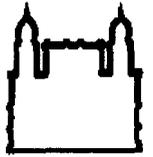




UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



FIOCRUZ

Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CORPÚSCULOS E MEDIADORES LIPÍDICOS NA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA A SALIVA DE *Lutzomyia*
longipalpis DURANTE A INFECÇÃO COM *Leishmania*
chagasi

Théo de Araújo Santos

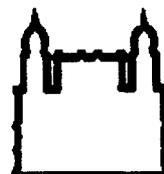
Salvador – Bahia - Brasil
2009



004474



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

**CORPÚSCULOS E MEDIADORES LIPÍDICOS NA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA A SALIVA DE *Lutzomyia
longipalpis* DURANTE A INFEÇÃO COM *Leishmania
chagasi***

Théo de Araújo Santos

Orientadora: Dra. Valéria de Matos Borges

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-graduação em Patologia Humana, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau Mestre.

Salvador – Bahia – Brasil
2009



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

S231c Santos, Théo de Araújo
Corpúsculos e mediadores lipídicos na resposta inflamatória a saliva de
Lutzomyia longipalpis durante a infecção com *Leishmania chagasi* [manuscrito] /
Théo de Araújo Santos. - 2009.
100 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Mestrado (dissertação) – Universidade Federal da Bahia. Centro de Pesquisas
Gonçalo Moniz, 2009.

Orientadora: Prof. Dra. Valéria de Matos Borges, Laboratório Integrado de
Microbiologia e Imunorregulação.

1. Corpúsculos Lipídicos. 2. Mediadores Lipídicos. 3. Saliva. 4. *Leishmania*. 4.
Lutzomyia longipalpis. I.Título.

CDU 595.131.3:616.993.161

"MEDIADORES LIPÍDICOS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA À SALIVA DE *Lutzomyia longipalpis*
DURANTE A INFECÇÃO COM *Leishmania chagasi*"

THEO DE ARAÚJO SANTOS

FOLHA DE APROVAÇÃO

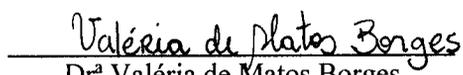
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr^a Rossana Correa Netto de Melo
Professora Colaboradora
UFJF



Dr^a Fabíola Cardillo
Pesquisadora Associada
CPqGM/FIOCRUZ



Dr^a Valéria de Matos Borges
Tecnologista Nível III
CPqGM/FIOCRUZ

Dedico este trabalho a

Carla, minha amada companheira

Meus pais Virginia e Edielson, sempre presentes pelo exemplo

Lia e João, meus queridos

Dona Del, minha segunda mãe

Gabriel, meu pequenino sentido

A Deus que está acima de todas as coisas e sempre será meu eterno companheiro

AGRADECIMENTOS

Valéria Borges

Jaqueline França

Bruno Bezerril

Deboraci Prates

Nívea Luz

Adriana Lanfredi

Marcos André Vannier

Diego Menezes

Antônio Reis

Maiana Monteiro

Danielle Nascimento

Heloísa D'Ávila

Petter Entringer

Giselle Bacan

Patrícia Bozza

Dirceu Joaquim

Aldina Barral

Manoel Barral

José Miranda

Edvaldo Passos

Claúdia Brodskyn

Camila Indiani

Jorge Clarêncio

Natali Alexandrino

Jorge Lessa

Aos amigos da família LIMI-LIP, LBP, LPBI e do CPQGM/FIOCRUZ;

Aos funcionários do biotério pelo cuidado e fornecimento dos animais;

Aos funcionários da Biblioteca do CPqGM pela ajuda na busca pelas bibliografias;

Ao CNPq, CPqGM e UFBA pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Aspectos gerais da leishmaniose visceral	12
1.2 Interação parasita x hospedeiro	13
1.3 Papel da saliva do vetor durante os estágios iniciais da infecção por <i>Leishmania</i>	14
1.4 Mediadores lipídicos	17
1.5 Corpúsculos lipídicos	21
1.6 Mediadores lipídicos na infecção por <i>Leishmania</i>	22
2. JUSTIFICATIVA	24
3. HIPÓTESE	24
4. OBJETIVOS	24
4.1 Geral	24
4.2 Específicos	24
5. MATERIAIS E MÉTODOS	26
DESENHO EXPERIMENTAL <i>IN VITRO</i>	26
DESENHO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i>	27

6. RESULTADOS	34
6.1 A saliva de <i>L. longipalpis</i> induz a formação de corpúsculos lipídicos e PGE ₂ em macrófagos peritoneais <i>in vitro</i>	34
6.2 A saliva de <i>L. longipalpis</i> induz a produção de mediadores lipídicos em macrófagos peritoneais via COX-2 e 5-LO.....	36
6.3 SGS de <i>L. longipalpis</i> induz recrutamento celular durante a infecção por <i>L. chagasi</i> <i>in vivo</i>	37
6.4 Efeito <i>in vivo</i> do SGS de <i>L. longipalpis</i> na formação de corpúsculos lipídicos (CLs) na presença <i>L. chagasi</i>	40
6.5 Efeito <i>ex vivo</i> do SGS de <i>L. longipalpis</i> na produção de PGE ₂ e LTB ₄ durante a infecção por <i>L. chagasi</i>	42
6.6 Fagocitose de <i>L. chagasi</i> no sitio de infecção.....	43
6.7 Microscopia eletrônica de células do lavado peritoneal de camundongos C57BL/6 tratados com SGS e <i>L. chagasi</i>	45
7. DISCUSSÃO	48
8. CONCLUSÃO	55
9. PERSPECTIVAS	55
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
11. APÊNDICE	64
1. PRANCHAS DE MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	
2. ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO	

RESUMO

CORPÚSCULOS E MEDIADORES LIPÍDICOS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA A SALIVA DE *Lutzomyia longipalpis* DURANTE A INFECÇÃO COM *Leishmania chagasi*.

THÉO DE ARAÚJO SANTOS. *Lutzomyia longipalpis* é o principal transmissor da *Leishmania chagasi*, agente etiológico da leishmaniose visceral (LV), a forma mais letal da doença. A saliva de *L. longipalpis* possui moléculas capazes de modular as repostas hemostática, inflamatória e imunológica do hospedeiro, favorecendo o estabelecimento da infecção. Entretanto, poucos trabalhos têm abordado o papel da saliva de *L. longipalpis* na indução de mediadores lipídicos e sua implicação nos momentos iniciais da infecção por *Leishmania*. Neste trabalho, investigamos o papel do sonicado de glândula salivar (SGS) de *Lutzomyia longipalpis* na indução da formação de corpúsculos lipídicos (CL) e produção de mediadores lipídicos durante os estágios iniciais da infecção por *Leishmania chagasi*. O SGS foi capaz de induzir *in vitro* a formação de CLs e a produção de PGE₂ em macrófagos murinos. Durante a infecção de camundongos C57BL/6 por *L. chagasi*, a presença de saliva de *L. longipalpis* aumentou a formação de CLs em macrófagos após 3 horas de estímulo, o que esteve correlacionado com o aumento do influxo de células para o sítio inflamatório, principalmente neutrófilos. A infecção de *L. chagasi* em presença do SGS de *L. longipalpis* induziu a produção de LTB₄ e PGE₂ em leucócitos peritoneais *ex vivo*. Após 3 horas, macrófagos e neutrófilos infectados, bem como a interação entre essas células foram observadas. O percentual de macrófagos infectados e o número de parasitas por macrófago esteve reduzido durante a infecção em presença de SGS. O conjunto dos nossos resultados indica que a saliva do vetor desempenha um papel importante na modulação da inflamação

durante os estágios iniciais da infecção por *L. chagasi* e abre novas perspectivas para o entendimento da imunopatogênese da leishmaniose visceral.

Palavras-Chave: Corpúsculos Lipídicos; Mediadores lipídicos; *Leishmania*; *Lutzomyia longipalpis*; Saliva.

ABSTRACT

LIPID BODIES AND MEDIATORS IN THE INFLAMMATORY RESPONSE TO *Lutzomyia longipalpis* SALIVA DURING *Leishmania chagasi* INFECTION. **THÉO DE ARAÚJO SANTOS.** *Lutzomyia longipalpis* is the main transmitter of the *Leishmania chagasi*, etiologic agent of visceral leishmaniasis (VL), the most lethal form of the illness. *L. longipalpis* saliva contains molecules capable to modulate the haemostatic, inflammatory and immunologic response of the host. However, few works have investigated the role of the components of the vector saliva in the induction of lipid mediators production and its implication at the early steps of the *Leishmania* infection. In this work, we investigated the role of the salivary gland sonicate (SGS) of *L. longipalpis* in the induction of lipid bodies (LB) and mediators production during early steps of *L. chagasi* infection. SGS was capable to induce *in vitro* LBs formation and PGE₂ production in the murine peritoneal macrophages. During C57BL/6 mice infection by *L. chagasi*, presence of *L. longipalpis* saliva increased the LBs formation in macrophages after 3 hours of stimuli, which was correlated with the large cellular influx to the inflammatory site, mainly neutrophils. *L. chagasi* infection in the presence of *L. longipalpis* SGS induced the LTB₄ and PGE₂ production in the peritoneal leukocytes *ex vivo*. After 3 hours, macrophages and neutrophils infection, as well as the interaction between these cells was observed. Percentage of macrophages infected and the parasite number per macrophage were reduced during infection in the presence of SGS. In set, our results indicates that the vector saliva plays a important role in the modulation of the inflammation during early steps of *L. chagasi* infection and they open new insights to learning of visceral leishmaniasis immunopathogenesis.

Keywords: Lipid bodies; Lipid mediators; *Leishmania*; *Lutzomyia longipalpis*; Saliva.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	-	Ácido Aracdônico
BODIPY	-	4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene, sonda fluorescente utilizada para marcação de corpúsculos lipídicos.
CL	-	Corpúsculo Lipídico
COX	-	Ciclooxigenase
CyPGs	-	Cis-Prostaglandinas
EIA	-	Ensaio Imunoenzimático
HBSS ^{-/-}	-	Solução Salina Balanceada de Hank sem Ca ²⁺ e Mg ²⁺ do inglês <i>Hank's Balanced Salts Solution without Ca²⁺ and Mg²⁺</i>
HBSS ^{+/+}	-	Solução Salina Balanceada de Hank com Ca ²⁺ e Mg ²⁺ do inglês <i>Hank's Balanced Salts Solution with Ca²⁺ and Mg²⁺</i>
IFN-γ	-	Interferon-γ
IL	-	Interleucina
LO	-	Lipoxigenase
LPS	-	Lipopolissacarídeo
LSH	-	<i>Leishmania</i>
LTB ₄	-	Leucotrieno B ₄
LV	-	Leishmaniose Visceral
MCP-1	-	Proteína quimiotática de Macrófagos do inglês <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MET	-	Microscopia Eletrônica de Transmissão

MIP	-	Proteína inibidora de Macrófago do inglês <i>Macrophage Inhibitory Protein</i>
NO	-	Óxido Nítrico
NS-398	-	Meta-sulfonamida N-[ciclohexilona] 4-nitrofenil, inibidor seletivo de COX-2
PACAP	-	Peptídeo de ativação da adenilato-ciclase pituitária do inglês <i>Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide</i>
PAF	-	Fator de Ativação Plaquetária do inglês <i>Platelet-Activating Factor</i>
PGE ₂	-	Prostaglandina E ₂
PLA ₂	-	Fosfolipase A ₂
ROS	-	Espécies Reativas de Oxigênio
SGS	-	Sonicado de Glândula Salivar de <i>Lutzomyia longipalpis</i>
TGF-β	-	Fator de Crescimento Transformante Beta do inglês <i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TNF-α	-	Fator de Necrose Tumoral alfa do inglês <i>Tumoral Necrosis Factor Alpha</i>
ΔMFI	-	Diferença da Intensidade Média de Fluorescência do inglês <i>Difference of Media Fluorescence Intensity</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeito dose e tempo dependente da saliva de <i>L. longipalpis</i> sobre a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais residentes de camundongos C57BL/6.....	35
Figura 2. Efeito da saliva de <i>L. longipalpis</i> sobre a produção de PGE ₂ em macrófagos peritoneais.....	36
Figura 3. Efeito de inibidores das vias de produção dos mediadores lipídicos em macrófagos estimulados com a saliva de <i>L. longipalpis</i>	37
Figura 4. Efeito <i>in vivo</i> da saliva de <i>L. longipalpis</i> sobre o recrutamento celular durante a infecção por <i>L. chagasi</i>	39
Figura 5. Corpúsculos lipídicos (CLs) em células tratadas com SGS ou infectadas por <i>L. chagasi in vivo</i>	41
Figura 6. Efeito <i>in vivo</i> da saliva de <i>L. longipalpis</i> sobre a formação de corpúsculos lipídicos em células peritoneais durante a infecção por <i>Leishmania chagasi</i>	42
Figura 7. Efeito <i>ex vivo</i> do SGS de <i>L. longipalpis</i> na produção de PGE ₂ e LTB ₄ durante a infecção por <i>L. chagasi</i>	43
Figura 8. Eventos de infecção por <i>L. chagasi in vivo</i>	44
Figura 9. Efeito da saliva de <i>L. longipalpis</i> na infecção de macrófagos por <i>L. chagasi</i>	45
Figura 10. Microscopia eletrônica de transmissão de células do lavado peritoneal de camundongos C57BL/6 tratados com SGS e <i>L. chagasi</i>	47

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais da Leishmaniose Visceral

A leishmaniose é considerada uma das principais endemias do mundo e o seu controle apresenta-se como uma das prioridades da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2008). Estima-se que cerca de 2 milhões de novos casos sejam registrados a cada ano, sendo 500 mil de leishmaniose visceral (LV), a forma mais letal desta doença, a qual é caracterizada pela presença de febre alta, perda de peso, anemia e hepatoesplenomegalia (Chappuis et al., 2007). Quando não tratados, os indivíduos infectados podem desenvolver co-infecções como pneumonia, diarreia e tuberculose e a forma sistêmica pode progredir para um quadro fatal (Manual de Vigilância da LV, 2006).

A LV tem ampla distribuição ocorrendo na África, Ásia, Europa, Oriente Médio e nas Américas (Chappuis et al., 2007). Na América do Sul, 90% dos casos registrados de LV pertencem ao Brasil, onde anualmente têm sido registrados 3156 casos em média ao longo dos últimos onze anos, tendo a incidência da LV aumentado de 1,7 para 2,7 casos por 100.000 habitantes entre 1993 e 2003. Atualmente, a LV é observada em 19 dos 27 estados da federação, com aproximadamente 1.600 municípios envolvidos, sendo 77% dos casos registrados encontrados na região Nordeste (Costa, 2005; Manual de Vigilância da LV, 2006).

O tratamento da LV é realizado pelo uso de antimoniais pentavalentes, entretanto a resistência a medicamentos tem aumentado, chegando a 50% dos casos na Índia (Chappuis et al., 2007). A ausência de uma vacina eficaz contra a doença tem incentivado pesquisas por antígenos que possam ser utilizados como novos candidatos vacinais (Palatnik-de-Sousa, 2008). Dentre os antígenos promissores para a vacinação estão as proteínas da *Leishmania*, LACK, LeIF, TSA, LmST11, H1, CpA + CpB, KMP11 e NH36, as quais apresentaram

resultados positivos em diferentes modelos experimentais (revisado em Palatnik-de-Sousa, 2008). Além dos antígenos da *Leishmania*, alguns trabalhos têm mostrado a participação de antígenos da saliva do vetor na proteção contra infecção. Neste sentido, foram obtidos alguns sucessos com vacinas utilizando a proteína Maxadilan (Milleron et al., 2004) da saliva de *L. longipalpis* e SP15 da saliva de *Phlebotomus papatasi*, as quais conferiram resistência a infecção murina por *L. major* (Valenzuela et al., 2001). A imunização com a proteína LJM19 da saliva de *L. longipalpis* conferiu proteção contra a infecção por *L. chagasi* no modelo experimental do hamster (Gomes et al., 2008). Entretanto, a combinação entre a proteína da saliva do vetor, LJM19 e a proteína de superfície do parasita, KMP11, a qual se encontra entre os antígenos mais promissores para vacinação, não conferiu proteção neste modelo. Desta forma, a busca por novos antígenos e estratégias terapêuticas para o controle da leishmaniose permanece.

1.2 Interação parasita-hospedeiro

Leishmania é um parasita digenético, caracterizado por uma forma promastigota, extracelular e uma forma amastigota, intracelular. A forma promastigota é encontrada no trato intestinal de *Diptera* da família *Psicodidae*, onde passam por diversos estágios de diferenciação até chegar à forma promastigota metacíclica ou infectiva, em um processo denominado metaciclogênese. Durante o repasto sanguíneo, o flebótomo injeta formas metacíclicas de *Leishmania* no hospedeiro. Neste momento, as promastigotas são internalizadas por células fagocíticas, tais como neutrófilos, células dendríticas imaturas e macrófagos, o seu hospedeiro celular preferencial. No vacúolo parasitóforo dessas células, se diferenciam e multiplicam na forma amastigota, rompem a membrana da célula hospedeira e

infectam outras células, possibilitando a disseminação do parasita (Sacks *et al.*, 2002). As características clínicas da leishmaniose dependem da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção e do hospedeiro vertebrado (Chappuis *et al.*, 2007).

A LV humana pode ser reproduzida no modelo experimental murino. Em camundongos C57BL/6 e BALB/c, a injeção intravenosa de *L. chagasi* leva ao aumento do baço e do fígado, resultando em um aumento da carga parasitária nestes órgãos, nos quais ocorre o desenvolvimento de uma imunidade órgão-específica (Liese *et al.*, 2007). O fígado é o sítio de resolução da infecção aguda associada com o desenvolvimento de granulomas inflamatórios circundados por células de Kupffer infectadas e resistência a reinfeção. O baço, embora seja um sítio inicial para a produção da resposta imune mediada por célula, se torna um sítio de persistência da infecção com mudanças imunopatológicas associadas. O progresso da doença é caracterizado pelo imunocomprometimento do hospedeiro associado com altos níveis de TNF e IL-10 (revisado em Stanley e Engwerda, 2007).

1.3 Papel da saliva do vetor durante os estágios iniciais da infecção por *Leishmania*

As leishmanioses têm como vetores, dípteros pertencentes à ordem *Phlebotominae*, sendo os principais gêneros de importância médica *Phlebotomus* e o *Lutzomyia*, endêmicos do Velho Mundo e das Américas, respectivamente (Soares e Turco, 2003). No Brasil, o agente etiológico da LV é a *Leishmania chagasi* que é transmitida principalmente pelo flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*.

Durante o repasto de fêmeas de flebotomíneos, os capilares epiteliais são lacerados formando um lago sanguíneo, onde a *Leishmania* é inoculada juntamente com a saliva do vetor. Componentes salivares do flebótomo afetam a atividade hemostática do hospedeiro,

facilitando a formação do lago sangüíneo pela inibição da coagulação, aumento da vasodilatação e atração de leucócitos para o local da picada (Charlab et al., 1995; Ribeiro, 1987). Este cenário favorece a infecção do hospedeiro vertebrado pela *Leishmania* (Andrade et al., 2007; Andrade et al., 2005).

Dentre as propriedades da saliva de *L. longipalpis* está a capacidade de estimular o recrutamento celular. Utilizando o modelo de bolsão inflamatório, Teixeira e cols. (2005) demonstraram experimentalmente que o sonicado de glândula salivar de *L. longipalpis* foi capaz de induzir um aumento no recrutamento de macrófagos após 12 horas de estímulo em camundongos BALB/c, mas não em camundongos C57BL/6. Este aumento foi correlacionado a expressão de CCL2/MCP-1 e seu receptor CCR2 (Teixeira et al., 2005). A saliva de *Phlebotomus dubosqi* atrai monócitos *in vitro* (Anjili et al., 1995) e a saliva de *P. papatasi*, não só atrai macrófagos como também favorece a infecção por *Leishmania donovani* nestas células aumentando a carga parasitária (Zer et al., 2001). Além de induzirem o recrutamento de macrófagos, os componentes salivares de *L. longipalpis* inibem uma resposta pró-inflamatória em monócitos humanos estimulados com LPS, quando tratados com sonicado de glândula salivar, os quais são induzidos a reduzir a produção de citocinas como TNF- α e IL-10, ao passo que aumentam a produção de IL-6 (Costa et al., 2004). A saliva de *L. longipalpis* inibe a capacidade de macrófagos de apresentar antígenos de *Leishmania* a linfócitos T (Theodos and Titus, 1993). Foi demonstrado que a saliva de *P. papatasi* é capaz de inibir a apresentação de antígeno e a produção de óxido nítrico em macrófagos infectados por *Leishmania major*, importante mecanismo microbicida no controle da infecção (Bogdan et al., 2000; Hall and Titus, 1995; Theodos and Titus, 1993).

A saliva de *L. longipalpis* também foi capaz de estimular o influxo de neutrófilos no modelo peritonial murino, o qual foi aumentado durante a infecção por *L. major* (Monteiro et al. 2007). Dados do nosso grupo revelaram que a saliva de *L. longipalpis* induziu um rápido edema com acúmulo de neutrófilos quando inoculada intradermicamente na orelha de camundongos previamente expostos a picada natural do flebotomíneo (Silva et al. 2005). Em estudo realizado recentemente, Peters e cols. (2008) demonstraram em tempo real que a picada do *Phlebotomus duboscqi* foi capaz de induzir o rápido influxo de neutrófilos para o local da picada. Entretanto, se a saliva de flebotomínios têm uma participação direta no influxo de neutrófilos para o sítio da infecção e qual é a participação de seus componentes neste contexto ainda não foi avaliado até o presente estudo.

Recentemente as proteínas da saliva de *L. longipalpis* foram purificadas e tiveram seus cDNAs descritos (Anderson et al., 2006). Dentre os componentes da saliva identificados que já tem atividade bem caracterizada na literatura estão: maxadilan (6,5 kDa), peptídeo com potente atividade vasodilatadora (Lerner et al., 1991; Svensjo et al. 2009); apirase (35,07 kDa), enzima com a ação anti-agregação plaquetária e anti-inflamatória que hidrolisa ADP e ATP a AMP e ortofosfato; hialuronidase (42,28 kDa), enzima que auxilia na difusão de agentes farmacológicos da própria saliva na pele (Cerna et al., 2002); yellow (45 e 14 kDa), proteína que parece ter função na oxidação de norepinefrina; adenosina desaminase (52 kDa), enzima que hidrolisa a adenosina em inosina, que possui efeitos antiinflamatórios (Charlab et al., 2000); adenosina e AMP, envolvidos na vasodilatação e anti-agregação plaquetária, substâncias que inibem a síntese de óxido nítrico e a função de linfócitos (Katz et al., 2000); alfa-amilase (54,02 kDa), enzima responsável pela digestão de carboidratos (Ribeiro et al., 2000); 5'-nucleotidase (60,62 kDa), pertencente a família das apirases, essa enzima degrada

AMP à adenosina, uma proteína com atividade vasodilatadora, anti-agregante plaquetária e imunossupressora (Charlab et al., 1999); além de proteínas com função ainda desconhecida, como as proteínas da família D7 (15,5 a 36,3 kDa), apesar de estarem expressas em grande quantidade na saliva de flebotomíneos (Valenzuela et al., 2002) e a família antígeno-5 (28,8 kDa) (Valenzuela et al., 2001).

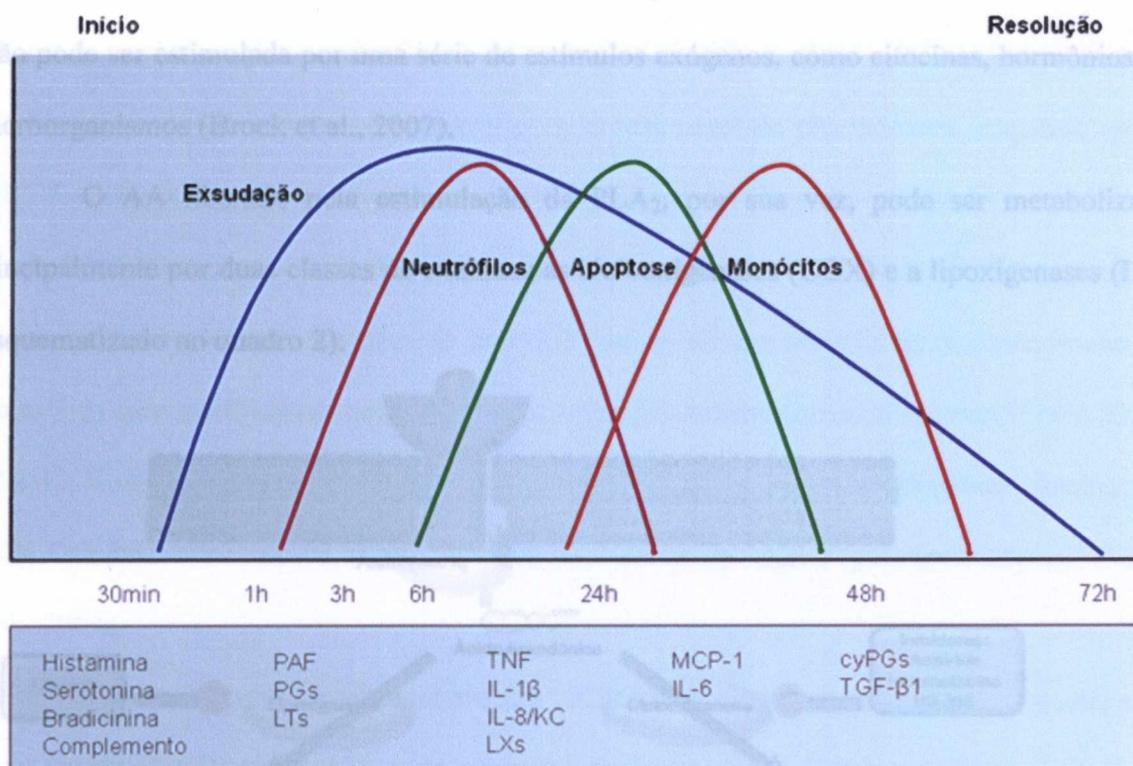
Apesar do conhecimento sobre a ação de alguns componentes da saliva de *L. longipalpis*, pouco é conhecido sobre o seu efeito na indução da produção de mediadores lipídicos. Apenas o maxadilan, proteína presente na saliva de *L. longipalpis*, foi implicado em ativar a produção de PGE₂, IL-6 e IL-10 em macrófagos murinos através de um receptor que reconhece um neuropeptídeo, o PACAP, enquanto que reduziu a produção de TNF- α (Bozza et al., 1998; Soares et al., 1998; Svensjo et al. 2009).

Neste trabalho, buscamos avaliar o papel da saliva total de *L. longipalpis* na indução de mediadores lipídicos e suas implicações na infecção por *L. chagasi*.

1.4 Mediadores lipídicos

Os mediadores lipídicos desempenham um papel importante nos estágios iniciais da inflamação, bem como nas etapas de resolução do processo inflamatório. Após a lesão tecidual, a produção de prostaglandinas e leucotrienos está associada ao processo de vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e recrutamento celular de neutrófilos, gerando uma resposta pró-inflamatória, característica dos primeiros estágios da resposta inflamatória aguda. Já nos estágios tardios, a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos recrutados para o sítio inflamatório induz uma mudança na categoria de mediadores lipídicos para um perfil anti-inflamatório e, conseqüentemente, há uma redução no

influxo de células ao local da lesão associado ao processo de resolução da inflamação (esquemático no quadro 1) (Lawrence et al., 2002).

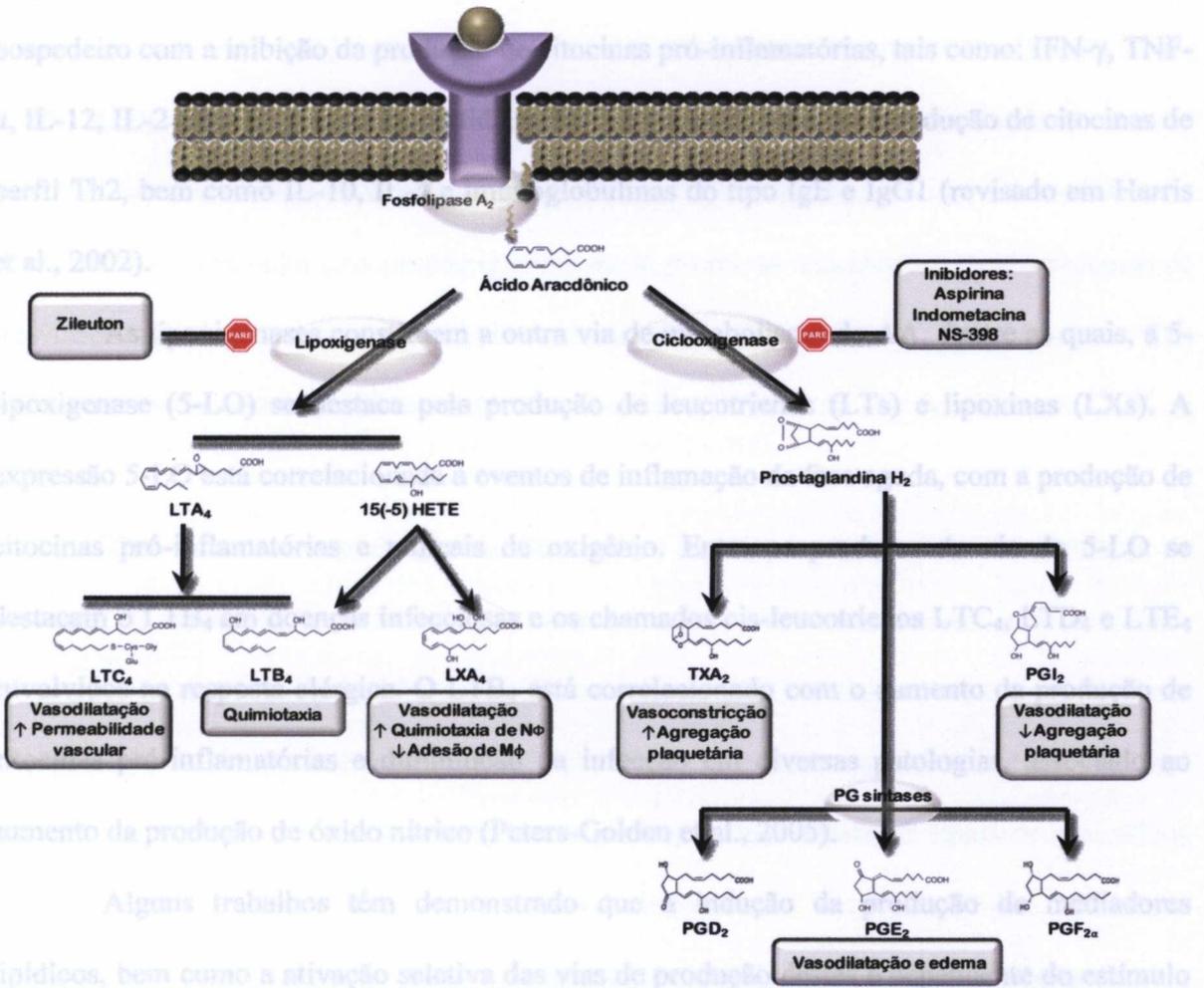


Quadro 1. Representação esquemática das etapas da cinética de resolução da inflamação e tabela mostrando os principais mediadores inflamatórios produzidos ao longo dessa cinética (adaptado de Lawrence et al., 2002).

Mediadores lipídicos da inflamação são moléculas orgânicas biologicamente ativas que são liberadas no decorrer da resposta inflamatória. Os mediadores lipídicos mais estudados são os eicosanóides, uma família de metabólitos derivados da oxidação do ácido araquidônico (AA), uma molécula de 20 carbonos. O AA faz parte de ácidos graxos que encontram-se na porção *sn*-2 dos fosfolipídios de membrana e sua disponibilidade depende da capacidade relativa de enzimas de realizarem sua remoção ou reinserção nos fosfolipídios (Brock et al., 2007). O processo de desacilação ou liberação do AA dos fosfolipídios de

membrana está associado à atividade da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂), a qual possui três famílias: a secretória e a citosólica, ambas dependentes de Ca²⁺ e a iPLA₂, independente de cálcio. A PLA₂ citosólica (cPLA₂) está envolvida no processo de síntese de eicosanóides e sua ação pode ser estimulada por uma série de estímulos exógenos, como citocinas, hormônios ou microorganismos (Brock et al., 2007).

O AA liberado pela estimulação da PLA₂, por sua vez, pode ser metabolizado principalmente por duas classes de enzimas: as ciclooxigenases (COX) e a lipoxigenases (LO) (esquemático no quadro 2).



Quadro 2. Representação esquemática das vias de produção dos principais eicosanóides e de suas funções durante a resposta inflamatória (adaptado de Robbins & Cotran, 2005).

As COXs são isoenzimas que catalisam, a partir do AA, a formação de prostaglandina H_2 , a qual pode ser convertida pela ação de PG sintases célula-específica em diversas moléculas biologicamente ativas, tais como: PGE_2 , $PGF_2\alpha$, PGI_2 , PGD_2 e tromboxano A_2 (TXA_2), coletivamente conhecidos como prostanóides (Funk, 2001). COX-1 tem expressão constitutiva, sendo a enzima responsável pela síntese basal de prostanóides, enquanto que a COX-2 é importante em vários processos inflamatórios devido a sua expressão ser induzível (Funk, 2001). No contexto da infecção com microorganismos, a produção de prostaglandina E_2 tem sido associada ao aumento da produção de cAMP e supressão da resposta imune do hospedeiro com a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como: $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$, IL-12, IL-2 e IL-1 β . Em contrapartida, a PGE_2 é capaz de induzir a produção de citocinas de perfil Th2, bem como IL-10, IL-4 e imunoglobulinas do tipo IgE e IgG1 (revisado em Harris et al., 2002).

As lipoxigenases constituem a outra via de metabolismo do AA, dentre as quais, a 5-lipoxigenase (5-LO) se destaca pela produção de leucotrienos (LTs) e lipoxinas (LXs). A expressão 5-LO está correlacionada a eventos de inflamação da fase aguda, com a produção de citocinas pró-inflamatórias e radicais de oxigênio. Entre os produtos da via da 5-LO se destacam o LTB_4 em doenças infecciosas e os chamados cis-leucotrienos LTC_4 , LTD_4 e LTE_4 envolvidos na resposta alérgica. O LTB_4 está correlacionado com o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e diminuição da infecção em diversas patologias, associado ao aumento da produção de óxido nítrico (Peters-Golden et al., 2005).

Alguns trabalhos têm demonstrado que a indução da produção de mediadores lipídicos, bem como a ativação seletiva das vias de produção destes é dependente do estímulo envolvido. No contexto da inflamação induzida pela picada de artrópodes, por exemplo, foi

demonstrado que a saliva do *Ixodes scapularis* possui PGE₂ em doses farmacológicas, o qual seria responsável pela inibição da maturação de células dendríticas do hospedeiro resultando na ineficiência no estabelecimento de uma resposta imune do hospedeiro aos componentes da saliva do hospedeiro (Sa-Nunes et al., 2007).

1.5 Corpúsculos lipídicos

Corpúsculos lipídicos (CLs) são organelas citoplasmáticas compostas de um conjunto de lipídios neutros, tais como diacilglicerol, triacilglicerol, caveolina e ésteres de colesterol circundados por uma hemi-membrana composta de fosfolipídios (revisado em D'Avila et al., 2008). Além destes componentes, os CLs apresentam uma grande quantidade de AA, o principal substrato utilizado na síntese de mediadores lipídicos, tais como os eicosanóides. Os CLs também apresentam uma grande quantidade de proteínas relacionadas com o processo de sinalização celular e endereçamento de vesículas (Wan et al., 2007). Além disso, os CLs podem apresentar enzimas diretamente relacionadas à síntese de eicosanóides, as COXs e LOs.

Tem sido demonstrado que os CLs podem ser os principais sítios intracelulares de produção de eicosanóides, uma vez que possuem todo o aparato enzimático e de substrato. Além disso, o ambiente hidrofóbico dos CLs seria ideal para o funcionamento da maquinaria responsável pela síntese de mediadores lipídicos. Foi demonstrado que a formação de CLs, sua constituição lipídica e o seu engajamento na produção de mediadores lipídicos específicos estão diretamente correlacionados ao estímulo inflamatório envolvido. Neste sentido, a formação de CLs em leucócitos teria um importante papel durante a resposta inflamatória em diversos processos patogênicos (revisado em D'Avila et al., 2008).

No contexto da infecção por patógenos, tem sido mostrado que estas organelas participam ativamente da produção de mediadores durante a infecção. Pacheco e cols. (2002) mostraram que LPS é capaz de induzir a formação de CLs de maneira dose e tempo dependente e identificou nestas organelas enzimas das vias de produção de leucotrienos e prostaglandinas, o que esteve associado com a produção destes mediadores *in vivo*. Componentes isolados da membrana de microorganismos tais como de *M. bovis* aumentaram a quantidade de corpúsculos lipídicos em macrófagos, o que esteve associado com um aumento na produção de PGE₂ (D'Avila et al., 2008). Ainda neste contexto, Melo e cols. (2003) mostraram que durante a infecção em ratos por *Trypanosoma cruzi* houve uma intensa formação de CLs em macrófagos peritoneais, o que esteve correlacionada com a produção de PGE₂ no sítio inflamatório (Melo et al., 2003; Melo et al., 2006). Durante infecção por *T. cruzi* a presença no tecido cardíaco de corpúsculos lipídicos em macrófagos infectados é um indício de ativação celular (Melo et al., 2008).

1.6 Mediadores lipídicos na infecção por *Leishmania*

Os mediadores lipídicos desempenham um papel crucial na infecção por *Leishmania*. A presença de pequenas doses de LTB₄ levou à redução da carga parasitária durante a infecção por *Leishmania amazonensis* em macrófagos peritoneais murinos, em um mecanismo associado ao aumento da produção de óxido nítrico (Lonardoni et al., 2000; Serezani et al., 2006). Entretanto, a infecção por *L. donovani* de macrófagos induziu uma maior expressão de ciclooxigenase, PGE sintase e a produção de prostaglandinas quando comparada a infecção por *L. major*, o que sugere haver a indução de respostas distintas a depender da espécie de *Leishmania* (Gregory et al., 2008; Matte et al., 2001).

A produção de PGE₂ parece desempenhar um papel crucial durante a infecção por *L. donovani*. Neste sentido, foi demonstrado que macrófagos murinos infectados por *L. donovani* tem o metabolismo de AA direcionado à produção de PGE₂ (Reiner, 1984; Reiner, 1985; Reiner, 1988). A interação entre macrófagos humanos infectados e neutrófilos apoptóticos no modelo experimental humano (Afonso et al., 2008) e murino (Ribeiro-Gomes et al., 2005) resultou no sucesso da infecção por *Leishmania* e aumento da carga parasitária por um mecanismo de supressão da resposta imune dependente da produção de PGE₂ e TGF-β.

Os CLs e mediadores lipídicos estão envolvidos na patogênese de diversas doenças, incluindo as doenças parasitárias (revisado em D'Ávila et al., 2008). Entretanto, não existem trabalhos demonstrando a participação de CLs na infecção por *Leishmania* e poucos estudos têm como enfoque o papel dos mediadores lipídicos durante os primeiros estágios da infecção. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo principal avaliar o papel da saliva de *L. longipalpis* na produção de mediadores lipídicos durante os estágios iniciais da infecção por *L. chagasi*.

2. JUSTIFICATIVA

Alguns trabalhos têm demonstrado que os eicosanóides desempenham um importante papel durante o estabelecimento da infecção por *Leishmania sp.*. Entretanto, pouco se sabe sobre o efeito da saliva de *Lutzomyia longipalpis* na produção desses mediadores. Desta forma, entender se a saliva de *L. longipalpis* é capaz de induzir a produção de eicosanóides e se esta indução está correlacionada com a modulação da resposta imune do hospedeiro no momento da infecção por *L. chagasi* é de grande interesse para o entendimento da imunopatogênese da leishmaniose visceral.

3. HIPÓTESE

A saliva de *Lutzomyia longipalpis* induz a formação de corpúsculos lipídicos e produção de mediadores lipídicos modulando a resposta inflamatória durante os estágios iniciais da infecção por *Leishmania chagasi*.

4. OBJETIVOS

Geral

Investigar o papel da saliva de *Lutzomyia longipalpis* na indução da formação de corpúsculos lipídicos e produção de mediadores lipídicos durante os estágios iniciais da infecção por *Leishmania chagasi*.

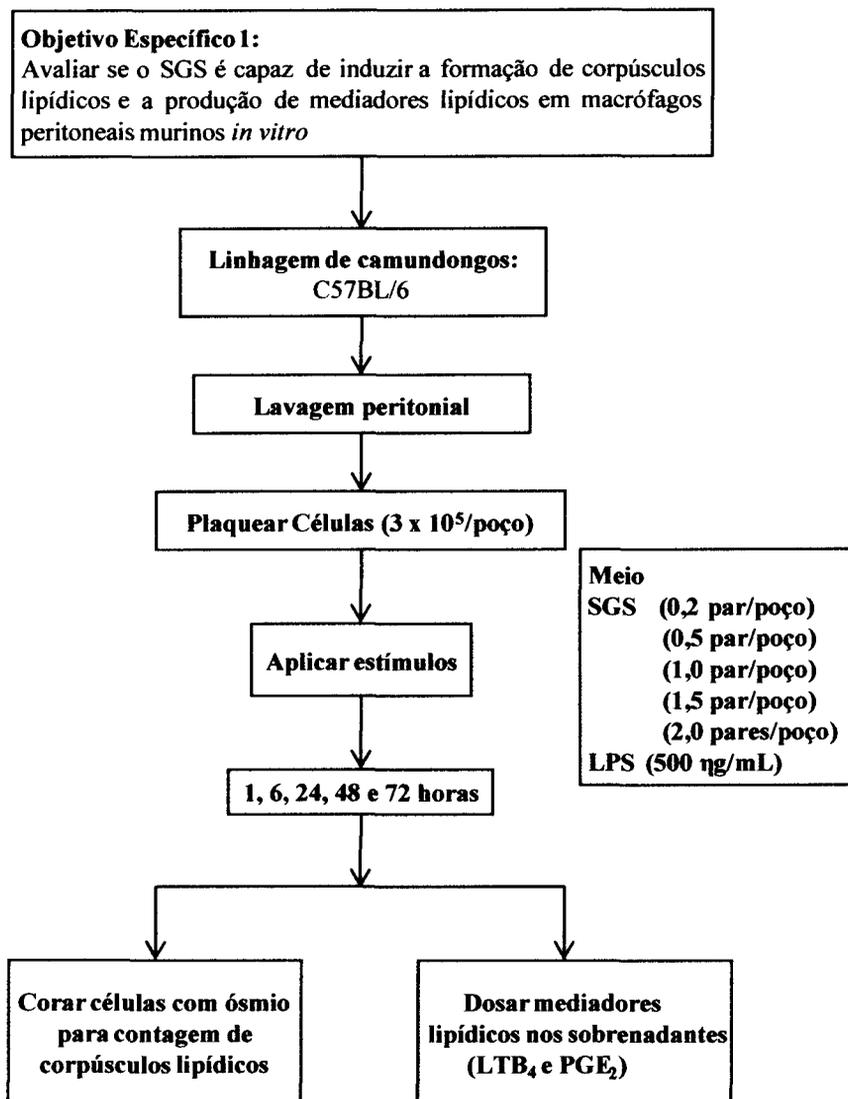
Específicos

- Avaliar se o SGS é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos e a produção de mediadores lipídicos em macrófagos peritoneais murinos *in vitro*;

- Avaliar o efeito *in vivo* do SGS durante a infecção por *Leishmania chagasi* na formação de corpúsculos lipídicos e recrutamento celular;
- Verificar o efeito *in vivo* do SGS durante a infecção por *L. chagasi* na produção de mediadores lipídicos, na taxa de infecção e ultra-estrutura celular.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

DESENHO EXPERIMENTAL *IN VITRO*



DESENHO EXPERIMENTAL *IN VIVO***Objetivo Específico 2:**

Avaliar o efeito *in vivo* do SGS durante a infecção por *Leishmania chagasi* na formação de corpúsculos lipídicos, produção de mediadores lipídicos, recrutamento celular e taxa de infecção durante os estágios iniciais da infecção.

Linhagem de camundongos:
C57BL/6

Injeção intraperitoneal com estímulos:
Salina, SGS, *L. chagasi*, *L. chagasi* + SGS

3 e 6 horas

Lavagem peritoneal

Citospin e coloração
por HE:
contagem diferencial;
taxa de infecção.

Quantificação
de CLs por
citometria de
fluxo

Avaliação da
Produção de
mediadores
lipídicos pelo
EIA

Microscopia de
Fluorescência e
MET

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1- Animais. Foram utilizados camundongos machos, isogênicos, da linhagem C57BL/6 com idade entre 6 e 8 semanas e pesando entre 20 e 25g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) (CEUA – 006/2008) e mantidos com água e ração balanceada *ad libitum*.

5.2- Obtenção de insetos e criação. Os flebotomíneos foram coletados na localidade de Cavunge, município de Ipecaetá, no estado da Bahia, utilizando-se armadilhas luminosas do tipo HP (Hoover Pugedo). Exemplares de *L. longipalpis* foram criados no Insetário do Laboratório de Imunoparasitologia do CPqGM – FIOCRUZ/Ba, para extração da glândula salivar. Para criação desses insetos, as fêmeas foram alimentadas em hamsters (*Mesocricetus auratus*) sadios, provenientes do biotério do CPqGM. Após a alimentação, as fêmeas ingurgitadas foram colocadas em potes para ovoposição e mantidas com solução açucarada em uma estufa incubadora (B.O.D) a 24°C. Após a eclosão das larvas, estas foram mantidas com ração até completar o seu ciclo de vida, chegando à fase de inseto adulto.

5.3- Obtenção e preparo de sonicação de glândula salivar (SGS). As glândulas salivares foram obtidas de fêmeas de *L. longipalpis*. Após a dissecação, as glândulas foram estocadas em uma solução PBS estéril à -70°C. Imediatamente antes do uso, as glândulas foram sonicadas, utilizando um sonicador Branson Sonifier 250 com a frequência de 40 Hz e 60 pulsos. Em seguida, o SGS foi submetido à centrifugação 10.000 rpm por 4 minutos para precipitar o epitélio glandular e o sobrenadante contendo SGS foi utilizado para os experimentos. Os

níveis de contaminação por LPS das preparações de SGS foram determinados utilizando o kit colorimétrico comercial LAL (QCL-1000, Lonza Bioscience), resultando em níveis negligenciáveis de endotoxina no sobrenadante do sonicado de glândula salivar. Além disso, os sobrenadantes de macrófagos peritoneais estimulados com 0,5 par de SGS por 6 horas não apresentaram níveis detectáveis de TNF- α quando avaliados pela técnica de ELISA.

5.4- Obtenção, diferenciação e cultivo de macrófagos peritoneais murinos.

Resumidamente, nós obtivemos macrófagos peritoneais residentes a partir da lavagem intraperitoneal de camundongos C57BL/6 com 10 mL de RPMI 1640 (GIBCO) estéril a 4°C. Após a centrifugação a 400 x *g* por 10 minutos, as células foram ressuspensas para contagem em RPMI 1640 suplementado com HEPES 25mM, Nutridoma-sp 1% (ROCHE, 11 011 375 001), penicilina 100 μ g/ml e streptomicina 100 μ g/ml (Gibco, Carlsbad, CA, USA). Em seguida, as células foram diluídas no mesmo meio para uma concentração final de 3×10^5 /mL e distribuídas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro 13mm estéreis, sendo mantidas em estufa a 37°C e CO₂ 5%, por 1 hora. Após este período, as células foram submetidas a cinco lavagens para retirada das células não aderentes e re-incubadas com meio RPMI suplementado por 24 horas para diferenciação dos macrófagos.

5.5- Ensaio de cinética e dose-resposta com macrófagos peritoneais induzidos por SGS *in vitro*.

Os macrófagos peritoneais foram estimulados com diferentes concentrações de SGS de *L. longipalpis* (0,2, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 pares/poço), 500 ng/mL de lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* como controle positivo, ou não receberam estímulo, controle negativo. Após

os tempos de 1, 6, 24, 48 e 72 horas de estímulo, os sobrenadantes foram coletados, congelados e armazenados a -20°C para dosagem dos mediadores lipídicos. As células foram fixadas para processamento e avaliação da formação de corpúsculos lipídicos.

5.6- Marcação e quantificação de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais *in vitro*. Após os tratamentos, macrófagos peritoneais foram submetidos à fixação com formaldeído 3,7% em HBSS^{-/-} (pH 7,4) por 10 min. Em seguida, as células foram lavadas em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,4) e tratadas com tetróxido de ósmio 1,5% por 30 minutos. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas com água MilliQ e incubadas com solução de tiocarbohidrazida 1% por 5 minutos, para redução do ósmio. Então, as lamínulas foram submetidas a novas lavagens com água e tampão cacodilato 0,1M, contrastadas com tetróxido de ósmio 1,5% por 3 minutos. Por fim, as preparações foram lavadas com água MilliQ duas vezes e montadas em lâminas de vidro em meio aquoso (Aquapolymount – polivinil álcool – vinil acetato). As preparações foram analisadas ao microscópio óptico com a objetiva de 100 vezes. Os corpúsculos de 50 células consecutivas foram contados e os resultados expressos como média de corpúsculos por célula (Pacheco et al., 2002).

5.7- Dosagem de Mediadores Lipídicos. A dosagem de PGE_2 e LTB_4 no sobrenadante de células estimuladas como descrito acima foi realizada pela técnica de EIA (Enzyme Immuneassay) como indicado pelo fabricante do kit de dosagem (Cayman Chemical) (D'Avila et al., 2008).

5.8- Estímulos intraperitoneais e avaliação de recrutamento celular. Camundongos C57BL/6 (n=5, por grupo) foram inoculados com 100µL de salina estéril (controle negativo), LPS (500ng/animal; controle positivo), SGS (0,5 par/animal) e 3×10^6 *L. chagasi*, ou SGS junto com *L. chagasi*. Após os tempos de 3 e 6 horas foi realizada a lavagem peritoneal dos animais com 10 mL de HBSS^{-/-}. Foram retiradas alíquotas de 200 µL do exsudato para preparação de cito-centrifugados, as quais foram coradas com kit panótico rápido (LB, Laborclin, 620529) e analisadas pela contagem diferencial de leucócitos ao microscópio óptico em objetiva de 40x. Foram contadas 200 células por tratamento, sendo os valores absolutos obtidos para cada tipo celular pela contagem total dos leucócitos em câmara de Neubauer e multiplicados pelo percentual diferencial quantificado nas preparações (Teixeira et al., 2005).

5.9- Quantificação de corpúsculos lipídicos por citometria de fluxo. Células do lavado peritoneal obtidas de camundongos estimulados como descrito acima foram centrifugadas a 400 x g, ressuspensas em 1 µM de 4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY® 493/503), o qual é uma sonda fluorescente que se liga a lipídios neutros. Após incubação por 30 min, as células foram lavadas 2 vezes com 500 µl de HBSS^{-/-} e submetidas a análise pela técnica de citometria de fluxo (adaptado de Plotkowski, 2008). As amostras foram adquiridas em um citômetro FAC Sort e analisadas com o software Cell Quest (Becton Dickinson and Company, 1997).

5.10- Marcação de corpúsculos lipídicos para microscopia de fluorescência. As células de camundongos estimulados (item 5.8) foram centrifugadas a 400 x g, e fixadas em formalina 3,7% por 10 minutos. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com HBSS^{-/-} e

incubadas com 1 μM de 4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY® 493/503). Após incubação por 30 min, as células foram lavadas 2 vezes com 500 μl de HBSS^{-/-} e submetidas a confecção de citospins. As preparações foram montadas em meio Vecta Shield contendo DAPI e analisadas ao microscópio de fluorescência modelo Olympus (adaptado de D'Ávila, 2006).

5.11- Microscopia Eletrônica de Transmissão. Células do lavado peritoneal de camundongos foram centrifugadas e fixadas em uma mistura de aldeídos recém preparada (paraformaldeído 1% e glutaraldeído 1%) diluída em tampão fosfato 0,1 M e mantidas a 4°C até o processamento. Em seguida, as células foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 1,5 % (concentração final), desidratadas e incluídas em resina Epon (PolyBed 812; Polysciences). Por fim, os cortes foram montados em malhas de cobre de 200 meshes, contrastados com acetato de uranila e, então, visualizados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 109 (D'Avila et al., 2006).

5.12- Estimulação de Leucócitos *ex vivo*. Camundongos C57BL/6 (n=5, por grupo) foram inoculados com 100 μL de salina estéril (controle negativo), LPS (500 ηg /animal; controle positivo), SGS (0,5 par/animal) e 3x10⁶ *L. chagasi*, ou SGS junto com *L. chagasi*. Após 3 e 6 horas de estímulo, foi realizado o lavado peritoneal dos animais com 10 mL de HBSS^{-/-}. As células foram centrifugadas a 400 x g, ressuspendidas em HBSS^{+/+} e contadas em câmara de Neubauer. Então, 1x10⁶ células foram estimuladas com 1 mL de ionóforo de cálcio A23187 (0,5 μM) em HBSS^{+/+} por 15 min. A reação foi parada no gelo e as amostras foram

centrifugadas a 500 x g por 10 min a 4°C. LTB₄ e PGE₂ foram quantificados nos sobrenadantes pelo método de EIA, como descrito acima (item 5.7) (Pacheco et al., 2002).

5.13- Análise Estatística. Os ensaios *in vitro* foram realizados utilizando macrófagos provenientes de três pools diferentes de células por grupo. Cada experimento foi repetido no mínimo três vezes, sendo utilizado o teste *t* de student para comparar os grupos estimulados em relação ao grupo controle. Para os ensaios *in vivo* foram utilizados 5 animais por grupo. Os dados foram representados como média ± desvio padrão e analisados utilizando o teste Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn para avaliar a significância entre os grupos. Todas as análises foram realizadas no Software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, 2007).

6. RESULTADOS

6.1 A saliva de *L. longipalpis* induz a formação de corpúsculos lipídicos e PGE₂ em macrófagos peritoneais *in vitro*. Os corpúsculos lipídicos têm sido utilizados como indicadores de ativação celular e produção de mediadores lipídicos durante diversos processos inflamatórios (Bozza et al., 2007; D'Avila et al., 2008). Para verificar se a saliva de *L. longipalpis* é capaz de ativar a formação de corpúsculos lipídicos relacionados à resposta inflamatória, nós realizamos ensaios *in vitro* de dose e tempo resposta com macrófagos peritoneais residentes de camundongos C57BL/6. O efeito no tratamento com doses crescentes do sonicado de glândula salivar de *L. longipalpis* (SGS) (0,2 à 2,0 pares de glândula) foram avaliados entre os tempos de 1 à 72 horas. SGS foi capaz de induzir um aumento na quantidade de corpúsculos lipídicos em macrófagos murinos de maneira dose (figura 1C) e tempo (figura 1D) dependente, sendo o efeito mais acentuado no tempo de 24 horas para as doses de 1,5 e 2,0 pares.

Para verificar se a formação de corpúsculos lipídicos induzidos pela saliva de *L. longipalpis* estava associada à produção de eicosanóides, nós realizamos dosagens de mediadores lipídicos (PGE₂ e LTB₄) nos sobrenadantes de cultura. SGS foi capaz de estimular a produção de PGE₂, quando utilizados 1,5 e 2,0 pares de SGS (figura 2), enquanto que os níveis de LTB₄ não foram detectáveis (dados não mostrados).

Estes resultados mostraram que a saliva de *L. longipalpis* é capaz de estimular a formação de corpúsculos lipídicos e a produção de PGE₂ em macrófagos peritoneais.

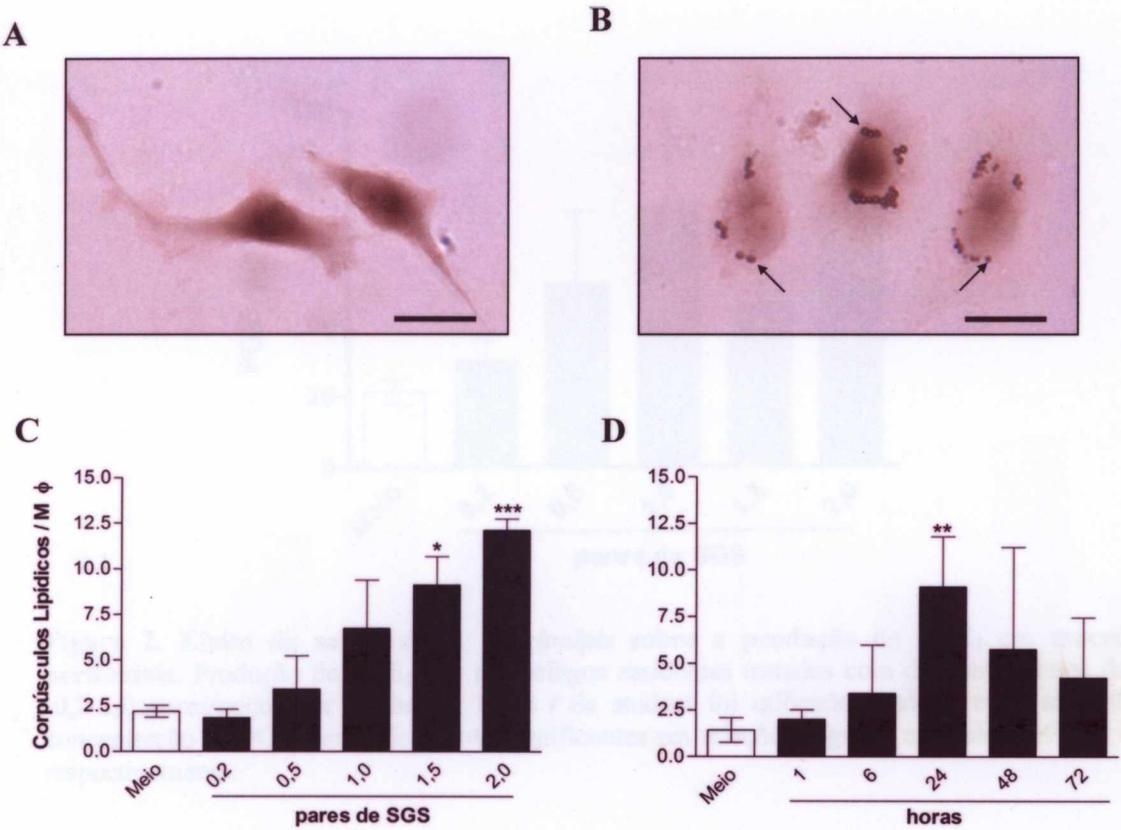


Figura 1. Efeito dose e tempo dependente da saliva de *L. longipalpis* sobre a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais residentes de camundongos C57BL/6. Micrografia representativa da marcação dos corpúsculos lipídicos pela técnica de coloração por tetróxido de ósmio em macrófagos não-tratados (A) ou tratados com 1,5 par de SGS por 24 horas (B), indicado por setas. Avaliação dose resposta de formação de corpúsculos lipídicos de macrófagos estimulados com doses crescentes de SGS (0,2 – 2,0 pares/ poço) por 24 horas. (C) Cinética de indução de corpúsculos lipídicos em macrófagos tratados com 1,5 par de SGS. (D) Os corpúsculos lipídicos foram contados após marcação utilizando a objetiva de 100x. Barra, 10µm. Teste *t* de Student foi utilizado sendo *, ** e *** aumento na quantidade de corpúsculos lipídicos estatisticamente significantes em relação ao grupo controle, $p < 0,5$, 0,01 e 0,001, respectivamente.

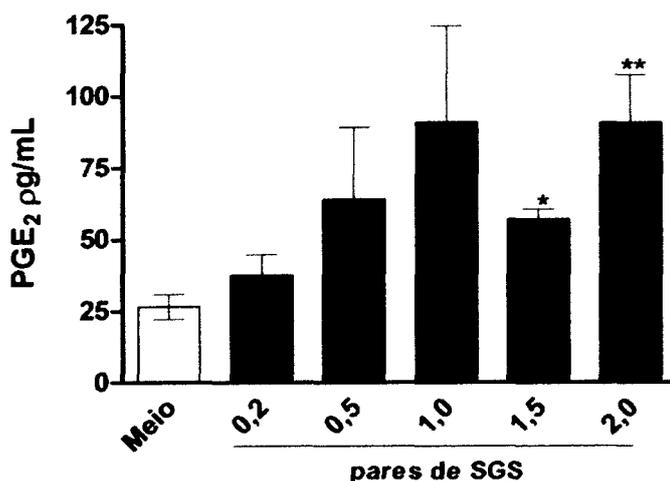


Figura 2. Efeito da saliva de *L. longipalpis* sobre a produção de PGE₂ em macrófagos peritoneais. Produção de PGE₂ por macrófagos residentes tratados com diferentes doses de SGS (0,2-2,0 pares/poço) por 24 horas. Teste *t* de student foi utilizado sendo * e ** aumentos na concentração de PGE₂ estatisticamente significantes em relação ao grupo controle, $p < 0,05$ e $0,01$ respectivamente.

6.2 A saliva de *L. longipalpis* induz a produção de mediadores lipídicos em macrófagos peritoneais via COX-2 e 5-LO. A produção de prostaglandinas é realizada por uma enzima denominada ciclooxigenase (COX) que existe sob duas formas, sendo uma de expressão constitutiva (COX-1) e outra induzível (COX-2) em resposta à estímulos inflamatórios (Brock et al., 2007). Para avaliar se o SGS é capaz de ativar a via induzível de produção de PGE₂, nós utilizamos o NS-398, um inibidor seletivo de COX-2. O tratamento com NS-398 reduziu a produção de PGE₂ induzida por 1,5 par de SGS aos níveis basais (figura 3), sugerindo que a produção de PGE₂ em macrófagos peritoneais induzida pelo SGS de *L. longipalpis* ocorre por um mecanismo dependente de COX-2.

Nós também avaliamos a capacidade da saliva de induzir a produção de LTB₄. Foi observada uma tendência de aumento na produção de LTB₄ após o tratamento com 1,5 par de SGS, embora não tenha sido estatisticamente significante. Este efeito foi revertido pela

utilização do zileuton, um inibidor da enzima 5-LO, uma vez que a produção de LTB_4 retornou aos níveis basais em macrófagos tratados com a droga junto com o SGS (figura 3B).

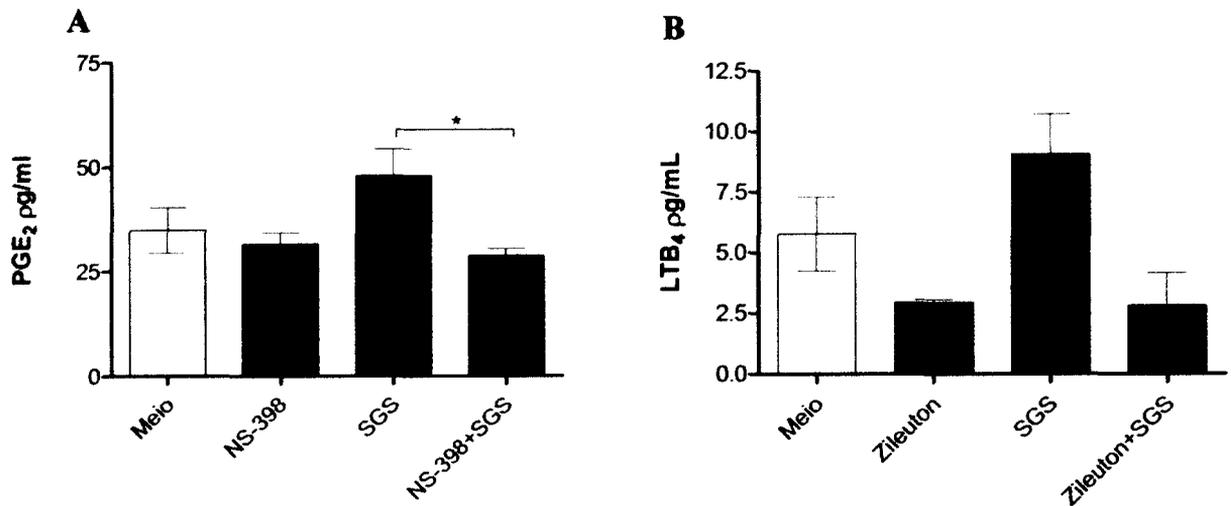


Figura 3. Efeito de inibidores das vias de produção dos mediadores lipídicos em macrófagos estimulados com a saliva de *L. longipalpis*. Macrófagos residentes foram tratados NS-398 1 μ M (A) ou Zileuton 10 μ M (B) por 1 hora, antes da incubação com 1,5 par de SGS. Após 4 e 24 horas de estímulo foi realizada a dosagem de LTB_4 e PGE_2 , respectivamente. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's (*, $p < 0,05$).

6.3. SGS de *L. longipalpis* induz recrutamento celular durante a infecção por *L. chagasi* in vivo. Nosso grupo tem padronizado a dose de 0,5 par de SGS para indução de recrutamento de leucócitos para cavidade peritoneal no modelo murino (dados não publicados). Para avaliar se a saliva de *L. longipalpis* é capaz de modular o recrutamento celular durante a infecção por *L. chagasi*, nós injetamos intraperitonealmente em camundongos C57BL/6, 100 μ L de salina, SGS (0,5 par/animal), *L. chagasi* (3×10^6 /animal) ou SGS juntamente com *L. chagasi*.

Nós observamos um aumento na migração de leucócitos totais para o sítio inflamatório nos grupos estimulados quando comparados ao grupo controle no tempo de 3

horas (figura 4A). Entretanto, após 6 horas de estímulo, a quantidade de leucócitos não diferiu entre os grupos (figura 4A).

Dentre os leucócitos da cavidade peritoneal, a população de células predominante é a de macrófagos residentes. Ao analisar o perfil de recrutamento celular diferencial, nós verificamos uma tendência de aumento no número de macrófagos nos grupos estimulados com SGS ou infectados com *L. chagasi* no tempo de 3 horas, o que não se manteve no tempo de 6 horas (figura 4B). Com relação aos neutrófilos, foi observado um aumento no número dessas células no sítio inflamatório após 3 e 6 horas de infecção com *L. chagasi*, sendo este efeito potencializado pela presença de SGS no tempo de 3 horas (figura 4C).

Além disso, no grupo que foi apenas infectado por *L. chagasi* foi observado um aumento no número de linfócitos no tempo de 3 horas (figura 4D) e na quantidade de eosinófilos (figura 4E) e mastócitos (figura 4 F) após 6 horas de infecção.

Esses dados indicam que a saliva de *L. longipalpis* tem um papel na modulação do recrutamento celular nos estágios iniciais da infecção por *L. chagasi*.

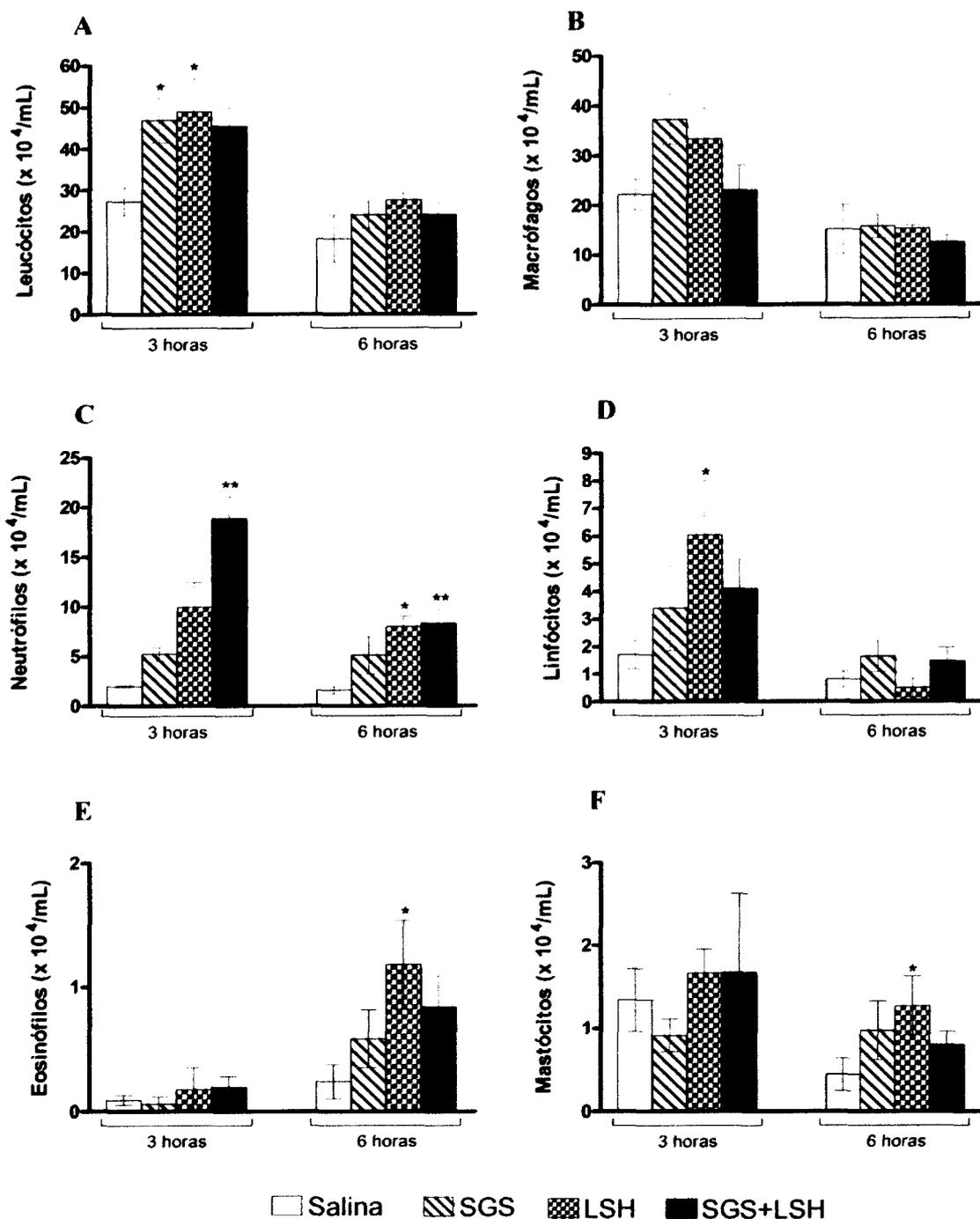


Figura 4. Efeito *in vivo* da saliva de *L. longipalpis* sobre o recrutamento celular durante a infecção por *Leishmania chagasi*. Camundongos C57BL/6 foram inoculados com 100 μl de salina, SGS 0,5 par, *L. chagasi* 3×10^6 e SGS juntamente com *L. chagasi*. Após 3 e 6 horas de estímulo foi realizada a contagem dos leucócitos totais (A) e diferencial (B - F). Os resultados representam a média e erro padrão de células por mL de 5 animais por grupo. Teste Kruskal-Wallis foi utilizado sendo * e ** aumentos estatisticamente significantes na quantidade de células nos grupos de animais tratados em relação ao grupo controle, $p < 0,05$ e $0,01$, respectivamente.

6.4 Efeito *in vivo* do SGS de *L. longipalpis* na formação de corpúsculos lipídicos (CLs) em presença de *L. chagasi*. Para verificar se as diferenças observadas no recrutamento celular estavam associadas à ativação celular, nós avaliamos o efeito do SGS sobre a formação de corpúsculos lipídicos em leucócitos do lavado peritoneal de camundongos.

Inicialmente, nós realizamos a detecção dos CLs por microscopia de fluorescência utilizando uma sonda fluorescente, 14,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (BODIPY[®] 493/503), um ácido graxo fluorescente contendo um diglicerídeo que se liga aos CLs. Leucócitos estimulados com SGS por apenas 3 horas e incubados com BODIPY apresentaram uma marcação pontual citoplasmática, compatível com a descrição estrutural de CLs (figura 5A e B). Em seguida, avaliamos a distribuição de CLs em macrófagos (figura 5C e D) e neutrófilos (figura 5E e F) infectados com *L. chagasi*. Células infectadas apresentaram CLs predominantemente localizados na proximidade de vacúolos parasitóforos (Figura 5C e E).

A formação de CLs *in vivo* foi quantificada em animais tratados com salina, 0,5 par de SGS, infectados com *L. chagasi* ou SGS junto com *L. chagasi* nos tempos de 3 horas e 6 horas. Nós observamos um aumento na quantidade de CLs em monócitos nos grupos de animais estimulados no tempo de 3 horas quando comparados ao grupo controle, embora não tenha sido observado um efeito aditivo entre os tratamentos com SGS e *L. chagasi*. Além disso, não foi observada diferença na formação de CLs em monócitos no tempo de 6 horas nos grupos de estudo (figura 6A). Com relação aos polimorfonucleares, observamos uma tendência de aumento dos CLs em células estimuladas com SGS apenas no tempo de 3 horas. Entretanto, houve uma redução na quantidade de CLs no tempo de 6 horas em todos os grupos estimulados quando comparados ao grupo salina (figura 6B).

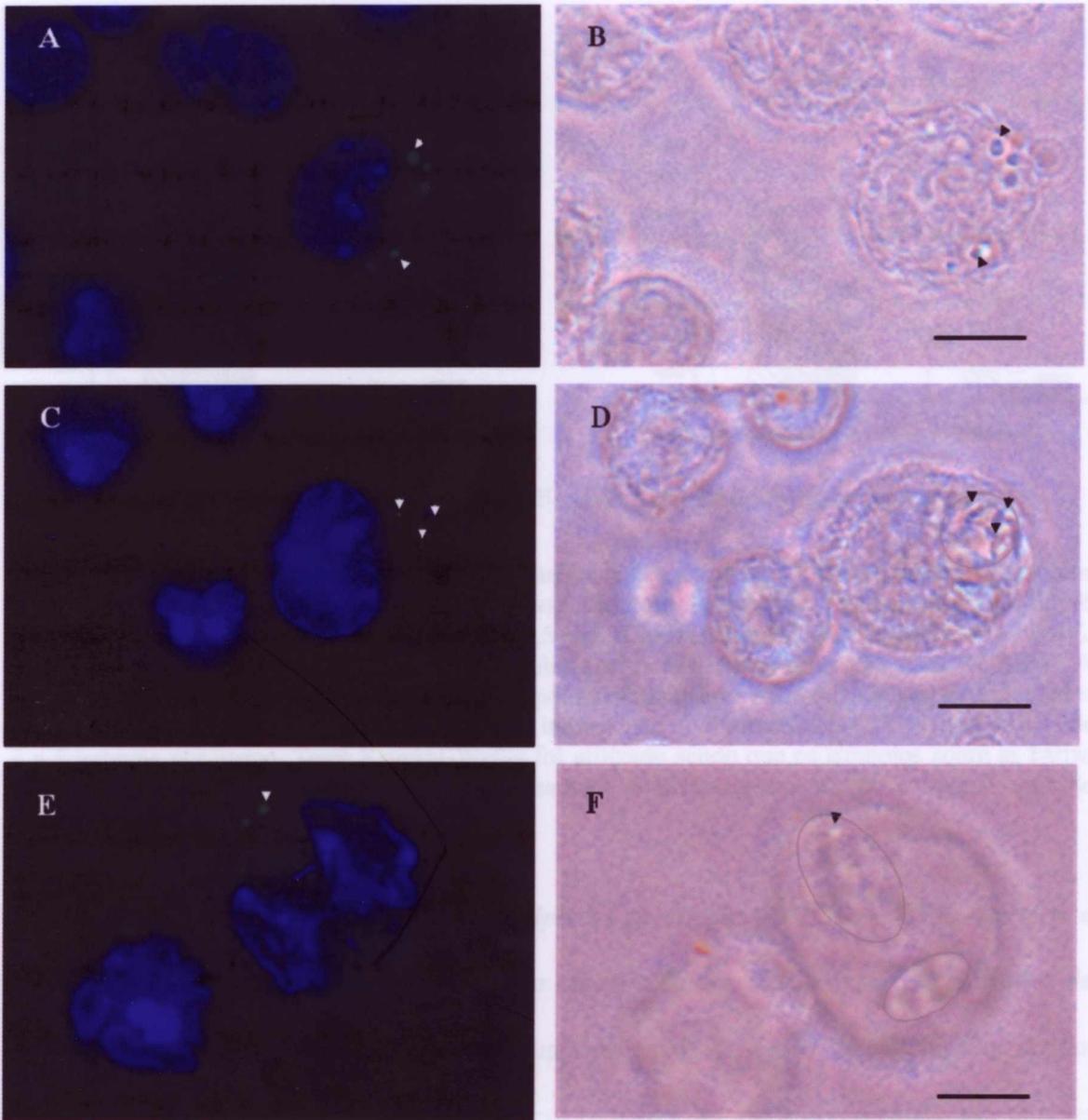


Figura 5. Corpúsculos Lipídicos (CLs) em células tratadas com SGS ou infectadas por *L. chagasi in vivo*. Camundongos C57BL/6 foram inoculados com 100 μ l de salina contendo 0,5 μ l de SGS (A-B) ou *L. chagasi* 3×10^6 (C - F). Após 3 horas de estímulo, os CLs das células do lavado peritoneal foram avaliados pela microscopia de fluorescência (painel esquerdo) e por contraste de fase (painel direito). Os CLs foram marcados utilizando a sonda BODIPY e o núcleo foi marcado com DAPI. Cabeças de seta indicam os CLs em macrófagos (A e C) e neutrófilos (E e F). Os vacúolos contendo *L. chagasi* foram grifados no contraste de fase (D e F). Imagens com aumento de 1000 x. Barra, 10 μ m.

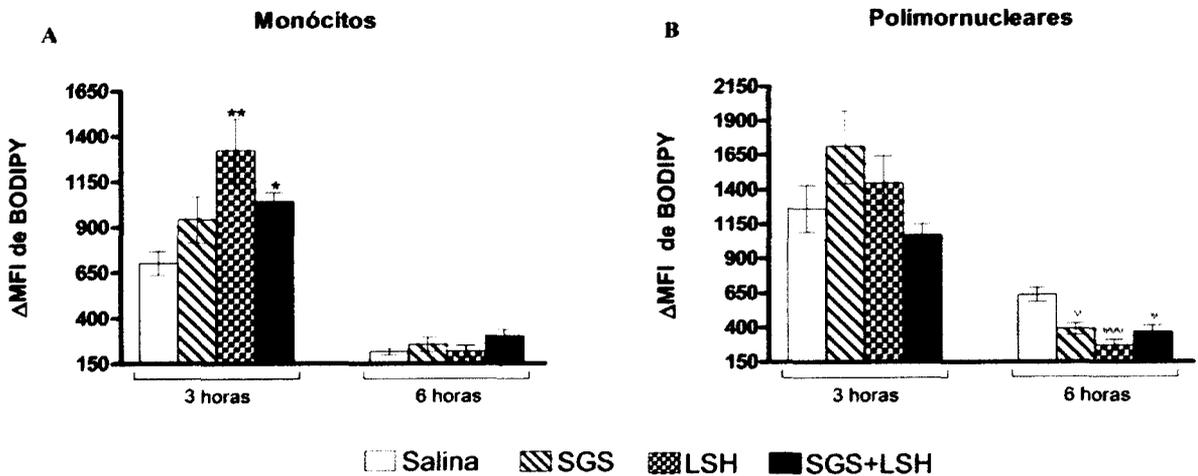


Figura 6. Efeito *in vivo* da saliva de *L. longipalpis* sobre a formação de corpúsculos lipídicos em células peritoneais durante a infecção por *Leishmania chagasi*. Camundongos C57BL/6 foram inoculados com 100 μ l de salina, SGS 0,5 par, *L. chagasi* 3×10^6 e SGS juntamente com *L. chagasi*. Após 3 e 6 horas de estímulo as células peritoneais foram marcadas com BODIPY. A quantificação de CLs em (A) monócitos e (B) polimorfonucleares foi realizada por FACS. Dados representam média e desvio padrão da média de intensidade de fluorescência (Δ MFI) nos grupos de 4 a 5 animais por grupo. Teste Kruskal-Wallis foi utilizado sendo que os símbolos sobre as barras indicam aumento (*) ou redução (Ψ) estatisticamente significativa em relação ao grupo controle estimulado com salina.

6.5 Efeito *ex vivo* do SGS de *L. longipalpis* na produção de PGE_2 e LTB_4 durante a infecção por *L. chagasi*. Leucócitos naïve são capazes de produzir baixas concentrações de eicosanóides quando expostos a pequenas quantidades de ionóforo de cálcio. Entretanto, células primadas com estímulos inflamatórios em contato com ionóforo de cálcio são capazes de liberar elevadas concentrações de mediadores lipídicos (D'Avila et al., 2006). A presença de corpúsculos lipídicos durante o processo inflamatório tem sido associada à produção de eicosanóides, por isso em nosso estudo, avaliamos a capacidade das células peritoneais murinas produzirem PGE_2 e LTB_4 *ex vivo*, após 3 e 6 horas de estímulo com 0,5 par de SGS, *L. chagasi* ou ambos.

Seguido do tratamento *ex vivo* por 15 minutos com ionóforo de cálcio A23187, foi observado um aumento na produção de PGE_2 em animais tratados com SGS e infectados com

L. chagasi quando comparados ao grupo controle, sugerindo haver um efeito aditivo na produção deste mediador no tempo de 6 horas (figura 7A).

Também foi observada a indução da produção de LTB_4 , entretanto esta produção esteve associada à infecção por *L. chagasi* independentemente da presença do SGS. Além disso, houve uma tendência de aumento na produção de LTB_4 apenas 6 horas após o estímulo com SGS, sugerindo a existência de uma cinética de indução da produção deste mediador diferente entre a saliva e a *L. chagasi*, não havendo sinergismo na produção de LTB_4 quando ambos os estímulos foram aplicados simultaneamente (figura 7B).

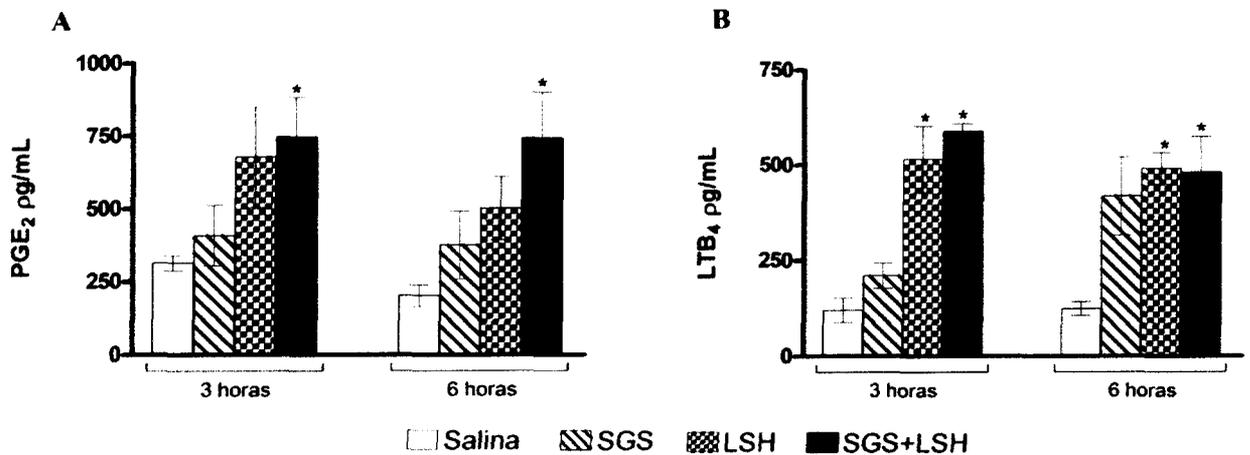


Figura 7. Efeito *ex vivo* do SGS de *L. longipalpis* na produção de PGE_2 e LTB_4 durante a infecção por *L. chagasi*. Camundongos C57BL/6 foram inoculados com 100 μ l de salina, SGS 0,5 par, *L. chagasi* 3×10^6 e SGS juntamente com *L. chagasi*. Após 3 e 6 horas de estímulo, 1×10^6 células de cada animal foram reestimuladas com $0,5 \mu$ M de ionóforo de cálcio A23187 em HBSS contendo Ca^{2+} e Mg^{2+} . Foi realizada a dosagem de PGE_2 (A) e LTB_4 (B) nos sobrenadantes por EIA. Dados representam média e erro padrão de 5 animais por grupo. Teste Kruskal-Wallis foi utilizado sendo * aumento estatisticamente significativo dos grupos de animais tratados em relação ao grupo controle, $p < 0,05$.

6.6. Fagocitose de *L. chagasi* no sítio de infecção. Afim de melhor caracterizar morfologicamente os eventos iniciais da infecção por *L. chagasi*, nós avaliamos as preparações dos citocentrifugados corados com panótico rápido. No tempo de 3 horas de infecção foram observados eventos de fagocitose de *L. chagasi* principalmente por macrófagos

(figura 8A), mas também por neutrófilos (figura 8B). Além disso, foi observado o contato entre estas células fagocíticas, com a presença de macrófagos infectados em contato com neutrófilos (figura 8C). Também observamos eventos de fagocitose de neutrófilos infectados por macrófagos também infectados no tempo de 3 horas de infecção (figura 8D). Entretanto, no tempo de 6 horas não observamos a presença de células infectadas.

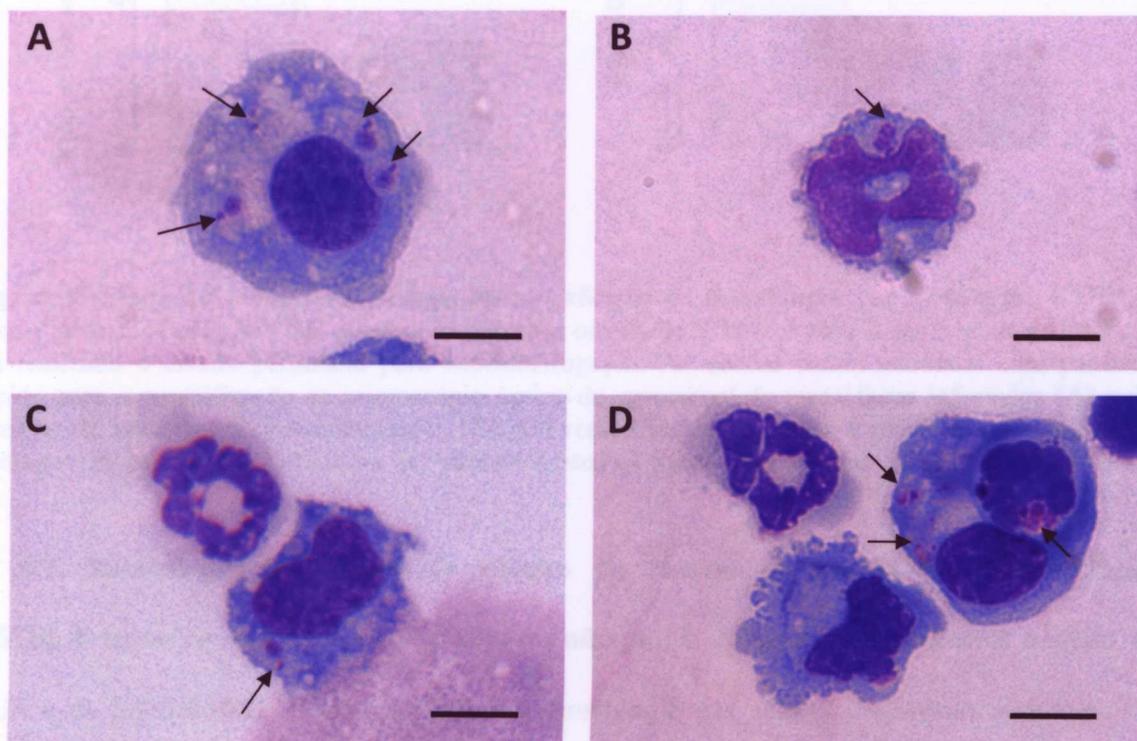


Figura 8. Eventos de infecção por *L. chagasi* in vivo. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 3×10^6 *L. chagasi* na ausência (A-C) ou presença de SGS (0,5 par) (D). Após 3 horas de infecção foi realizado o lavado peritoneal para citocentrifugação. Foram observados eventos de infecção de macrófagos (A) e neutrófilos (B), bem como eventos de ligação de neutrófilos com macrófagos infectados (C) e de neutrófilos infectados internalizados por macrófagos também infectados (D). Setas indicam *L. chagasi* em vacúolos parasitóforos. Imagens com aumento de 1000x. Barra, 10 μ m.

O percentual de macrófagos infectados e a quantidade de *L. chagasi* fagocitadas em animais tratados ou não com SGS foram avaliados. A presença de SGS reduziu o percentual

de macrófagos infectados (figura 9A) e o número de amastigotas no sítio inflamatório (figura 9B).

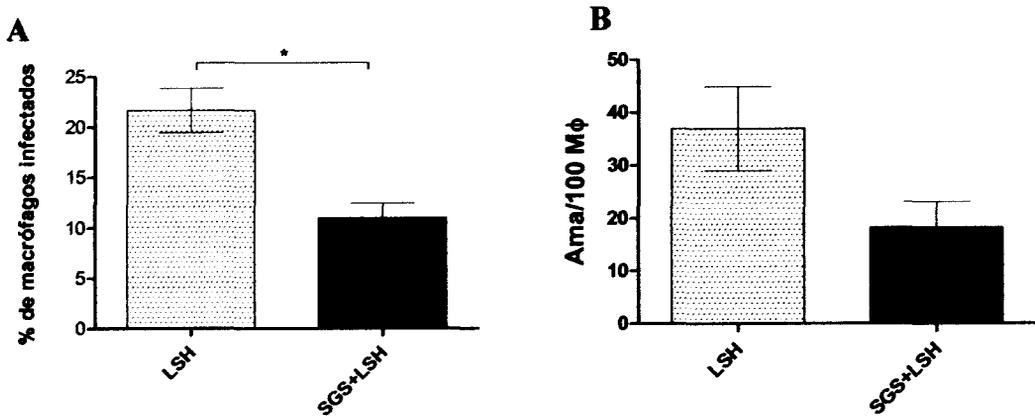


Figura 9. Efeito da saliva de *L. longpalpis* na infecção de macrófagos por *L. chagasi*. C57BL/6 foram infectados com 3×10^6 *L. chagasi* na presença ou não de SGS (0,5 par). Após 3 horas de infecção foi realizado o lavado peritoneal para citocentrifugação. As células foram marcadas com panótico rápido para a quantificação ao microscópio óptico do percentual de macrófagos infectados (A) e do número de amastigotas por macrófagos (B). Os resultados representam a média e erro padrão da contagem de no mínimo 200 células por lâmina. Teste t de Student foi utilizado sendo * para $p < 0,05$.

6.7. Microscopia eletrônica de células do lavado peritoneal de camundongos

C57BL/6 tratados com SGS e infectados ou não por *L. chagasi*. Nós avaliamos o efeito do SGS e da infecção por *L. chagasi* sobre a morfologia das células do lavado peritoneal de camundongos C57BL/6 estimulados durante 6 horas por microscopia eletrônica de transmissão (figura 10). Neste tempo, não observamos a presença de CLs nas células do infiltrado inflamatório, corroborando a análise realizada por citometria de fluxo utilizando a sonda BODIPY (figura 5). Entretanto, nós verificamos que as células do lavado peritoneal do grupo de animais tratados com SGS apenas (figura 10 C) ou na presença de SGS juntamente com *L. chagasi* (figura 10 E) apresentaram uma grande quantidade de grânulos de mastócitos associados à membrana de neutrófilos (figura 10 C e 10 E). Nos tratamentos incluindo SGS, os grânulos de mastócitos foram observados em estreita interação com a superfície de

polimorfonucleares em imagens sugestivas de eventos de fagocitose por polimorfonucleares (figura 10 D e 10 F). Não foi observada a presença de grânulos de mastócito no exudato de camundongos dos animais inoculados com salina (figura 10 A) ou apenas infectados com *L. chagasi* (figura 10 B), sugerindo um papel específico para o SGS na degranulação de mastócitos. Eventos de interação entre os grânulos de mastócitos e macrófagos também foram observados apenas em presença de SGS de *L. longipalpis* (micrografias em apêndice).

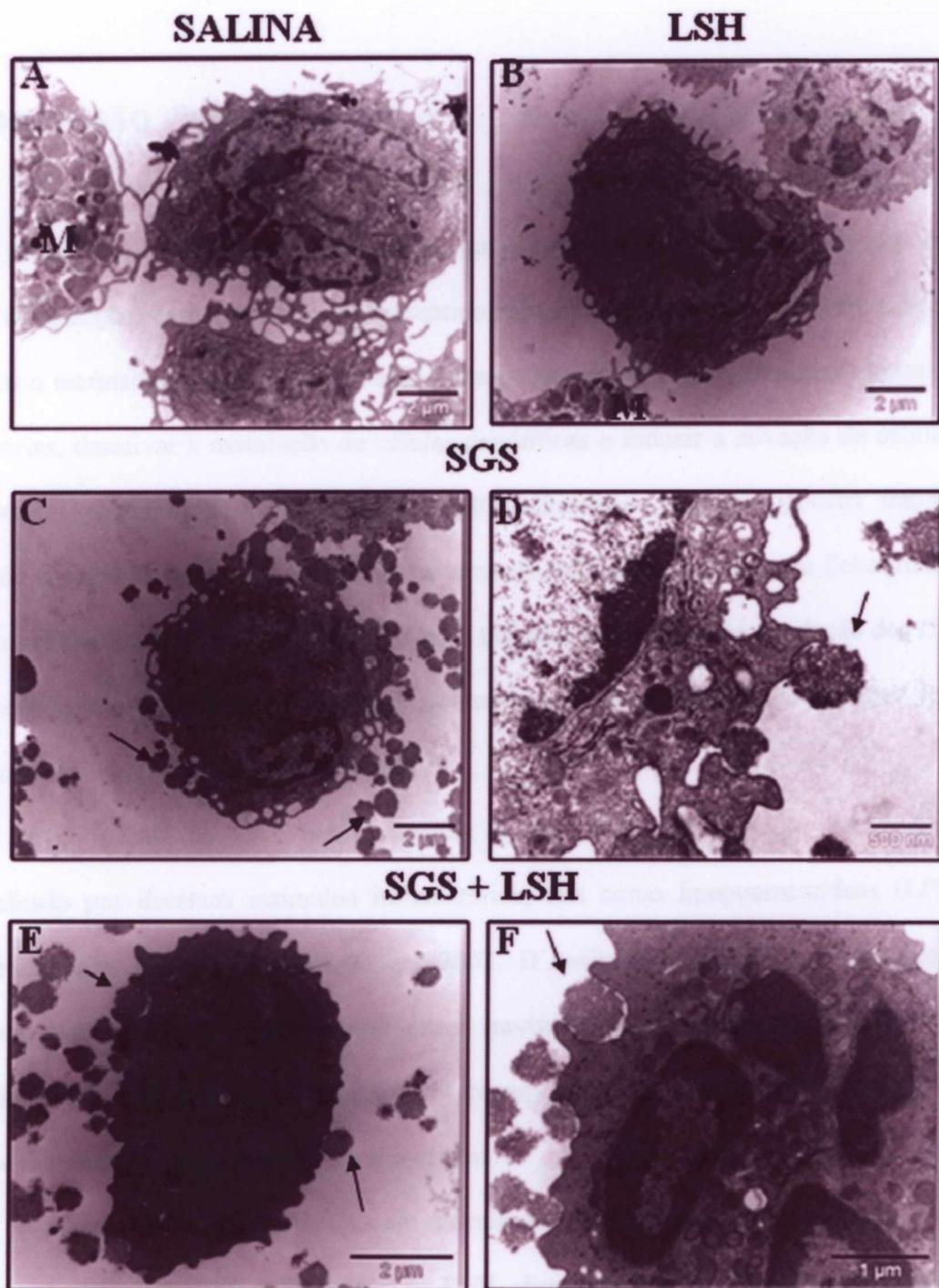


Figura 10. Microscopia eletrônica de transmissão de células do lavado peritoneal de camundongos C57BL/6 tratados com SGS e *L. chagasi*. Camundongos C57BL/6 foram inoculados com 100 μ l salina (A) *L. chagasi* 3×10^6 (B) 0,5 par de SGS (C e D), e SGS juntamente com *L. chagasi* (E e F). Após 6 horas de estímulo foi realizado processamento para microscopia eletrônica de transmissão. Setas pretas indicam a presença de grânulos de mastócitos (C-F) que podem ser visualizados associados a membrana de neutrófilos em maior aumento (D e F). A aquisição das imagens foi feita em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 109. Mastócito (M).

7. DISCUSSÃO

A saliva de flebótomos desenvolve um importante papel durante os primeiros estágios da infecção por *Leishmania*. Neste sentido, tem sido demonstrado que a saliva é capaz de induzir o recrutamento celular para o sítio inflamatório, inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, desativar a maturação de células dendríticas e induzir a ativação de células T regulatórias (revisado em Andrade et al., 2007). Entretanto, existem poucos trabalhos mostrando o papel de mediadores lipídicos na resposta inflamatória à saliva de flebotomíneos (Monteiro et al., 2007; Bozza et al., 1998). Nesse trabalho, nós avaliamos a indução dos CLs e mediadores lipídicos durante a interação dos componentes da saliva de *L. longipalpis* com a célula hospedeira na infecção por *L. chagasi*.

A formação de CLs em leucócitos é um evento controlado que pode ser desencadeado por diversos estímulos inflamatórios, tais como lipopossacarídeos (LPS) e lipoarabidomanan (LAM) (Pacheco et al., 2002; D'Ávila et al., 2006) e, infecções por *Mycobacterium bovis* e *Trypanosoma cruzi* (revisado em D'Ávila et al., 2008). Nós verificamos que o SGS de *L. longipalpis* foi capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos murinos *in vitro* e *in vivo*.

A indução da formação de CLs em macrófagos peritoneais residentes pelo SGS de *L. longipalpis* esteve associada à produção de PGE₂. Foi demonstrado que o maxadilan, uma proteína de 6,5 kDa presente na saliva de *L. longipalpis* é capaz de induzir a produção de PGE₂ pela ativação de um receptor de um neuropeptídeo, o PACAP, em macrófagos murinos (Soares et al., 1998). O maxadilan é capaz de inibir a produção de TNF- α ao mesmo tempo em que aumenta a produção de IL-6 e IL-10 em macrófagos previamente estimulados com LPS

(Bozza et al., 1998; Soares et al., 1998), efeitos também descritos para a saliva total de *L. longipalpis* (Costa et al., 2004). Nossos dados mostraram que a produção de PGE₂ induzida pelo SGS ocorreu através da ativação da COX-2, que compreende a via induzível de produção de prostaglandinas, uma vez que o uso do inibidor desta enzima, o NS-398, reduziu a quantidade de PGE₂ nos sobrenadantes de cultura de macrófagos murinos aos níveis basais. Em estudo anterior, Soares e cols. (1998) mostraram que os efeitos inibitórios do maxadilán sobre o LPS foram revertidos pelo uso de um inibidor da COX-1, ou seja, a via constitutiva de produção de prostaglandina. Serão necessários mais estudos para demonstrar se existem outros componentes da saliva de *L. longipalpis* capazes de ativar a produção de PGs.

Foi demonstrado recentemente, que a saliva de *Ixodes scapularis*, conhecido como carrapato, possui dose farmacológica de PGE₂, a qual seria responsável pela inibição dos mecanismos hemostáticos do hospedeiro e facilitação do repasto sanguíneo (Sa-Nunes et al., 2007). PGE₂ da saliva de *I. scapularis* foi capaz de inibir a maturação de células dendríticas, a produção IL-12 e TNF- α , citocinas pró-inflamatórias (Sa-Nunes et al., 2007). Não podemos descartar que na saliva de *L. longipalpis* possa haver PGE₂ ativa, a qual seria responsável por potencializar alguns dos efeitos já descritos para o maxadilán. Investigar a presença de PGE₂ ativa na saliva de *L. longipalpis* é algo que nosso grupo pretende investigar futuramente.

A saliva de *L. longipalpis* é capaz de estimular a migração de leucócitos para o sítio inflamatório (Monteiro et al., 2007, Teixeira et al., 2005). Nossos resultados mostraram que a saliva potencializou o recrutamento de neutrófilos durante os primeiros momentos da infecção por *L. chagasi*. Nesse contexto, foi recentemente demonstrado pelo grupo de David Sacks, utilizando a técnica de microscopia em tempo real, que a picada do flebotomíneo é capaz de induzir o recrutamento de neutrófilos para o local da picada (Petters et al., 2008). Segundo os

autores, os neutrófilos seriam responsáveis pela eliminação da maior parte dos parasitas no sítio de infecção, entretanto a morte destas células e a liberação de cepas mais resistentes favoreceriam o estabelecimento posterior da infecção em macrófagos recém migrados (Petters et al., 2008). Uma segunda hipótese defendida pelo grupo de Tamás Laskay é que os neutrófilos presentes no sítio de infecção serviriam de veículo para infecção de macrófagos em momentos mais tardios da infecção, em um processo denominado “Cavalo de Tróia” (Laskay et al., 2003; van Zandbergen et al., 2004). Entretanto, ambas as correntes não associam uma implicação direta de componentes da saliva do vetor nos momentos iniciais da infecção por *Leishmania*.

Nós mostramos a interação entre neutrófilos e macrófagos infectados nos estágios iniciais da infecção. Também identificamos a presença de neutrófilos infectados fagocitados por macrófagos também infectados nos grupos de animais estimulados com SGS, sugerindo uma participação da saliva de *L. longipalpis* na indução da interação destas células (figura 8). Além disso, dados do nosso grupo mostram que o SGS de *L. longipalpis* não só foi capaz de induzir o recrutamento e apoptose de neutrófilos, como também um aumento da taxa de infecção por *L. chagasi* nessas células (artigo submetido em apêndice). Embora nossas observações corroborem mais a idéia do “Cavalo de Tróia”, ambos os mecanismos podem estar ocorrendo concomitantemente e contribuindo no estabelecimento da infecção por *Leishmania*.

O SGS foi capaz de potencializar a produção de PGE₂ e LTB₄ em presença de *L. chagasi*. A produção de PGE₂ tem sido atribuída como um fator que favorece o estabelecimento da infecção por diferentes patógenos. No modelo murino, a infecção por *Mycobacterium bovis* induziu a produção PGE₂ e TGF-β1 decorrente da fagocitose de

neutrófilos apoptóticos infectados por macrófagos no sítio inflamatório, o que resultou no aumento da infecção (D'Ávila et al., 2008). Em ratos e camundongos, a infecção por *T. cruzi* induziu a formação de CLs em macrófagos peritoneais associada à produção de PGE₂ (Melo et al., 2003; D'Avila et al., 2008). A interação entre neutrófilos apoptóticos e macrófagos humanos também resultou no aumento na taxa de infecção por *Leishmania amazonensis* em um mecanismo dependente da produção de PGE₂ e TGF-β1 (Afonso et al., 2008). Por outro lado, a produção de LTB₄ tem sido associada ao aumento da taxa de fagocitose e morte de patógenos (Peters-Golden, 2005). No contexto da infecção por *Leishmania*, a produção de LTB₄ está envolvida na produção de NO e diminuição da carga parasitária em camundongos susceptíveis e resistentes a infecção por *Leishmania amazonensis* (Serezani et al., 2006). A produção de mediadores lipídicos com atividade antagônica induzida pelo SGS de *L. longipalpis* em presença de *L. chagasi* pode ser um reflexo de cinéticas distintas de ativação durante interação *in vivo* de componentes da saliva do vetor com a célula hospedeira em presença do parasita. Enquanto que a produção de LTB₄ induzida pelo SGS poderia estar inicialmente envolvida no recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório durante a picada, a presença de PGE₂ poderia ser decorrente da fagocitose de neutrófilos apoptóticos, gerando um ambiente permissivo ao estabelecimento da infecção.

A infecção por *L. chagasi* sozinha também foi capaz de induzir a produção de PGE₂ e LTB₄. Estes dados estiveram de acordo com o trabalho de Milano e cols. (1996), no qual foi demonstrada a produção destes mediadores em células do baço durante o curso da infecção por *L. major* (Milano et al., 1996). Além disso, nos grupos apenas infectados, nós verificamos um aumento na formação de corpúsculos lipídicos pela citometria de fluxo. Entretanto, para nossa surpresa, ao avaliarmos macrófagos e neutrófilos infectados com *L. chagasi* pela técnica

de microscopia de fluorescência, observamos poucos CLs citoplasmáticos nas primeiras 3 horas de infecção. A marcação com BODIPY foi observada em associação com vacúolos parasitóforos de *L. chagasi*, estando alguns CLs localizados no parasita (figura 10).

A observação da presença de inclusões lipídicas em formas promastigotas de *Leishmania* através de abordagens de ultra-estrutura é bem descrita na literatura (Chang et al., 1956; Pimenta et al., 1991). Todavia, se estas organelas são equivalentes aos CLs de leucócitos e se estariam relacionadas com a síntese de mediadores lipídicos nesses protozoários ainda permanece por ser estabelecido. Sabe-se que algumas espécies de *Leishmania* apresentam prostaglandina F(2alfa) sintase e que o lisado de promastigotas de *Leishmania* é capaz de metabolizar AA a prostaglandinas (Kabutu et al., 2003, Kubata et al., 2007). Neste sentido, o parasita poderia estar recrutando lipídios para a sua sobrevivência e metabolismo ou até modulando a resposta da célula hospedeira. A associação de CLs com a mobilização de lipídios de macrófagos para o parasita intracelular foi demonstrada com *Toxoplasma gondii* (Nishikawa et al., 2005). A avaliação da ultra-estrutura por MET de leucócitos infectados por *L. chagasi* na presença ou ausência de SGS no tempo de 3 horas, nos permitirá uma melhor conclusão sobre esse efeito.

A presença da saliva durante a infecção por *L. chagasi* levou a uma redução do percentual de infecção no sítio inflamatório, bem como do número de parasitas por macrófagos após três horas de estímulo. Esses resultados remetem a duas possibilidades: (i) que a saliva de *L. longipalpis* aumentou a capacidade de resolução da infecção com rápida eliminação dos parasitas no sítio inflamatório ou (ii) que o processo de disseminação da infecção tenha sido acelerado pela presença da saliva de *L. longipalpis* e que, após 3 horas de infecção, a redução no percentual de macrófagos infectados represente a migração das células

infectadas para outros órgãos, tais como linfonodos, baço e fígado, tendo em vista que não são observadas células infectadas no lavado peritoneal após 6 horas de estímulo. A análise por RT-PCR para detecção de *Leishmania* nos possíveis órgãos alvos elucidará esta questão (análise em andamento).

A exposição *in vivo* à picada natural de fêmeas de *L. longipalpis* na orelha de camundongos e posterior desafio intradérmico com SGS induziu a formação de edema com predominância de neutrófilos, eosinófilos e mastócitos, em uma resposta de hipersensibilidade tardia (Silva et al., 2005). Ao avaliarmos a ultra-estrutura de células do lavado peritoneal de camundongos infectados, foram observados eventos de degranulação de mastócitos apenas nos grupos tratados com a saliva de *L. longipalpis*. Os mastócitos têm sido implicados como células responsáveis pela produção imediata de mediadores lipídicos. Em resposta a agentes inflamatórios, mastócitos rapidamente degranulam liberando fatores quimiotáticos, tais como MIP-1 α , LTB $_4$, os quais recrutam macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos T para sítio inflamatório (Boyce et al., 2007; Villasenor-Cardoso et al., 2008). Neste trabalho, nós observamos uma interação entre os grânulos de mastócitos e neutrófilos em células peritoniais de camundongos tratado com SGS. Foi demonstrado que a picada de *Anopheles* é capaz de controlar a resposta imune de células T antígeno-específicas e induzir o influxo celular inflamatório em um mecanismo dependente de mastócitos e mediado por IL-10 (Depinay et al., 2006). Alguns trabalhos têm estudado o papel dos mastócitos no sítio de infecção por *Leishmania* (Saha et al. 2004), embora o papel dos mastócitos na lesão cutânea em camundongos C57BL/6 ainda seja controverso quanto a aumentar (Wershil et al., 1994) ou controlar (Maurer et al., 2006) a infecção por *L. major*. Durante a infecção por *L. mexicana*, a participação dos mastócitos foi dependente do *background* genético, sendo observada rápida

degranulação, aumento do infiltrado inflamatório e número de parasita em animais susceptíveis (BALB/c) e, em contrapartida, retardo da degranulação e manutenção da chegada de neutrófilos com diminuição da infecção em camundongos resistentes (C57BL/6) (Villasenor-Cardoso et al., 2008). Desta forma, o achado de que a saliva de *L. longipalpis* induz a degranulação de mastócitos, bem como que estes grânulos estão em interação com neutrófilos, traz perspectivas para o entendimento dos mecanismos pelos quais a *L. chagasi* consegue estabelecer a infecção *in vivo*. Ou seja, a ação inflamatória do SGS sobre os mastócitos poderia corroborar nossos resultados de rápido influxo de neutrófilos e aumento na produção de LTB₄ e PGE₂ no sítio inflamatório, dentre outros eventos. Se a capacidade de induzir a degranulação de mastócitos é uma propriedade direta da saliva de *L. longipalpis* ainda permanece em aberto e será uma das questões que o nosso grupo pretende investigar futuramente.

O conjunto dos nossos resultados indica que a saliva do vetor desempenha um papel importante na modulação da inflamação durante os estágios iniciais da infecção por *L. chagasi*. Nossas observações sugerem importantes implicações da ação inflamatória dos corpúsculos e mediadores lipídicos para a imunopatogênese da leishmaniose visceral.

8. CONCLUSÃO

A saliva de *L. longipalpis* induz a formação de corpúsculos lipídicos e a produção de PGE₂ *in vitro* e, durante os estágios iniciais da infecção *L. chagasi*, potencializa o recrutamento de neutrófilos e a produção de mediadores lipídicos (PGE₂ e LTB₄) no sítio inflamatório.

9. PERSPECTIVAS

- Avaliar ultra-estruturalmente os corpúsculos lipídicos em células infectadas do lavado peritoneal por microscopia eletrônica de transmissão no tempo de 3 horas após infecção;
- Avaliar a produção de citocinas e quimiocinas no lavado peritoneal de camundongos infectados com *L. chagasi* na presença ou não do SGS de *L. longipalpis*;
- Avaliar a disseminação da infecção para outros órgãos utilizando a técnica de PCR para detecção da presença de *L. chagasi*;
- Avaliar o efeito da inibição das vias de produção dos mediadores lipídicos pelo uso de inibidores de COX e 5-LO sobre o recrutamento celular e estabelecimento da infecção por *L. chagasi* na presença ou não da saliva de *L. longipalpis*.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, L., V. M. BORGES, H. CRUZ, *et al.* Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **J Leukoc Biol**, v.84, n.2, p.389-96. 2008.
- ANDERSON, J. M., F. OLIVEIRA, S. KAMHAWI, *et al.* Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. **BMC Genomics**, v.7, p.52. 2006.
- ANDRADE, B. B., C. I. DE OLIVEIRA, C. I. BRODSKYN, *et al.* Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. **Scand J Immunol**, v.66, n.2-3, p.122-7. 2007.
- ANDRADE, B. B., C. R. TEIXEIRA, A. BARRAL, *et al.* Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. **An Acad Bras Cienc**, v.77, n.4, p.665-93. 2005.
- ANJILI, C. O., P. A. MBATI, R. W. MWANGI, *et al.* The chemotactic effect of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates to murine monocytes. **Acta Trop**, v.60, n.2, p.97-100. 1995.
- BECKER, I., N. SALAIZA, M. AGUIRRE, *et al.* *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. **Mol Biochem Parasitol**, v.130, n.2, p.65-74. 2003.
- BOGDAN, C., M. ROLLINGHOFF e A. DIEFENBACH. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunol Rev**, v.173, p.17-26. 2000.
- BOYCE, J. A. Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation. **Immunol Rev**, v.217, p.168-85. 2007.
- BOZZA, M., M. B. SOARES, P. T. BOZZA, *et al.* The PACAP-type I receptor agonist maxadilan from sand fly saliva protects mice against lethal endotoxemia by a mechanism partially dependent on IL-10. **Eur J Immunol**, v.28, n.10, p.3120-7. 1998.
- BOZZA, P. T., R. C. MELO e C. BANDEIRA-MELO. Leukocyte lipid bodies regulation and function: Contribution to allergy and host defense. **Pharmacol Ther**, v.113, n.1, p.30-49. 2007.
- BROCK, T. G. e M. PETERS-GOLDEN. Activation and regulation of cellular eicosanoid biosynthesis. **ScientificWorldJournal**, v.7, p.1273-84. 2007.
- CERNA, P., L. MIKES e P. VOLF. Salivary gland hyaluronidase in various species of phlebotomine sand flies (Diptera: psychodidae). **Insect Biochem Mol Biol**, v.32, n.12, p.1691-7. 2002.

- CHANG, P. C. The ultrastructure of *Leishmania donovani*. **J Parasitol**, v.42, n.2, p.126-36. 1956.
- CHAPPUIS, F., S. SUNDAR, A. HAILU, *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol**, v.5, n.11, p.873-82. 2007.
- CHARLAB, R., E. D. ROWTON e J. M. RIBEIRO. The salivary adenosine deaminase from the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Exp Parasitol**, v.95, n.1, p.45-53. 2000.
- CHARLAB, R., R. B. TESH, E. D. ROWTON, *et al.* *Leishmania amazonensis*: sensitivity of different promastigote morphotypes to salivary gland homogenates of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Exp Parasitol**, v.80, n.2, p.167-75. 1995.
- CHARLAB, R., J. G. VALENZUELA, E. D. ROWTON, *et al.* Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.96, n.26, p.15155-60. 1999.
- COSTA, D. J., C. FAVALI, J. CLARENCIO, *et al.* *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. **Infect Immun**, v.72, n.3, p.1298-305. 2004.
- COSTA, J. M. L. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v.75, n.1, p.3-17. 2005.
- D'AVILA, H., C. M. MAYA-MONTEIRO e P. T. BOZZA. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. **Int Immunopharmacol**, v.8, n.10, p.1308-15. 2008.
- D'AVILA, H., R. C. MELO, G. G. PARREIRA, *et al.* *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. **J Immunol**, v.176, n.5, p.3087-97. 2006.
- D'AVILA, H., ROQUE, N. R., CARDOSO, R. M. *et al.* Neutrophils recruited to the site of *Mycobacterium bovis* BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E production by macrophages. **Cell Microbiol**, v.10, n.12, p.2589-604. 2008.
- DEPINAY, N., HACINI, F., BEGHDAI, W., PERONET, R. e MÉCHERI, S. Mast cell-dependent down-regulation of antigen-specific immune response by mosquito bites. **J Immunol**, v.176, p.4141-4146. 2006.
- FRANCISCHETTI, I. M., T. N. MATHER e J. M. RIBEIRO. Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. **Thromb Haemost**, v.94, n.1, p.167-74. 2005.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, v.294, n.5548, p.1871-5. 2001.

GOMES, R., C. TEIXEIRA, M. J. TEIXEIRA, *et al.* Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.105, n.22, p.7845-50. 2008.

GREGORY, D. J., R. SLADEK, M. OLIVIER, *et al.* Comparison of the effects of *Leishmania major* or *Leishmania donovani* infection on macrophage gene expression. **Infect Immun**, v.76, n.3, p.1186-92. 2008.

HALL, L. R. e R. G. TITUS. Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. **J Immunol**, v.155, n.7, p.3501-6. 1995.

HARRIS, S. G., J. PADILLA, L. KOUMAS, *et al.* Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends Immunol**, v.23, n.3, p.144-50. 2002.

JOHN, B. e C. A. HUNTER. Immunology. Neutrophil soldiers or Trojan Horses? **Science**, v.321, n.5891, p.917-8. 2008.

KABUTUTU, Z., S. K. MARTIN, T. NOZAKI, *et al.* Prostaglandin production from arachidonic acid and evidence for a 9,11-endoperoxide prostaglandin H2 reductase in *Leishmania*. **Int J Parasitol**, v.33, n.2, p.221-8. 2003.

KATZ, O., J. N. WAITUMBI, R. ZER, *et al.* Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva. **Am J Trop Med Hyg**, v.62, n.1, p.145-50. 2000.

KROPF, P., M. A. FREUDENBERG, M. MODOLELL, *et al.* Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. **Infect Immun**, v.72, n.4, p.1920-8. 2004.

KROPF, P., N. FREUDENBERG, C. KALIS, *et al.* Infection of C57BL/10ScCr and C57BL/10ScNCr mice with *Leishmania major* reveals a role for Toll-like receptor 4 in the control of parasite replication. **J Leukoc Biol**, v.76, n.1, p.48-57. 2004.

KUBATA, B. K., M. DUSZENKO, K. S. MARTIN, *et al.* Molecular basis for prostaglandin production in hosts and parasites. **Trends Parasitol**, v.23, n.7, p.325-31. 2007.

LASKAY, T., G. VAN ZANDBERGEN e W. SOLBACH. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends Microbiol**, v.11, n.5, p.210-4. 2003.

LAWRENCE, T., D. A. WILLOUGHBY e D. W. GILROY. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol**, v.2, n.10, p.787-95. 2002.

LERNER, E. A., J. M. RIBEIRO, R. J. NELSON, *et al.* Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **J Biol Chem**, v.266, n.17, p.11234-6. 1991.

LIESE, J., SCHLEICHER, U., BOGDAN, C. Innate immune response against *Leishmania* parasites. **Immunobiology**, v. 213, p.377-387. 2007.

LONARDONI, M. V., M. RUSSO e S. JANCAR. Essential role of platelet-activating factor in control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Infect Immun**, v.68, n.11, p.6355-61. 2000.

Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Ministério da Saúde do Brasil. Editora MS. 1ª edição. 2006.

MATTE, C., G. MAION, W. MOURAD, *et al.* *Leishmania donovani*-induced macrophages cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 synthesis. **Parasite Immunol**, v.23, n.4, p.177-84. 2001.

MAURER, M., S. LOPEZ KOSTKA, F. SIEBENHAAR, *et al.* Skin mast cells control T cell-dependent host defense in *Leishmania major* infections. **Faseb J**, v.20, n.14, p.2460-7. 2006.

MELO, R. C. Acute Heart Inflammation: ultrastructural and functional aspects of macrophages elicited by *Trypanosoma cruzi* infection. **J Cell Mol Med**, 2008.

MELO, R. C., H. D'AVILA, D. L. FABRINO, *et al.* Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. **Tissue Cell**, v.35, n.1, p.59-67. 2003.

MELO, R. C., D. L. FABRINO, F. F. DIAS, *et al.* Lipid bodies: Structural markers of inflammatory macrophages in innate immunity. **Inflamm Res**, v.55, n.8, p.342-8. 2006.

MILANO, S., ARCOLEO, F., DIELI, M., D'AGOSTINO, R., DE NUCCI, G., D'AGOSTINO, P., AND CILLARI, E. Ex vivo evidence for PGE2 and LTB4 involvement in cutaneous leishmaniasis: relation with infection status and cytokine production. **Parasitology**, v.112, p.13-19. 1996.

MILLERON, R. S., J. M. RIBEIRO, D. ELNAIME, *et al.* Negative effect of antibodies against maxadilan on the fitness of the sand fly vector of American visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v.70, n.3, p.278-85. 2004.

MONTEIRO, M. C., H. C. LIMA, A. A. SOUZA, *et al.* Effect of *Lutzomyia longipalpis* salivary gland extracts on leukocyte migration induced by *Leishmania major*. **Am J Trop Med Hyg**, v.76, n.1, p.88-94. 2007.

NISHIKAWA, Y., F. QUITTAT, T. T. STEDMAN, *et al.* Host cell lipids control cholesteryl ester synthesis and storage in intracellular *Toxoplasma*. **Cell Microbiol**, v.7, n.6, p.849-67. 2005.

PACHECO, P., F. A. BOZZA, R. N. GOMES, *et al.* Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. **J Immunol**, v.169, n.11, p.6498-506. 2002.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. **Vaccine**, v.26, n.14, p.1709-24. 2008.

PETERS-GOLDEN, M., C. CANETTI, P. MANCUSO, *et al.* Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. **J Immunol**, v.174, n.2, p.589-94. 2005.

PETERS, N. C., J. G. EGEN, N. SECUNDINO, *et al.* In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v.321, n.5891, p.970-4. 2008.

PIMENTA, P. F., E. M. SARAIVA e D. L. SACKS. The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. **Exp Parasitol**, v.72, n.2, p.191-204. 1991.

PLOTKOWSKI, M. C., B. A. BRANDAO, M. C. DE ASSIS, *et al.* Lipid body mobilization in the ExoU-induced release of inflammatory mediators by airway epithelial cells. **Microb Pathog**, v.45, n.1, p.30-7. 2008.

REINER, N. E. e C. J. MALEMUD. Arachidonic acid metabolism in murine leishmaniasis (*Donovani*): ex-vivo evidence for increased cyclooxygenase and 5-lipoxygenase activity in spleen cells. **Cell Immunol**, v.88, n.2, p.501-10. 1984.

_____. Arachidonic acid metabolism by murine peritoneal macrophages infected with *Leishmania donovani*: in vitro evidence for parasite-induced alterations in cyclooxygenase and lipoxygenase pathways. **J Immunol**, v.134, n.1, p.556-63. 1985.

REINER, N. E., L. A. SCHULTZ e C. J. MALEMUD. Eicosanoid metabolism by *Leishmania donovani*-infected macrophages: mouse strain responses in prostanoid synthesis. **Am J Trop Med Hyg**, v.38, n.1, p.59-64. 1988.

RIBEIRO, J. M. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annu Rev Entomol**, v.32, p.463-78. 1987.

RIBEIRO, J. M. e I. M. FRANCISCHETTI. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. **Annu Rev Entomol**, v.48, p.73-88. 2003.

RIBEIRO, J. M. e G. MODI. The salivary adenosine/AMP content of *Phlebotomus argentipes* Annandale and Brunetti, the main vector of human kala-azar. **J Parasitol**, v.87, n.4, p.915-7. 2001.

RIBEIRO, J. M., E. D. ROWTON e R. CHARLAB. The salivary 5'-nucleotidase/phosphodiesterase of the hematophagous sand fly, *Lutzomyia longipalpis* [corrected]. **Insect Biochem Mol Biol**, v.30, n.4, p.279-85. 2000a.

_____. Salivary amylase activity of the phlebotomine sand fly, *Lutzomyia longipalpis*. **Insect Biochem Mol Biol**, v.30, n.4, p.271-7. 2000b.

SA-NUNES, A., A. BAFICA, D. A. LUCAS, *et al.* Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in *Ixodes scapularis* saliva. **J Immunol**, v.179, n.3, p.1497-505. 2007.

SACKS, D. e N. NOBEN-TRAUTH. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat Rev Immunol**, v.2, n.11, p.845-58. 2002.

SACKS, D. L. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. **Cell Microbiol**, v.3, n.4, Apr, p.189-96. 2001.

SAHA, B., A. M. TONKAL, S. CROFT, *et al.* Mast cells at the host-pathogen interface: host-protection versus immune evasion in leishmaniasis. **Clin Exp Immunol**, v.137, n.1, p.19-23. 2004.

SEREZANI, C. H., J. H. PERRELA, M. RUSSO, *et al.* Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. **J Immunol**, v.177, n.5, p.3201-8. 2006.

SILVA, F., R. GOMES, D. PRATES, *et al.* Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. **Am J Trop Med Hyg**, v.72, n.1, p.94-8. 2005.

SOARES, M. B., R. G. TITUS, C. B. SHOEMAKER, *et al.* The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. **J Immunol**, v.160, n.4, p.1811-6. 1998.

SOARES, R. P. e S. J. TURCO. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. **An Acad Bras Cienc**, v.75, n.3, p.301-30. 2003.

STANLEY, A.C., e ENGWERDA, C.R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunol and Cell Biol**, v.85, p.138-147. 2007.

SVENSJO, E., E. M. SARAIVA, *et al.* Salivary Gland Homogenates of *Lutzomyia longipalpis* and Its Vasodilatory Peptide Maxadilan Cause Plasma Leakage via PAC1 Receptor Activation. **J Vasc Res**, v.46, n.5, p.435-446. 2009.

TEIXEIRA, C. R., M. J. TEIXEIRA, R. B. GOMES, *et al.* Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. **J Immunol**, v.175, n.12, p.8346-53. 2005.

THEODOS, C. M. e R. G. TITUS. Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function in vitro. **Parasite Immunol**, v.15, n.8, p.481-7. 1993.

VALENZUELA, J. G., Y. BELKAID, M. K. GARFIELD, *et al.* Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. **J Exp Med**, v.194, n.3, p.331-42. 2001.

VALENZUELA, J. G., Y. BELKAID, E. ROWTON, *et al.* The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel Cimex family of apyrases. **J Exp Biol**, v.204, n.Pt 2, p.229-37. 2001.

VALENZUELA, J. G., R. CHARLAB, E. C. GONZALEZ, *et al.* The D7 family of salivary proteins in blood sucking diptera. **Insect Mol Biol**, v.11, n.2, p.149-55. 2002.

VAN ZANDBERGEN, G., M. KLINGER, A. MUELLER, *et al.* Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **J Immunol**, v.173, n.11, p.6521-5. 2004.

VAN ZANDBERGEN, G., W. SOLBACH e T. LASKAY. Apoptosis driven infection. **Autoimmunity**, v.40, n.4, Jun, p.349-52. 2007.

VANNIER-SANTOS, M. A., J. A. URBINA, A. MARTINY, *et al.* Alterations induced by the antifungal compounds ketoconazole and terbinafine in *Leishmania*. **J Eukaryot Microbiol**, v.42, n.4, p.337-46. 1995.

VILLASENOR-CARDOSO, M. I., N. SALAIZA, J. DELGADO, *et al.* Mast cells are activated by *Leishmania mexicana* LPG and regulate the disease outcome depending on the genetic background of the host. **Parasite Immunol**, 2008.

WAN, H. C., R. C. MELO, Z. JIN, *et al.* Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. **Faseb J**, v.21, n.1, p.167-78. 2007.

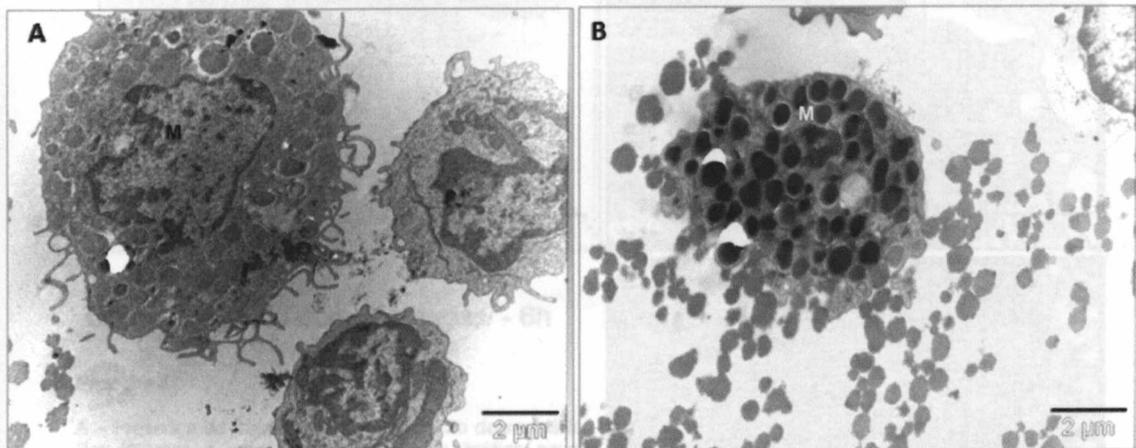
WERSHIL, B. K., C. M. THEODOS, S. J. GALLI, *et al.* Mast cells augment lesion size and persistence during experimental *Leishmania major* infection in the mouse. **J Immunol**, v.152, n.9, p.4563-71. 1994.

World Health Organization (WHO). <http://www.who.int/leishmaniasis/resources/en/>. 2008.

ZER, R., I. YAROSLAVSKI, L. ROSEN, *et al.* Effect of sand fly saliva on Leishmania uptake by murine macrophages. **Int J Parasitol**, v.31, n.8, p.810-4. 2001.

APÊNDICE 1

Mastócitos 6 horas



Grupo tratado com Salina - 6h

Grupo tratado com SGS + *L. chagasi* - 6h

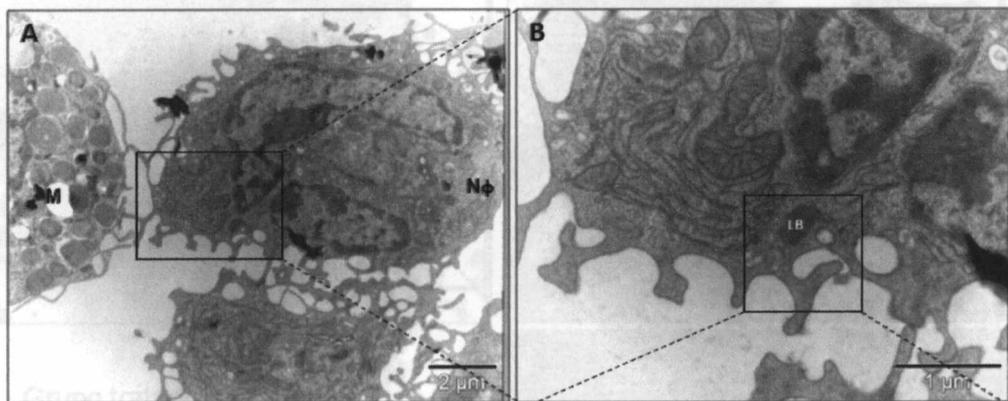
B e C - Neutrófilo em maior aumento. Corpúsculo lipídico (LB) em destaque apresentando estrutura organizada e contido num retículo endoplasmático rugoso e mitocôndria. Não são observados processos de internalização de grânulos (G).

Prancha 1

A - Mastócito com poucos grânulos liberados;

B - Mastócito em intenso processo de degranulação.

Neutrófilos 6 horas



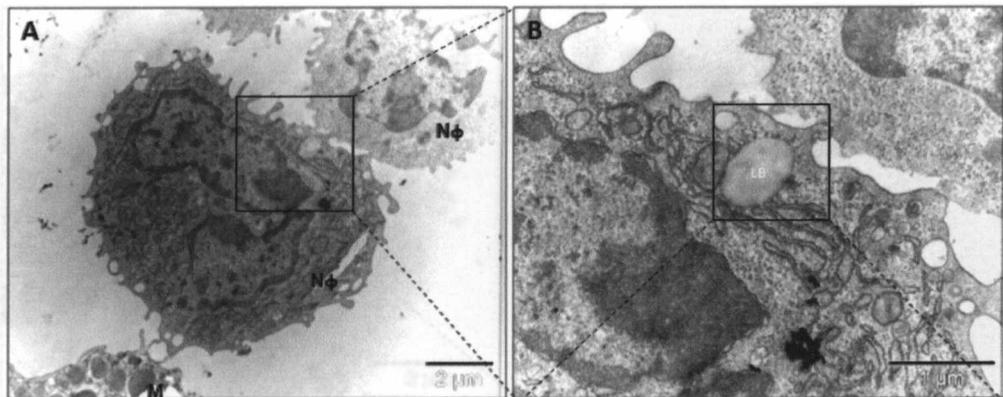
Prancha 2 Grupo tratado com Salina - 6h

Prancha 2

A - Presença de mastócito (M) íntegro, não degranulado;

B e C - Neutrófilo em maior aumento. Apenas um corpúsculo lipídico foi observado (LB).



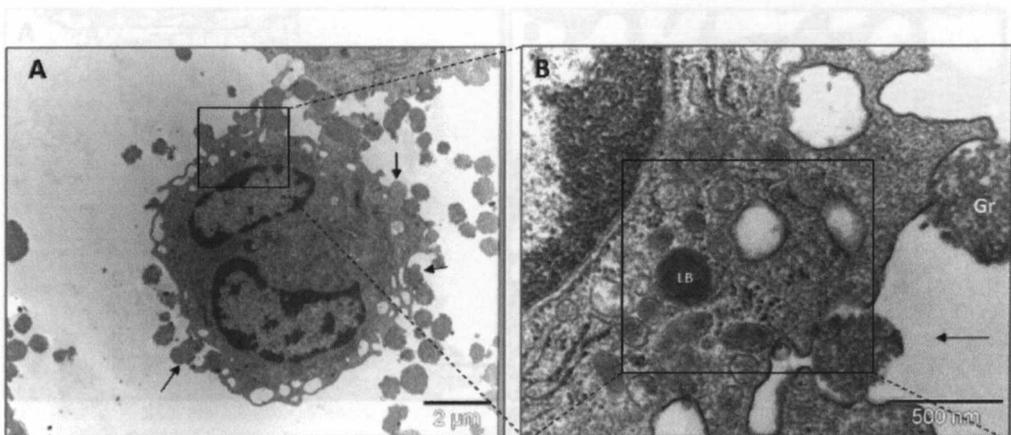
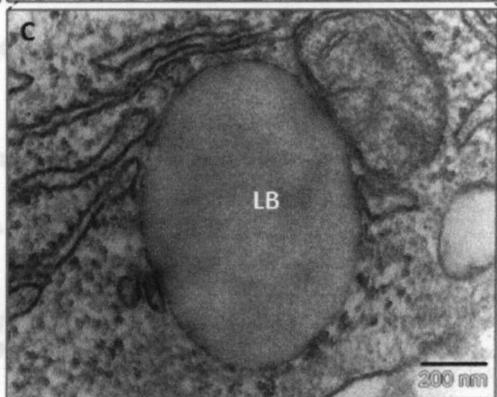


Grupo infectado com *L. chagasi* - 6h

Prancha 3

A – Presença de mastócito (M) íntegro, não degranulado. Box destaca a presença de corpúsculo lipídico pouco eletrondenso em neutrófilo (Nφ).

B e C – Neutrófilo em maior aumento. Corpúsculo lipídico (LB) em destaque, apresentando baixa eletrondensidade e contato com retículo endoplasmático rugoso e mitocôndria. Não são observados processos de internalização de grânulos.

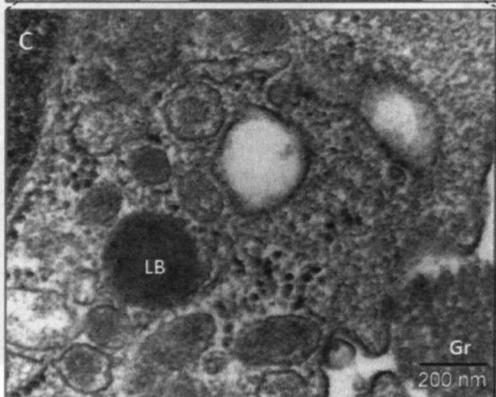


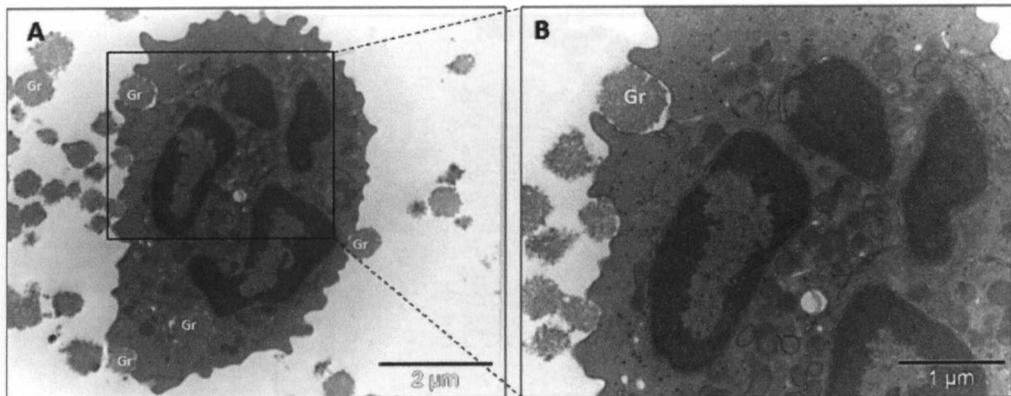
Grupo tratado com SGS - 6h

Prancha 4

A – Presença de muitos grânulos de mastócito. Neutrófilo em intenso processo de fagocitose de grânulos (Gr). Box destaca a presença de corpúsculo lipídico eletrondenso (LB).

B e C – Neutrófilo em maior aumento. Corpúsculo lipídico em destaque, apresentando eletrondensidade. São observados processos de internalização de grânulos (Gr) indicados por setas.





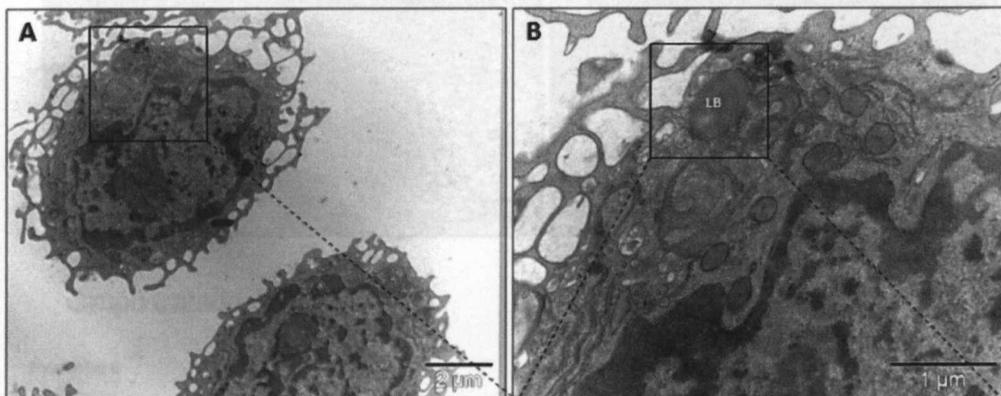
Grupo tratado com SGS + *L. chagasi* - 6h

Prancha 5

A – São observados eventos de fagocitose de grânulos (Gr) de mastócito por neutrófilos;

B – Destaque da fagocitose de grânulos de mastócito por neutrófilos.

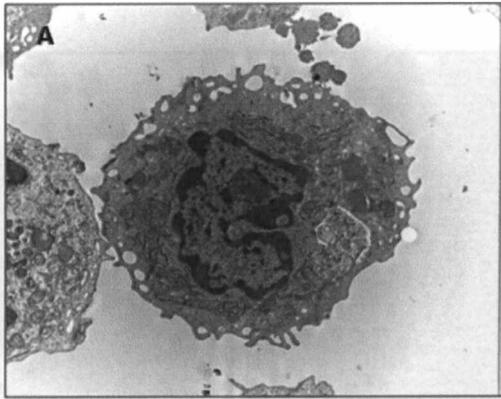
Macrófagos 6 horas



Grupo tratado com Salina - 6h

Prancha 6

A – Ausência de grânulos de mastócito. Macrófago residente. Corpúsculo lipídico (LB) eletrondenso em destaque (B e C);



Grupo infectado com *L. chagasi* - 6h

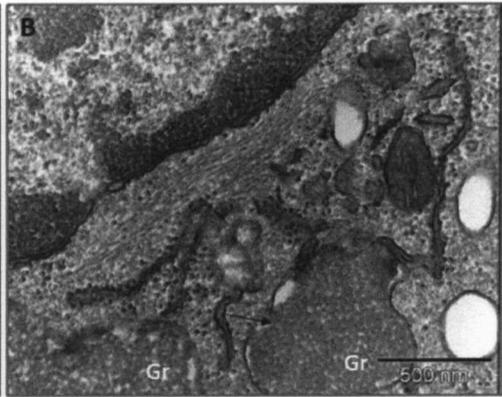
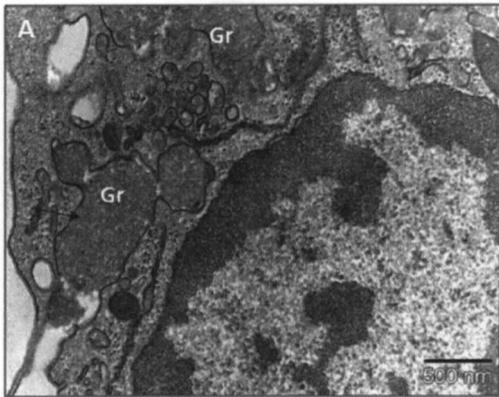
Prancha 7

Grupo tratado com SGS + *L. chagasi* - 6h

A - Ausência de grânulos de mastócito sendo internalizados.

Prancha 8

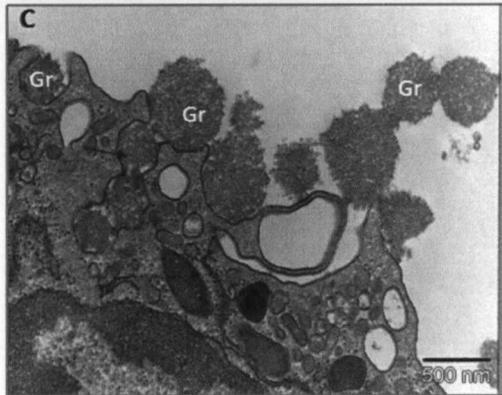
A e B - Eventos de internalização de grânulos de mastócitos por macrófagos residentes estão indicados por setas.

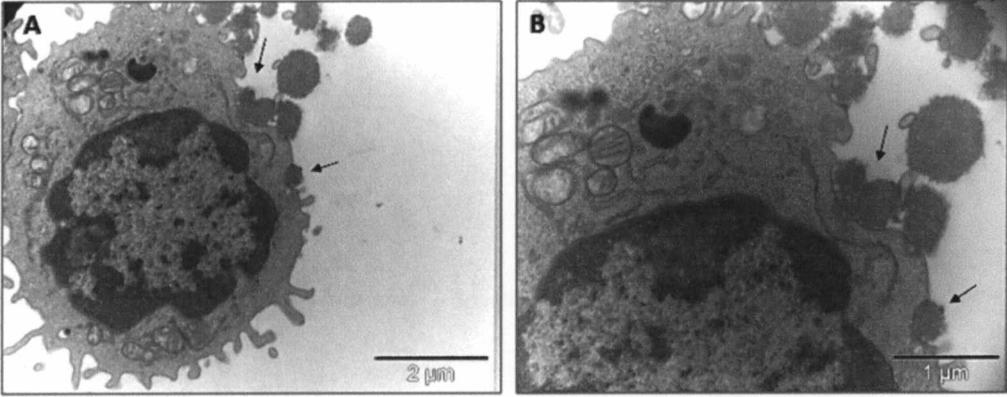


Grupo tratado com SGS - 6h

Prancha 8

A, B e C - Eventos de internalização de grânulos de mastócitos por macrófagos residentes estão indicados por setas.





Grupo tratado com SGS + *L. chagasi* - 6h

Prancha 9

A e B - Eventos de internalização de grânulos de mastócitos por macrófagos residentes estão indicados por setas.

APÊNDICE 2

APÊNDICE 2

Title page

Lutzomyia longipalpis Saliva Enhances *Leishmania chagasi* Infection through Neutrophil Recruitment and Apoptosis ¹

Deboraci Prates ^{*†}, Théo Araújo-Santos ^{*†}, Nivea Luz ^{**}, Jaqueline França-Costa ^{*†}, Bruno B. Andrade ^{*†}, Danielle Oliveira Nascimento [§], Jorge Clarêncio ^{*}, José Carlos Miranda ^{*}, Patrícia T. Bozza [§], George A. DosReis [¶], Cláudia Brodskyn ^{*||}, Manoel Barral-Netto ^{**||}, Valéria de Matos Borges ^{*||} and Aldina Barral ^{**||}

^{*}Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM/FIOCRUZ), and

[†]Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil; [‡] Instituto de

Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil; [§]Laboratório de

Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ,

Brasil; [¶]Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro,

Rio de Janeiro, Brasil; ^{||}Instituto de Investigação em Imunologia-iii, Salvador, Bahia, Brasil.

D.P. and T.A.S. contributed equally to this work.

The seniors' authors V.M.B. and A.B. have equally contributed to this work.

Corresponding author: Aldina Barral

Laboratório de Imunoparasitologia

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM/ FIOCRUZ-BA)

Rua Waldemar Falcão 121, Candeal - CEP 40295-001/ Salvador – Bahia – Brasil

Phone number: +55 – 71 – 3176-2215 - Fax number: +55 – 71 – 3176-2279

E-mail address: abarral@bahia.fiocruz.br

Running title: Sand fly SGS induces PMN apoptosis

Key words: saliva, *Lutzomyia longipalpis*, *Leishmania chagasi*, neutrophils, apoptosis

¹This study was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and iii (Institute of Investigation in Immunology).

Abstract

Neutrophils are considered the host first line defense against infections, and seem to be implicated in the immunopathogenesis of murine Leishmaniasis. Here, we evaluated the effect of *Lutzomyia longipalpis* saliva on neutrophil recruitment, apoptosis and its implications on the initial response to *Leishmania chagasi* infection. Intraperitoneal injection of *Lu. longipalpis* salivary gland sonicate (SGS) induced an earlier (6h peak response) neutrophil recruitment in C57BL/6, compared to BALB/c mice. This kinetics was correlated with events of neutrophil binding and phagocytosis by macrophages in both mouse strains. Furthermore, neutrophil recruitment induced in the presence of SGS and *L. chagasi* was correlated with the increase of neutrophil apoptosis and lipid mediators production on C57BL/6 mice. Internalization of *L. chagasi*-infected neutrophils by macrophages was also observed in vivo within 3 h. In vitro exposure of inflammatory peritoneal neutrophils to SGS induced apoptosis through a mechanism dependent on SGS proteins and mediated by caspases. Moreover, SGS in the presence of *L. chagasi* increased TGF- β 1 release while reduced ROS production, and these mechanisms led to increased neutrophil infection by *L. chagasi*. Conversely, inhibition of neutrophil apoptosis abrogated the SGS-induced increase in parasite burden. Taken together, our data indicate that neutrophil recruitment and apoptosis induced by *Lu. longipalpis* saliva increase *L. chagasi* parasite burden and may represent an important mechanism on establishment of infection by *L. chagasi*.

Introduction

Transmission of *Leishmania* sp. by hematophagous sand fly vectors occurs during blood feeding, when the salivary content is inoculated alongside *Leishmania* into host skin. Sand fly saliva enhances *Leishmania* infection on several experimental models (1, 2) through its modulatory role on the host immune system (3). A successful blood feeding depends on the formation of a blood hemorrhagic pool (4). In such environment there are many inflammatory cells (3), and *Lutzomyia longipalpis* saliva is able to enhance recruitment of both macrophages and neutrophils (5, 6).

Neutrophils are the first line of defense against infections. At inflammatory sites these cells play phagocytic and microbicidal roles in parasitic infections and constitutively die by apoptosis, being ingested by macrophages (7, 8). Recruitment and phagocytosis of neutrophils correlates with local production of inflammatory mediators. Neutrophil recruitment, survival and phagocytosis are regulated by LTB₄ (9). Furthermore, phagocytosis of apoptotic neutrophils triggers the production of anti-inflammatory mediators such TGF- β and PGE₂ which impair activation of macrophages (10). Neutrophils may play immunoregulatory roles in the host immune response to several infections (11), including those caused by *Leishmania* (12). Neutrophils are rapidly recruited to tissues infected with *Leishmania* (12-15).

Interactions with dead neutrophils exacerbate *Leishmania major* growth through induction of PGE₂ and TGF- β production, both on BALB/c mouse macrophages (16) and on human macrophages (17). In addition, neutrophils infected with *Leishmania* are evident in murine infections (18), and recent evidence suggests an important role for *Leishmania*-infected apoptotic neutrophils at the site of sand fly bite (19).

Despite the importance of both saliva and neutrophils at the initial stages of *Leishmania* infection, the role of sand fly saliva on recruitment, infection and turnover of neutrophils is not clear. In the present study, we explored the effect of *Lu. longipalpis* saliva on murine neutrophil recruitment and apoptosis and the importance of such aspects on parasite burden of neutrophils infected with *L. chagasi*.

Materials and Methods

Antibodies and Reagents

Anti-GR-1 was from BD Bioscience (San Diego, CA). Annexin V and PI were from R&D Systems (apoptosis detection kit; Minneapolis, MN). Neutrophils were treated with 100 μ M benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe)-fluoromethyl ketone [z-VAD (OMe)-FMK] (R&D Systems, Minneapolis, MN) or 0.4% solvent (DMSO) alone and 20 μ M Ectoposide (VP-16, Sigma, Saint Louis, Missouri). SGS were treated with 10 mg/ml proteinase K (Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY). 2'7'-dihydrodichlorofluorescein diacetate (H₂DCFDA) fluorescent probe was from Invitrogen, Molecular Probes, Inc (Eugene, OR).

Mice and parasite

Inbred male BALB/c and C57BL/6 mice, aging 6-8 wk, were obtained from the animal facility of CPqGM-FIOCRUZ (Bahia, Brazil). All experimental procedures were approved and conducted according to the Animal Care and Utilization Committee of the FIOCRUZ.

Leishmania chagasi (MCAN/BR/89/BA262) promastigotes were cultured at 27°C in Schneider's insect medium (Sigma, St. Louis, MO) supplemented with 20% inactive FBS, 2

mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Sand flies and preparation of salivary glands

Adult *Lutzomyia longipalpis* captured in Cavunge (Bahia, Brazil) were reared at the Laboratório de Imunoparasitologia/CPqGM/FIOCRUZ as described previously (5). Salivary glands were dissected from 5- to 7-day-old *Lu. longipalpis* female and stored in endotoxin-free PBS and stored at -70°C. Immediately before use, glands were sonicated (Sonifier 450, Branson, Danbury, CT) and centrifuged to obtain the salivary gland sonicate (SGS). The level of LPS contamination of SGS preparations was determined using a commercially available LAL Chromogenic Kit (QCL-1000, Lonza Bioscience) resulting in negligible levels of endotoxin in the salivary gland supernatant. All experimental procedures were used SGS equivalent to 0.5 pair of salivary gland per group which possesses approximately 0.7 micrograms of proteins (20).

Neutrophil migration into the peritoneal cavity

C57BL/6 and BALB/c mice were i.p.-inoculated with 0.1 ml of SGS (0.5 pair/cavity), 0.1 ml of *L. chagasi* (3×10^6 /cavity), 0.1 ml of endotoxin-free saline per cavity (negative control) or 0.1 ml of LPS (20µg/ml; positive control). After 6, 12, 24 and 48 h post stimulus the total leukocytes that migrated to the peritoneal cavity were harvested and total counts were performed on a Neubauer hemocytometer. Differential cell counts (200 cells total) were carried out microscopically on cytospin preparations stained with Diff-Quick. The results are presented as the number of leukocytes per ml.

Exudate neutrophils

For in vitro assays neutrophils were obtained from mice 7 hours after i.p. injection of 3 ml of aged, 3% thioglycolate solution (SIGMA). Peritoneal lavage was performed with 10 ml of RPMI 1640 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 1% Nutridoma-SP (Roche, Indianapolis, In, USA), 2mM/ml L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (all for Invitrogen). To remove adherent macrophages exudate cells were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 1 h in 250 ml flasks (Costar, Cambridge, MA), supernatants were recovered. The population obtained in this manner was comprised of 93-96% neutrophils as verified by FACS analyzing Gr-1⁺ population and differential cells counts on Diff-Quick stained cytopsin preparations. Cell viability was > 98% as determined by trypan blue exclusion (data not shown). For cell cultures neutrophils (5 x 10⁵/well) were placed in 200 µl RPMI 1640 medium supplemented with 1% Nutridoma-SP, 2mM/ml L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin in 96-well plates (Nunc, Denmark) in the presence of SGS (0.5 pair/well), Ectoposide (20µM) or LPS (100ng/well). As negative control cells were incubated with RPMI 1640 medium only. In some experiments SGS was incubated with proteinase K.

Assessment of neutrophil apoptosis

Neutrophil apoptosis was evaluated by a combination of two methods. Expression of membrane phosphatidilserine (PS) was assessed by labeling with annexin V-FITC by FACS analyses in conjunction with the propidium iodide (PI) nucleic dye (17). Morphological criteria as separation of nuclear lobes and darkly stained pyknotic nuclei was also used on

Diff-Quick stained cytospin preparations under oil immersion light microscopy. It was examined 200 cells/slide, graded as apoptotic and nonapoptotic.

In vitro neutrophil infection

Peritoneal neutrophils were infected in vitro with *L. chagasi* promastigotes stationary-phase at a ratio of 1:5 or 1:2 in the presence or absence of SGS (0.5 pair/well) in RPMI 1640 supplemented medium. In some experiments neutrophils were pre-incubated with z-VAD (100 μ M), or DMSO (0.4%) as a stock diluent control, for 30 minutes before infection.

Assessment of intracellular load of *L. chagasi*

Intracellular load of *L. chagasi* was estimated by production of proliferating extracellular motile promastigotes in Schneider medium (16). Briefly, after 3 and 20 hours, infected neutrophils were centrifuged and supernatants containing non-internalized promastigotes were collected and medium was replaced by 250 μ l of Schneider medium supplemented. Infected neutrophils were cultured at 26°C for additional 3 days. During these time points promastigotes in the cultures were counted in a Neubauer hemocytometer. Alternatively, cytospin preparations of infected neutrophils in the culture were stained with Diff-Quick and intracellular amastigotes of *L. chagasi* were counted in 200 neutrophils. Results are shown as parasites number per 100 neutrophils and as percentage of infected neutrophils.

PGE₂ and LTB₄ measurement

PGE₂ and LTB₄ levels were measured ex vivo from leukocytes harvested by peritoneal washing with Ca²⁺-Mg²⁺-free HBSS. After recovered cells (1x10⁶ cells/ml) were resuspended

in HBSS contained Ca^{2+} - Mg^{2+} and then stimulated with A23187 (0.5 μM) for 15 min.

Reactions were stopped on ice, and the samples were centrifuged at 500 x g for 10 min at 4°C.

PGE_2 and LTB_4 were assayed by enzyme-linked immunoassay (EIA), according to manufacturer's instructions (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI).

Cytokine production

Supernatants of neutrophils cultures stimulated with LPS (100ng/well) were collected 20 hours after incubation with medium (negative control), SGS, *L. chagasi*, SGS plus *L. chagasi* and LPS (positive control) cleared by centrifugation and stored at -20°C until cytokine determination. Total TGF- β 1 level was measured using ELISA (DuoSet kit; R&D Systems) according to the manufacturer's instructions. IL-10, IL-12 and IFN- γ were measured using Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

ROS evaluation

Intracellular reactive oxygen species (ROS) detection in neutrophils cultures (5×10^5 cells) was performed using 2',7'-dihydrodichlorofluorescein diacetate (H_2DCFDA) fluorescent probe following analyses by FACS, according to the manufacturer's instructions.

Flow cytometry

Peritoneal exudates cells obtained 6 h after i.p. injection of 3% thioglycolate were analyzed by forward and side scatter parameter, plus anti-Gr-1 mAb for neutrophil purify. Neutrophil cultures were treated with anti-CD16 (Fc block), stained with annexin V-FITC plus propidium

iodide for apoptosis assessment. Annexin V specificity was tested using Ca^{2+} -free buffer and binding was not observed in this case. For cytokine production assessment, CBA Mouse Inflammation Kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) was used according to the manufacture's instructions. For ROS production investigation neutrophil population was analyzed by forward and side scatter parameter following the $\text{H}_2\text{DCFDA-FITC}$ probe.

Statistical analysis

The in vivo assays and in vitro cultures were done using five mice per group. Each experiment was repeated at least three times. Data were reported as the mean \pm standard error of mean (SEM) of representative experiments and were analyzed statistically using GraphPad Prism Software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). After performing normality test, Kruskal-Wallis nonparametric test followed by Dunns' post test or ANOVA parametric test followed by Bonferroni post test were used to evaluate significance among groups.

Results

Effect of *Lu. longipalpis* SGS and *L. chagasi* on neutrophil recruitment and lipid mediators production

Sand fly saliva induces leukocyte recruitment in different models of *Leishmania* infection (5, 6, 21, 22). In order to investigate the effect of *Lu. longipalpis* saliva on neutrophil recruitment on BALB/c or C57BL/6 mice, we injected SGS i.p. (0.5 pair/cavity), LPS (2 μg /cavity) or saline and collected exudates after 6, 12, 24 and 48 h. *Lu. longipalpis* saliva

recruited neutrophils to the peritoneal cavity of BALB/c or C57BL/6 mice with distinct kinetics (Figure 1 A). In C57BL/6 mice, *Lu. longipalpis* SGS induced an increase in neutrophil recruitment, which was already evident 6 hours after inoculation, and that persisted up to 12 h when compared to mice injected with endotoxin-free saline. On the other hand, in BALB/c mice, the increase of neutrophils was evident only after 24 h (Figure 1 A). Cytospin preparations of the peritoneal cells from these assays showed neutrophils in contact with, or phagocytosed by macrophages at 6 hours (Figure 1 B). A slight increase on neutrophil adhesion to macrophages was observed 12 h after SGS inoculation in C57BL/6 mice, whereas in BALB/c mice this event was significant only after 48 h (Figure 1 C). Similarly, neutrophil phagocytosis by macrophages in C57BL/6 mice was an early event (6 and 12 h) relative to BALB/c mice (48 h; Figure 1 C).

The next step was to evaluate SGS-induced neutrophil recruitment in the presence of *L. chagasi* in C57BL/6 mice. *Leishmania* parasites induce recruitment of neutrophils and macrophages in different experimental models (23, 24). We found that neutrophils were recruited to the peritoneal cavity 3h after SGS injection, and this pattern persisted for up to 24 h (Figure 2 A). *L. chagasi* alone was able to recruit neutrophils into the peritoneal cavity at 3 h and this effect was further enhanced by the combination of SGS plus *L. chagasi* (Figure 2 A).

We next decided to quantify the presence of apoptotic neutrophils 3, 6 and 24 hours after injection of SGS. Apoptotic neutrophils were not found at 3 h after any stimuli (data not shown). By contrast, 6 h after either SGS, *L. chagasi* or both combined there was a significant increase on the percentage of apoptotic neutrophils in C57BL/6 mice (Figure 2 B), whereas in BALB/mice this event was only observed after 24 h (data not shown).

Moreover, we observed the presence of infected peritoneal macrophages and neutrophils in C57BL/6 mice 3 h after injection of SGS plus *L. chagasi* (Figure 2 C and D). Interestingly, infected neutrophils were observed inside peritoneal macrophages (Figure 2 E). The uptake of apoptotic neutrophils by macrophages triggers PGE₂ production, which leads to macrophage deactivation (10) and enhances infections by different microorganisms (17, 25, 26). Furthermore, it has been demonstrated that leukotrienes are important in host responses to infection (27) including those caused by protozoans (28, 29). There was a significant increase of both PGE₂ and LTB₄ levels on supernatants of restimulated peritoneal cells recovered 3 and 6 hours after injection with *L. chagasi* in the presence of SGS (Figure 2 F).

SGS-induced neutrophil apoptosis in vitro was mediated by caspases and FasL expression

Based on the above results we hypothesized that *Lu. longipalpis* saliva promptly recruits neutrophils and induces their apoptosis in C57BL/6 mice, favoring their internalization by macrophages. To assess the role of *Lu. longipalpis* SGS on apoptosis of murine neutrophils, we performed in vitro assays using neutrophils from C57BL/6 mice obtained 6 h after i.p. thioglycolate injection. An SGS equivalent to 0.5 pair of salivary gland per well was used in the in vitro neutrophil apoptosis assays based on a dose-response curve (data not shown). Ectoposide was used as positive control to induce neutrophil apoptosis. Twenty, but not 3 h after incubation, we observed the pro-apoptotic activity of SGS on C57BL/6 neutrophils both by annexin V detection (Figure 3 A) and by the presence of pyknotic nuclei (Figure 3 B). These results indicate that *Lu. longipalpis* SGS induces apoptosis of murine neutrophils. In order to address the *Lu. longipalpis* saliva components responsible for its apoptotic activity, we pre-incubated SGS with proteinase k before in vitro

stimulation of neutrophils. We observed a reduction of apoptotic activity of *Lu. longipalpis* SGS by incubation with proteinase k (Figure 3 C). This result suggests that apoptosis of neutrophils induced by *Lu. longipalpis* saliva is mediated by a proteic component.

Caspases are cysteine proteases involved in execution of the apoptosis program. With the purpose of evaluating the mechanisms by which *Lu. longipalpis* saliva induces neutrophil apoptosis, we incubated C57BL/6 murine neutrophils with zVAD, a pan-caspase inhibitor, for 30 minutes before addition of *Lu. longipalpis* SGS. Treatment with zVAD prevented neutrophil apoptosis induced by *Lu. longipalpis* SGS, in contrast to treatment with vehicle DMSO alone (Figure 3 D). Furthermore, caspases are mediators of Fas-induced apoptosis. In this case, activation of these proteases occurs by interaction between Fas ligand (FasL), a protein that belongs to the TNF gene family, with Fas receptor (7, 30). Because expression of FasL increases susceptibility to *Leishmania* infection (31) we assessed FasL expression on neutrophils exposed to *Lu. longipalpis* saliva. C57BL/6 neutrophils incubated with *Lu. longipalpis* SGS showed an increase in FasL expression as observed by FACS analysis (Figure 3 E).

Neutrophil apoptosis induced by *Lu. longipalpis* SGS increase *L. chagasi* parasite burden

After demonstrating the pro-apoptotic effect of *Lu. longipalpis* saliva we evaluated whether *L. chagasi* alone or in combination with SGS induced neutrophil apoptosis in vitro. Analysis of PS exposition on inflammatory neutrophils confirmed that *L. chagasi* was able to induce neutrophil apoptosis (Figure 4 A). Indeed, this effect was exacerbated when neutrophils were incubated with SGS plus *L. chagasi* (Figure 4 A).

Besides having an essential role in controlling infections by microorganisms, neutrophils ultimately can be host cells to *Leishmania* (18, 19, 32). Since sand fly saliva

exacerbates *Leishmania* infections (1), we performed in vitro infections of C57BL/6 inflammatory neutrophils with *L. chagasi* in the presence of *Lu. longipalpis* SGS. Microscopic assessment of neutrophil infection demonstrated that SGS increased the percentage of infected neutrophils and intracellular amastigote numbers (Figure 4 B). Additionally, there was a significant increase on viable promastigotes obtained from cultures of neutrophils infected with *L. chagasi* plus SGS (Figure 4 C). Infection performed in the presence of ectoposide did not enhance neutrophil parasite burden, presenting similar numbers to control cultures infected with *L. chagasi* alone (Figure 4 C). As we observed infected apoptotic neutrophils (Figure 2 D), we investigated whether neutrophil apoptosis induced by *Lu. longipalpis* saliva affects the increase of parasite burden in vitro. Neutrophil cultures pre-treated with zVAD had lower parasite burdens than untreated cultures upon infection with *L. chagasi* in association with SGS (Figure 4 D). These data suggest that neutrophil apoptosis induced by *Lu. longipalpis* saliva favors infections by *L. chagasi*.

Cytokine and ROS production by neutrophil in the presence of SGS

Caspase activation during apoptosis is associated with changes in neutrophil function (33). We next evaluated whether the increased neutrophil infection induced by *Lu. longipalpis* SGS was due to a decrease in the neutrophil oxidative mechanisms. Analyses by flow cytometry after using H₂DCFDA fluorescent probe (34) revealed a partial inhibition of ROS generation by neutrophils incubated with *L. chagasi* in the presence of *Lu. longipalpis* SGS (Figure 5 A).

Besides an effector function, neutrophils also play immunoregulatory roles through cytokine production (35, 36). To investigate whether *Lu. longipalpis* saliva modulates

cytokine production by neutrophils, we measured IL-12, IL-10, IFN- γ and TGF- β levels in culture supernatants of neutrophils previously incubated with *L. chagasi* with or without SGS and stimulated with LPS (Figure 5 B). TGF- β , IFN- γ , IL-12 and IL-10 were differentially modulated after injection with different stimuli (Figure 5 B). SGS alone was able to induce higher production of both IL-12p70 and IFN- γ in culture supernatants (Figure 5 B). Stimulation with *L. chagasi* alone was related to increased IL-10 levels compared to medium or SGS. Interestingly, SGS together with *L. chagasi* decreased IL-10 production compared to cultures primed with *L. chagasi* alone, while TGF- β levels were significantly higher and sustained IL-12p70 levels was noted as compared to SGS alone. Taken together, these results suggested that SGS in combination with *L. chagasi* could favor neutrophil infection by modulating ROS generation and cytokine production.

Discussion

Our results provided the first evidence that saliva from a *Leishmania* vector plays a relevant role on the outcome of infection by recruiting neutrophils and inducing their apoptosis, leading to higher parasite burdens. Neutrophils are considered as an initial target of *Leishmania* infection (19, 37) and they are implicated in the immunopathogenesis of murine Leishmaniasis (12, 16). Moreover, significant numbers of neutrophils are present at the inoculation site, lesions and draining lymph nodes from *Leishmania* infected mice (12-15, 38). In addition, *Leishmania* parasites undergo a silent entry into macrophages inside phagocytosed neutrophils, thus reinforcing the role of neutrophils on establishment of *Leishmania* infection (39). However, the role of *Leishmania* vector saliva was not investigated before in the context of neutrophil infection by *Leishmania*.

Sand fly saliva recruits macrophages, eosinophils and neutrophils to the site of infection (5, 6, 21, 22). Our data and those of others (19) confirmed that sand fly saliva induced a sustained neutrophil recruitment response to the peritoneum, compared to needle injection alone. Although *Lu. longipalpis* saliva induces macrophage recruitment into murine air pouches (6), we did not observe a similar recruitment to the peritoneum, which already presents a large population of resident macrophages. On the other hand, our results confirmed the neutrophil recruitment ability of sand fly saliva, and showed additive effects between SGS and *L. chagasi* as previously observed in the air pouch model (6).

When we performed *in vivo* infections, infected neutrophils and macrophages, as well as phagocytosis of infected neutrophils by macrophages, were observed on C57BL/6 peritoneal cavity. Furthermore, we found that high levels of LTB₄ and PGE₂ were associated with inoculation of *L. chagasi* plus SGS. Leukotrienes increase pathogen internalization by phagocytes. Release of LTB₄ could favor the recruitment of neutrophils and phagocytosis of parasites by these cells. On the other hand, PGE₂ facilitates *Leishmania* infections by deactivating macrophage microbicidal functions (16, 17, 25, 26). Our data suggested that the presence of sand fly saliva favors an anti-inflammatory response through induction of neutrophil apoptosis and production of PGE₂ that could be facilitating the parasite infection.

The differences on neutrophil recruitment kinetics between BALB/c and C57BL/6 mice were also observed on neutrophil adhesion to, and phagocytosis by macrophages. Noteworthy was the increased presence of apoptotic neutrophils as early as six hours after SGS and/or *L. chagasi* inoculation on C57BL/6, and only at 24 hours on BALB/c mice (data not shown). Viable parasites are released from murine apoptotic neutrophils after *L. major* infection by sand fly bites (19). Our observation that components of sand fly saliva are able to

both recruit and induce a pro-apoptotic effect on neutrophils fits well in such context, and adds to the notion of the beneficial effect of vector saliva on *Leishmania* transmission.

Our results demonstrated that SGS increased neutrophil parasite burden. This deleterious effect was specifically attributed to SGS-induced neutrophil apoptosis because it was not observed in etoposide-induced apoptosis and inhibition of apoptosis by zVAD partially reduced the parasite burden. Apoptosis plays an important role on parasite replication in phagocytes. Treatment with zVAD blocks lymphocyte apoptosis and increases in vitro and in vivo resistance to *Trypanosoma cruzi* infection (25, 40). We found *L. chagasi*-infected neutrophils phagocytosed by macrophages in the presence of SGS. These results give support to the proposed “Trojan horse” role of neutrophils as vectors for parasite entry into macrophages (37). However, since apoptosis elicits anti-inflammatory responses (10, 41), we cannot rule out the possibility of *Leishmania* being released by infected neutrophils and subsequently being phagocytosed by deactivated macrophages (19). It is possible that both mechanisms coexist at the site of infection.

Production of reactive oxygen species is an important microbicidal mechanism (42), and reactive oxygen and nitrogen intermediates contribute to intracellular killing of *L. chagasi* in macrophages (43). Additionally, the functional impairment of aged tissue neutrophils correlates with induction of apoptosis (33, 44). SGS reduced ROS production by neutrophils incubated with *L. chagasi*. This reduction might be related to the caspase-mediated apoptosis triggered by SGS. It is possible that this mechanism contributed to the increased parasite burden induced by SGS on *L. chagasi*-infected neutrophils.

Finally, we investigated the role of SGS on cytokine production by neutrophils incubated in the presence of *L. chagasi*. Neutrophils release immunomodulatory cytokines in

response to different stimuli (36, 45-47). TGF- β inhibits pro-inflammatory cytokine production through autocrine and paracrine mechanisms (10, 48) and is implicated in the establishment of *Leishmania* infection (17, 31, 49, 50). In the presence of SGS and *L. chagasi* there was a significant increase of bioactive TGF- β 1 produced by neutrophils, which could be implicated in the observed increase on parasite burden. We found that *Lu. longipalpis* SGS inhibits IL-10 production while augmenting the levels of IL-12p70 and IFN- γ production by neutrophils, similar to previous findings using human monocytes in vitro (51). These results suggested that SGS promotes the development of a cell-mediated response, which could be beneficial to the sand fly blood meal as it increased blood flow at bite site (21).

Our results suggested that induction of neutrophil apoptosis could be an important mechanism to promote *Leishmania* infection because: i) apoptosis of neutrophils induced by saliva and *L. chagasi* impaired microbicidal function of these cells and decreased generation of ROS; and ii) triggered an anti-inflammatory environment through release of TGF- β 1. Our in vivo results of neutrophil recruitment and infection in the presence of saliva, associated with production of PGE₂ and LTB₄ sustained this hypothesis. These factors could favor parasite survival on neutrophils until macrophages arrive at large numbers at the infection site. Indeed, apoptotic cells are able to recruit macrophages (52) and their phagocytosis promotes incomplete macrophage activation without inflammation (7). Altogether, these results reveal that vector saliva plays an active role in the interactions between innate and acquired immunity and likely contribute to the establishment of *Leishmania* infection.

Acknowledgements

We thank Clarissa Teixeira for helpful with discussions and Edvaldo Passos for technical assistance with the insect colony. DP, TAS, NL, JFC, BBA and DON are recipients of a CNPq fellowship. PTB, GAR, CIB, MBN, VMB and AB are senior investigators from CNPq.

References

1. Belkaid, Y., S. Kamhawi, G. Modi, J. Valenzuela, N. Noben-Trauth, E. Rowton, J. Ribeiro, and D. L. Sacks. 1998. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *The Journal of experimental medicine* 188:1941-1953.
2. Kamhawi, S., Y. Belkaid, G. Modi, E. Rowton, and D. Sacks. 2000. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290:1351-1354.
3. Andrade, B. B., C. R. Teixeira, A. Barral, and M. Barral-Netto. 2005. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 77:665-693.
4. Ribeiro, J. M. 1987. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu Rev Entomol* 32:463-478.
5. Silva, F., R. Gomes, D. Prates, J. C. Miranda, B. Andrade, M. Barral-Netto, and A. Barral. 2005. Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. *Am J Trop Med Hyg* 72:94-98.
6. Teixeira, C. R., M. J. Teixeira, R. B. Gomes, C. S. Santos, B. B. Andrade, I. Raffaele-Netto, J. S. Silva, A. Guglielmotti, J. C. Miranda, A. Barral, C. Brodskyn, and M. Barral-Netto. 2005. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. *J Immunol* 175:8346-8353.
7. Savill, J. S., P. M. Henson, and C. Haslett. 1989. Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages is mediated by a novel "charge-sensitive" recognition mechanism. *J Clin Invest* 84:1518-1527.
8. Nathan, C. 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6:173-182.
9. Murray, J., C. Ward, J. T. O'Flaherty, I. Dransfield, C. Haslett, E. R. Chilvers, and A. G. Rossi. 2003. Role of leukotrienes in the regulation of human granulocyte behaviour.

- dissociation between agonist-induced activation and retardation of apoptosis. *British journal of pharmacology* 139:388-398.
10. Fadok, V. A., D. L. Bratton, A. Konowal, P. W. Freed, J. Y. Westcott, and P. M. Henson. 1998. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101:890-898.
 11. Romani, L., A. Mencacci, E. Cenci, P. Puccetti, and F. Bistoni. 1996. Neutrophils and the adaptive immune response to *Candida albicans*. *Research in immunology* 147:512-518.
 12. Tacchini-Cottier, F., C. Zweifel, Y. Belkaid, C. Mukankundiye, M. Vasei, P. Launois, G. Milon, and J. A. Louis. 2000. An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4+ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *J Immunol* 165:2628-2636.
 13. Pompeu, M. L., L. A. Freitas, M. L. Santos, M. Khouri, and M. Barral-Netto. 1991. Granulocytes in the inflammatory process of BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. A quantitative approach. *Acta Trop* 48:185-193.
 14. Lima, G. M., A. L. Vallochi, U. R. Silva, E. M. Bevilacqua, M. M. Kiffer, and I. A. Abrahamsohn. 1998. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. *Immunol Lett* 64:145-151.
 15. de Moura, T. R., F. O. Novais, F. Oliveira, J. Clarencio, A. Noronha, A. Barral, C. Brodskyn, and C. I. de Oliveira. 2005. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun* 73:5827-5834.
 16. Ribeiro-Gomes, F. L., A. C. Otero, N. A. Gomes, M. C. Moniz-De-Souza, L. Cysne-Finkelstein, A. C. Amholdt, V. L. Calich, S. G. Coutinho, M. F. Lopes, and G. A. DosReis. 2004. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J Immunol* 172:4454-4462.
 17. Afonso, L., V. M. Borges, H. Cruz, F. L. Ribeiro-Gomes, G. A. DosReis, A. N. Dutra, J. Clarencio, C. I. de Oliveira, A. Barral, M. Barral-Netto, and C. I. Brodskyn. 2008. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J Leukoc Biol* 84:389-396.
 18. Belkaid, Y., S. Mendez, R. Lira, N. Kadambi, G. Milon, and D. Sacks. 2000. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J Immunol* 165:969-977.
 19. Peters, N. C., J. G. Egen, N. Secundino, A. Debrabant, N. Kimblin, S. Kamhawi, P. Lawyer, M. P. Fay, R. N. Germain, and D. Sacks. 2008. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321:970-974.
 20. Prates, D. B., L. D. Santos, J. C. Miranda, A. P. Souza, M. S. Palma, M. Barral-Netto, and A. Barral. 2008. Changes in amounts of total salivary gland proteins of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) according to age and diet. *J Med Entomol* 45:409-413.

21. Belkaid, Y., J. G. Valenzuela, S. Kamhawi, E. Rowton, D. L. Sacks, and J. M. Ribeiro. 2000. Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly? *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6704-6709.
22. Monteiro, M. C., H. C. Lima, A. A. Souza, R. G. Titus, P. R. Romao, and F. Q. Cunha. 2007. Effect of *Lutzomyia longipalpis* salivary gland extracts on leukocyte migration induced by *Leishmania major*. *Am J Trop Med Hyg* 76:88-94.
23. van Zandbergen, G., N. Hermann, H. Laufs, W. Solbach, and T. Laskay. 2002. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. *Infect Immun* 70:4177-4184.
24. Teixeira, M. J., J. D. Fernandes, C. R. Teixeira, B. B. Andrade, M. L. Pompeu, J. Santana da Silva, C. I. Brodskyn, M. Barral-Netto, and A. Barral. 2005. Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different paces of chemokine expression patterns. *Infect Immun* 73:1191-1195.
25. Freire-de-Lima, C. G., D. O. Nascimento, M. B. Soares, P. T. Bozza, H. C. Castro-Faria-Neto, F. G. de Mello, G. A. DosReis, and M. F. Lopes. 2000. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* 403:199-203.
26. D'Avila, H., N. R. Roque, R. M. Cardoso, H. C. Castro-Faria-Neto, R. C. Melo, and P. T. Bozza. 2008. Neutrophils recruited to the site of *Mycobacterium bovis* BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and Prostaglandin E production by macrophages. *Cellular microbiology*.
27. Peters-Golden, M., C. Canetti, P. Mancuso, and M. J. Coffey. 2005. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. *J Immunol* 174:589-594.
28. Wirth, J. J., and F. Kierszenbaum. 1985. Stimulatory effects of leukotriene B4 on macrophage association with and intracellular destruction of *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 134:1989-1993.
29. Serezani, C. H., J. H. Perrela, M. Russo, M. Peters-Golden, and S. Jancar. 2006. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. *J Immunol* 177:3201-3208.
30. Nagata, S. 1999. Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet* 33:29-55.
31. Ribeiro-Gomes, F. L., M. C. Moniz-de-Souza, V. M. Borges, M. P. Nunes, M. Mantuano-Barradas, H. D'Avila, P. T. Bozza, V. L. Calich, and G. A. DosReis. 2005. Turnover of neutrophils mediated by Fas ligand drives *Leishmania major* infection. *J Infect Dis* 192:1127-1134.
32. Laufs, H., K. Muller, J. Fleischer, N. Reiling, N. Jahnke, J. C. Jensenius, W. Solbach, and T. Laskay. 2002. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun* 70:826-835.
33. Yamashita, K., A. Takahashi, S. Kobayashi, H. Hirata, P. W. Mesner, Jr., S. H. Kaufmann, S. Yonehara, K. Yamamoto, T. Uchiyama, and M. Sasada. 1999. Caspases mediate tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil apoptosis and downregulation of reactive oxygen production. *Blood* 93:674-685.
34. Negre-Salvayre, A., N. Auge, C. Duval, F. Robbesyn, J. C. Thiers, D. Nazzari, H. Benoist, and R. Salvayre. 2002. Detection of intracellular reactive oxygen species in cultured cells using fluorescent probes. *Methods Enzymol* 352:62-71.

35. Grotendorst, G. R., G. Smale, and D. Pancev. 1989. Production of transforming growth factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils. *J Cell Physiol* 140:396-402.
36. Romani, L., A. Mencacci, E. Cenci, R. Spaccapelo, G. Del Sero, I. Nicoletti, G. Trinchieri, F. Bistoni, and P. Puccetti. 1997. Neutrophil production of IL-12 and IL-10 in candidiasis and efficacy of IL-12 therapy in neutropenic mice. *J Immunol* 158:5349-5356.
37. van Zandbergen, G., W. Solbach, and T. Laskay. 2007. Apoptosis driven infection. *Autoimmunity* 40:349-352.
38. Barral-Netto, M., L. A. de Freitas, and Z. A. Andrade. 1987. Histopathologic changes induced by vaccination in experimental cutaneous leishmaniasis of BALB/c mice. *Am J Pathol* 127:271-278.
39. van Zandbergen, G., M. Klinger, A. Mueller, S. Dannenberg, A. Gebert, W. Solbach, and T. Laskay. 2004. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol* 173:6521-6525.
40. Silva, E. M., L. V. Guillermo, F. L. Ribeiro-Gomes, J. De Meis, M. P. Nunes, J. F. Senra, M. B. Soares, G. A. DosReis, and M. F. Lopes. 2007. Caspase inhibition reduces lymphocyte apoptosis and improves host immune responses to *Trypanosoma cruzi* infection. *Eur J Immunol* 37:738-746.
41. Savill, J., I. Dransfield, C. Gregory, and C. Haslett. 2002. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2:965-975.
42. Henson, P. M., and R. B. Johnston, Jr. 1987. Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins. *J Clin Invest* 79:669-674.
43. Gantt, K. R., T. L. Goldman, M. L. McCormick, M. A. Miller, S. M. Jeronimo, E. T. Nascimento, B. E. Britigan, and M. E. Wilson. 2001. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J Immunol* 167:893-901.
44. Whyte, M. K., L. C. Meagher, J. MacDermot, and C. Haslett. 1993. Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *J Immunol* 150:5124-5134.
45. Romani, L., A. Mencacci, E. Cenci, G. Del Sero, F. Bistoni, and P. Puccetti. 1997. An immunoregulatory role for neutrophils in CD4+ T helper subset selection in mice with candidiasis. *J Immunol* 158:2356-2362.
46. Bliss, S. K., B. A. Butcher, and E. Y. Denkers. 2000. Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection. *J Immunol* 165:4515-4521.
47. Charmoy, M., R. Megnekou, C. Allenbach, C. Zweifel, C. Perez, K. Monnat, M. Breton, C. Ronet, P. Launois, and F. Tacchini-Cottier. 2007. *Leishmania major* induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. *J Leukoc Biol* 82:288-299.
48. Freire-de-Lima, C. G., Y. Q. Xiao, S. J. Gardai, D. L. Bratton, W. P. Schiemann, and P. M. Henson. 2006. Apoptotic cells, through transforming growth factor-beta, coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages. *J Biol Chem* 281:38376-38384.
49. Barral-Netto, M., A. Barral, C. E. Brownell, Y. A. Skeiky, L. R. Ellingsworth, D. R. Twardzik, and S. G. Reed. 1992. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science* 257:545-548.

50. Li, J., C. A. Hunter, and J. P. Farrell. 1999. Anti-TGF-beta treatment promotes rapid healing of *Leishmania major* infection in mice by enhancing in vivo nitric oxide production. *J Immunol* 162:974-979.
51. Costa, D. J., C. Favali, J. Clarencio, L. Afonso, V. Conceicao, J. C. Miranda, R. G. Titus, J. Valenzuela, M. Barral-Netto, A. Barral, and C. I. Brodskyn. 2004. *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. *Infect Immun* 72:1298-1305.
52. Lauber, K., E. Bohn, S. M. Krober, Y. J. Xiao, S. G. Blumenthal, R. K. Lindemann, P. Marini, C. Wiedig, A. Zobywalski, S. Baksh, Y. Xu, I. B. Autenrieth, K. Schulze-Osthoff, C. Belka, G. Stuhler, and S. Wesselborg. 2003. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 113:717-730.

Figure legends

Figure 1

Neutrophil influx into BALB/c and C57BL/6 peritoneal cavity in response to *Lu. longipalpis*. Mice were injected with endotoxin-free saline or *Lu. longipalpis* SGS (0.5 pair/animal). Six, 12, 24 and 48 hours after stimulation, peritoneal cavities were washed and differential cell counts were performed on Diff-quick stained cytospin preparations. A, Kinetics of neutrophil recruitment in BALB/c (top) and C57BL/6 mice. Values represent means \pm SEM of five mice per group. Significant differences (**, $p < 0.01$) between saline and SGS-treated groups. B, Representative events of adhesion and phagocytosis of neutrophils by macrophages on Diff-

Quick stained cytospin. Note the presence of apoptotic neutrophils (arrow) being internalized by macrophages (Magnification X1000). C, Adhesion of neutrophils by macrophages and phagocytosis of leukocytes by macrophages after 6, 12, 24 and 48h of stimulation with SGS (■) or saline (□). Values represent means \pm SEM of five mice per group. *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$. Data shown are from a single experiment representative of three independent experiments.

Figure 2

Neutrophil influx and apoptosis into C57BL/6 peritoneal cavity in response to *Lu. longipalpis* SGS and/or *L. chagasi*. Mice were injected with saline, SGS (0.5 pair/animal), *L. chagasi* (3×10^6), SGS plus *L. chagasi* and LPS (500 ng/ml). Three, 6 and 24 hours after stimulation, peritoneal cavities were washed and differential cell counts were performed on Diff-quick stained cytospin preparations. A, Neutrophil recruitment on C57BL/6 mice at 3, 6 and 24 h. B, Percentage of apoptotic neutrophils on C57BL/6 mice at 6 and 24 h after stimulation. C, D and E, Representative events of infected macrophages (C), infected neutrophils (D) and macrophages internalizing *L. chagasi*-infected neutrophils (E) three hours after infection in the presence of SGS. *L. chagasi* inside vacuole (arrow) (Magnification X1000). F, Ex-vivo PGE₂ and LTB₄ production by restimulated peritoneal cells recovered at 3 and 6 h p.i. Values represent means \pm SEM of five mice per group. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ and ***, $p < 0.001$, compared to saline. $\Psi\Psi$, $p < 0.01$ and $\Psi\Psi\Psi$, $p < 0.001$ indicate a significant difference between 6 and 24h analysed groups. Data shown are from a single experiment representative of three independent experiments.

Figure 3

Induction of neutrophil apoptosis by *Lu. longipalpis* SGS in vitro. Neutrophils from C57BL/6 mice were incubated with medium alone, SGS (0.5 pair/well) or etoposide (20 μ M). Three and 20 hours after stimulation, neutrophil apoptosis was assessed by flow cytometry through annexin-V staining (A) and by counting cells with pyknotic nuclei (B). *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$ compared to medium alone. C, Inhibition of SGS-induced neutrophil apoptosis after SGS treatment with proteinase-K. Neutrophils were pre-treated with proteinase K and incubated for 20 h with SGS, and analyzed for annexin-V staining. *, $p < 0.05$ compared to the absence of proteinase-K. D, Inhibition of neutrophil apoptosis by zVAD. Neutrophils were pre-treated with the pan-caspase inhibitor, zVAD or DMSO before incubation with SGS. Twenty hours after incubation apoptosis was assessed by annexin-V staining (*, $p < 0.05$ compared to solvent). E, FasL expression induced by SGS on neutrophils was analyzed by flow cytometry twenty hours after incubation. Results are expressed as the mean fluorescence intensity (MFI) (top/left) and percentage of FasL expressing-neutrophils (bottom/right) on Gr-1 population (*, $p < 0.05$). Values represent means \pm SEM of five individual mice per group. Data shown are from a single experiment representative of three independent experiments.

Figure 4

Lu. longipalpis saliva increases parasite burden on neutrophils in vitro. A, Effect of *L. chagasi* on neutrophil apoptosis induced by SGS. Inflammatory neutrophils from C57BL/6 mice were incubated with medium alone, SGS (0.5 pair/well), *L. chagasi* (5:1) or SGS+*L. chagasi*. After 20 h neutrophil apoptosis was assessed by annexin-V staining (following flow cytometry analyses). B, Twenty hours after infection with *L. chagasi* (2:1) alone or *L. chagasi* in the

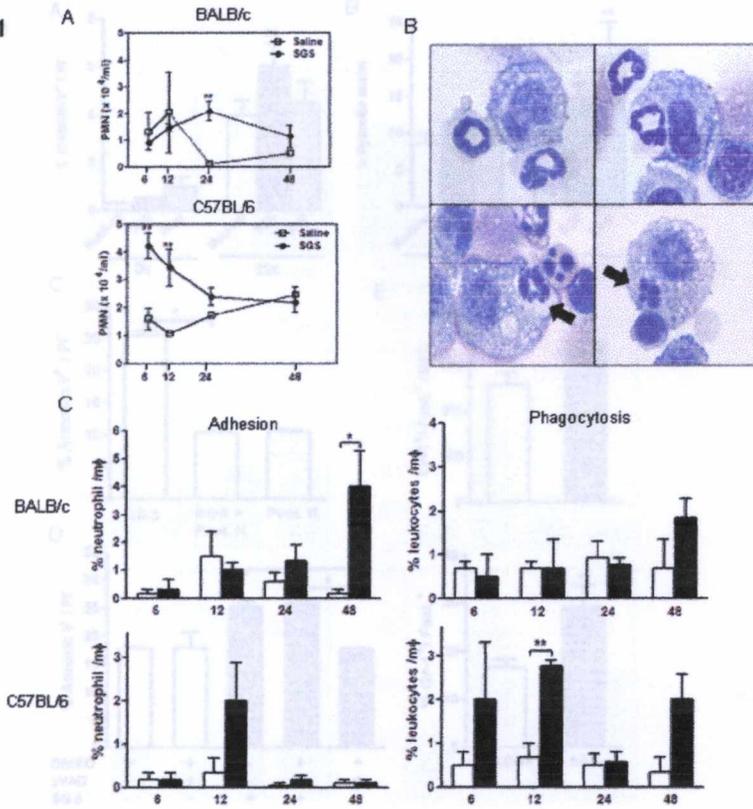
presence of SGS, neutrophils were cytocentrifuged, stained and assessed for amastigote number/100 neutrophils (left) and for percentage of infected neutrophils (right). Values represent means \pm SEM of 3 individual mice per group. B, Representative Diff-Quick stained cytospin of neutrophils infected with *L. chagasi* alone and *L. chagasi* plus SGS. Note parasites inside viable and apoptotic neutrophils (Magnification X1000). C, Extracellular *L. chagasi* promastigote production was measured after 1, 2 and 3 days. Results are means \pm SEM of five individual mice per group. *, $p < 0.05$ compared to *L. chagasi* group. D, Reduction of *L. chagasi* parasite burden in neutrophils treated with zVAD. Parasite burden was estimated after 3 d by counting viable promastigote production. Results are means \pm SEM of five individual mice per group (*, $p < 0.05$). Data shown are from a single experiment representative of three independent experiments.

Figure 5

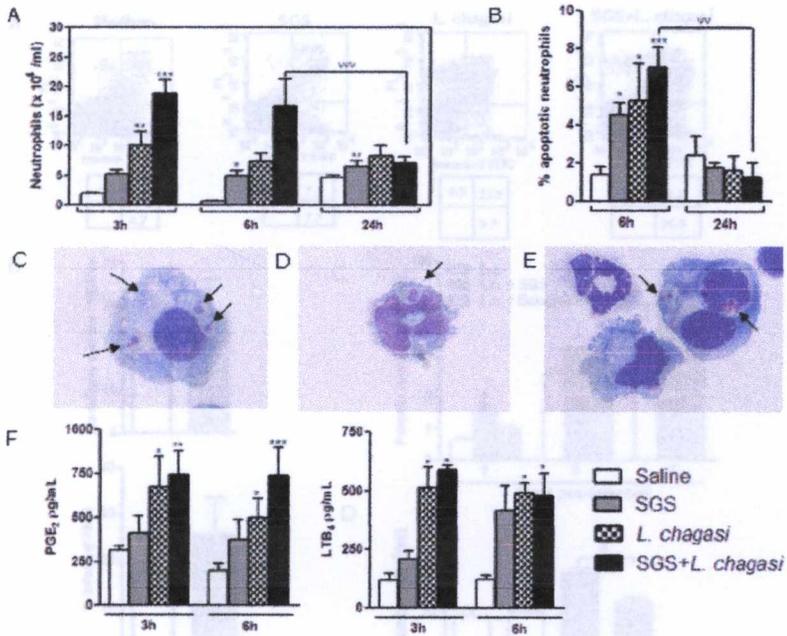
ROS and cytokine production by neutrophils infected with *L. chagasi* in the presence of *Lu. longipalpis* saliva. A, Peritoneal neutrophils obtained after thioglycolate stimulation were incubated with *L. chagasi* or *L. chagasi* plus SGS. One hour after incubation, neutrophils were incubated with H2DCFDA and ROS production was evaluated by flow cytometry. Results are expressed as the mean \pm SEM of the MFI (**, $p < 0.01$). B, Neutrophils were incubated for 20 h with medium, SGS, *L. chagasi*, *L. chagasi* plus SGS, or LPS (100ng/well). Supernatants were recovered and the levels of cytokines produced were measured by ELISA (TGF- β) or Cytometric Bead Array (CBA) (IL10, IL-12p70, IFN- γ) (*, $p < 0.05$ and ***, $p < 0.001$,

compared to medium alone). Results are means \pm SEM of five individual mice per group. Data shown are from a single experiment representative of three independent experiments.

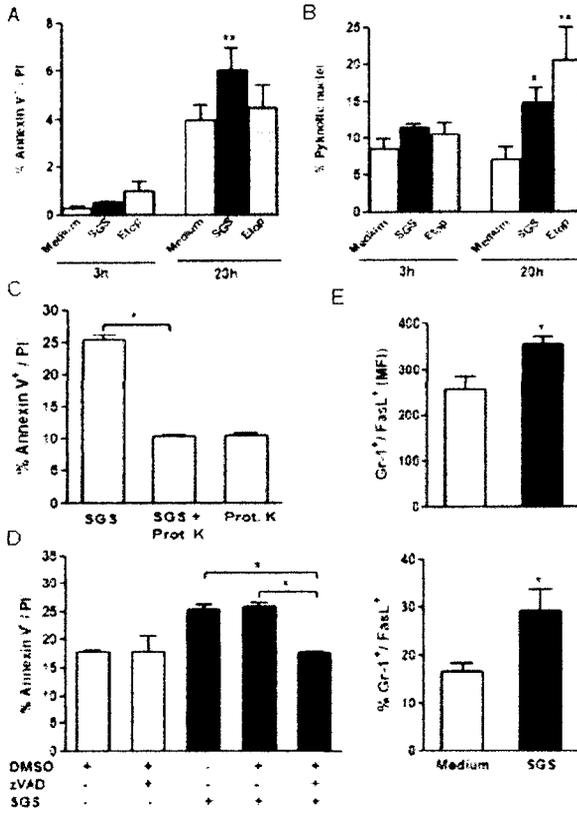
Prates et al. Figure 1



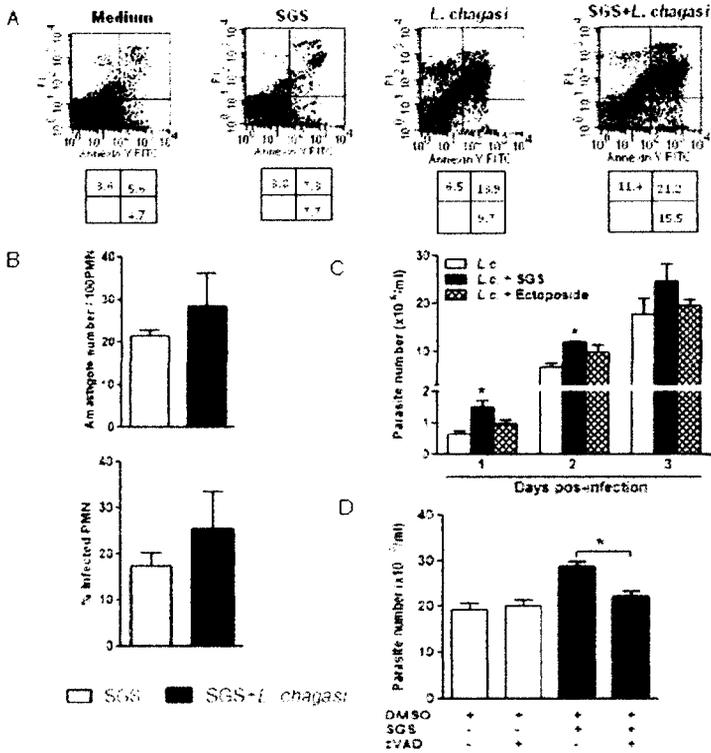
Prates et al. Figure 2



Prates et al. Figure 3



Prates et al. Figure 4



Prates et al. Figure 5

