas áreas de floresta do município de Sena Madureira (Acre);

Observação: todos os objetivos começam com verbo no infinitivo.

XVI. INTRODUÇÃO

USO OBRIGATÓRIO: Dissertação, Tese

A introdução deve ser breve e geral, buscando focar o problema a ser estudado e permitindo ao leitor ter conhecimento exato do mesmo, sem a necessidade de recorrer ao item seguinte (REVISÃO DA LITERATURA, quando obrigatória: Dissertação).

Quando Tese, se não houver o capítulo “Revisão da Literatura”, esse item pode ter conteúdo mais aprofundado, oferecendo ao leitor a exata compreensão do problema a ser estudado. No caso de Tese, pode também ser apresentada em itens (sub-capítulos) ou não. Vale ressaltar, quando Dissertação esse capítulo deve ser breve (até 2 páginas) e não cabe item ou sub-capítulo.

OBSERVAÇÕES:

1. quando referir o nome de qualquer espécie, a citação deve ser em **negrito**, em **itálico** (preferencial) ou **sublinhada**. Por exemplo: **Schistosoma mansoni** ou *Schistosoma mansoni* ou Schistosoma mansoni. Porém, optando por uma das formas, a mesma deve ser citada assim em todo o texto, inclusive nas outras partes do trabalho;
2. após a primeira citação o gênero da espécie deve ser abreviado: **S. mansoni** ou *S. mansoni* ou S. mansoni;
3. caso somente o gênero for citado incluir a sigla sp. (ponto após sp. e sem **negrito** **itálico** ou **sublinhado**). Por exemplo: **Schistosoma** sp. ou *Schistosoma* sp. ou Schistosoma sp.
4. neste capítulo, como nos demais, justifique às margens direita e esquerda e inicie cada parágrafo recuando a primeira linha entre 1,2 a 1,5 – na versão final utilize espaçamento de 1,5, mas na fase de minuta o espaço duplo é mais recomendado porque facilita o trabalho dos revisores (membros da Comissão Examinadora). Exemplos:

Recomendado:

O seu trabalho de conclusão do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE (PPgCS) da Faculdade de Medicina da Bahia da UFBA deve ser publicado, o mais breve possível. Do contrário, terá uma circulação restrita ou de conhecimento só seu ..., será que dessa forma valeu o seu esforço ou do Professor-orientador?

Não-recomendados:

- a) sem recuar para a direita e não-alinhado a direita

O seu trabalho de conclusão do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE (PPgCS) da Faculdade de Medicina da Bahia da UFBA deve ser publicado, o mais breve possível. Do contrário, terá uma circulação restrita ou de conhecimento só seu ..., será que dessa forma valeu o seu esforço ou do Professor-orientador?

b) recuado para a direita e não-alinhado a direita

O seu trabalho de conclusão do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE (PPgCS) da Faculdade de Medicina da Bahia da UFBA deve ser publicado, o mais breve possível. Do contrário, terá uma circulação restrita ou de conhecimento só seu ..., será que dessa forma valeu o seu esforço ou do Professor-orientador?

c) não-recuado para a direita e alinhado

O seu trabalho de conclusão do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE (PPgCS) da Faculdade de Medicina da Bahia da UFBA deve ser publicado, o mais breve possível. Do contrário, terá uma circulação restrita ou de conhecimento só seu ..., será que dessa forma valeu o seu esforço ou do Professor-orientador?

XVII. REVISÃO DA LITERATURA

USO OBRIGATÓRIO: Dissertação, Tese (opcional)

O tema da Dissertação deve ser explorado com erudição, demonstrando domínio da literatura pertinente, visão crítica dos dados publicados e observando as lacunas existentes na literatura, especialmente quando associadas ao(s) objetivo(s) do trabalho. Vale ressaltar, **o objetivo do estudo é o guia da revisão.**

Os estudos desenvolvidos na região devem ser revistos e os dados citados com destaque. Isso também se aplica à Introdução, quando o modelo do trabalho de conclusão não incluir o capítulo “Revisão da literatura”.

Para facilitar a compreensão dos dados citados por outros Autores pode se utilizar de tabelas, gráficos ou figuras - neste caso, numerá-los com algarismos **romanos** (maiúsculos) para distinguir dos apresentados no capítulo **Resultados** (de artigos ou Resultados gerais, se couber).

Caso use tabelas, gráficos ou figuras, citar no rodapé a fonte [exemplo: FONTE: Rey et al. (1995) ou FONTE: adaptada de Rey et al. (1995) ou FONTE: referências 12, 26, 78, 184, 206.] ou, em algumas tabelas, citar no corpo ou rodapé o(s) autor(es) e ano da publicação. Em qualquer dos casos, essas referências devem também ser citadas em “Referências Bibliográficas”.

XVIII. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

USO OBRIGATÓRIO: Na Dissertação ou Tese, esse capítulo é parte obrigatória de cada artigo, mas não desobriga o pós-graduando de incluir o capítulo Metodologia do Estudo quando a produção incluir apenas 1 (um artigo). Caso a produção inclua 2 (dois) ou mais artigos, a apresentação desse capítulo passa a ser opcional, aceitando-se a apresentação da Metodologia exclusivamente nos artigos apensado.

Quando o estudo envolver *anima nobili* utilizar: CASUÍSTICA, MATERIAL e MÉTODOS, do contrário (espécimes do *anima nobili*, animais ou outros objetos de estudo), utilizar: MATERIAL e MÉTODOS.

Casuística: quem você vai estudar?

Material: quais os recursos vai utilizar?

Método: como vai estudar?

ESPECIFICAR COM DESTAQUE:

1. População de referência;
2. Características da população de estudo (ou população-alvo);
3. Desenho do estudo;
4. Critérios de inclusão e exclusão;
5. Quando se aplicar: definição de caso e de controle (se estudo do tipo caso-controle) ou definição do *par* (estudo com pareamento) ou do grupo de comparação;
6. Técnica de amostragem;
7. Classificar as variáveis a serem usadas no estudo, como:
 - a. variável (is) que define(m) o evento (a resposta). Em Bioestatística, a variável de evento é denominada variável-dependente;
 - b. principais variáveis de predição;
8. Quando se aplicar, definir possíveis variáveis de confusão ou de modificação de efeito;
9. Descrever como as variáveis foram operacionalizadas;
10. Técnicas e equipamentos utilizados. Descreva e detalhe, passo a passo, as técnicas (e os reagentes, por exemplo), de modo que o seu trabalho possa ser reproduzido por outro pesquisador;

11. Na descrição da análise estatística: procedimentos para análise descritiva; procedimentos estatísticos para avaliar a probabilidade (p) dos achados no caso da hipótese nula ser a verdadeira. Deve ser observado que o objetivo e as hipóteses não têm o mesmo significado - um estudo sempre tem um objetivo. No entanto, um estudo pode ser realizado sem que uma hipótese seja declarada *a priori*. Ao referir-se à estatística analítica, declare as hipóteses (H_0 ou nula e H_1 ou alternativa). No caso da H_1 , especificar se é monocausal ou bicausal. As hipóteses alternativas são, em geral, bicausais, quando monocausal deve ser acompanhada de justificativa.

Exemplo de como expressar as hipóteses:

- H_0 : A frequência da hipertensão arterial grave em brancos = A frequência da hipertensão arterial grave em negros.
- H_1 : A frequência da hipertensão arterial grave em brancos $<^*$ A frequência da hipertensão arterial grave em negros.

(*) conforme a hipótese poderia ser $>$ ou \neq , por exemplo.

12. Ao citar como foi feito o planejamento da análise estatística, apresentar:

- a) tamanho da amostra de acordo com as hipóteses. Para amostras com tamanho fixo, avalie o poder do estudo;
- b) erros tipo I (α) e II (β);
- c) possibilidade de perda de *follow-up* (seguimento);
- d) necessidade de controle para variáveis de confusão; e
- e) tamanho mínimo do efeito que o pesquisador deseja levar em consideração.

13. Quando se aplicar, referir-se ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (segundo a Resolução CONEP nº 196 de 1996; e anexar o modelo do Termo – *vide* modelo **Anexo 2**);

14. Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é diferente de Comissão de Ética de instituição de saúde, inclusive quanto à subordinação administrativa e/ou legal: o primeiro é a CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa) do Ministério da Saúde e a segunda (Comissão de Ética) ao Conselho Regional (de Medicina, Enfermagem, Farmácia, Nutrição, etc.). Essa última trata de conflitos de interesse deontológico ou avalia questões potencialmente geradoras de conflitos. O CEP avalia o Projeto de Pesquisa, segundo aspectos éticos e bioéticos. O Parecer de um CEP credenciado pela CONEP tem validade nacional.

15. Anexar a cópia do parecer do CEP (**como anexo**).

16. Outras informações ou Resoluções do CONEP consultar a “home page”: <http://conselho.saude.gov.br/comissao/conep>.

XIX. ARTIGO

USO OBRIGATÓRIO: Dissertação (pelo menos 1 [**um**] artigo submetido em revista pelo menos B2) e Tese (pelo menos 1 [**um**] artigo aceito para publicação em revista pelo menos B1 na classificação Qualis vigente em 2010) (vide Portaria 003/2010).

Na Introdução desse Roteiro, há a orientação geral sobre as especificidades em cada tipo de trabalho de conclusão (se Dissertação ou Tese).

Qualquer que seja a situação do artigo (sob a forma de publicação, aceito para publicação ou publicado), a primeira página de cada artigo deve ser precedida por outra página, constando os elementos assinalados na página seguinte: número do artigo, título, nome da Revista ou periódico, Normas de Publicação (+ anexo) e carta do Editor, acusando o recebimento do artigo para análise de “referee” do Conselho Editorial. Caso tenha sido aceito, basta assinalar: número do artigo, título, nome da revista e cópia da carta de aceitação (como anexo). Porém, caso já tenha sido publicado, assinalar: número do artigo, título, nome do periódico (espaço) número do volume: (dois pontos) página inicial-final, ano. Exemplo: *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 87: 34-41, 2003. Nesse último caso (artigo já publicado), anexar a Tese ou a Dissertação a cópia reprográfica do artigo como foi publicado na revista ou periódico.

Os artigos sob a forma de publicação (submetidos) devem observar, obrigatoriamente, as Normas de Publicação da Revista indicada. Nesses casos, quase sempre, os Editores exigem que Tabelas, Gráficos ou Figuras ocupem as últimas páginas do artigo (cada elemento em uma página), após o capítulo das Referências bibliográficas.

ARTIGO 1

“Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis*: clinical findings and diagnostic approach”. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical [submetido, *vide* Normas de Publicação no **ANEXO 4** e carta ao Editor, no **ANEXO 5**).

XXI. RESULTADOS GERAIS

USO OBRIGATÓRIO: Dissertação ou Tese.

Quando a produção incluir apenas 1 (um) artigo, a apresentação do capítulo Resultados Gerais é obrigatória. Caso a produção inclua 2 (dois) ou mais artigos, a apresentação dos Resultados pode ser restrita aos Resultados apresentados nos artigos apensados, sendo facultado ao pós-graduando o direito de apresentar os resultados também na forma de capítulo Resultados Gerais.

Esses resultados devem ser apresentados distribuindo-os em itens, começando pela caracterização geral da população de estudo, siga o seguinte roteiro na apresentação dos seus resultados: do geral para o particular, e destacando os resultados referentes às variáveis-respostas.

Na apresentação dos seus resultados seja objetivo, não dê margem a confusão.

a. as tabelas, gráficos, figuras ou quadros devem ser numerados, seqüencialmente, com **algarismos arábicos**;

b. em Resultados gerais, as tabelas, gráficos, quadros ou figuras devem aparecer na mesma página da primeira citação ou, quando não for possível, na página seguinte. Em caso de artigo submetido, como já referido, esses elementos devem ser citados um em cada página após o capítulo das referências bibliográficas;

c. em anexo do trabalho de conclusão podem ser colocados gráficos, tabelas, quadros ou figuras, de conteúdo geral ou que melhor ilustrem a metodologia, área de estudo, etc;

d. os dados não devem ser exclusivamente apresentados em gráficos ou figuras, porque não dispensam tabelas. O pós-graduando é tentado, com os atuais recursos da Informática, a utilizar gráficos em profusão e, desse modo, sem a tabela respectiva, o que dificulta a recuperação (com precisão) de muitas informações;

e. tabelas e quadros, principalmente, devem ter título e corpo de compreensão que independa do texto;

f. o sistema métrico decimal deve ser o adotado;

g. preferencialmente, no texto, quadros, tabelas, etc., utilize somente uma casa decimal (7,3%); use sempre o mesmo método para fazer as aproximações dos decimais. Seja preciso, evite fazer aproximações desnecessárias: encontrando o percentual de 7,3% não cite 7%. Deixe tais aproximações para o seu futuro leitor;

h. principalmente neste item, mas também nos demais, evite citar números utilizando-se de expressões como: cerca de 4% (quando o preciso é 4,4%), aproximadamente 10% (sendo correto: 8,6%), etc. **SEJA SEMPRE PRECISO.**

i. no sistema métrico-decimal, os decimais **não** devem ser separados por ponto (.) e **SIM** por vírgula (,) - exceto quando se escreve na língua inglesa (*vide* "Summary");

j. não faça comparação dos seus resultados com o de outros Autores (isto é na Discussão) ou os interprete (isto também é na Discussão);

k. caso utilize nota de rodapé: deve ser incluída na mesma página do texto, onde ocorreu a referência - use uma linha sólida (_____) entre o corpo do texto e o rodapé (preferencialmente com outro tipo de fonte e de tamanho menor);

l. utilize com propriedade os recursos do seu programa "redator de texto". O "Word", por exemplo, dispõe dos seguintes símbolos (v. ícone Inserir ⇒ Símbolo [selecionar tipo de fonte]): α (alfa), β (beta), χ^2 (qui-quadrado), \geq (maior ou igual), \pm (mais ou menos), \leq (menor ou igual), \cong (aproximadamente), entre outros;

m. quando utilizar escala intervalar, observe o exemplo abaixo e respectivos símbolos:

Exemplo: faixa etária (anos)

- 4 |—| 6 (inclui pessoas de 4 e 6 anos)
- 4 —| 6 (não inclui pessoas de 4 e inclui de 6 anos)
- 4 |— 6 (inclui pessoas de 4 e não inclui de 6 anos)
- 4 — 6 (não inclui pessoas de 4 nem de 6 anos)
- 4 ... 6 (os limites do intervalo não foram ou não puderam ser precisados)

n. é freqüente a confusão do que seja um quadro ou tabela, o primeiro tem linhas verticais "fechando" as laterais ao contrário da Tabela (é a apresentação mais exigida pelas revistas). Por exemplo (os números citados são fictícios):

QUADRO 4. Número de casos de leptospirose em 2003 e 2004, internados no Hospital Couto Maia (Salvador, Bahia), conforme o sexo dos pacientes.

ANO	NÚMERO DE CASOS, n (%)		
	Masculino	Feminino	TOTAL
2003	286 (93,2)	21 (6,8)	307 (100,0)
2004	212 (95,1)	11 (4,9)	223 (100,0)
TOTAL	498 (94,0)	32 (6,0)	530 (100,0)

TABELA 4. Número de casos de leptospirose em 2003 e 2004, internados no Hospital Couto Maia (Salvador, Bahia), conforme o sexo dos pacientes.

ANO	NÚMERO DE CASOS, n (%)		
	Masculino	Feminino	TOTAL
2003	286 (93,2)	21 (6,8)	307 (100,0)
2004	212 (95,1)	11 (4,9)	223 (100,0)
TOTAL	498 (94,0)	32 (6,0)	530 (100,0)

XXII. DISCUSSÃO

USO OBRIGATÓRIO: Dissertação e Tese, independente da discussão de cada artigo.

Não cometa o erro de apresentar novos resultados e tabelas nesse capítulo. Nesse item, o pesquisador oferece sua contribuição pessoal, com base nos resultados observados.

É a parte de síntese–interpretação. Siga um roteiro:

1. Qual a sua interpretação dos resultados?
2. Como os associa com os de outros Autores?
3. Qual a sua análise crítica, de cada resultado observado? Ressalte os aspectos relevantes, os possíveis erros do estudo (qual a sua sugestão para serem contornados em estudo futuro?), etc.
4. Como explica os seus resultados, associando-os ao conhecimento correlato?
5. Tem hipóteses a formular?
6. Tem propostas de estudos futuros? (neste caso, veja os itens seguintes aplicáveis para os trabalhos finais).

XXIII. PERSPECTIVAS DE ESTUDO

USO OBRIGATÓRIO: Dissertação

No final da Discussão o(a) Mestrando deverá, em capítulo a parte, citar as suas propostas de estudo, com base nos seus resultados ou inferências.

XXIV. PROPOSTAS DE ESTUDO

USO OBRIGATÓRIO: Tese

No final da Discussão o(a) Doutorando(a) deverá, em capítulo a parte, citar as suas propostas de estudo, com base nos seus resultados ou inferências e nos conhecimentos descritos na literatura. Ao mesmo tempo, deverá também assinalar e descrever quais os modelos de investigação científica recomendado, para cada proposta de estudo apresentada.

XXV. CONCLUSÕES

USO OBRIGATÓRIO: Dissertação, Tese

Cada conclusão deve ser numerada, com números arábicos. Cada conclusão deve ser baseada nos objetivos e resultados observados (mas sem necessidade de repeti-los), e expressa de forma objetiva. As especulações e hipóteses pertencem ao capítulo da Discussão.

Exemplo:

1. Em moradores da área endêmica de Catolândia – Bahia não ocorreu associação de infecções pelos vírus das hepatites B e C em casos de esquistossomose mansônica da forma hepatoplênica;
2. A infecção pelo vírus da hepatite B não apresentou associação com a ocorrência da ausência de regressão da forma hepatoplênica esquistossomose mansônica; e
3. ...

XXVI. SUMMARY

USO OBRIGATÓRIO: Dissertação, Tese

Observação: neste caso, ao contrário de quando escreve na língua portuguesa, assinale 70.3% (e **não** 70,3%) ou 10,000.03 (e não: 10.000,03).

(VER ELEMENTOS DO RESUMO: Title, Background, Objective, Design, Methods, Results, Conclusions, Key words)

XXVII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(*vide ANEXO*: Normas do PPgCS)

USO OBRIGATÓRIO: Dissertação, Tese.

O gerenciador eletrônico de referências (“Endnote”: <http://www.anacom.com.br>) poderá ser muito útil e evitar os freqüentes erros, até de falta de sistematização.

XXVIII. ANEXO(S)

USO RECOMENDÁVEL: Dissertação, Tese.

NUMERE CADA ANEXO

Exemplos:

- ANEXO 1. Modelo do questionário;
- ANEXO 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- ANEXO 3. Ofício do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUPES, aprovando a investigação; etc;

- ANEXO 4. Normas de publicação de revistas para as quais os artigos foram submetidos (Mestrado) ou aceitos para publicação (Doutorado);
- ANEXO 5. Carta do Editor acusando o recebimento do artigo (Mestrado) ou aceitação (Doutorado).

XXIX. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de todas as regras e normas, não se esqueça da originalidade e da criatividade. Entretanto, os itens acima ou fazem parte do método científico ou são exigências do Colegiado do PPgCS.

ANEXO-1

NORMAS DE REGISTRO DE REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

O registro das referências bibliográficas foram adaptadas pelo PPgCS das normas da ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT)¹, mas tendo também como fonte o estilo Vancouver do American National Standards Institute (ANSI), adaptado da Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos². No entanto, muitos periódicos (nacionais e internacionais) utilizam outras normas, que devem ser observadas quando da publicação do trabalho.

No texto, os membros da Comissão Examinadora devem observar o registro das referências segundo as determinações do PPgCS, e as do artigo conforme as Normas de Publicação de cada revista.

As referências valorizam o trabalho e são fontes de consulta para outros pesquisadores e, também no futuro, para você.

O termo Bibliografia somente deve ser utilizado quando o levantamento for completo e abranger todos os períodos. Portanto, somente utilize a expressão “Referências bibliográficas”.

Alguns cuidados:

- A. muitos, no afã de citar somente a literatura atual ("dos últimos cinco anos"), esquecem-se da história do conhecimento abordado;
- B. muitos livros textos têm por base trabalhos publicados em outras fontes;

(1) ABNT. Informação e Documentação. Referências. Elaboração. Associação Brasileira de Normas Técnicas, Rio de Janeiro, 22p., Agosto de 2000 (endereço eletrônico: <http://www.abnt.org.br>);

(2) International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. New England Journal of the Medicine 336: 309-315, 1997. Tradução no Informe Epidemiológico do SUS 8: 5-16, 1999.

- C. não deixe para a "última hora" a listagem (registro) das suas referências, caso proceda assim terá muitos problemas nos momentos finais. Desde a fase de projeto, mantenha atualizado banco de dados com os trabalhos a serem referidos. Peça, com alguma periodicidade, a listagem das referências e faça a revisão, tomando como base a cópia reprográfica da fonte, por exemplo;
- D. a numeração das referências é obrigatória (exceto no texto, *vide* item "E", seguinte);
- E. ATENÇÃO: as referências numeradas por ordem de citação no texto podem sofrer muitas alterações na etapa final (revisões do Professor-orientador ou dos Membros da Comissão Examinadora) e, procedendo desse modo, poderá ter muitas dificuldades. Daí ser muito mais prudente colocar as referências por ordem alfabética, no capítulo "Referências bibliográficas" e, posteriormente, numerá-las na lista das Referências bibliográficas (o "Word" faz isto automaticamente, à medida que insere novos registros).

NORMAS

1. autores com nomes terminados com Junior, Sobrinho, Filho, Neto, etc., devem ser assim citados (texto e em referências):

- José Costa Filho citar como Costa Filho no texto e Costa Filho J no capítulo das Referências bibliográficas;

2. as páginas finais são citadas, preferencialmente, excluindo os algarismos iguais à esquerda: **Exemplos:**

- 1409-12 (e não: 1409-1412)
- 21-8 (e não: 21-28).

3. em *itálico* devem ser referidos o título dos livros e o nome de periódicos ou revistas (v. exemplos adiante);

4. se o autor for o mesmo da referência seguinte, assinale com o traço contínuo (a referência seguinte) em tamanho correspondente. **EXEMPLOS:**

Barros N. A pediatria ...
_____. Ocorrência de um caso ...

5. nas referências bibliográficas **todos** os autores devem ser citados. Portanto, o uso de et al.* (ou cols.) somente se aplica no texto. **No texto** (vale ressaltar, não se aplica às referências), quando a referência for de dois autores, citá-los com o "e comercial" (&), por exemplo: Marcondes & Soares; sendo três ou mais: Marcondes et al. (nesses exemplos o verbo da frase não deve ser na primeira pessoa; ou seja, é incorreto dizer "Marcondes et al. demonstrou a...", assinale corretamente: "Marcondes et al. demonstraram a ...";

(*) et al. (após "al" digitar ponto), porque é a abreviatura da expressão latina *et alii*;

6. Nas citações das referências, no texto (introdução; revisão da literatura; racional; casuística, material e métodos; e discussão), devem se seguir somente uma das formas de citação, para manter a uniformidade:

xyy

não-recomendadas:

a).por ordem numérica crescente, conforme aparecem no texto. Exemplo: O mapa de caracteres foi capaz de exibir todas as fontes (1,2)... também como assinalado por Oliveira (3). ... Em outro estudo, Ximenes (4) observou dados contraditórios,... já especulados por Alcântara & Pinto(5);

b).autoria e número da referência. Exemplo: O mapa de caracteres foi capaz de exibir todas as fontes (Souza Filho⁸² e Vianna & Ottoni¹²³) ou O mapa..., segundo Souza Filho (82) e Vianna & Ottoni (123);

c).autoria, ano e número da referência. Exemplo: O mapa de caracteres foi capaz de exibir todas as fontes (Vianna & Ottoni, 1945¹²³; Souza Filho, 1995⁹²)*... . Anteriormente, Azevêdo et al. (1914)⁴ e Vianna & Ottoni (1945)¹²³, já haviam especulado a respeito... ;

(*) observe que entre as citações, quando entre parênteses, há um ponto e vírgula (;)

recomendadas

d).autor(es) e data. Exemplo: O mapa de caracteres foi capaz de exibir todas as fontes (Vianna & Ottoni, 1945; Souza Filho, 1995). ... Antes de Azevêdo et al. (1914) e Vianna & Ottoni (1945), já haviam especulado a respeito... . **Este é o modo preferencial, quando estiver escrevendo o texto. Na etapa final, após receber a revisão dos membros da Comissão examinadora, poderá optar em fazer as numerações das referências e optar por "a", "b", "c" ou manter a alternativa "d" (mais segura);**

7) Observe, nos itens "c" e "d", acima, que os trabalhos são citados no -texto na ordem cronológica de publicação (ANO). Ou seja, os trabalhos são citados no texto conforme a ordem do ano de publicação. Porém, quando dois (2) ou mais trabalhos foram publicados no mesmo ano, e citados no mesmo período ou frase, o registro **no texto** será em ordem alfabética. Exemplo: Revendo este aspecto vários autores encontraram resultados discordantes ... (Katz, 1978; Klöetzel, 1978; Azevedo et al., 1992; Figueiredo & Zaitz, 1995), deste modo, Asis et al. (1996) sugeriram controlar... ;

8) Quando o mesmo autor tiver dois ou mais trabalhos no mesmo ano, registrar após o ano: a, b, c,... (tanto no texto, se a opção permitir, mas especialmente nas referências). Exemplo

1(texto): Como observou Souza Filho (1993a,b) e também Souza Filho & Vanderlit (1993) Observe que como Vanderlit participou do terceiro trabalho, apesar do mesmo ano dos dois trabalhos anteriores (a, b), os autores não são os mesmos e, sendo assim, NÃO cabe assinalar: Souza Filho & Vanderlit (1993c); Exemplo 2 (aplicado ao registro das referências):

Souza Filho G. O Abcesso cerebral..., 1993 a.
_____. Distribuição das ..., 1993b.
_____, Vanderlit T. As fontanelas ..., 1993.

OBSERVE: a ordem, nas referências bibliográficas, foi pelo título do artigo (no caso das duas primeiras). Ou seja, primeiramente segue a ordem alfabética do sobrenome dos autores, secundariamente a ordem de cada título (sem levar em consideração: o, a, os e as ou correspondentes em outras línguas).

9) Não assinale nas referências bibliográficas: “informação pessoal”, mas SOMENTE NO TEXTO, anotando: nome, instituição (**se possível**) e ano: informação pessoal). Exemplo: “Os resultados foram semelhantes aos observados por J. Pinto Soares (FAMED/UFBA, 1995: informação pessoal) ou Gilberta Bensabath (1995: informação pessoal)”.

10) O registro da referência de trabalho não-publicado se aplica quando já foi publicado ou aceito para publicação (nesse caso, o pós-graduando deve ter: autores, título, nome da revista, ano). Do contrário, o mais correto (e prudente) é assinalar: “informação pessoal” no texto;

Exemplos:

Tinhorão Sobrinho M, Andrade V. Genótipo do
Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
34, 2002 [in press ou no prelo].

11) Havendo dois ou mais autores com o mesmo sobrenome e mesmo ano de publicação citar no texto do trabalho o sobrenome e as iniciais do nome (isto quando não usar as referências numeradas). Exemplo: “Esse resultado foi semelhante ao observado por Silva GT (1972) e Silva P (1972)”;

12) Quando não tiver acesso ao trabalho do autor, mas sendo conhecido de outra fonte consultada, não registrar nas referências e SOMENTE no texto. Por exemplo, lendo um artigo de Sherlock (1993) teve informação sobre outro artigo de Blumberg (1964), assim irá assinalar no texto: “A observação do antígeno Austrália coube a Blumberg (1964 *apud* Sherlock, 1993). Observar que a palavra latina *apud* (“junto a” ou “em”) deve ser assinalada em *itálico*.

13) Registro de um livro

Sobrenome/nome.//Título da obra: subtítulo.//número da edição*/editora**:
local da publicação***,/se houver: volume ou número de série,/número de páginas(p.),/ano da publicação.

Observação: uma barra (/) ou duas (//) correspondem ao número de espaços.

Exemplo: Alcantâra Filho A. *Fisiopatologia clínica*: Bases do raciocínio clínico. 4. ed., Kosmos: Porto Alegre, 280p., 1991.

(*) não citar a edição como 4ª e sim como 4. ed. (4 ponto ed ponto); (**) na citação da editora os prenomes são abreviados e a natureza comercial ou jurídica são excluídas. Exemplos: Rocco (e não: Livraria Rocco Ltda.) e J. Olympio (e não: José Olympio Editora S/A);

(***) quando a publicação tiver mais de um local (Porto Alegre, Boston, Londres, São Paulo) cite somente o primeiro. Sendo impossível determinar o local cite a sigla: s.l.. Quando o local não for citado, mas pode ser identificado, coloque-o entre colchetes: [Rio de Janeiro].

Observações:

a. tendo o livro dois ou mais autores: no texto assinale (Thomaz & Silva, 1943), se dois, e tendo três ou mais (Bevilaqua et al., 1978). Porém, nas referências, todos os autores devem ser citados: Thomaz C, Silva H. ..., 1943; Bevilaqua D, Tavares S, Santos O, Pedra-Silva T. ..., 1978;

b quando o autor do livro é: órgão público, entidade filantrópica, autarquia, universidade, instituição de fomento, etc., assinalar o nome por extenso, antecipado pela sigla oficial ou abreviatura (para facilitar a citação no texto e/ou a localização da referência). Exemplos:

1) OMS, Organização Mundial da Saúde. *Vetores da Malária*: Prevenção e controle ..., 1990.

2) UFBA, Universidade Federal da Bahia. *Bibliografia Bahiana dos movimentos populares* ..., 1982

c. quando o autor do livro for entidade coletiva, assinale: País./nome da entidade (por extenso)./nome do setor, seção, diretoria ou região (por extenso)//título... (ver exemplo do livro, acima).

Exemplo:

Inglaterra. Sindicato dos Mineiros. Setor de Saúde Ocupacional. *Os mineiros na terceira idade*: Causas de morbidade e mortalidade..., 1995.

d. quando o autor do livro for entidade coletiva que contém no título o nome do País ou derivado, assinale: Sigla, Nome da entidade (por extenso)./cidade*./Título ... (ver exemplo do livro acima). Exemplo: IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Brasília. *Censo populacional do Brasil*: Dados demográficos. Região nordeste. ..., 1992.

(*) mesmo que o local do órgão seja igual ao da editora, assinalar o nome da cidade duas vezes.

e. quando o livro foi escrito por vários autores, os quais não podem ser identificados: inicie a citação pelo título da obra (nesse caso, não coloque em itálico). Exemplo:

Título da obra: subtítulo//número da edição*/editora**: local da publicação** */se houver: volume, série,/número de páginas(p.)/data da publicação.

Enciclopédia Britânica. História das epidemias na idade média. 16. ed., Libs-Libs: Rio de Janeiro, 8 vol., p. 1 1-22, 1989.

f. sendo o autor do livro: anônimo. Comece a referência pelo título da obra, neste caso em *itálico*.

14) Registro de capítulo de livro

Sobrenome(s) e nome(s) do(s) autor (es)//Título do capítulo: Sub-título, se houver//In:/Sobrenome nome/(ed.)*//Título da obra: subtítulo//número da edição*/editora**: /local da publicação***/se houver volume, série,/número de páginas(p.)/ano da publicação.

*(ed.) - abreviatura de editores; incorreto: (eds.). **Exemplo:**

Maciel S, Santos-Neto F. Diarréia: diarréia dos viajantes. In: Jofre PS, Espírito Santo J, Nascimento-e-Silva J (ed.), *Clinica das doenças infecciosas doenças bacterianas e virais*. 1. ed., Blue: Recife, Série Verde, 11-22p., 1992.

a). quando o capítulo não tem autoria definida, o título do capítulo aparece no final, após as páginas. Exemplo:

Jofre PS, Espírito Santo J, Nascimento-e-Silva J (ed). *Clinica das doenças infecciosas: doenças bacterianas e virais*. 1. ed., Blue: Recife, Série verde, 11-22p., Diarréia: diarréia dos viajantes, 1992.

b). capítulo sem título ou autoria: após o título do livro coloque uma barra(/), seguida de dois espaços. Exemplo:

Jofre PS, Espírito Santo J, Nascimento-e-Silva J (ed.). *Clinica das doenças infecciosas: doenças bacterianas e virais*. / 1. ed., Blue: Recife, Série verde, 11-22p.,1992.

15) Registro de artigo de revista

Sobrenome nome.// título do artigo// *título da revista*,*/ local (caso se aplique, para diferenciar de outro periódico) // volume (número**): /páginas,/ano.

(* *em itálico*); o nome do periódico não pode ser abreviado, de acordo com o catálogo próprio ou verifique no artigo (não abrevie por conta própria, porque muitos periódicos têm siglas semelhantes). No entanto, muitos periódicos exigem a citação do nome da revista ou periódico por extenso e, quando da publicação, você poderá ter dificuldades em recuperar o nome completo, se usou a forma abreviada. **O PPgCS EXIGE O NOME DO PERÍODO POR EXTENSO;**

(**) o número pode ser dispensado, no entanto, se optou pelo uso devem utilizá-lo em todas as citações.

Exemplo:

Viana H, Azevêdo T, Salgado MEF, Silva O, Nascimento J, Dias J, Gomes Sobrinho O. A esquistossomose mansônica em brancos e negros. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo 39: 34-8,1991.

OBSERVE, como no registro de livros e dos seguintes, que na separação entre os nomes dos Autores não tem (;) somente (,). O nome de cada autor é separado somente por espaço. Exemplo: Sobrenome/Inicial prenome Inicial dos demais nomes, sem pontos (Salgado MEF)

16) Registro de Tese e Dissertação

Sobrenome nome. //Título da tese ou dissertação.//Dissertação (mestrado) ou Tese (doutorado, Livre docência, Titular, etc. // Instituição/, local,/número de páginas (p.)/ano.

Exemplo:

Prata GF. O cromossomo Y ..., em São Paulo. Tese de Titular. Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 186p., 1976.

17) Registro de Resumo publicado em Anais de Congresso, Jornadas, etc.

Sobrenome nome.//Título do trabalho.//In: Evento científico.// Instituição ou Entidade (quando se aplicar),/Local (cidade, onde ocorreu o evento,/número de páginas(p.)/ano.

Exemplo:

Garcia M, Sabrosa TG, Oliveira Neto N. A solução do Brasil: planejamento familiar. In: Anais do XXIV Congresso de Demografia. São Paulo, 33-4p., 1994.

18) Registro de leis, decretos, resoluções, e afins

País ou Estado./Título (sublinhado).//Diário oficial,/número,/página*,/capítulo*,/parágrafo*,/artigo*,/ano

(*) caso necessário

19) Registro de trabalho mimeografado ou datilografado

Sobrenome nome./Título,/Local,/Instituição,/número de páginas,/ano.//[datilografado ou mimeografado].

Exemplo:

Freitas O. Planorbídeos do Brasil Central, Goiânia EMBRAPA, 20p.,1981. (Mimeografado).

20) Trabalho no prelo (v. também item 7, das Normas Gerais neste capítulo)

Sobrenome nome./título do artigo./Título da revista *,/local (caso se aplique, para diferenciar de outro periódico)://[no prelo] ou [in press].

Exemplo:

Viana H, Azevedo T, Salgado MEF, Silva O, Nascimento J, Dias J, Gomes Sobrinho O. A esquistossomose mansônica em brancos e negros. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo: [no prelo].

Observação:

- a. somente se aplica para os trabalhos aceitos para publicação;
- b. no exemplo acima, quando citado no texto, deve ser referido como: Viana et al., dados não-publicados.

21) Trabalho extraído de endereço eletrônico

(entradas conforme o tipo de documento). /Disponível em: <endereço eletrônico >. Acesso em:/data (dia, mês, ano). **Exemplo:**

Birds from Amapá: banco de dados. Disponível em: <<http://www.bdt.org/bdt/avifauna/aves>>. Acesso em: 22 de outubro de 2000.

22) Consultar as Normas da ABNT (<http://www.abnt.org.br>), para citar jornais populares, revistas leigas, entrevistas, entre outros documentos, mas adaptando-as conforme as determinações do PPgCS.