

Expresión transcripcional de receptores tipo Toll y citoquinas proinflamatorias en macrófagos infectados con *Leishmania braziliensis* nativa

Transcriptional expression of Toll-like receptors and proinflammatory cytokines in macrophages infected with native *Leishmania braziliensis*

Dina Torres Gonzales^{1,a}, Libertad Alzamora-Gonzales^{1,b}

¹ Instituto de Investigación «Antonio Raimondi», Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

^a Magíster en biología molecular. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2142-7575>

^b Doctora en ciencias biológicas. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7425-7453>

An Fac med. 2024;85(1):51-56. / DOI: <https://doi.org/10.15381/anales.v85i1.26800>.

Correspondencia:

Libertad Alzamora Gonzales
lalzamora@unmsm.edu.pe

Recibido: 15 de enero 2024

Aprobado: 22 de febrero 2024

Publicación en línea: 25 de marzo 2024

Conflicto de interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Los presentes resultados forman parte de la tesis: Torres Gonzales D. "Detección y cuantificación de la expresión transcripcional para tres receptores tipo Toll y dos citoquinas proinflamatorias en cultivos de macrófagos murinos infectados con *Leishmania braziliensis* nativa" [tesis de maestría]. Lima: Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2019.

Fuente de financiamiento: El proyecto fue financiado por el Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (PEM2009B01 y 101001011).

Contribuciones de autoría: Dina Torres: Recolección/obtención de resultados, análisis e interpretación de datos, redacción del manuscrito, revisión crítica del manuscrito, aprobación de su versión final. Libertad Alzamora: Concepción y diseño del trabajo, recolección/obtención de resultados, análisis e interpretación de datos, redacción del manuscrito, revisión crítica del manuscrito, aprobación de su versión final, obtención de financiamiento.

Citar como: Torres D, Alzamora-Gonzales L. Expresión transcripcional de receptores tipo Toll y citoquinas proinflamatorias en macrófagos infectados con *Leishmania braziliensis* nativa. An Fac med. 2024; 85(1):51-56. DOI: <https://doi.org/10.15381/anales.v85i1.26800>.

Resumen

Introducción. El receptor de tipo Toll (TLR) que interactúa con el promastigote de *Leishmania* spp. determina la vía de activación celular. **Objetivo.** Identificar la expresión transcripcional de TLR-3, TLR-4, TLR-9, IL-12 y TNF- α en macrófagos infectados con una cepa nativa de *L. braziliensis* (Lbn). **Métodos.** La identificación de Lbn se hizo empleando qPCR para secuencias del DNA del cinetoplasto. Los macrófagos peritoneales de ratones fueron infectados con promastigotes y se midieron la producción de óxido nítrico (ON). Se cuantificaron los niveles transcripcionales para TLRs y citoquinas empleando qRT-PCR. **Resultados.** Lbn presentó 96% de homología con *L. braziliensis*. En los infectados con promastigotes se observó elevada producción de ON a las 2 h; significativa expresión transcripcional especialmente de TLR-3 y TLR-9 que se correspondió con la expresión para citoquinas. **Conclusión.** Lbn activó fuertemente a los macrófagos mediante los TLRs endosomales lo cual puede ser aplicado en el diseño de agonistas para tratar la enfermedad.

Palabras clave: *Leishmania braziliensis*; Citocinas; Fagocitosis; Óxido Nítrico; Leishmaniasis Cutánea (Fuente: DeCS BIREME)

Abstract

Introduction. The Toll-like receptor (TLR) interacting with the promastigote of *Leishmania* spp. determines the cellular activation pathway. **Objective.** To determine the transcriptional expression of TLR-3, TLR-4, TLR-9, IL-12 and TNF- α in macrophages infected with a native strain of *L. braziliensis* (Lbn). **Materials and Methods.** Identification of Lbn was performed by qPCR for kinetoplast DNA sequences. Mouse peritoneal macrophages were infected with promastigotes (MI) and nitric oxide (NO) production was measured; transcript levels for TLRs and cytokines were quantified by qRT-PCR. **Results.** Lbn showed 96% homology to *L. braziliensis*. High ON production was observed in IMs at 2 h; significant transcriptional expression especially of TLR-3 and TLR-9, which corresponded with expression for cytokines. **Conclusions.** Lbn strongly activated macrophages via endosomal TLRs, which can be applied in the design of agonists to treat the disease.

Keywords: *Leishmania braziliensis*; Cytokines; Phagocytosis; Nitric Oxide; Cutaneous leishmaniasis (source: MeSH NLM)

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis cutánea (LC) es la forma más común de la enfermedad causada por *Leishmania spp.* El riesgo del incremento de LC es latente debido a que el cambio climático afecta la distribución de los flebotomos y la migración de las poblaciones a regiones con alta transmisibilidad ⁽¹⁾. *Leishmania braziliensis* es el principal agente etiológico de LC y mucosa en América del Sur, el promastigote metacíclico ingresa a las células diana mediante receptores, siendo fundamentales los de tipo Toll (TLR).

La señalización dependiente de TLR ocasiona el incremento de la respuesta celular innata mediada por la producción de citoquinas proinflamatorias. Durante la etapa inicial de la infección, las células hospedadoras liberan especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, cuya intensidad no está relacionada con la carga parasitaria ⁽²⁾. Aunque la mayoría de los estudios consideran la función protectora de los TLR, el hecho de que los parásitos se aprovechen de estos receptores promueve la infección ⁽³⁾. El objetivo del estudio fue cuantificar y comparar la producción de óxido nítrico y los niveles de transcripción de TLR-3, TLR-9 (endosomales), TLR-4, IL-12 y TNF- α entre macrófagos murinos infectados y no infectados con la especie nativa de *Leishmania sp.* (Lbn).

MÉTODOS

Identificación de Lbn

La cepa fue donada en estadio de promastigote (pasaje 234, aislada de exudado de LC) por el Laboratorio de Zoonosis del Instituto Nacional de Salud (INS), Lima, Perú. Su mantenimiento se realizó en medio bifásico elaborado con sangre desfibrinada humana al 10% (37 °C, 5% CO₂, 95% humedad relativa). Para la identificación de la especie se extrajo el DNA a partir de $\sim 3,2 \times 10_5$ promastigotes/mL empleando QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) según las indicaciones del fabricante. Los *primers* (Immunochem) diseñados para *Leishmania (Viannia) braziliensis* ⁽⁴⁾ fueron analizados empleando

BLAST seguido de Oligoanalyzer Tool. Las secuencias fueron: F (Forward) 5' AAATTTCGCGTTTTTGGCCTCCCCG 3', posición en el genoma: 185-209, Tm: 66.2 °C; R (Reverse) 5'GCATAAAGTAGAGACGGAACAGAG 3', posición en el genoma: 643-620, Tm: 62.9 °C.

La amplificación se hizo por qPCR empleando minicírculos de kDNA. Se elaboró una mezcla formada por 10 ng de DNA total, 0,5 μ M de cada *primer*, 2,5 mM de los dNTPs (Invitrogen), 2 mM MgCl₂, Taq polimerasa 2,5 μ L/ reacción y buffer de PCR 10X (sin MgCl₂) (Invitrogen) en un volumen final de 25 μ L. Los pasos del qPCR fueron: desnaturalización inicial (94 °C, 15 min), desnaturalización final (94 °C, 1 min), alineamiento (55 °C, 30 s, 40 ciclos), extensión inicial (72 °C, 1 min) y extensión final (72 °C, 7 min). Los amplificados se visualizaron mediante electroforesis horizontal en agarosa (1,5%, 120 V, 40 min) y fotografiaron en un transiluminador (Bio-Rad). Se empleó un marcador de 100-1000 pb (Sigma).

La purificación del amplicón se hizo con el kit QIAquick-Gel Extraction, seguido del kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin-Elmer), utilizando los *primers* respectivos (F y R) siguiendo las indicaciones del fabricante. El secuenciamiento se hizo en las siguientes condiciones: activación inicial a 94 °C (3 min), 24 ciclos de 30 s (96 °C), 30 s (51 °C) y 4 min (60 °C). Para el secuenciamiento se utilizó ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Para encontrar la secuencia consenso se utilizó el programa CLUSTAL X versión 1.83. Posteriormente, estas secuencias se contrastaron con otras del GenBank utilizando BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov) y se analizaron con el software SeqMan (Dnastar Inc., Wisconsin, USA). Para el análisis filogenético se empleó MEGA versión 5.10 y el método Neighbor Joining, Tamura-Nei de 1000 repeticiones.

Obtención de macrófagos peritoneales

Se inocularon 1,5 mL de caldo tioglicolato de Brewer por vía intraperitoneal (ip) a ratones Balb/c adquiridos del INS (n=6, hembras de 8 semanas de edad). Después de 3 días, se inoculó 1 mL de RPMI (ip, 15 min). Los ratones fueron sedados

en cámara de cloroformo y eutanizados por dislocación cervical. Los macrófagos se lavaron 2 veces con PBS 1X (10 °C, 1000 rpm, 7 min), el *pellet* se resuspendió en 3 mL de RPMI 1640 10% de suero de bovino fetal, antibióticos y antimicótico (coRPMI, Gibco), se colocaron en placas Petri e incubaron (1 h, 33 °C, 5% CO₂), se lavó con PBS 1X, se añadieron 2 mL de coRPMI, los macrófagos adheridos se colectaron y se centrifugó a 2000 rpm (3 min). El *pellet* se resuspendió en coRPMI. Dependiendo del tipo de ensayo, se cultivaron en microplacas de 96 pocillos con fondo plano o laminillas cubreobjetos (37 °C, 5% CO₂).

Infección de macrófagos con Lbn

La fase líquida del medio bifásico (promastigotes estacionarios) se colectó y centrifugó (1000 rpm, 5 min), el *pellet* se resuspendió en coRPMI. Para la infección se ajustó la concentración en la proporción de 1 macrófago: 10 promastigotes ⁽⁵⁾. Los co-cultivos (macrófago-Lbn) se hicieron sobre laminillas, en cámara húmeda y se incubaron durante 24 y 48 h, los controles fueron macrófagos no infectados (n = 3). Las laminillas se colorearon con Giemsa y analizaron por microscopía óptica. El porcentaje de macrófagos infectados (MI) en los co-cultivos se determinó contando 100 macrófagos con o sin amastigotes intracelulares ⁽⁶⁾ (n = 3). La capacidad infectiva fue representada como el resultado del valor promedio de amastigotes en MI multiplicado por el porcentaje de MI. El valor promedio de amastigotes se determinó mediante el conteo de éstos por cada 100 MI ⁽⁷⁾.

Producción de óxido nítrico

Después de centrifugar, se colectaron los sobrenadantes de los co-cultivos y controles a las 0, 2, 12, 15, 24 y 48 h de incubación (n = 3). A 100 μ L del sobrenadante se agregaron 100 μ L del reactivo de Peter Griess (1 min) y se midió la absorbancia (540 nm). Para la expresión transcripcional (ET) de TLRs y citoquinas, se emplearon co-cultivos de 24 h de incubación ⁽⁸⁾ (n = 3).

Obtención de RNA para la expresión transcripcional de TLRs y citoquinas

La extracción de RNA se hizo con el kit Power SyBr Green Cell-To TM (Applied

Byosistem), siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración determinada se utilizó como referencia de la cantidad aproximada de RNA para qRT-PCR.

Retrotranscripción a DNA complementario (cDNA) de TLRs y citoquinas

Se empleó el kit Power SyBr Green Cell-T o TM siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la síntesis de cDNA se incubó a 37 °C (60 min), y para la desnaturalización de la enzima a 95 °C (5 min). El cDNA se almacenó a -20 °C. En la tabla 1 se presentan las secuencias de los *primers* (9). Como control endógeno se utilizó GAPDH.

Amplificación de cDNA para TLRs y citoquinas

La cuantificación de la expresión de los *primers* TLR-3, TLR-4 y TLR-9 se hizo con el kit Master Mix Power SyBrGreen PCR (Applied Biosystem) y la amplificación de cDNA (qRT-PCR) con el Mix de SyBr Green (Thermocycler Corbett). Se utilizaron 5 µL de cDNA diluido en agua ultra pura (1:3 respectivamente). La concentración final de los *primers* fue de 500 nM y de cDNA de 2,7 µg/µL. Como control negativo se utilizó agua ultrapura (n = 3). Las condiciones de PCR para los tres *primers* fueron: 95 °C (10 min) para activar la enzima, 95 °C (15 s) y 53 °C (1 min) para los 40 ciclos de PCR y calentamiento gradual cada 0,1 °C, desde 50 hasta 99 °C para la curva de disociación. La temperatura media para la amplificación fue de 52 °C (TLR-3),

51,6 °C (TLR-4), 50,4 °C (TLR-9) y 54,9 °C (GAPDH). En el caso de las citoquinas, la temperatura media para la amplificación fue de 50,5 °C (IL-12), 55,4 °C (TNF-α) y 54,9 °C (GADPH). La cuantificación relativa para TLRs y citoquinas fue calculada mediante Delta-Delta Ct con el programa de *Applied Biosystems* y la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Análisis estadístico

La media aritmética y la desviación estándar de la producción de ON se determinó con Microsoft Excel 2016. Para la significancia se utilizó la prueba t de Student de muestras independientes y se consideró significativo si $p < 0,05$. La ET se calculó con el programa SPSS (versión 15).

Aspectos éticos

Las autoras reconocen haber seguido las responsabilidades éticas para el uso de animales menores.

RESULTADOS

En el análisis de las secuencias obtenidas para Lbn, el amplicón tuvo 536 pb (Figura 1A- *primer* F). Se obtuvo un producto de 393 nucleótidos. Al confrontar las secuencias de Lbn con *L. (V.) braziliensis* se encontró una homología de 98% con un valor de E de 0,0 (M87315.1).

Se colectaron $1,83 \times 10^5$ /mL macrófagos murinos infectados con Lbn por ratón. Después de 24 h de co-cultivo, el porcen-

taje de MI fue (~13,38%, a las 48 h se incrementó a (~37,47%. En cuanto a los amastigotes, a las 24 h de co-cultivo fue de (~3,1 y a las 48 h fue (~5,3 (Figura 1B). La fagocitosis estuvo acompañada por la mayor formación de vacuolas parasitóforas (Figura 1C). La capacidad infectiva se incrementó de 40,14% (24 h) a más del 100% (48 h) ($p < 0,001$).

La producción de óxido nítrico en los MI fue mayor a las 2 h (~2,53 µM), mientras que en los controles fue de (~1,54 µM ($p < 0,05$). En los controles se incrementó en función al tiempo, llegando a (~13,69 µM a las 48 h ($p < 0,0001$) (Figura 2).

La expresión transcripcional (ET) para TLR-3 fue 5,12 veces mayor ($p < 0,001$), TLR-9 fue 3,95 veces ($p < 0,01$) y TLR-4 fue 3,23 veces ($p < 0,05$), respecto a los controles (Figura 3A). La diferencia de niveles de ET entre TLR-4 y TLR-9 no fue significativa ($p = 0,12$). También, se encontró 4,18 veces mayor nivel transcripcional para las dos citoquinas proinflamatorias en los MI respecto a los controles ($p < 0,001$). En el caso de TNF-α fue 3,66 veces mayor ($p < 0,001$) (Figura 3B).

DISCUSIÓN

La cepa Lbn mostró una homología del 98% para *L. (V.) braziliensis* coincidiendo con Satow *et al.* (11). El amplicón tuvo 536 pb (cinetoplasto) para la misma especie se reportó un amplicón de 599 pb (citocromo B) (12). Los macrófagos peritone-

Tabla 1. Secuencia de los *primers* para receptores de tipo Toll empleados en la expresión transcripcional.

Receptor tipo Toll/ Citoquina	Secuencia del <i>primer</i> (5' - 3')	Tamaño del amplicón (bp)	Número de acceso al GenBank
TRL-3	F: TTGTCTTCTGCACGAACCTG R: CGCAACGCAAGGATTTTATT	186	NM_126166.5
TLR-4	F: GGACTCTGATCATGGCACTG R: ACTACCTCTATGCAGGGA	520	NM_021297.3
TLR-9	F: ATCCTCCATCTCCCAAC R: ACGGGGTACAGACTTC	167	NM_031178.2
GAPDH Balb/c	F: CTA CTGGTGTCTTACCACC R:GTGGCAGTGATGGCATGGAC	258	NM_008084
IL-12	F: CAGAAGCTAACCATCTCCTGGTTTG R: CCGGAGTAATTTGGTGCTCCACAC	371	BC103608.1
TNF-α	F: CCTCACACTCAGATGATCTTCTCA R: TGGTTGTCTTTGAGATCCATGC	146	NM_013693
GAPDH* Balb/c	F: TGCACCACCAACTGCTTAGC R: GGCATGGACTGTGGTCATGAG	258	NM_008084

* Control endógeno para citoquinas. Los *primers* se analizaron mediante Oligoanalyzer 3,1 y *Primer* BLAST y, fueron sintetizados (50 nM) por Invitrogen Life Technologies®

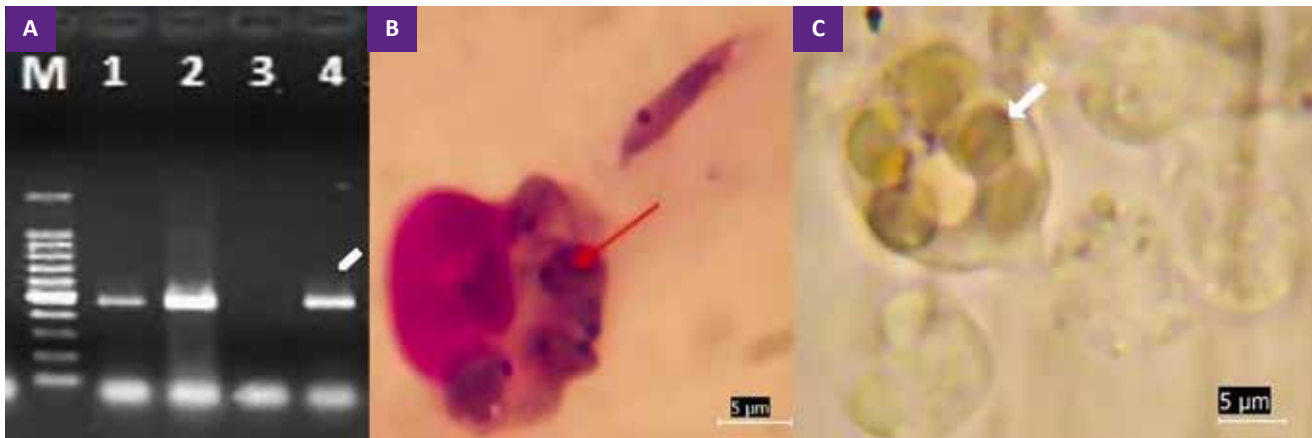


Figura 1. (A) Amplicón de kDNA de promastigotes de *L. braziliensis* Lbn, la flecha señala el amplicón para F (536 pb, carriles 1, 2, 4). M: Marcador molecular de PCR (100-1000 pb), control negativo (carril 3). (B) Macrófago infectado con *L. braziliensis* Lbn (24 h), la flecha señala amastigotes, externamente al macrófago se observa el promastigote (Giemsa, x 1000). (C) Macrófago con vacuolas parasitóforas después de 6 h de co-cultivo (fresco, x 1000).

ales primarios se consideran maduros y más estables en su funcionalidad y fenotipo^(8,13) y permitieron verificar el incremento de la capacidad infectiva de Lbn. El número de amastigotes por macrófago a las 48 h (~5,3 amastigotes) fue mayor que el reportado 5 días posinfección (Figura 1A, 1B y 1C)⁽¹⁴⁾, diversos factores influyen sobre estos valores⁽⁷⁾.

La producción de ON por los MI fue significativa únicamente a las 2 h posinfección (Figura 2), el incremento en los controles podría estar relacionado con algún componente del coRPMI 1640⁽¹⁵⁾; asimismo, la baja producción sugiere que Lbn es resistente al ON⁽¹⁶⁾ o existe mayor consumo de glucosa⁽¹⁷⁾.

En los MI, la mayor expresión transcripcional encontrada para TLR-3, seguida de TLR-9 y TL-4, y los niveles elevados de IL-12 y TNF- α (Figuras 3A y 3B) confirmarían que la participación de TLR-9, TLR-4, TLR-2 y TLR-3 es fundamental para generar una respuesta de citoquinas proinflamatorias⁽¹⁹⁾, y especies reactivas de

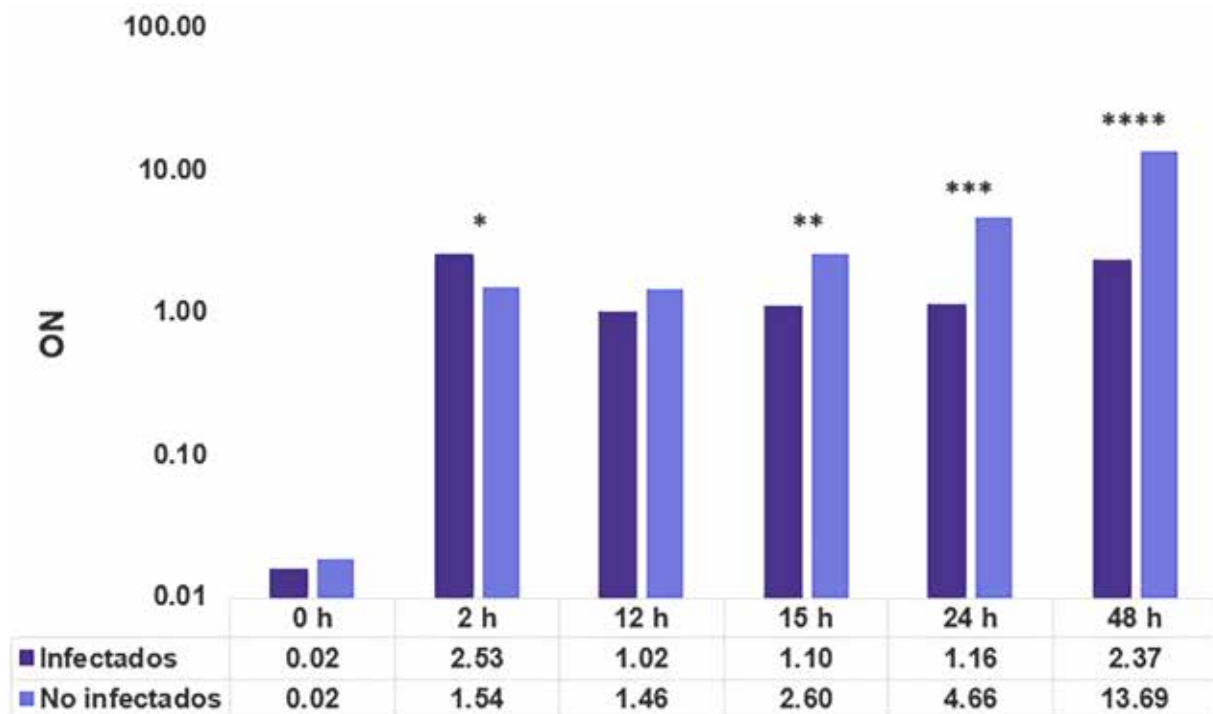


Figura 2. Cuantificación de óxido nítrico (ON). En los cultivos de macrófagos infectados con *L. V. braziliensis* la mayor producción de ON se presentó a las 2 h. Las diferencias se determinaron mediante t – Student para muestras independientes, (n = 3).

*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

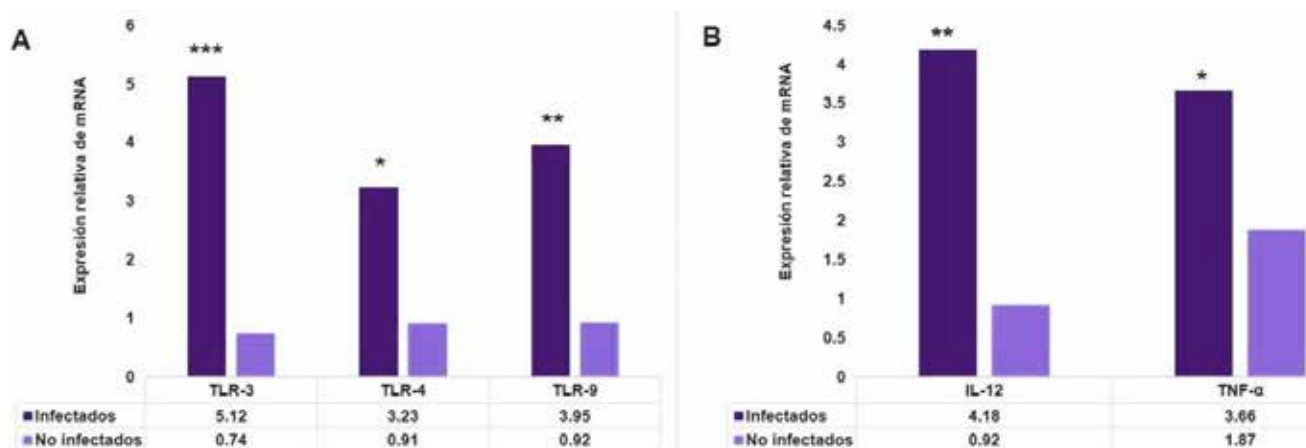


Figura 3. Expresión transcripcional de TLR y citoquinas proinflamatorias en macrófagos infectados con *L. braziliensis* Lbn. **(A)** Se encontró mayor nivel transcripcional para los TLR-3, TLR-4 y TLR-9 respecto a los no infectados (controles). **(B)** Se determinó mayor nivel transcripcional para IL-12 y TNF-α respecto a los controles. Se aplicó t-Student para muestras independientes (n = 3). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

oxígeno y nitrógeno^(19,20). La menor expresión transcripcional para TLR-4 podría estar relacionada con la baja producción de ON⁽¹⁸⁾.

La expresión transcripcional de TLR-3 resultó predominante indicando mayor estimulación intracelular. Se han observado fuertes interacciones de TLR-2 y TLR-4 con las formas clínicas asociadas a *L. (V.) braziliensis*, mientras que TLR-9 lo hizo con *L. (L.) amazonensis*⁽²¹⁾, para esta especie se demostró que el TLR-3 es fundamental en el crecimiento intracelular y supervivencia del parásito⁽²²⁾. No se encontró información acerca de TLRs en MI, animales o humano, infectados con *L. braziliensis* nativas en Perú.

La expresión transcripcional para IL-12 y TNF-α indican que la infección por *L. V. braziliensis* promueve una potente respuesta celular⁽²³⁾, corroborada por la reducción del estrés oxidativo, número de células infectadas y citoquinas proinflamatorias cuando se bloquean TLR-2 y TLR-4⁽²⁴⁾. Esto sugiere que los antagonistas y agonistas de TLR pueden ser excelentes inmunomoduladores⁽²¹⁾.

El estudio tiene limitaciones como no haber incluido una cepa referencial, un inductor de citoquinas proinflamatorias y un ligando específico para el TLR a evaluar, a fin de determinar si existen diferencias en la ET de estos receptores

y las citoquinas proinflamatorias entre cepas nativas y referenciales.

En conclusión, se verificó la activación del macrófago por señales de peligro (Lbn) tanto a nivel extracelular (TLR-4) como intracelular (TLR-3 y TLR-9) directamente relacionada con la significativa ET para IL-12 y TNF-α. El modelo podría ser utilizado para evaluar fármacos y productos agonistas y antagonistas en LC.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen al MSc. Carlos Padilla por su valiosa orientación de la metodología molecular utilizada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Organización Mundial de la Salud. Leishmaniasis. Enero 2023. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.
- Yasuyuki G, Haruka M. Pathological roles of macrophages in *Leishmania* infections. *Parasitol. Int.* 2023; 94:102738. DOI: [org/10.1016/j.parint.2023.102738](https://doi.org/10.1016/j.parint.2023.102738).
- Bamigbola IE, Ali S. Paradoxical immune response in leishmaniasis: The role of toll-like receptors in disease progression. *Parasite Immunol.* 2022;44(4-5):e12910. DOI: [org/10.1111/pim.12910](https://doi.org/10.1111/pim.12910).
- Marcussi VM, Marcussi LM, Barbosa-Tessmann IP, Lonardonni MVC, Silveira TGV. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: New primers for identification using polymerase chain reaction. *Exp. Parasitol.* 2008;120(4):300-5. DOI: [org/10.1016/j.exppara.2008.08.005](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.08.005).
- Bonyek-Silva I, Nunes S, Bastos R, Lima R, Barbosa L, Grimaldi G, et al. Obtainment of macrophages from human monocytes to assess *Leishmania braziliensis*

- infection rate and innate host immune response. *J. Vis. Exp.* 2021;174:e62555. DOI: [org/10.3791/62555](https://doi.org/10.3791/62555).
- Mesa CV, Muñoz DL, Echeverry M, Velez ID, Robledo SM. Susceptibilidad in vitro a infección por *Leishmania* y sensibilidad a medicamentos difiere según tipo de macrófagos. *Rev. Univ. Ind. Santander. Salud.* 2010;42(3):200-11.
- Calvay-Sánchez KD, Rojas-Palomino NM, Sandoval-Juarez AC, Cisneros-Tarameño A, Obregón-Cahuaya C, Minaya-Gómez GS. Capacidad infectiva de promastigotes en fase estacionaria de *Leishmania (Viannia) braziliensis* y *Leishmania (Viannia) peruviana*, en línea celular DH 82. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2015;32(1):33-40.
- Hsiao CH, Ueno N, Shao JQ, Schroeder KR, Moore KC, Donelson JE, et al. The effects of macrophage source on the mechanism of phagocytosis and intracellular survival of *Leishmania*. *Microbes Infect.* 2011;13(12-13):1033-44. DOI: [org/10.1016/j.micinf.2011.05.014](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.05.014).
- Charmoy M, Megnekou R, Allenbach C, Zweifel C, Perez C, Monnat K, et al. *Leishmania major* induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. *J Leukoc Biol.* 2007;82(2):288-99. DOI: [org/10.1189/jlb.0706440](https://doi.org/10.1189/jlb.0706440).
- Moura LIF, Silva L, Leal EC, Tellechea A, Cruz MT, Carvalho E. Neurotensin Modulates the Migratory and Inflammatory Response of Macrophages under Hyperglycemic Conditions. *BioMed Research International.* 2013; 1-13. DOI: [org/10.1155/2013/941764](https://doi.org/10.1155/2013/941764).
- Satow MM, Yamashiro-Kanashiro EH, Rocha MC, Oyafuso LK, Soler RC, Cotrim PC, et al. Applicability of kDNA-PCR for routine diagnosis of american tegumentary leishmaniasis in a tertiary reference hospital. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 2013;55(6):393-399. DOI: [org/10.1590/s0036-46652013000600004](https://doi.org/10.1590/s0036-46652013000600004).
- Martínez L, Paternina-Gómez M, Paternina LE, Pérez-Doria A, Bejarano EE. Actualización de la distribución geográfica de especies de *Leishmania*, caracterizadas por genética molecular, en el macrofoco de leishmaniasis del Caribe colombiano. *Biomedica.* 2011;31(S3):101-1. DOI: [org/10.7705/biomedica.v31i0471](https://doi.org/10.7705/biomedica.v31i0471).

13. Layoun A, Samba M, Santos MM. Isolation of murine peritoneal macrophages to carry out gene expression analysis upon Toll-like receptors stimulation. *J Vis Exp.* 2015;29(98):e52749. DOI: [org/10.3791/52749](https://doi.org/10.3791/52749).
14. Jara M, Berg M, Caljon G, de Muylder G, Cuypers B, Castillo D, et al. Macromolecular biosynthetic parameters and metabolic profile in different life stages of *Leishmania braziliensis*: Amastigotes as a functionally less active stage. *PLoS One.* 2017;12(7):e0180532. DOI: [org/10.1371/journal.pone.0180532](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180532).
15. Kawakami T, Kawamura K, Fujimori K, Koike A, Amano F. Influence of the culture medium on the production of nitric oxide and expression of inducible nitric oxide synthase by activated macrophages in vitro. *Biochem. Biophys. Rep.* 2016;5:328-334. DOI: [org/10.1016/j.bbrep.2016.01.006](https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.01.006).
16. Formaglio P, Alabdullah M, Siokis A, Handschuh J, Sauerland I, Yan F. Nitric oxide controls proliferation of *Leishmania major* by inhibiting the recruitment of permissive host cells. *Immunity.* 2021;54(12): 2724-39.e10. DOI: [org/10.1016/j.immuni.2021.09.021](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.09.021).
17. Pinho N, Bombaça AC, Wisniewski JR, Dias-Lopes G, Saboia-Vahia L, Cupolillo E, et al. Nitric oxide resistance in *Leishmania (Viannia) braziliensis* involves regulation of glucose consumption, glutathione metabolism and abundance of pentose phosphate pathway enzymes. *Antioxidants (Basel).* 2022;11(2):277. DOI: [org/10.3390/antiox11020277](https://doi.org/10.3390/antiox11020277).
18. Li Y, Deng SL, Lian ZX, Yu K. Roles of Toll-like receptors in nitroxidative stress in mammals. *Cells.* 2019;8(6):576. DOI: [org/10.3390/cells8060576](https://doi.org/10.3390/cells8060576).
19. Polari LP, Cameiro PP, Macedo M, Machado PRL, Scott P, Carvalho EM, et al. *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;9:20. DOI: [org/10.3389/fcimb.2019.00120](https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00120).
20. Bhattacharya P, Gannavaram S, Ismail N, Saxena A, Dagur PK, Akue A, et al. Toll-like receptor-9 (TLR-9) signaling is crucial for inducing protective immunity following immunization with genetically modified live attenuated *Leishmania* parasites. *Pathogens.* 2023;12(4), 534. DOI: [org/10.3390/pathogens12040534](https://doi.org/10.3390/pathogens12040534).
21. Campos MB, Lima LV do R, de Lima ACS, Vasconcelos T, Ramos PKS, Gomes CM de C, et al. Toll-like receptors 2, 4, and 9 expressions over the entire clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (V.) braziliensis* and *Leishmania (L.) amazonensis*. *PLoS One.* 2018;13(3):e0194383. DOI: [org/10.1371/journal.pone.0194383](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194383).
22. Rath CT, Vivarini AC, Dos Santos JV, Medina JM, Saliba AM, Mottram JC, et al. Toll-like receptor 3 (TLR3) is engaged in the intracellular survival of the protozoan parasite *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Infect Immun.* 2022;90(9):e0032422. DOI: [org/10.1128/iai.00324-22](https://doi.org/10.1128/iai.00324-22).
23. Kalavi K, Jorjani O, Faghghi MA, Mowla SJ. Cytokine gene expression alterations in human macrophages infected by *Leishmania major*. *Cell J.* 2021;22(4):476-81. DOI: [org/10.22074/cellj.2021.6524](https://doi.org/10.22074/cellj.2021.6524).
24. Cameiro PP, Dórea AS, Oliveira WN, Guimarães LH, Brodskyn C, Carvalho EM, et al. Blockade of TLR2 and TLR4 attenuates inflammatory response and parasite load in cutaneous leishmaniasis. *Front. Immunol.* 2021;12:706510. DOI: [org/10.3389/fimmu.2021.706510](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.706510).