



UFBA

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**



FIOCRUZ

Curso de Pós-graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE NEUTRÓFILOS, CÉLULAS
DENDRÍTICAS HUMANAS E *L. braziliensis***

MARTHA SENA SUAREZ

**Salvador – Bahia
2015**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ
UNIVERSIDADE FERAL DA BAHIA**

Curso de Pós-graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE NEUTRÓFILOS, CÉLULAS
DENDRÍTICAS HUMANAS E *L. braziliensis***

MARTHA SENA SUAREZ

Orientador: Cláudia Ida Brodskyn

Co-orientador: Natália Machado Tavares

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

**Salvador – Bahia
2015**

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

S939e	<p>Suarez, Martha Sena Estudo da interação entre neutrófilos, células dendríticas humanas e <i>L. braziliensis</i> / Martha Sena Suarez. - 2015. 61 f. : il. ; 30 cm.</p> <p>Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Claudia Ida Brodskyn, Laboratório Integrado de Microbiologia e Imunoregulação de Biologia Parasitária. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia, Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2015.</p> <p>1. <i>L. Braziliensis</i>. 2. Células dendríticas. 3. Neutrófilos. I.Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 616.993.161</p>
-------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**“ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE NEUTRÓFILOS, CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS E
LEISHMANIA BRAZILIENSIS”**

MARTHA SENA SUAREZ

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Elvira Maria Saraiva Chequer Bou Habib
Professora Associada
UFRJ



Dr. Lucas Pedreira de Carvalho
Pesquisador
CPqGM/FIOCRUZ



Dra. Claudia Ida Brodskyn
Pesquisadora Titular
CPqGM/FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

Aos meus anjos e amores: Maristela, Osemilton, Heraldo, Cleunice e Ricardo. Sem vocês, nada seria possível. Obrigada pelo amor incondicional, incentivo, confiança, dedicação e pela vida! Vocês são as minhas inspirações e motivos para seguir em frente. Obrigada por tudo!

Aos meus familiares, por toda admiração e amor;

Ao meu namorado Jorge, pelo amor, incentivo, paciência, atenção, sorrisos...

Aos meus amigos, principalmente Iohama e Uiara, pela amizade de sempre e para sempre;

À minha orientadora Cláudia Brodskyn pelos ensinamentos diários e por ajudar na minha formação profissional e pessoal;

Natália Machado, pela co-orientação e preciosas contribuições;

Jurema C., Melissa A., Grazielle Q. e Daniela Andrade pela amizade, companheirismo e cumplicidade;

Todos os companheiros LIMI e LIP, pelo convívio harmonioso e disponibilidade para ajudar;

Ludmila V. e Manu A., pela parceria e por tornarem as aulas e trabalhos mais chatos em motivos para sorrir;

Aos bibliotecários, funcionários, técnicos e secretárias, principalmente Elaine, pela simpatia de sempre;

Ao CPqGM e CNPq.

Agradeço a Deus, por tudo.

SUAREZ, Martha Sena. Estudo da interação entre neutrófilos, células dendríticas humanas e *L. Braziliensis*. 61 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

RESUMO

Os neutrófilos são essenciais para a resposta imune inata contra uma variedade de patógenos. Eles são capazes de modular a resposta imune através da produção de citocinas e quimiocinas, degranulação e a sua interação direta com outras células no local da infecção, tais como as células dendríticas. A interação entre as células do sistema imune inato é essencial para direcionar a resposta imune adaptativa, a qual é responsável pela eliminação de microrganismos e manutenção de memória imunológica. **Objetivo:** Este estudo avaliou a interação de neutrófilos humanos com *Leishmania braziliensis*, através da análise da expressão de moléculas de superfície, liberação de enzimas presentes nos grânulos e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Também foi avaliada a interação entre neutrófilos humanos infectados e células dendríticas, a fim de se observar o efeito desta interação na indução da ativação das células dendríticas. **Metodologia:** Os neutrófilos foram purificados a partir do sangue periférico de doadores saudáveis e as células dendríticas foram geradas *in vitro*. Os neutrófilos foram infectados ou não com *L. braziliensis* e co-cultivados com as células dendríticas. Em seguida, os sobrenadantes e as células foram coletadas para avaliar a liberação de enzimas, tais como mieloperoxidase (MPO) e metaloproteinase 9 (MMP-9). O fenótipo e a função dos neutrófilos foram analisados através da expressão de Mac-1 (CD18 e CD11b), CD16, CD62-L e produção de ROS. As células dendríticas foram adicionadas à co-cultura e a expressão de CD1a, a DC-SIGN, HLA-DR e CD80 foram avaliados, bem como a produção de citocinas e quimiocinas. **Resultados:** A infecção de neutrófilos com *L. braziliensis* induz a produção de MPO, MMP-9, IL-8, LTB4 e ROS. Observou-se também um aumento na expressão de Mac-1 e uma diminuição na expressão de CD16 e CD62-L. As células dendríticas tratadas com o sobrenadante dos neutrófilos infectados apresentaram redução significativa da expressão do DC-SIGN e aumento da expressão do HLA-DR e CD80. Nessas condições, observamos também a presença de IL-8 na cultura. **Conclusões:** Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que os neutrófilos, além de agirem como células efetoras na destruição do parasito, também podem ser importantes na modulação da ativação das células dendríticas.

Palavras-chave: Palavras-chave: Neutrófilos, Células dendríticas, *Leishmania braziliensis*, Interação.

SUAREZ, Martha Sena. Study of the interaction between neutrophils, human dendritic cells and *L. braziliensis*. 61 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

ABSTRACT

Neutrophils are essential in the innate immune response against a variety of pathogens. They are able to modulate immune response by cytokine and chemokine production, release of granules and their direct interaction with other cells at the infection site. Dendritic cells are recruited in response to cytokines and chemokines produced by neutrophils. The interaction between cells of the innate immune system is essential for targeting the adaptive immune response, which is responsible for eliminating microorganisms and the maintenance of immunological memory. **Objective:** Evaluate the interaction of human neutrophils with *Leishmania braziliensis*, through the analysis of surface molecule expression, release of granules enzymes and production of reactive oxygen species (ROS). We also evaluated the interaction between human infected neutrophils and dendritic cells, in order to observe the effect of this interaction on dendritic cells. **Methodology:** Neutrophils were purified from peripheral blood of healthy donors and dendritic cells were generated *in vitro*. Neutrophils were infected or not with *L. braziliensis* and cocultured with DC. Afterwards, supernatants and cells were harvested to evaluate the release of granules enzymes, such as myeloperoxidase (MPO) and metalloproteinase 9 (MMP-9). Neutrophils phenotype and function were analyzed by the expression of Mac-1 (CD18 and CD11b), CD16 and ROS production. Dendritic cells were added to the co-culture to assess the rate of infection of DCs in the presence of neutrophils. Dendritic cells were also treated with supernatant of infected neutrophils and the expression of CD80, DC-SIGN and HLA-DR were evaluated, as well as the cytokine production. We also filtered the supernatant of infected neutrophils to compare the difference in the activation of dendritic cells. **Results:** Neutrophil infection with *L. braziliensis* induced the production of MPO, MMP-9, IL-8, LTB₄ and ROS. We also observed an increase in Mac-1 and a decrease in CD16 and CD62-L expression. Dendritic cells treated with the infected supernatant of neutrophils showed a significant reduction of the DC-SIGN expression and increased expression of HLA-DR and CD80. Under these conditions, we also observed the presence of IL-8 in culture. **Conclusions:** Neutrophils act as effector cells in the destruction of the parasite and could be important in mediating the activation of DCs.

Key words: neutrophils, dendritic cells, *Leishmania braziliensis*, interactions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo biológico da <i>Leishmania spp.</i> .	13
Figura 2	Comparação entre as taxas de infecção de neutrófilos humanos com <i>Leishmania braziliensis</i> -GFP por microscopia ótica (MO) e citometria de fluxo (FACS)	32
Figura 3	Neutrófilos humanos infectados com <i>Leishmania braziliensis</i> GFP expressam marcadores de ativação na superfície	34
Figura 4	Neutrófilos humanos infectados com <i>Leishmania braziliensis</i> produzem espécies reativas de oxigênio (ROS)	36
Figura 5	Infecção de neutrófilos humanos com <i>Leishmania braziliensis</i> induz a produção de quimiocinas	37
Figura 6	Neutrófilos humanos infectados com <i>Leishmania braziliensis</i> degranulam e liberam mediadores lipídicos	39
Figura 7	Avaliação da apoptose e necrose em neutrófilos humanos infectados com <i>Leishmania braziliensis</i> .	41
Figura 8	Taxa de infecção das células dendríticas na presença dos neutrófilos humanos infectados com <i>Leishmania braziliensis</i>	42
Figura 9	Expressão dos marcadores de superfície da células dendríticas tratadas com o sobrenadante dos neutrófilos humanos infectados com <i>Leishmania braziliensis</i>	45
Figura 10	Produção de citocinas no sobrenadante das células dendríticas tratadas com o sobrenadante dos neutrófilos humanos	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
CBA	Ensaio de Citometria com Esferas, do inglês <i>Cytometric Bead Array</i>
CCL3,4	Quimiocina Ligante 3, 4, do inglês <i>Chemokine (C-C motif) Ligand 3,4</i>
DC-SIGN	DC Specific Intracellular Adhesion Molecule 3-Grabbing Nonintegrin
DHE	“ <i>Dihydroethidium</i> ”
ELISA	Ensaio Imunoenzimático, do inglês <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
fMLP	N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
IFN	Interferon
IL-8	Interleucina 8
LTB4	Leucotrieno B4
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeo
MMP-9	Matoproteinase 9
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo P
NE	Elastase Neutrófila, do inglês <i>Neutrophil Elastase</i>
NET	“ <i>Neutrophils Extracellular Traps</i> ”
PGE2	Prostaglandina E2
PMN	Polimorfonuclear
ROS	Espécies Reativas do Oxigênio, do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
SBF	Soro Bovino Fetal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	DEFINIÇÃO DA DOENÇA E EPIDEMIOLOGIA	11
1.2	TRANSMISSÃO DA DOENÇA E CICLO DO VETOR	11
1.3	ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE	13
1.4	CARACTERÍSTICAS DOS NEUTRÓFILOS	14
1.5	ATIVIDADE MICROBICIDA DOS NEUTRÓFILOS	15
1.6	RESPOSTA DE NEUTRÓFILOS DIANTE DA EXPOSIÇÃO À <i>Leishmania</i>	17
1.7	INTERAÇÃO ENTRE NEUTRÓFILOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS	19
2	JUSTIFICATIVA	22
3	HIPÓTESE	23
4	OBJETIVOS	23
4.1	OBJETIVO GERAL	23
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
5	DESENHO EXPERIMENTAL	24
5.1	AVALIAR A INTERAÇÃO ENTRE OS NEUTRÓFILOS HUMANOS E A <i>Leishmania braziliensis</i>	24
5.2	AVALIAR AS CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS CULTIVADAS NA PRESENÇA DO SOBRENADANTE DOS NEUTRÓFILOS	25
6	MATERIAL E MÉTODOS	26
6.1	OBTENÇÃO E CULTURA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS	26
6.2	OBTENÇÃO E CULTURA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS	26
6.3	CULTIVO DE <i>Leishmania braziliensis</i>	27
6.4	INFECÇÃO DE NEUTRÓFILOS COM <i>Leishmania braziliensis</i> <i>IN VITRO</i> .	27
6.5	DOSAGEM DE MPO E MMP-9	27
6.6	DETECÇÃO DE MEDIADORES LIPÍDICOS E QUIMIOCINAS	28
6.7	DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)	28
6.8	AVALIAÇÃO DA APOPTOSE DOS NEUTRÓFILOS	28
6.9	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE	28
7.10	CULTURA DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS COM O SOBRENADANTE DOS NEUTRÓFILOS INFECTADOS	29
7.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
7.12	COMITÊ DE ÉTICA	30
7	RESULTADOS	31
7.1	ANÁLISE <i>IN VITRO</i> DA TAXA DE INFECÇÃO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS POR <i>Leishmania braziliensis</i> ATRAVÉS DA COMPARAÇÃO ENTRE A MICROSCOPIA ÓTICA (MO) E CITOMETRIA DE FLUXO (FACS)	31
7.2	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE SUPERFÍCIE NOS NEUTRÓFILOS HUMANOS INFECTADOS COM <i>Leishmania braziliensis</i> -GFP	33
7.3	PRODUÇÃO DE ROS POR NEUTRÓFILOS HUMANOS APÓS INFECÇÃO POR <i>Leishmania braziliensis</i>	36

7.4	QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE QUIMIOCIAS PELOS NEUTRÓFILOS HUMANOS INFECTADOS COM <i>Leishmania braziliensis</i>	37
7.5	AVALIAÇÃO DA DEGRANULAÇÃO E PRODUÇÃO DE MEDIADORES LIPÍDICOS DOS NEUTRÓFILOS HUMANOS INFECTADOS COM <i>Leishmania Braziliensis</i>	38
7.6	AVALIAÇÃO DA APOPTOSE E NECROSE EM NEUTRÓFILOS HUMANOS INFECTADOS COM <i>Leishmania braziliensis</i>	40
7.7	AVALIAÇÃO DA TAXA DE INFECÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS (DCS) CO-CULTIVADAS COM NEUTRÓFILOS INFECTADOS COM <i>Leishmania braziliensis</i>	42
7.8	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS MARCADORES DE SUPERFÍCIE DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS TRATADAS COM O SOBRENADANTE FILTRADO DOS NEUTRÓFILOS INFECTADOS OU NÃO	44
7.9	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCIAS DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS TRATADAS COM O SOBRENADANTE DOS NEUTRÓFILOS INFECTADOS	46
8	DISCUSSÃO	48
9	CONCLUSÕES	54
10	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 DEFINIÇÃO DA DOENÇA E EPIDEMIOLOGIA

As leishmanioses compõem um grupo de antroponoses transmitidas a seres humanos e outros mamíferos por vetores flebotomíneos (CHAVES et al., 2007). São consideradas doenças tropicais negligenciadas (KEDZIERSKI, 2011) e podem ser causadas por cerca de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae (WHO, 2014). A doença é endêmica em 98 países, distribuídos nos 5 continentes (ALVAR et al., 2012).

Estima-se que 350 milhões de pessoas vivam em áreas sob risco de infecção e aproximadamente dois milhões de novos casos são reportados ao ano. As leishmanioses estão entre as principais doenças tropicais negligenciadas em termos de mortalidade e morbidade, com estimativa de 50000 mortes ao redor do mundo em 2010 (KEDZIERSKI, 2011). Foram reportados mais de 58000 casos anuais de Leishmaniose Visceral e mais de 220000 casos anuais de Leishmaniose Cutânea no período de 2007 a 2010 (ALVAR et al., 2012).

As populações com maior risco de infecção estão concentradas em áreas rurais e de expansão urbana, uma vez que algumas espécies de flebotomíneos têm preferência por habitar o peridomicílio. No entanto, outros fatores econômicos e sociais também contribuem para o risco de se contrair a doença (SANTANA; CRUZ e CARVALHO, 2013).

1.2 TRANSMISSÃO DA DOENÇA E CICLO DO VETOR

Os principais vetores das leishmanioses pertencem aos gêneros *Phlebotomus* (no Velho Mundo) e *Lutzomyia* (no Novo Mundo) (OLIVEIRA et al., 2009). São conhecidos popularmente no Brasil como mosquito palha, tatuquira ou birigui, a depender da localização geográfica (BRASIL, 2007). Cães domésticos, roedores e gambás são os principais mamíferos considerados reservatório do parasito (ASHFORD, 1996).

A doença é transmitida quando a fêmea do vetor flebotomíneo, inocula parasitos na pele do hospedeiro vertebrado (RUIZ; BECKER, 2007). A transmissão independente do vetor pode ocorrer através de acidentes de laboratório, transfusão sanguínea (FUKUTANI et al., 2014), transplante de órgãos (OLIVEIRA et al., 2008), transmissão vertical, por meio da passagem de formas amastigotas pela placenta durante o período gestacional em humanos (FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2004) e em cães (ROSYPAL ET AL, 2005), além da transmissão venérea em cães (SILVA et al., 2009).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos intracelulares obrigatórios, digenéticos, que vivem alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores (revisado em GONTIJO; CARVALHO, 2003). A forma promastigota é livre e flagelada, sendo encontrada no trato digestório do flebótomo (revisado em KAYE; SCOTT, 2011). A forma amastigota encontra-se no interior de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado. A transmissão do parasito ocorre quando a fêmea do vetor infectado, ao realizar seu repasto sanguíneo para maturação dos ovos, pica um hospedeiro mamífero e inocula junto com a saliva, as formas promastigotas. Diversos estudos já foram publicados demonstrando que além da saliva, o vetor também inocula promastigotas junto com um tampão gelatinoso composto principalmente por glicoproteína, produzido pelas próprias promastigotas e que dificultam o repasto sanguíneo. Essa dificuldade faz com que o vetor cometa múltiplas e demoradas tentativas de alimentação no hospedeiro, aumentando as chances de transmissão (ROGERS et al., 2010). Uma vez inoculadas, as promastigotas são, então, internalizadas por fagócitos e se instalam no interior do vacúolo parasitóforo. Neste vacúolo, a promastigota diferencia-se em amastigota, a qual se multiplica por divisão binária e, após sucessivas divisões, as células se rompem, liberando amastigotas. Outras células do hospedeiro podem fagocitar estas amastigotas, propagando a infecção no hospedeiro vertebrado (revisado de GENARO ET AL., 2000). Real e colaboradores (2014) demonstraram *in vitro* um mecanismo de escape da *Leishmania amazonensis* em que as amastigotas são transferidas de um macrófago a outro sem que haja ruptura da célula. Nesse modelo, o macrófago infectado entra num processo de iminência de apoptose e é então fagocitado por outro macrófago, transferindo assim o vacúolo parasitóforo íntegro, contendo amastigotas.

Durante outro repasto sanguíneo, o vetor adquire células infectadas, dando continuidade ao ciclo.

No interior do trato digestório do inseto, os macrófagos se rompem liberando as formas amastigotas, as quais sofrem divisões, multiplicam-se e se transformam em promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999).

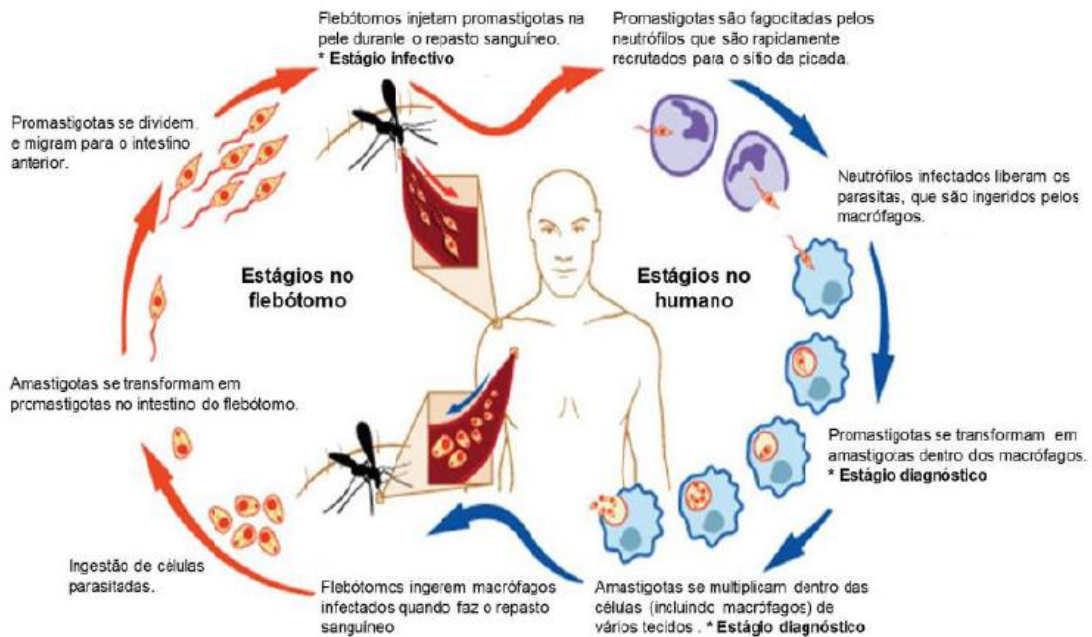


Figura 1. Ciclo biológico da *Leishmania* sp. (National institute of allergy and infectious diseases, 2012).

1.3 ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE

As leishmanioses apresentam duas formas clínicas principais: a Leishmaniose Visceral (LV) e a Leishmaniose Tegumentar (LT). A LV é uma forma grave e pode ser fatal se não tratada. Consiste em uma infecção generalizada envolvendo baço, fígado, medula óssea e linfonodos (BITTENCOURT e BARRAL-NETO, 1995; (CHAPPUIS et al., 2007). A Leishmaniose Tegumentar é subdividida em quatro grupos, a depender das manifestações clínicas: Leishmaniose Cutânea Disseminada (LCD), onde se encontram várias lesões formadas pela disseminação do parasito por vias hematogênica ou linfática, provocada principalmente por *L.braziliensis*; Leishmaniose Cutânea Mucosa (LCM), causada principalmente por *L.braziliensis*, essa forma clínica é caracterizada por uma resposta imune exacerbada com acometimento das mucosas, principalmente nasofaringe, onde são encontradas lesões destrutivas; Leishmaniose Difusa, causada principalmente por *L.amazonensis* e *L.pifanoi*, essa forma clínica é associada a lesões difusas não ulceradas e ricas em parasitos; Leishmaniose Cutâneo-Localizada (LCL), forma clínica mais frequente, no Brasil ocasionada principalmente pelas espécies *L.braziliensis* e *L.amazonensis* (SILVEIRA et al., 2008). A LCL tem como principal característica uma lesão ulcerada que se desenvolve, geralmente, nos membros inferiores, no local de inoculação do parasito pelo vetor. A

apresentação mais comum da lesão ulcerada é de fundo granuloso, com bordas bem delimitadas, elevadas e eritematosas, geralmente indolor (MARSDEN, 1986).

Alguns casos podem evoluir para a cura espontânea, contudo, a maioria requer tratamento com drogas leishmanicidas (COSTA ET AL., 1990; MARSDEN ET AL., 1984). A droga de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose cutâneo-mucosa é o antimoniato de N-metil-glucamina (VELLOSO et al., 2008).

A ocorrência de diferentes manifestações clínicas da leishmaniose depende de complexas interações que abrangem, desde a característica infectiva da espécie de *Leishmania* até o estado imunológico do hospedeiro humano (PEARSON e SOUSA, 1996).

1.4 CARACTERÍSTICAS DOS NEUTRÓFILOS

Os neutrófilos formam a primeira linha de defesa contra infecções e sua capacidade de fagocitar e eliminar o patógeno são essenciais para a defesa do organismo (PHAM, 2008). Os neutrófilos podem reconhecer diretamente os patógenos pela interação entre os Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), que são moléculas presentes nos microorganismos e ausentes em organismos superiores. Essas moléculas são reconhecidas pelos PRRs (Receptores de Reconhecimento Padrão), entre eles, receptores tipo toll (SABROE; WHYTE, 2007). A fagocitose de microorganismos pelos neutrófilos é eficiente após a opsonização de patógenos pelas proteínas do hospedeiro, tais como a molécula C3b e C3bi do complemento (LEE; HARRISON; GRINSTEIN, 2003).

Os polimorfonucleares (PMN) são componentes do sistema imune celular inato e são caracterizados por possuírem núcleo multilobulado e citoplasma granular (ZICHLINSKY; WEINRAUCH e WEISS, 2003). Os neutrófilos sempre foram considerados células de vida curta na circulação, no entanto, estudos mais recentes estão mudando esses conceitos e propondo que sob condições basais, a média de vida de um neutrófilo na circulação é de 12,5 horas em camundongos e até 5,4 dias em humanos (PILLAY et al., 2010). Essas células são continuamente geradas na medula óssea, a partir de precursores mielóides, e sua produção diária pode alcançar até 2×10^6 células (BORREGAARD, 2010). Durante a maturação, os neutrófilos passam por diferentes estágios, que são: mieloblastos, promielócito, mielócito, metamielócito e, finalmente, polimorfonuclear (BORREGAARD, 2010).

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes na circulação e atuam nas fases iniciais da resposta inflamatória, migrando para o local da inflamação em poucas horas (CHARMOY et al., 2010^a). A migração dessas células ocorre através de estímulos produzidos

localmente, como mediadores inflamatórios, que induzem a expressão de P-selectina pelas células do tecido vascular adjacente (BORREGAARD, 2010). Estas selectinas reconhecem seu ligante na superfície dos neutrófilos com baixa afinidade, promovendo o rolamento dessas células sobre o endotélio (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003). Iniciam-se então diversas mudanças na biologia dos neutrófilos, levando à sua firme adesão ao endotélio, que é mediada por integrinas como a Mac-1, expresso na superfície dos neutrófilos em seu estado ativado (BAINTON et al., 1994; LEY et al., 2007). Uma vez aderido, o neutrófilo inicia a transmigração através do endotélio e membrana basal (SHESHACHALAM et al., 2014). Esse processo é feito através da liberação de proteases presentes nos grânulos terciários, como a metaloproteinase-9 (MMP-9) (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003), responsável por degradar constituintes da membrana basal, como o colágeno tipo IV (DEUCLAUX ET AL, 1996). No espaço intersticial, o neutrófilo segue em direção ao local da infecção, onde irá iniciar suas atividades microbicidas (CHARMOY et al., 2010a) e secretar quimiocinas que irão recrutar outras células (AMULIC et al., 2012).

1.5 ATIVIDADE MICROBICIDA DOS NEUTRÓFILOS

A presença de um patógeno pode induzir ativação dos mecanismos microbicidas dos neutrófilos, dependentes ou não de oxigênio. Essa ativação induz alterações funcionais associadas à degranulação e liberação de enzimas neutrofilicas (BORREGAARD; SØRENSEN; THEILGAARD-MÖNCH, 2007).

Os grânulos dos neutrófilos são classificados de acordo com seu conteúdo e são formados através de um processo contínuo, onde vesículas brotam do Complexo de Golgi e se fundem, adquirindo estrutura granular (BORREGAARD & COWLAND, 1997). São reconhecidas 3 categorias de grânulos neutrofilicos:

- 1- Grânulo Primário ou Azurofílico, que contém enzimas como a mieloperoxidase (MPO), α -defensinas e serina proteases. A MPO reage com o peróxido de hidrogênio produzido pelos neutrófilos induzindo a formação do ácido hipocloroso que atua na membrana do patógeno. As α -defensinas são os principais constituintes deste grânulo e sua atividade microbicida consiste na formação de poros na membrana dos microorganismos. As serina proteases (elastase, catepsina e proteinase G) atuam na ativação de células endoteliais, epiteliais, macrófagos, linfócitos e plaquetas e possuem atividade proteolítica contra componentes da matriz extracelular

(FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003). A elastase neutrofílica induz a liberação de TNF- α pelos macrófagos (FADOK ET AL., 2001).

- 2- Grânulo Secundário ou Específico: contém lactoferrina, uma substância que sequestra ferro e impede o crescimento de bactérias Gram positivas e negativas (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003).
- 3- Grânulos Terciários ou Gelatinosos: contêm gelatinases como a metaloproteinase-9 (MMP-9), que degradam a matriz extracelular durante a diapedese (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003). A liberação da MMP-9 pode ocorrer em menos de 1 hora após a estimulação dos neutrófilos (OPDENAKKER ET AL., 2001).

Além dos grânulos, os neutrófilos possuem outra estrutura de armazenamento, denominada vesícula secretória, que diferentemente dos grânulos, elas não brotam do Golgi, mas são resultado de endocitose nos momentos finais da maturação dos neutrófilos (BORREGAARD; SØRENSEN; THEILGAARD-MÖNCH, 2007). As vesículas secretórias contêm receptores associados à membrana que são importantes na fase inicial da resposta inflamatória: β -2 integrinas, receptor de fMLP, CR1, Fc γ IIIR e CD14 (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003). Estas integrinas estocadas nas vesículas secretórias fundem-se à membrana do neutrófilo após estimulação, e vão permitir uma adesão firme ao endotélio (BORREGAARD; SØRENSEN; THEILGAARD-MÖNCH, 2007).

A atividade microbicida dos neutrófilos ocorre através da fagocitose e atividade das enzimas presentes nos seus grânulos ou por ativação da sua resposta oxidativa (PHAM, 2008). Após a ativação, os neutrófilos geram espécies reativas de oxigênio (ROS) por um processo conhecido como explosão respiratória. Em neutrófilos estimulados, ROS são gerados quase exclusivamente por NADPH oxidase (LEE; HARRISON; GRINSTEIN, 2003). O complexo NADPH oxidase é formado na membrana do fagolisossomo e o produto desta reação, o superóxido, pode ser convertido em outros metabólitos, incluindo peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso, que servem como agentes antimicrobianos eficazes (LEE; HARRISON; GRINSTEIN, 2003; MAYER-SCHOLL, 2004).

Outro mecanismo de controle de patógenos por neutrófilos, dependente da formação de ROS, são as NETs, do inglês “Neutrophils Extracellular Traps – (NETs)”. As NETs são estruturas extracelulares, compostas por cromatinas e grânulos de proteínas, caracterizadas pela formação de redes fibrosas de DNA, histonas e proteínas. Já foi demonstrado que estas estruturas são capazes de matar microorganismos como bactéria (BRINKMANN;

ZYCHLINSKY, 2012), fungos (URBAN, 2006), vírus (SAITOH et al., 2012) e protozoários (GUIMARA, 2009).

1.6 RESPOSTA DE NEUTRÓFILOS DIANTE DA EXPOSIÇÃO À *Leishmania*

Na leishmaniose, a resposta imune protetora é mediada por células e as interações celulares que ocorrem após o estabelecimento da infecção podem ser determinantes para o curso da resposta efetora. Peters e colaboradores demonstraram através de microscopia intravital um intenso recrutamento de neutrófilos nos momentos iniciais da infecção por *Leishmania* (PETERS; SACKS, 2009). Essas células possuem ferramentas microbicidas e a utilização desses mecanismos é regulada e localizada e tem início quando as células endoteliais são estimuladas por sinais inflamatórios ou derivados de patógenos (BORREGAARD, 2010).

Já foi demonstrado *in vitro* que neutrófilos internalizam *Leishmania major*, podendo levar à eliminação do parasito. Entretanto, verificou-se que estes microorganismos podem retardar o processo de apoptose destas células, mantendo sua viabilidade no interior dos neutrófilos (LAUFS et al., 2002). A fagocitose tem como principal consequência a fusão do fagossomo com os grânulos presentes no citoplasma dos neutrófilos (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003). No entanto, muitos microorganismos intracelulares desenvolveram mecanismos de escape que podem bloquear essa fusão, permitindo sua manutenção no interior dos neutrófilos. A fagocitose é a principal resposta inicial contra a *Leishmania*, no entanto, muitos parasitos conseguem sobreviver dentro dos neutrófilos e, posteriormente, se replicar dentro dos macrófagos (CHARMOY et al., 2010a). Em alguns casos ocorre inibição da resposta oxidativa dos neutrófilos (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2008). A *Leishmania major* é um dos patógenos que conseguem escapar do mecanismo de defesa dos neutrófilos (LAUFS et al., 2002).

Em um estudo com células humanas, foi demonstrado que corpos apoptóticos contendo parasitos de neutrófilos infectados podem ser fagocitados por macrófagos, resultando na transferência de parasitos diretamente para vacúolos de macrófagos (ZANDBERGEN et al., 2004). A fagocitose de corpos apoptóticos induz uma resposta anti-inflamatória e supressora associada à produção de TGF- β e PGE₂ pelos macrófagos (FADOK et al., 1998). Este mecanismo de escape do parasito foi denominado “Cavalo de Tróia” (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003). Posteriormente, foi sugerida a hipótese denominada “Coelho de Troia” em que a *Leishmania* escapa dos neutrófilos antes

destes entrarem em apoptose. Neste mecanismo o parasito se aproveita do ambiente supressor gerado após a fagocitose do neutrófilo apoptótico e infecta os macrófagos de forma silenciosa (RITTER; FRISCHKNECHT; VAN ZANDBERGEN, 2009).

A apoptose é um processo intensamente controlado de morte celular, que tem importantes implicações na defesa do hospedeiro e regulação da resposta imune (SAVILL et al., 2002). As células apoptóticas que não são removidas pelos fagócitos entram em necrose secundária. Os macrófagos que fagocitam células nesse estado liberam mediadores pró-inflamatórios (SAVILL et al., 2002). Afonso e colaboradores demonstraram que macrófagos infectados em contato com neutrófilos apoptóticos apresentaram um aumento da carga parasitária, por um mecanismo dependente de TGF- β e PGE₂, enquanto a interação dos macrófagos infectados com neutrófilos necróticos induziu a morte do parasita, com liberação de TNF- α e elastase neutrofílica (AFONSO et al., 2008). Por outro lado, neutrófilos viáveis apresentaram um efeito protetor contra *L. braziliensis*, ativando a capacidade microbicida de macrófagos, pela produção de TNF- α em modelo murino (NOVAIS et al., 2009).

A produção de mediadores lipídicos pró-inflamatórios, como leucotrienos e prostaglandinas também contribuem para o controle da infecção. Já foi demonstrado que o LTB₄ desempenha um importante papel no controle da infecção de neutrófilos humanos por *L. amazonensis* através da indução de respostas funcionais tais como a degranulação, que são importantes para a defesa imune do hospedeiro (TAVARES et al., 2014). Morato e colaboradores (2014). Demonstraram *in vitro* que o LTB₄ produzido pelos macrófagos em resposta à infecção por *Leishmania braziliensis* potencializa sua atividade leishmanicida, caracterizada pela secreção de espécies reativas de oxigênio (ROS) Níveis elevados de LTB₄ também foram encontrados em culturas *ex vivo* de esplenócitos de camundongos nos momentos iniciais da infecção por *L. major*, o que sugere um sinal de inflamação intensa. A adição de LTB₄ exógeno induziu um aumento *in vitro* da produção de citocinas tanto Th1 quanto Th2, sugerindo que LTB₄ pode também atuar no recrutamento de células T que já estão comprometidas com o perfil Th₁ ou Th₂ (MILANO ET AL, 1996).

Um crescente número de trabalhos demonstra que os neutrófilos são capazes de influenciar na resposta imune ao cooperar com outros tipos celulares e produzir citocinas e quimiocinas, atuando desse modo na interface entre a resposta imune inata e adaptativa (APPELBERG, 2007). Neutrófilos são capazes de interagir com células dendríticas (DCs), macrófagos e linfócitos T. Além de interagir, os neutrófilos são capazes de influenciar na

diferenciação dos linfócitos T através da secreção de IL-12 e IFN- γ , principal citocina envolvida no perfil de resposta Th₁ (ETHUIN et al., 2004).

1.7 INTERAÇÃO ENTRE NEUTRÓFILOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS

Durante a homeostase, neutrófilos e células dendríticas estão localizados em diferentes compartimentos, no entanto, durante a infecção, os dois tipos celulares se acumulam no sítio da inflamação (LUDWIG; GEIJTENBEEK; VAN KOOYK, 2006).

As células dendríticas são células apresentadoras de antígenos especializadas na captura e processamento de antígenos. Estas células estão distribuídas nos tecidos periféricos no seu estado imaturo, onde capturam microorganismos, células necróticas e/ou apoptóticas. Essa captura induz a ativação dessas células, que irão migrar para os órgãos linfoides secundários e iniciar a ativação dos linfócitos T naive (MEGIOVANNI; GLUCKMAN; BOUDALY, 2006). Uma vez ativados pelas DCs, os linfócitos T estabelecem a resposta imune interagindo com outras células, como as células B para produção de anticorpos, com os macrófagos para induzir a liberação de citocinas ou induzir a lise celular (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998).

Já foi demonstrado que os neutrófilos e as DCs interagem fisicamente através da ligação do Mac-1 dos neutrófilos e DC-SIGN das células dendríticas (VAN GISBERGEN et al., 2005). Induzida pela secreção do TNF- α dos neutrófilos, essa ligação induz a maturação das células dendríticas, com consequente aumento da expressão de HLA-DR, CD86 e CD40 e produção de IL-12. Essas características de ativação, em conjunto, favorecem a capacidade destas células em ativar os linfócitos (MEGIOVANNI; GLUCKMAN; BOUDALY, 2006).

Além dessa interação dependente de contato, os neutrófilos secretam fatores que induzem a maturação e quimiotaxia das células dendríticas. Benounna e colaboradores em 2003 demonstraram que o sobrenadante da cultura dos neutrófilos estimulados com *Toxoplasma gondii* induz a secreção de TNF- α e IL-12 pelas DCs, assim como o aumento da expressão de CD40 (BENNOUNA et al., 2003).

Já foi demonstrado que as células dendríticas murinas infectadas com *Leishmania braziliensis* aumentam a expressão de marcadores de superfície, tais como o CD86 e secretam IL-12 e TNF- α (CARVALHO; PEARCE; SCOTT, 2008). No entanto, as DCs em cultura que entraram em contato com a *L. braziliensis*, mas não foram infectadas (bystander), apresentaram um aumento maior na expressão de CD80, CD86 e MHC-II e produção de IL-12 quando comparadas com as células infectadas. Além disso, as células bystander também

demonstraram maior capacidade em ativar células T CD4 quando comparadas com a capacidade de apresentação de antígenos das células infectadas (CARVALHO; PEARCE; SCOTT, 2008; VARGAS-INCHAUSTEGUI; XIN; SOONG, 2008).

Por outro lado, a infecção da DC pela *Leishmania amazonensis* inibe sua maturação, com consequente redução da expressão de CD1a e CD80 na superfície e redução na secreção de IL-6, causando um atraso na resposta imune e favorecendo a sobrevivência do parasito (FAVALI et al., 2007). Sendo assim, a modulação da ativação das DCs pela *Leishmania* parece ser espécie-específica (GHOSH; BANDYOPADHYAY, 2004) e depende, dentre outros fatores, do subtipo e estágio de diferenciação das células dendríticas (SOONG, 2008).

Ribeiro-Gomes e colaboradores (2012) demonstraram que os neutrófilos infectados com *L. major* expressam marcadores apoptóticos e são preferencialmente capturados pelas células dendríticas, indicando que estas células adquirem parasitos preferencialmente via captura de neutrófilos infectados. Essa captura induz uma resposta imune supressora, que inibe a ativação dos linfócitos T CD4+(RIBEIRO-GOMES; SACKS, 2012). Outros trabalhos com *L. major* mostram que as amastigotas, mas não as promastigotas dessa espécie são capazes de ativar células dendríticas murinas, enquanto que para ativar as células dendríticas humanas é necessária uma ativação via CD40 (MCDOWELL et al., 2002).

As células dendríticas desempenham um importante papel na resistência à leishmaniose, tanto por ativar as células T CD4+ quanto por induzir a sua diferenciação em células Th1 através da secreção de IL-12. Diversos estudos têm sido conduzidos com as diferentes espécies de *Leishmania* e as células dendríticas, no entanto, os resultados ainda permanecem controversos. Diferenças no estágio do parasito, espécie ou cepa e a fonte das células dendríticas pode explicar a divergência desses estudos (GHOSH; BANDYOPADHYAY, 2004).

A interação entre as células da resposta imune inata é fundamental para o direcionamento da resposta imune adaptativa, responsável pela eliminação do parasito e manutenção da memória imunológica. Sendo assim, é de fundamental importância investigar se a interação dos neutrófilos com as células dendríticas favorece o desenvolvimento de uma resposta inflamatória capaz de eliminar a *Leishmania*.

Diversos dados na literatura relatam a interação entre os neutrófilos e as células dendríticas, no entanto, esses estudos são principalmente conduzidos com células de modelos murinos. Poucos trabalhos são feitos com células humanas, especialmente na infecção por *Leishmania braziliensis*. Diante disso, nesse estudo investigamos a interação dos neutrófilos

humanos com a *L. braziliensis* e as consequências dessa interação na função da célula dendrítica.

2 JUSTIFICATIVA

A *Leishmania braziliensis* é a principal espécie responsável pela leishmaniose cutânea no Brasil (SILVEIRA ET AL, 2010). Peters e colaboradores (2008) demonstraram em modelo murino a presença dos neutrófilos nos momentos iniciais da infecção por *Leishmania major*. Considerando o neutrófilo uma célula importante nesse contexto, inicialmente buscamos avaliar *in vitro* a interação dessas células com a *Leishmania braziliensis*. Sabendo-se que diferentes células são recrutadas para o sítio da infecção e que as interações celulares são cruciais para a resposta imune, avaliou-se a interação dos neutrófilos humanos infectados com *L. braziliensis* e as células dendríticas.

Um crescente número de estudos vem demonstrando a importância do papel do neutrófilo e seus mecanismos de controle na infecção por diferentes espécies de *Leishmania*. No entanto, a maioria desses estudos utiliza modelos experimentais para abordar tais questões, e estes achados necessitam de confirmação com células humanas. Diante disso, se faz necessário investigar os mecanismos envolvidos na interação entre neutrófilos humanos e *Leishmania*, além de identificar os processos que participam no controle da infecção.

3 HIPÓTESE

A exposição *in vitro* de neutrófilos humanos à *Leishmania braziliensis* induz ativação e sua interação com as DCs alteram o perfil funcional dessas células.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

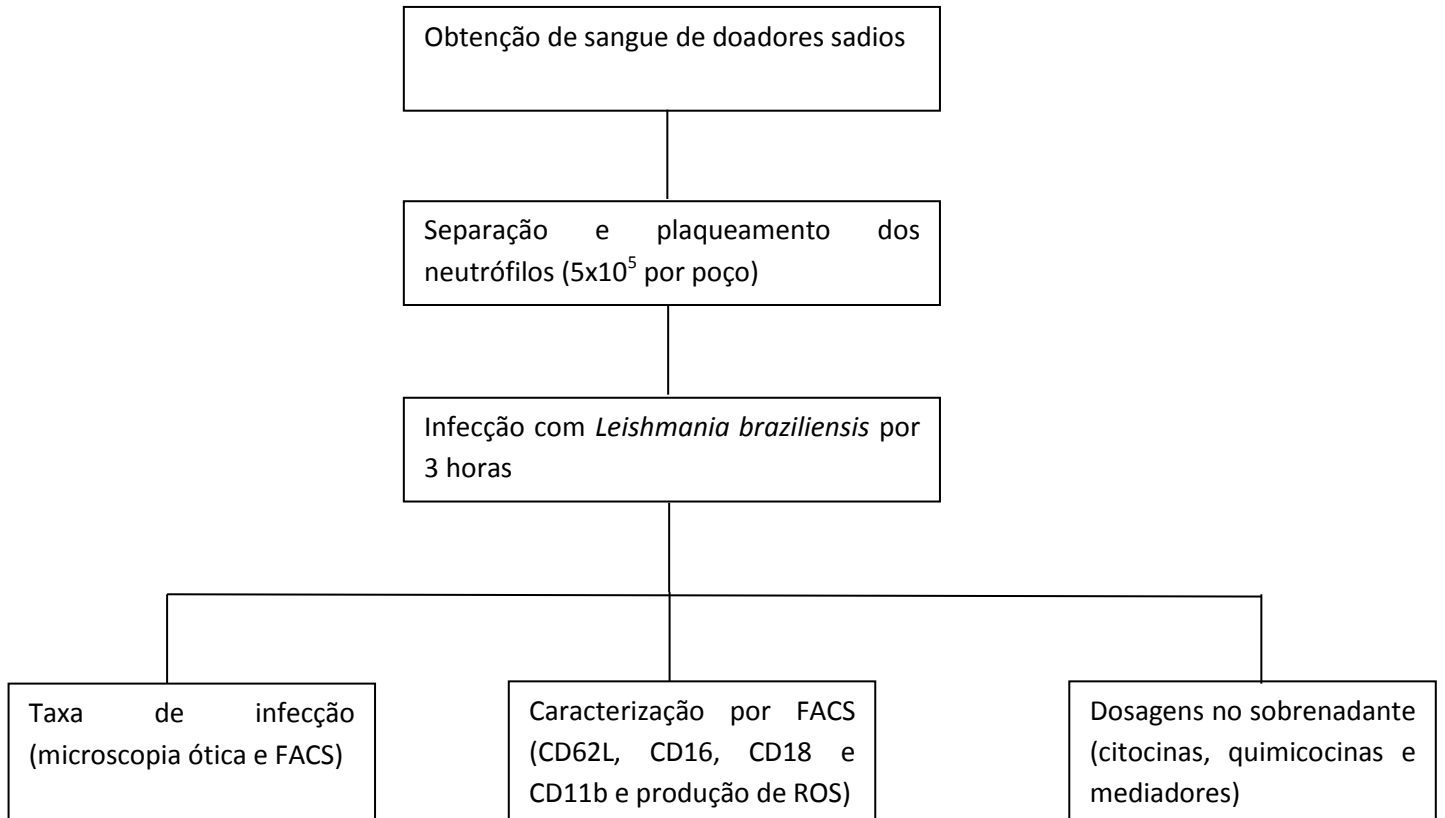
Avaliar *in vitro* a resposta dos neutrófilos humanos expostos e infectados com *Leishmania braziliensis* e as consequências da interação dessas células com as células dendríticas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

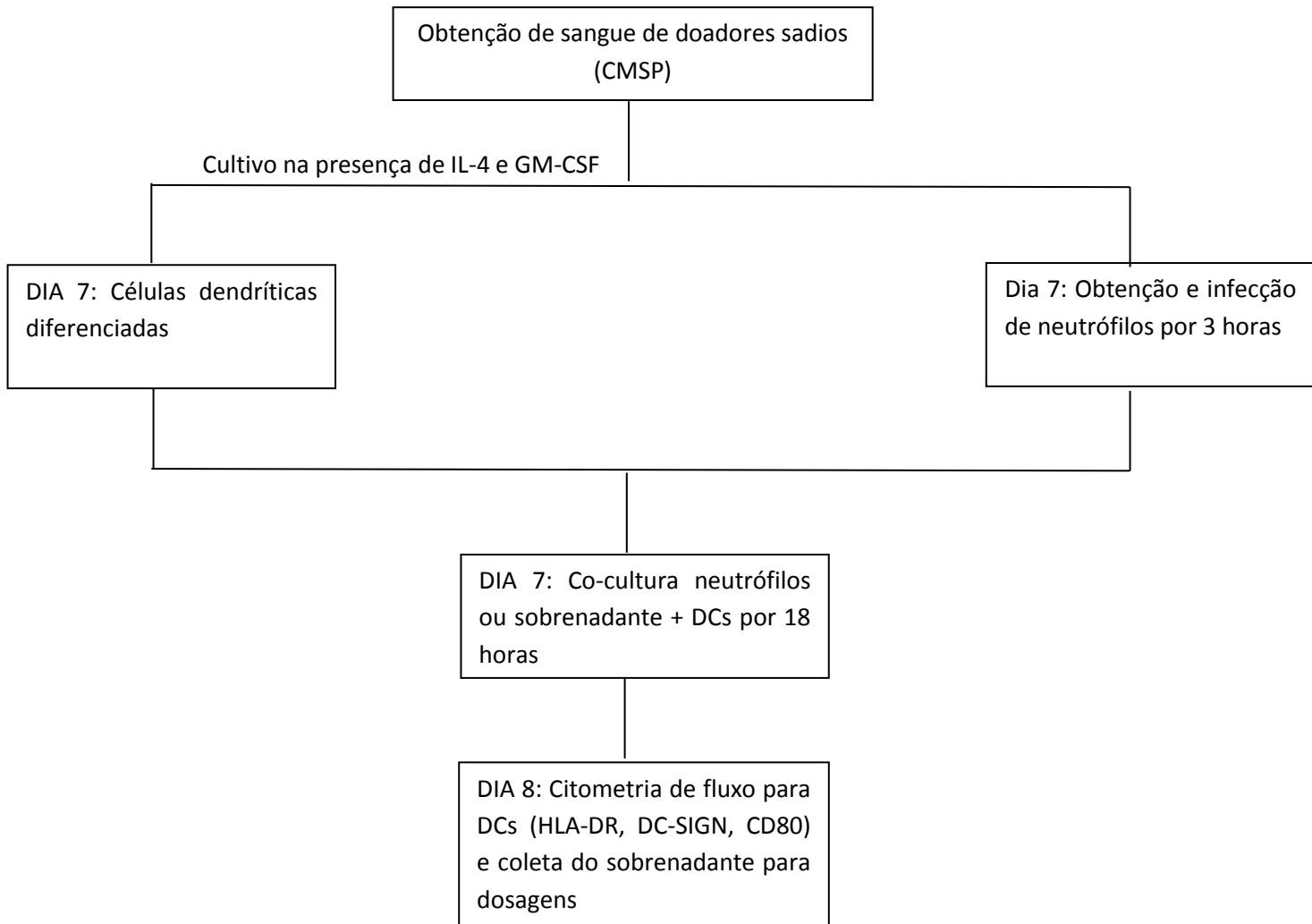
- 1- Avaliar a resposta dos neutrófilos humanos expostos e infectados por *Leishmania braziliensis* através da expressão de moléculas de superfície, degranulação, produção de mediadores lipídicos e produção de ROS.
- 2- Verificar a taxa de infecção das DCs humanas cultivadas na presença de neutrófilos infectados com *L. braziliensis*
- 3- Avaliar a ativação das células dendríticas tratadas com o sobrenadante dos neutrófilos infectados ou não, através da produção de citocinas, quimiocinas e expressão dos marcadores de superfície.

5 DESENHO EXPERIMENTAL

5.1 AVALIAR A INTERAÇÃO ENTRE OS NEUTRÓFILOS HUMANOS E A *L. braziliensis*



5.2 AVALIAR AS CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS CULTIVADAS NA PRESENÇA DO SOBRENADANTE NEUTRÓFILOS



6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 OBTENÇÃO E CULTURA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS

Os neutrófilos foram obtidos a partir do sangue periférico de doadores saudáveis do Hemocentro do Estado da Bahia (HEMOBA). O sangue foi processado utilizando-se o gradiente de separação Polymorphprep, conforme instruções do fabricante (Axis-Shield Poc AS, Oslo, Noruega). Em resumo, o sangue e o gradiente foram centrifugados por 45 minutos a 300xg a temperatura ambiente. Após a centrifugação, duas regiões são observadas: a primeira (mais superficial), constituída por células mononucleares e a segunda formada por polimorfonucleares, principalmente neutrófilos. Em seguida, os neutrófilos foram coletados e lavados três vezes com salina (NaCl a 0.9%) a 4°C por 10 minutos a 200xg, sendo a primeira lavagem, feita com salina a 0.45% para hidratar as células. Após a lavagem, foi feita a contagem das células em câmara de Neubauer, com uma diluição final de 100x no corante Turk. Esse método de separação permite a obtenção de uma população com cerca de 90% de neutrófilos (AFONSO ET AL., 2008).

As células foram ressuspensas na concentração de 5×10^5 /mL e cultivadas a 37°C, em 5% de CO₂, em meio RPMI-1640 (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 1% e Nutridoma-SP (Roche, Indianapolis, IN, USA), 2mM de L-glutamina, 100U/mL de penicilina e 100µ/mL de estreptomicina (meio completo) (Gibco Invitrogen Corporation) para cultivo em placa de 96 poços (Corning Incorporation, Costar, NY, USA).

6.2 OBTENÇÃO E CULTURA DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Os monócitos foram obtidos a partir do sangue periférico de doadores saudáveis do Hemocentro do Estado da Bahia (HEMOBA). O sangue foi diluído em salina (1:1) e processado, utilizando-se o gradiente de separação Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) por 30 minutos a 300xg em temperatura ambiente. Após a centrifugação, forma-se um anel composto por células mononucleares que foi coletado e lavado 3 vezes com salina a 4°C em 200xg. Para diferenciação em células dendríticas, os monócitos passaram por coluna de separação magnética para isolamento de células CD14⁺ (monócitos). Estas células CD14⁺ foram cultivadas por 7 dias na concentração de 1×10^6 /mL em meio completo na presença de IL-4 (100UI/mL) e GM-CSF (50ng/mL; ambos da PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) em placa de 24 poços. A cada 3 dias de cultura, uma parte deste meio contendo as citocinas foi repostado (retira 500 µl e repõe a mesma quantidade).

6.3 CULTIVO DE *Leishmania braziliensis*

A cepa MHOM/BR/00/BA788 foi isolada da úlcera de um paciente com leishmaniose cutânea localizada, do estado da Bahia. Promastigotas de *L. braziliensis* foram mantidas em meio de cultura Schneider (Sigma®), suplementado com 10 % de soro bovino fetal (Cripion), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma®), em estufa a 24 °C. Após 7 dias de cultura as formas promastigotas foram contadas na câmara de Neubauer, com uma diluição de 100x em salina. Em todos os experimentos foram utilizados parasitos em fase estacionária (enriquecido em promastigotas metacíclicas) do cultivo.

6.4 INFECÇÃO DE NEUTRÓFILOS COM *Leishmania braziliensis in vitro*

Os neutrófilos humanos foram infectados em placas de 96 poços com promastigotas de *L. braziliensis* em fase estacionária, por 3 horas com uma proporção de 5 parasitos para cada célula em meio de cultura completo a 37°C em 5% de CO₂. Após esse período, as células foram coletadas e centrifugadas com salina a 100xg para remoção dos parasitos não internalizados. Em alguns experimentos foram preparadas lâminas por citocentrifugação, que foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para determinação de alguns parâmetros, tais como avaliação da quantidade de parasitos dentro das células e aspecto celular. Com os resultados obtidos, foi possível avaliar o número de neutrófilos infectados, que foi determinado pela proporção de células infectadas em cem neutrófilos e a carga parasitária, número total de parasitos encontrados nas cem células contadas.

6.5 DOSAGEM DE MPO E MMP-9

A mieloperoxidase (MPO) é uma das enzimas presentes nos grânulos primários dos neutrófilos. Para sua dosagem, foi retirado 50 µL dos sobrenadantes da cultura de neutrófilos após 3 horas de infecção e adicionados a placas contendo 50 µL de solução de substrato 5 mM fenilendiamina (Sigma®) em 10 mM de tampão citrato, pH 5.0, e 8.8mM de H₂O₂. A reação foi interrompida após 15 minutos com 50 µL de H₂SO₄ 4 N e a leitura, feita a 492 nm (SCHNEIDER e ISSEKUTZ, 1996). A metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) é uma enzima dos grânulos terciários e sua dosagem foi feita usando o kit de dosagem de MMP-9 (R&D System®) de acordo com recomendações do fabricante. Resumidamente, adicionou-se 100 µL do diluente RD1-34 e 100 µL das amostras em cada poço e incubou-se por 2 horas. Após a incubação as amostras foram lavadas e 200 µL do MMP-9 conjugado com peroxidase foi adicionado. As amostras foram então incubadas por 1 hora a temperatura ambiente e

posteriormente 200 μ L do substrato foi adicionado. Após 30 minutos adicionou-se 50 μ L da solução de interrupção (H_2SO_4) em cada poço sendo a leitura feita dentro de 30 minutos, com um comprimento de onda de 450 nm.

6.6 DETECÇÃO DE MEDIADORES LIPÍDICOS E QUIMIOCINAS

Os sobrenadantes das culturas dos neutrófilos infectados com *L. braziliensis* durante 3h foram coletados e avaliados quanto a produção dos mediadores lipídicos PGE_2 e LTB_4 através da técnica de EIA (Enzyme Immuneassay) como indicado pelo fabricante do kit de dosagem (R&D System®). A produção de IL-8 foi avaliada pelo kit CBA (BD Biosciences) e CCL-3 por ELISA (R&D System®), de acordo com instruções do fabricante.

6.7 DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)

Após 1h de interação entre os neutrófilos humanos e *Leishmania braziliensis*, a placa contendo as células infectadas foi centrifugada a 800 RPM por 5 minutos, o sobrenadante foi retirado e as células foram ressuspensas em PBS 1X. Posteriormente, essas células foram incubadas a 37° na estufa de CO₂, com a sonda fluorescente *Dihydroethidium* (DHE) (10 μ M – Invitrogen/Molecular Probes, Grand Island, NY, USA) por 30 minutos. Após a incubação, a placa foi novamente centrifugada a 800 RPM durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 μ L/poço de tampão de FACS. Ao entrar nas células, a sonda DHE ao ser oxidada por ânions superóxidos emite fluorescência vermelha, sendo detectada por citometria de fluxo (FACSCalibur).

6.8 AVALIAÇÃO DA APOPTOSE DE NEUTRÓFILOS

Após as 3h de infecção, a apoptose e a necrose dos neutrófilos foi avaliada pela exposição de fosfatidilserina na superfície celular através da marcação com Anexina-V-PE e com 7-amino-actinomicina D (7AAD), respectivamente (kit de detecção de apoptose, BD Bioscience), seguida da análise por citometria de fluxo (FACSCalibur). Os resultados estão representados como percentual de células Anexina-V+/7AAD-, Anexina-V+/7AAD+ e Anexina-V-/7AAD+.

6.9 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE

Os neutrófilos foram infectados ou não com *L. braziliensis* durante 3h. Após esse período, as culturas foram centrifugadas e o sobrenadante retirado para as dosagens da enzima mieloperoxidase e para mensuração da atividade enzimática da metaloproteinase-9. As células foram lavadas 3 vezes com 100 μ L do tampão de FACS (PBS 1x e BSA 0.5%) e transferidas

para um tubo de FACS, onde foi realizada a marcação das moléculas de superfície conjugadas com seus devidos fluorocromos CD16-PE, CD18-PE, CD11b-PECy5 e CD-62L-PE (todos da BD Pharmingen). A determinação dos marcadores foi obtida por citometria de fluxo, tendo como base os parâmetros FSC (do inglês forward scatter - FSC) versus SSC (do inglês side scatter). As amostras foram adquiridas usando o FACSCalibur [Becton Dickinson and Company (BD)®] e as análises foram feitas usando o FlowJo software®. Os limites dos quadrantes foram determinados com as células marcadas com os isotipos controle.

6.10 CULTURA DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS COM O SOBRENADANTE DOS NEUTRÓFILOS INFECTADOS

Após a infecção dos neutrófilos com a *Leishmania braziliensis* GFP (*Green Fluorescence Protein*) por 3 horas, o sobrenadante da cultura foi coletado (e filtrado com filtro de 0,22 µM) para tratar as células dendríticas por 18 horas a 37°, com 5% de CO₂. Após esse período, a placa foi centrifugada para coleta de sobrenadante e obtenção das células dendríticas. As DCs foram avaliadas para sua expressão de marcadores de superfície, tais como DC-SIGN, HLA-DR, e CD80 (todos da BD Pharmingen) por citometria de fluxo. Os sobrenadantes das culturas foram avaliados para a produção de citocinas como IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, e TNF-α por CBA. Para avaliação da taxa de infecção e carga parasitária das células dendríticas, essas células foram co-cultivadas com neutrófilos infectados com *L. braziliensis* (5 neutrófilos: 1 célula dendrítica) durante 18h ou infectada diretamente com *L. braziliensis* (10 parasitos: 1 célula) durante 24h. Após esse período, foi feita citocentrifugação e as lâminas foram coradas por Hematoxilina-Eosina. A contagem foi feita manualmente em microscópio óptico de campo claro, de 100 células por cada lâmina.

6.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa Prism versão 5.0 (GraphPad Software®). Os dados representam as medianas obtidas em cada condição. As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando o teste ANOVA com pós-teste de Dunn para as análises com mais de 3 grupos e o teste de Mann-Witney (Teste t) para as outras comparações. Todos os experimentos foram realizados com pelo menos três repetições e valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

6.12 COMITÊ DE ÉTICA

O trabalho foi realizado com bolsas de sangue obtidas do Hemocentro do Estado da Bahia (HEMOBA). Este projeto foi submetido ao comitê de ética do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA sendo aprovado sob a licença 100/2006, protocolo 201, sem prazo de vigência.

7 RESULTADOS

7.1 ANÁLISE *IN VITRO* DA TAXA DE INFECÇÃO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS POR *Leishmania braziliensis* ATRAVÉS DA COMPARAÇÃO ENTRE A MICROSCOPIA ÓTICA (MO) E CITOMETRIA DE FLUXO (FACS)

As células retiradas do sangue periférico dos doadores saudáveis foram plaqueadas e infectadas com *L. braziliensis GFP* durante 3h, segundo a metodologia anteriormente descrita. Após esse período de infecção, as lâminas foram preparadas por citocentrifugação e coradas com hematoxilina e eosina para avaliação da taxa de infecção desses neutrófilos. Esse método manual de quantificação dos parasitas é o mais comumente empregado para este tipo de avaliação, por isso é importante comparar com a taxa de infecção quantificada através da citometria de fluxo. De acordo aos resultados encontrados, não há diferença estatística entre os dois métodos de quantificação (Figura 1 A). A mediana da taxa de infecção dos neutrófilos contados através de lâminas preparadas por citocentrifugação é de aproximadamente 60% e a média da taxa de infecção por citometria de fluxo é 70% (Figura 1 A). A figura 1 B representa a imagem obtida da lâmina dos neutrófilos infectados preparada por citocentrifugação. A partir destes resultados utilizamos as *Leishmanias GFP* e a citometria de fluxo para mensuração da infecção dos neutrófilos.

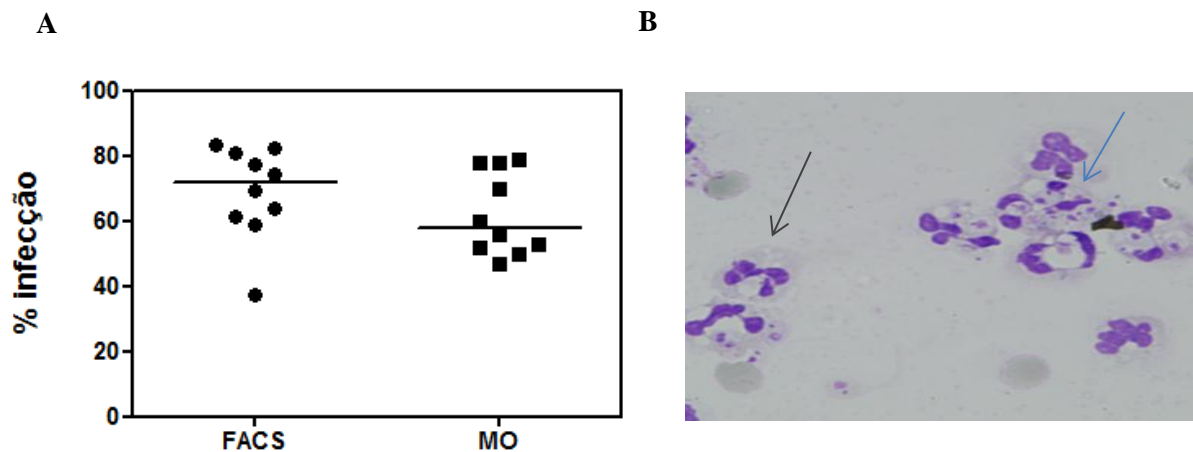
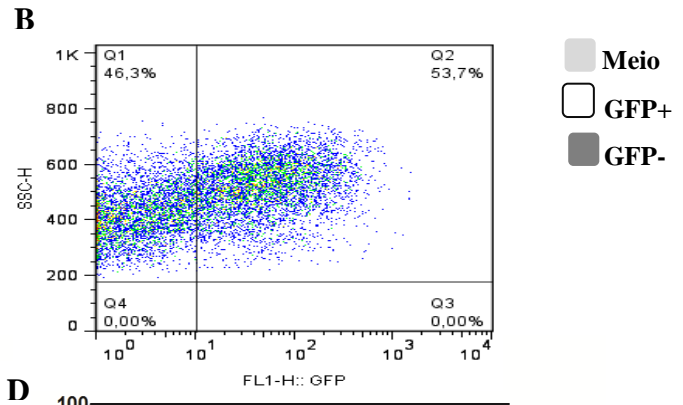
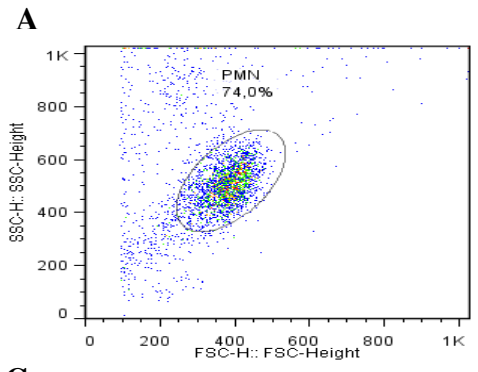


Figura 2. Comparação entre as taxas de infecção *in vitro* de neutrófilos humanos com *Leishmania braziliensis*-GFP por microscopia ótica (MO) e citometria de fluxo (FACS). Neutrófilos isolados do sangue periférico de doadores saudáveis foram infectados durante 3 horas com *Leishmania braziliensis* GFP na proporção de 5 parasitos para cada célula. A taxa de infecção foi avaliada em lâminas preparadas por citocentrifugação para microscopia ótica (MO) e em suspensão para citometria de fluxo (FACS) (A). A figura B representa a imagem de uma lâmina representativa por microscopia ótica. A seta azul indica um neutrófilo infectado e a seta escura indica um neutrófilo não infectado.

7.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE SUPERFÍCIE NOS NEUTRÓFILOS HUMANOS INFECTADOS COM *Leishmania braziliensis*-GFP

Para avaliarmos a expressão de moléculas de superfície, os neutrófilos expostos à *Leishmania braziliensis* GFP (*Green Fluorescence Protein*) durante 3h foram marcados com os anticorpos CD16, CD62-L, CD18 e CD11b conjugados a fluorocromos. A CD62L é importante durante o rolamento dos neutrófilos, a CD16 está envolvida com vias de ativação e a Mac-1 (CD18 e CD11b) é importante na adesão dos neutrófilos à superfície endotelial. Inicialmente as células foram separadas por tamanho e granulocidade (Figura 2 A). Como os neutrófilos infectados apresentam alterações na sua morfologia e consequente deslocamento da população, o gate da população dos neutrófilos foi ajustado em cada condição avaliada. Em seguida, as comparações foram feitas entre populações de neutrófilos definidas de acordo com a expressão do GFP: neutrófilos não estimulados (PMN), neutrófilos cultivados na presença da *L. braziliensis*, mas não infectados (GFP-) e neutrófilos infectados (GFP+) (Figura 2 B). A infecção por *L. braziliensis* induziu redução significativa na expressão de CD62L tanto na população GFP+ quanto na GFP- (Figuras 2 C e D). Dados semelhantes foram observados quando avaliamos a expressão do CD16 (Figuras 2 E e F) quando comparadas aos neutrófilos sem estímulo. A expressão dos componentes da Mac-1, CD18 (Figuras 2 G e H) e CD11b (Figuras 2 I e J) apresentou aumento significativo nas células GFP+ quando comparadas com as células GFP-. Estes achados indicam que a infecção por *L. braziliensis* induz um perfil fenotípico de ativação de neutrófilos humanos.



Meio
GFP+
GFP-

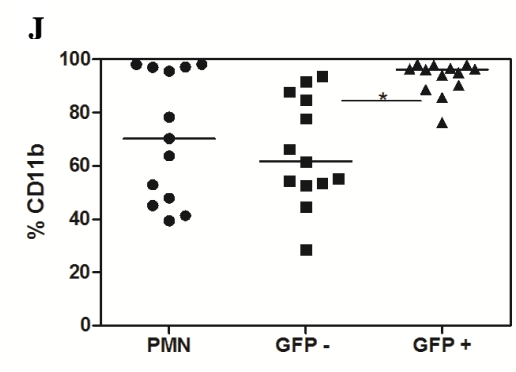
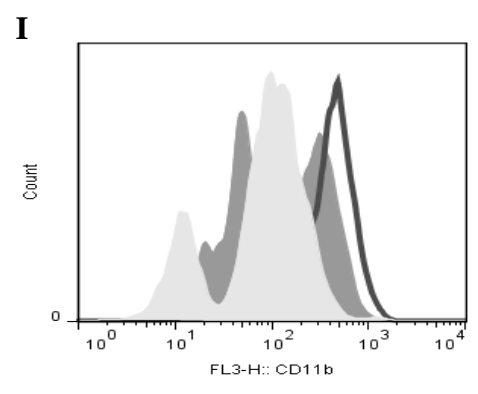
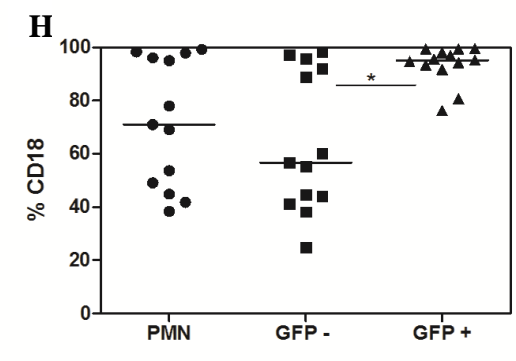
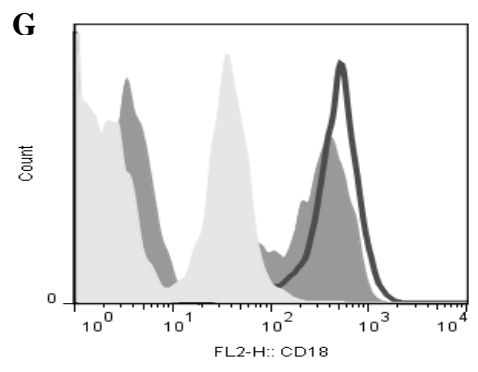
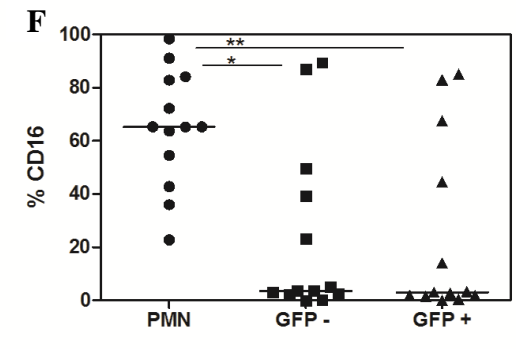
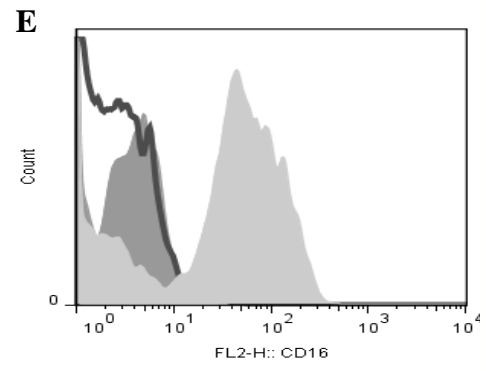
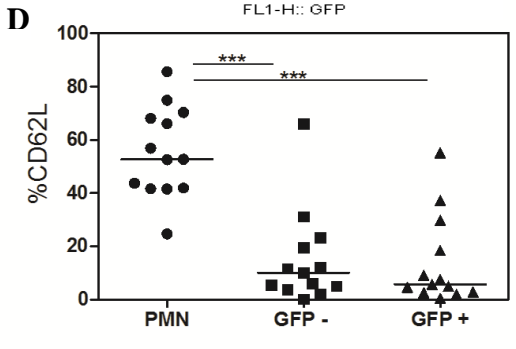
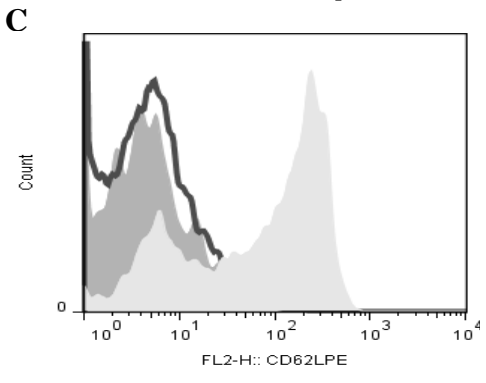


Figura 3. Neutr3filos humanos infectados com *Leishmania braziliensis* GFP apresentam um perfil fenot3pico de ativa33o de acordo com a express33o de marcadores de superf3cie.

Neutr3filos humanos isolados do sangue perif3rico de doadores saud3veis foram infectados com *Leishmania braziliensis* GFP (5 parasitos/1 neutr3filo) por 3 horas. A partir do *gate* da popula33o de neutr3filos (A) as subpopula33es de c3lulas GFP- (cultivadas em presen3a de *L. braziliensis*, mas n3o infectadas) e GFP+ (infectadas) (B) foram definidas. A express33o dos marcadores de superf3cie CD62L (C e D), CD16 (E e F), CD18 (G e H) e CD11b (I e J) foi avaliada entre estas diferentes popula33es por citometria de fluxo e comparadas com neutr3filos n3o estimulados (PMN). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ pelo teste Kruskal-Wallis com p3s-teste de Dunns.

7.3 PRODUÇÃO DE ROS POR NEUTRÓFILOS HUMANOS APÓS INFECÇÃO POR *Leishmania braziliensis*

Após a ativação, os neutrófilos geram espécies reativas de oxigênio (ROS) por um processo conhecido como explosão respiratória. A ativação da resposta oxidativa é uma importante atividade microbicida e pode contribuir para o controle de infecções causadas por patógenos intracelulares. Para avaliarmos se a *L. braziliensis* GFP induz a formação de espécies reativas de oxigênio nos neutrófilos, após 1 hora de infecção as células foram incubadas com a sonda fluorescente *Dihydroethidium* (DHE). Ao entrar nas células, a sonda DHE ao ser oxidada por ânions superóxidos emite fluorescência vermelha, que é detectada por citometria de fluxo. Foi observado um aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio nas células GFP+ (infectadas) quando comparadas com as células GFP- (não infectadas e expostas à *Leishmania*) e células sem estímulo (PMN) (Figuras 3 A e B). Esses resultados apontam que a infecção por *L. braziliensis* induz a ativação de mecanismos que podem ser importantes para o controle dos parasitos.

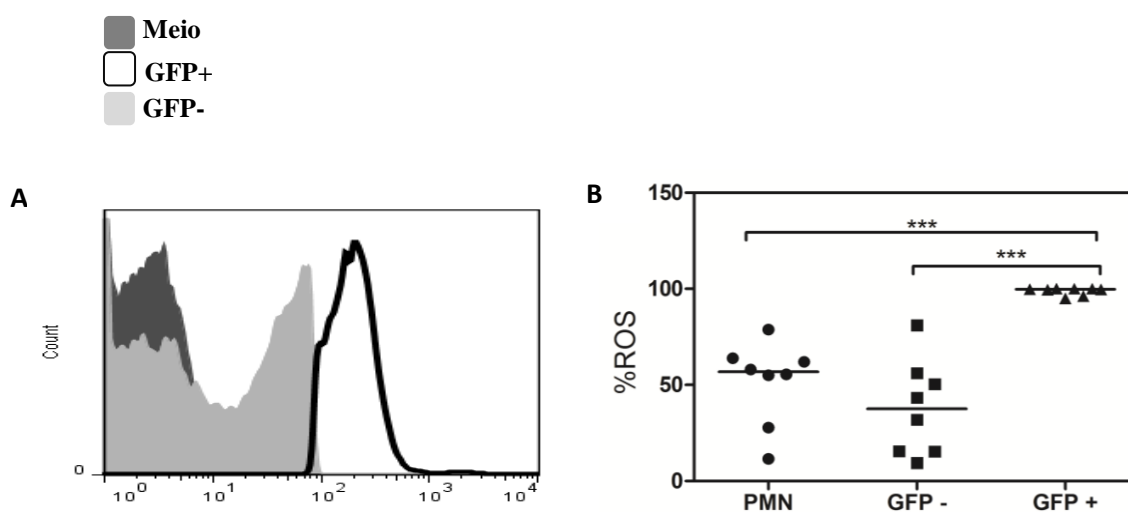


Figura 4. Neutrófilos humanos infectados com *Leishmania braziliensis* produzem espécies reativas de oxigênio (ROS). Neutrófilos humanos foram infectados com *L. braziliensis* e após uma hora de infecção foram incubados com a sonda *Dihydroethidium* (DHE), que entra nas células e ao ser oxidada por ânions superóxido, exibe fluorescência vermelha, detectada por citometria de fluxo. A figura 3 A é um histograma representativo da produção de ROS pelos neutrófilos humanos infectados e a figura 3 B representa a produção de ROS pelos doadores avaliados. Cada ponto representa um doador. *** $p < 0.001$ pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

7.4 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS PELOS NEUTRÓFILOS HUMANOS INFECTADOS COM *Leishmania braziliensis*

Para verificarmos se a infecção dos neutrófilos por *L. braziliensis* induz a produção de quimiocinas, após 3 horas de cultura, os sobrenadantes das culturas foram coletados e avaliados para a produção de citocinas pró-inflamatórias por CBA (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- α) ou ELISA (CCL-3, CCL-4 e CCL-20). A IL-8 induz o recrutamento de neutrófilos e sua produção foi significativamente maior no sobrenadante das células infectadas quando comparado com o sobrenadante das células não infectadas (Figura 4 A). As demais citocinas não apresentaram valores detectáveis. A CCL-3 está relacionada ao recrutamento de células dendríticas e sua produção também aumentou no sobrenadante das células infectadas (Figura 4 B). Também avaliamos a produção das quimiocinas CCL-4 e CCL-20, mas não foram encontrados valores detectáveis (dados não mostrados). A CCL-4 influencia no recrutamento de monócitos e a CCL-20, no recrutamento dos linfócitos. Estes achados indicam que neutrófilos humanos infectados com *L. braziliensis* são uma fonte importante de recrutamento celular e indução da infecção.

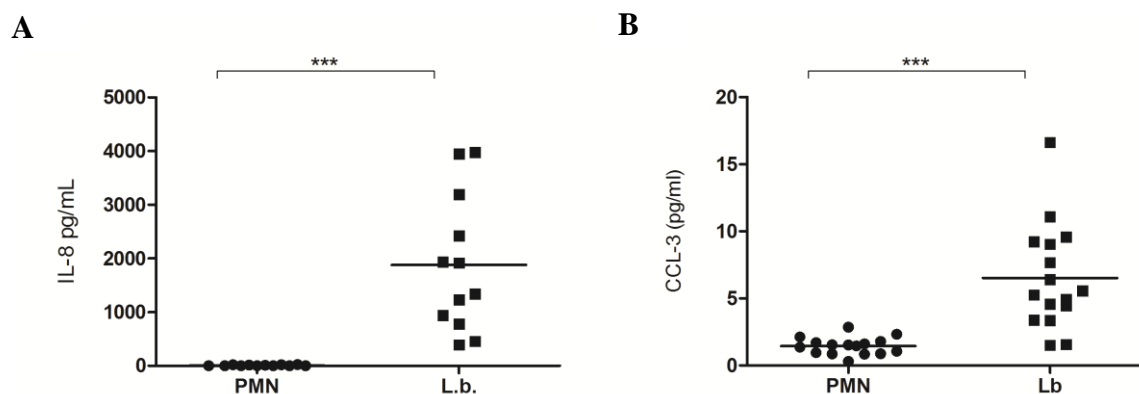


Figura 5. Infecção de neutrófilos humanos com *Leishmania braziliensis* induz a produção de quimiocinas. Neutrófilos humanos isolados do sangue periférico de doadores saudáveis foram infectados com *L. braziliensis* na proporção de 5 parasitos para cada célula durante 3 horas. Após esse tempo, os sobrenadantes das culturas foram coletados para quantificar por CBA a produção de IL-8 (A) e por ELISA a produção de CCL-3 (B). *** $p < 0.001$ pelo teste t não-paramétrico Mann-Whitney.

7.5 AVALIAÇÃO DA DEGRANULAÇÃO E PRODUÇÃO DE MEDIADORES LIPÍDICOS DOS NEUTRÓFILOS HUMANOS INFECTADOS COM *Leishmania braziliensis*

Com o objetivo de verificar se a infecção dos neutrófilos com a *L. braziliensis* induz a degranulação e produção de mediadores lipídicos, os sobrenadantes das culturas foram coletados após 3 horas de infecção e avaliados para a produção de metaloproteinase (MMP-9) (A), mieloperoxidase (MPO) (B), LTB₄ (C) e PGE₂. A quantidade de MMP-9 liberada no sobrenadante dos neutrófilos infectados com *L. braziliensis* foi significativamente maior quando comparados com o sobrenadante dos neutrófilos sem estímulo (A). Perfis semelhantes de resposta foram observados quando comparamos a atividade da enzima MPO (B) e a produção do LTB₄ (C) entre neutrófilos não estimulados e os expostos à *L. braziliensis*. Os resultados obtidos indicam que a exposição à *L. braziliensis* induz sua ativação com consequente degranulação e secreção de LTB₄, uma vez que não se detectou a produção de PGE₂ (dados não mostrados).

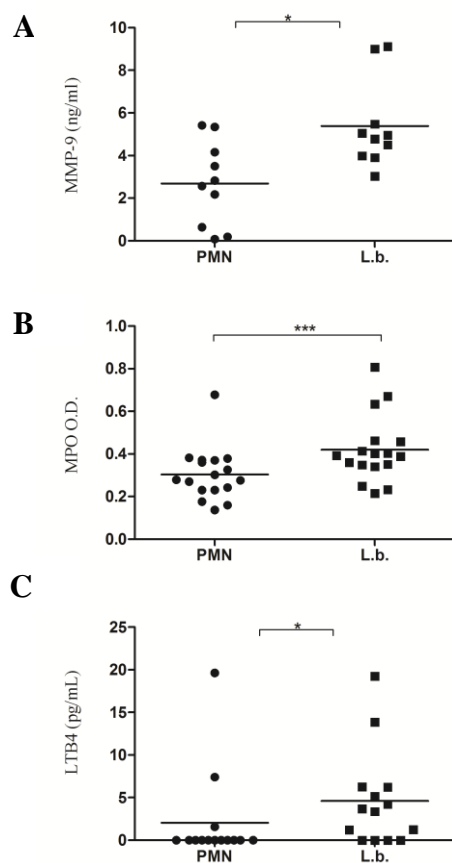


Figura 6. Neutr3filos humanos infectados com *Leishmania braziliensis* degranulam e liberam mediadores lip3dicos. Neutr3filos humanos obtidos do sangue perif3rico de doadores saud3veis foram infectados com *L. braziliensis* (5 parasitos para cada c3lula) por 3 horas. Os sobrenadantes das culturas foram coletados e utilizados para quantificar a produ33o de MMP-9 por ELISA sandu3che (A) e LTB₄ (C) por ELISA de competi33o. A mieloperoxidase (MPO) (B) foi avaliada por sua atividade para substrato espec3fico. *p<0.05, ***p<0.001 pelo teste t n3o param3trico Mann-Whitney.

7.6 AVALIAÇÃO DA APOPTOSE E NECROSE EM NEUTRÓFILOS HUMANOS INFECTADOS COM *Leishmania braziliensis*

Já foi demonstrado que parasitos como a *L. major* são capazes de modificar a apoptose espontânea dos neutrófilos, aumentando o seu tempo de vida (AGA et al, 2002). Para avaliar se a *L. braziliensis* induz a apoptose nos neutrófilos humanos, após as 3 horas de infecção, essas células foram incubadas com os marcadores Anexina-V-PE e 7AAD PARA análise por citometria de fluxo. Inicialmente as populações foram definidas por tamanho e granulosidade (A). Em seguida, a expressão de GFP foi utilizada para definir a infecção dos neutrófilos (B): GFP- (células cultivadas em presença do parasito, mas não infectadas) e GFP+ (células infectadas). Por fim, foi avaliado o percentual de expressão de Anexina+ e 7AAD+ nessas subpopulações- *dot plot* representativo (C). Como controle positivo da apoptose, as células foram expostas à luz UV durante 15 minutos e incubadas por 2 horas a 37° com 5% de CO₂. Foi observada uma redução na taxa de neutrófilos apoptóticos na população GFP- quando comparado ao controle positivo (UV) (D). Essa redução não foi estatisticamente significativa quando comparada às células GFP+ (D). Por outro lado, a marcação por 7AAD, que indica necrose, foi estatisticamente maior nas células GFP+ quando comparadas aos neutrófilos sem estímulo (PMN) e ao controle positivo UV (E). Avaliamos também a população duplo positiva (Anexina+ e 7AAD+), que indica necrose secundária e observamos um aumento significativo na população GFP+ quando comparada à população GFP- (F). Assim, os dados sugerem que a *L. braziliensis* ativa o neutrófilo, induzindo rapidamente sua degranulação e morte por necrose.

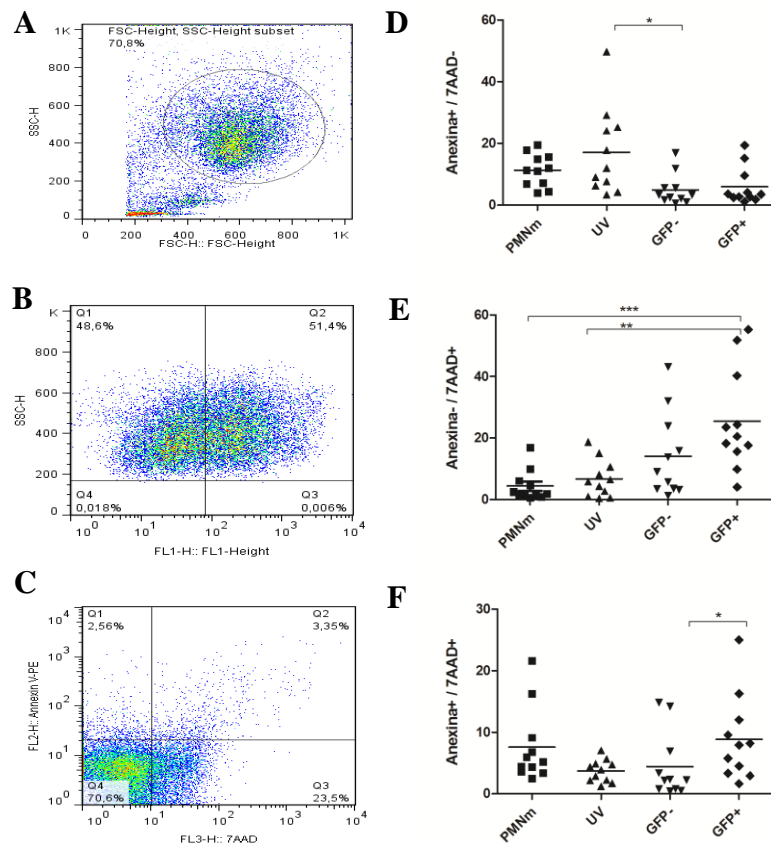
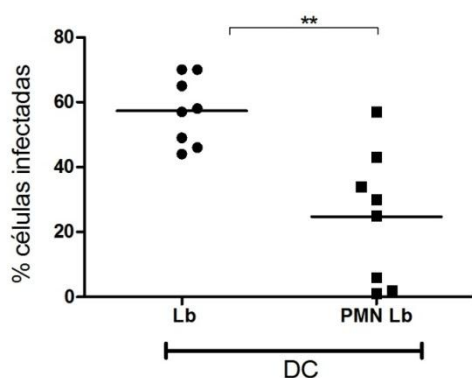


Figura 7. Avaliação da apoptose e necrose em neutrófilos infectados com *Leishmania braziliensis*. Neutrófilos humanos foram infectados com *L. braziliensis* por 3 horas e a morte celular foi avaliada pela marcação de Anexina V e 7AAD por citometria de fluxo. Os resultados estão representados como percentual de células. As populações foram definidas por tamanho e granulosidade (A). Em seguida, a expressão de GFP foi utilizada para definir a infecção dos neutrófilos (B): GFP- (células cultivadas em presença do parasito, mas não infectadas) e GFP+ (células não infectadas). A expressão de Anexina+ e 7AAD+ nessas subpopulações foi definida com base no *dot plot* representativo (C). Expressão de Anexina+7AAD- nos doadores testados (D). Expressão de Anexina-7AAD+ (E) e duplo positivo Anexina+7AAD+ (F). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 pelo teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns.

7.7 AVALIAÇÃO DA TAXA DE INFECÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS (DCS) CO-CULTIVADAS COM NEUTRÓFILOS INFECTADOS COM *leishmania braziliensis*

Células dendríticas isoladas a partir do sangue periférico de doadores saudáveis foram cultivadas durante 7 dias na presença de IL-4 e GM-CSF. No sétimo dia de cultura, as células dendríticas foram infectadas com *L. braziliensis*, na proporção de 10 parasitos para cada célula. No mesmo dia, neutrófilos humanos foram separados e infectados com *L. braziliensis* durante 3 horas e, após a lavagem para retirar os parasitos não internalizados, essas células foram co-cultivadas com as células dendríticas não infectadas (5 neutrófilos:1 célula dendrítica), durante 18h. No dia seguinte, as células foram coletadas e lâminas foram preparadas por citocentrifugação para contagem da taxa de infecção. Assim, observou-se que a mediana da taxa de infecção das células dendríticas é aproximadamente 50% (Figura 7 A). Por outro lado, na presença dos neutrófilos infectados, a mediana da taxa de infecção das células dendríticas reduz para aproximadamente 20% (Figura 7 A). A quantidade de amastigotas nas células dendríticas também foi significativamente reduzida na presença dos neutrófilos infectados (Figura 7 B). Os neutrófilos infectados parecem ativar os mecanismos microbicidas das DCs, levando à redução da carga parasitária, bem como do número de parasitos intracelulares.

A



B

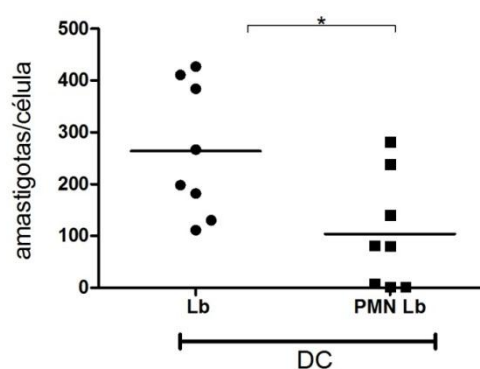


Figura 8. Redução da taxa de infecção das células dendríticas na presença dos neutrófilos humanos infectados com *Leishmania braziliensis*. Células dendríticas cultivadas durante 7 dias na presença de IL-4 e GM-CSF foram infectadas com *Leishmania braziliensis* (1 célula: 10 parasitos) por 24h ou cultivadas na presença de neutrófilos infectados com *L.b* por 18h (5 neutrófilos: 1 célula dendrítica). A taxa de infecção foi avaliada por lâminas preparadas por citocentrifugação (A) e (B). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ pelo teste t não-paramétrico.

7.8 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS MARCADORES DE SUPERFÍCIE DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS TRATADAS COM O SOBRENADANTE FILTRADO DOS NEUTRÓFILOS INFECTADOS OU NÃO

Células dendríticas isoladas a partir do sangue periférico de doadores saudáveis foram cultivadas durante 7 dias na presença de IL-4 e GM-CSF. No sétimo dia de cultura das células dendríticas, neutrófilos humanos foram separados e infectados com *L.braziliensis* durante 3 horas. Após as 3 horas de infecção dos neutrófilos, o sobrenadante foi coletado e filtrado para tratar as células dendríticas durante 18h. Após esse período, a expressão de marcadores de superfície nas células dendríticas tratadas com o sobrenadante filtrado dos neutrófilos foi avaliada por citometria de fluxo. Assim, observou-se uma redução significativa na expressão do DC-SIGN (Figura 8 A), HLA-DR (Figura 8 B) e CD80 (Figura 8 C) comparando a célula dendrítica sem estímulo (DC) e a célula dendrítica tratada com o sobrenadante do neutrófilo sem infecção (DC+PMN). Além disso, observou-se um aumento significativo na expressão do HLA-DR (Figura 8 B) e CD80 (Figura 8 C) comparando a célula dendrítica tratada com o neutrófilo em repouso (DC+PMN) e a célula dendrítica tratada com o sobrenadante do neutrófilo filtrado (DC+PMN-LbF) e não filtrado (DC+PMN-Lb). Em nenhuma das análises houve diferença estatística quando comparamos a expressão das moléculas nas células dendríticas tratadas com o sobrenadante dos neutrófilos filtrado e não filtrado. Dados sugerem que o sobrenadante de neutrófilos infectados contenha produtos como enzimas neutrofílicas e eicosanoides que levam à restauração da expressão das moléculas analisadas. Por outro lado, a interação do sobrenadante dos neutrófilos não infectados com as DCs sugere que a apoptose dos neutrófilos poderia contribuir para a inibição da expressão das moléculas co-estimulatórias observadas.

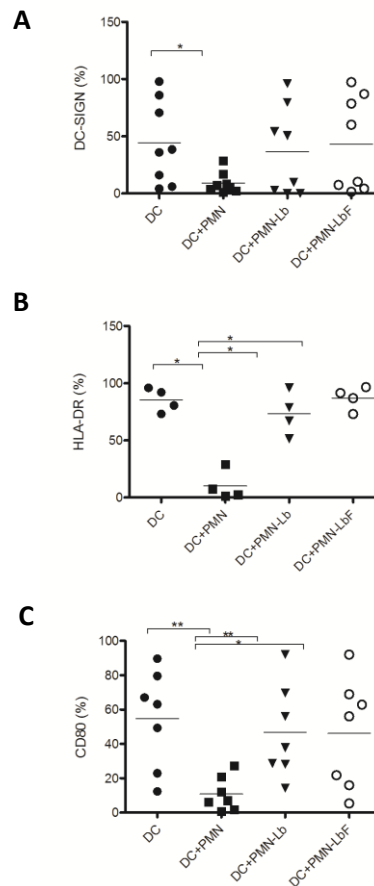


Figura 9. Expressão dos marcadores de superfície da células dendríticas tratadas com o sobrenadante dos neutrófilos humanos infectados com *Leishmania braziliensis*. Células dendríticas cultivadas durante 7 dias na presença de IL-4 e GM-CSF foram tratadas com o sobrenadante filtrado ou não dos neutrófilos infectados com *L. braziliensis* (1 célula: 5 parasitos). A expressão de DC-SIGN (A), HLA-DR (B) e CD80 (C) foi avaliada por citometria de fluxo no oitavo dia de cultura. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ pelo teste t não paramétrico Mann-Whitney, comparando os pares DC e DC+PMN; DC+PMN e DC+PMN-Lb; DC+PMN e DC+PMN-LbF; DC+PMN-Lb e DC+PMN-LbF.

7.9 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS TRATADAS COM O SOBRENADANTE DOS NEUTRÓFILOS INFECTADOS

Células dendríticas isoladas a partir do sangue periférico de doadores saudáveis foram cultivadas durante 7 dias na presença de IL-4 e GM-CSF. No sétimo dia de cultura das células dendríticas, neutrófilos humanos foram separados e infectados com *L.braziliensis* durante 3 horas. Após as 3 horas de infecção dos neutrófilos, o sobrenadante foi coletado para tratar as células dendríticas durante 18h. Após esse período, os sobrenadantes das co-culturas foram avaliados para a produção de citocinas como IL1- β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- α por CBA. Observou-se um aumento significativo na produção de IL-8 comparando a célula dendrítica tratada com o sobrenadante do neutrófilo sem infecção (Figura 9 A). Os níveis de TNF- α (Figura 9 B) e IL-12 (Figura 9 C) não apresentaram diferença estatística entre as condições avaliadas, porém, a mediana desses valores parece aumentar quando as células dendríticas são tratadas com o sobrenadante dos neutrófilos infectados, mantendo o mesmo perfil de resposta dos resultados anteriores. Os dados sugerem que as DCs se ativam na presença do sobrenadante dos neutrófilos infectados, reiterando os dados anteriores. Novos experimentos, porém, são necessários para confirmarmos esse achado.

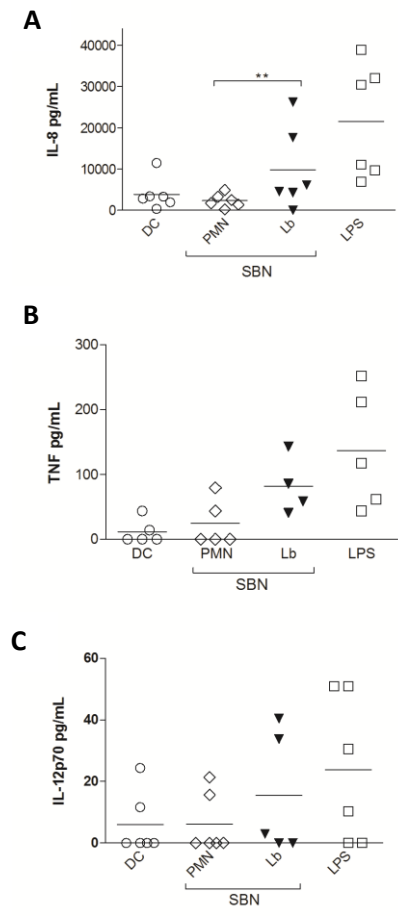


Figura 10. Produção de citocinas no sobrenadante das células dendríticas tratadas com o sobrenadante dos neutrófilos humanos. Células dendríticas cultivadas durante 7 dias na presença de IL-4 e GM-CSF tratadas com o sobrenadante dos neutrófilos infectados com *L. braziliensis* (1 célula: 5 parasitos) durante 18h. Após esse período, o sobrenadante da cultura foi coletado e a produção de IL-8 (A), TNF- α (B) e IL-12 (C) foi avaliada por CBA (*Cytometric Bead Array*). * $p < 0.01$, pelo teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns.

8 DISCUSSÃO

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes no sangue, com concentrações que variam de 3 a 5×10^6 /ml de sangue e podem aumentar o seu número em casos de infecção (EDWARD ET AL., 1994).

No nosso estudo, inicialmente buscamos avaliar a interação de neutrófilos humanos e *Leishmania braziliensis* em experimentos *in vitro*. Observamos uma alta taxa de infecção destas células pela *L. braziliensis*. A infecção de neutrófilos por *L. amazonensis*, entretanto, resultou em porcentagens menores de infecção (entre 40 e 50%) (TAVARES et al., 2014). Esses dados sugerem que a internalização de diferentes espécies de *Leishmania* pelos neutrófilos ocorre de forma distinta, provavelmente por estruturas diferentes presentes na membrana, como LPG (SOARES et al., 2002).

Os neutrófilos que migraram da circulação para os tecidos apresentam um perfil fenotípico ativado, que pode ser identificado através da expressão de moléculas de superfície (AMULIC et al., 2012), tais como as integrinas CD11b/CD18, que são importantes no processo de adesão celular (LAU et al., 2005). Já foi demonstrado que o estímulo com LPS induz alterações na expressão de CD62L e CD16 (PILLAY *et al.*, 2012). Dados na literatura indicam uma redução na expressão da CD62-L quando os neutrófilos estão ativados (BEZERRA et al., 2011). No nosso estudo, observamos que a *L. braziliensis* induz a ativação dos neutrófilos humanos, com consequente redução da expressão de CD62L e de CD16 nas populações cultivadas na presença de *L. braziliensis*, mas não infectadas (GFP-) e infectadas (GFP+). Este efeito de ativação de células não infectadas já foi demonstrado em células dendríticas de camundongos (CARVALHO; PEARCE; SCOTT, 2008) e em neutrófilos humanos (TAVARES et al., 2014). Observamos também aumento da expressão de MAC-1 (composta pelas moléculas CD18 e CD11b) nessas mesmas células. Resultados semelhantes foram encontrados em neutrófilos humanos infectados com *L. amazonensis*, sugerindo que a infecção por espécies *Leishmanias* do Novo Mundo induzem ativação dos neutrófilos (TAVARES et al., 2014).

Durante a ativação dos neutrófilos, os mecanismos microbicidas são induzidos. Dentre eles, está a produção de ROS, que é produzido em resposta à infecção por microorganismos (PHAM, 2006). Nesse estudo, avaliamos a ativação dos neutrófilos também pela produção de espécies reativas de oxigênio e observamos aumento da produção na população GFP+, que corresponde aos neutrófilos infectados, sugerindo que a *L. braziliensis* induz explosão respiratória nessas células.

Os neutrófilos recrutados para os locais de infecção podem influenciar no recrutamento de outras células através da secreção de quimiocinas. Assim, observamos que a infecção de neutrófilos por *L. braziliensis* induziu a produção de IL-8 por essas células. Van Zandbergen (2002) e colaboradores também observaram *in vitro* a produção de IL-8 por neutrófilos humanos infectados com *L. major*, o que favorece o recrutamento de outros neutrófilos. Observamos também aumento na secreção de CCL-3, uma quimiocina importante no recrutamento das células dendríticas, não observamos, porém, produção de CCL-4, responsável pelo recrutamento de monócitos e CCL-20, quimiocina capaz de atrair linfócitos quando comparamos os neutrófilos sem estímulo e os infectados com *L. braziliensis*. Resultados semelhantes foram encontrados por Charmoy e colaboradores com neutrófilos de camundongos infectados por *L. major* (CHARMOY et al., 2010b). Nosso grupo demonstrou que neutrófilos humanos infectados por *L. amazonensis* secretam CCL-3 e CCL-4 (TESE NATÁLIA TAVARES, 2013), sugerindo que diferentes espécies de *Leishmania* induzem respostas distintas que se refletem na resposta inflamatória observada em modelos experimentais e nos pacientes infectados por *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (MACEDO et al., 2012).

Quando os neutrófilos fagocitam um patógeno, ocorre fusão do fagossomo com os grânulos do citoplasma (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003). Esses grânulos contêm proteínas, enzimas e peptídeos antimicrobianos (MAYER-SCHOLL; AVERHOFF; ZYCHLINSKY, 2004). O aumento da atividade da MPO é um dos principais mecanismos de defesa do hospedeiro contra diferentes patógenos (LAU et al., 2005). Estudos *in vitro* e *in vivo* em modelos experimentais mostraram que a infecção por *Trypanosoma cruzi* provoca um aumento na atividade da MPO nos neutrófilos (DHIMAN et al., 2009). A atividade da MPO também é importante por controlar infecções com *Klebsiella pneumoniae* (HIRCHE et al., 2005). No nosso estudo também observamos aumento da atividade da mieloperoxidase quando comparamos os neutrófilos sem estímulo e os neutrófilos infectados com *L. braziliensis*. Nos grânulos primários também avaliamos a atividade da MMP-9 e observamos aumento na sua concentração após a infecção por *L. braziliensis*. A liberação da MMP-9 a partir dos grânulos ocorre em menos de 1 hora após a estimulação dos neutrófilos por fatores quimiotáticos como IL-8 (OPDENAKKER et al., 2001). Estes dados sugerem que a infecção dos neutrófilos por *L. braziliensis* levam à ativação e consequente degranulação dessas células, com liberação das enzimas neutrofílicas.

Além da degranulação, avaliamos também a produção de mediadores lipídicos nos neutrófilos infectados. Já foi demonstrado que o LTB₄ produzido por neutrófilos ativados *in vitro* pode induzir a degranulação e conseqüentemente controlar infecções bacterianas e virais (FLAMAND; TREMBLAY; BERGEAT, 2007). Em infecções causadas por *L. amazonensis*, o LTB₄ secretado pelos neutrófilos humanos (TAVARES et al., 2014) ou pelos macrófagos murinos (SEREZANI et al., 2006) aumenta a capacidade leishmanicida dessas células por induzir a degranulação e produção de óxido nítrico. Morato e colaboradores (2014) demonstraram que o LTB₄ produzido pelos macrófagos humanos infectados com *L. braziliensis* controla a carga parasitária através da produção de espécies reativas de oxigênio. A liberação de LTB₄ pelos neutrófilos humanos infectados com *L. braziliensis* mais uma vez confirma o estado de ativação inflamatória dessas células. Avaliamos também a produção de PGE₂, porém, os resultados encontrados mostraram-se abaixo dos níveis detectáveis. A prostaglandina E2 é produzida por diferentes tipos celulares e conhecida por exercer efeitos anti-inflamatórios (revisto em ARAÚJO-SANTOS et al., 2010).

Os neutrófilos têm um curto ciclo de vida e são constitutivamente programados para morte celular por apoptose (SAVILL; FADOK, 2000). Segundo Savill e colaboradores (2002), a remoção dessas células apoptóticas pelas células dendríticas ou pelos macrófagos pode suprimir a inflamação. No nosso estudo avaliamos o percentual de neutrófilos apoptóticos e necróticos após a infecção com *Leishmania braziliensis*. Observamos que houve uma redução no percentual de células apoptóticas e aumento no percentual de células necróticas. Estes resultados diferem daqueles encontrados por Van Zandbergen e colaboradores (2002) que demonstraram que a *L. major* retarda a apoptose dos neutrófilos humanos, permitindo o recrutamento dos monócitos e, então, internalização dos parasitos pelos macrófagos de forma silenciosa. Por outro lado, Afonso e colaboradores (2008) demonstraram que a interação dos macrófagos humanos infectados com *L. amazonensis* e neutrófilos apoptóticos aumentou a carga parasitária nos macrófagos, por um mecanismo dependente de PGE₂ e TGF- β . A interação, entretanto, entre os neutrófilos necróticos com os macrófagos infectados com *L. amazonensis* levou à redução da carga parasitária. Esse mecanismo foi dependente da secreção de TNF- α e NE, e mediado pela produção de espécies reativas de oxigênio (AFONSO et al., 2008).

As células dendríticas representam um importante elo entre as respostas imune inata e adaptativa. Elas são recrutadas em resposta às quimiocinas secretadas pelos neutrófilos e a interação entre essas células é fundamental para o direcionamento da resposta imune

adaptativa (VAN GISBERGEN et al., 2005). A CCL-3 produzida pelos neutrófilos desempenha esse papel de recrutar as células dendríticas e é secretada frente à infecção por patógenos como *L. braziliensis*, como observado no nosso trabalho, e *L. major* (CHARMOY et al., 2010b).

Inicialmente comparamos a taxa de infecção das células dendríticas diretamente infectadas com *L. braziliensis* com as não infectadas, co-cultivadas com neutrófilos infectados. Observamos uma redução na taxa de infecção das células dendríticas na presença dos neutrófilos infectados, possivelmente porque esses neutrófilos estão necróticos e, assim, ativando as células dendríticas. Afonso e colaboradores publicaram dados com perfis semelhantes, demonstrando a ativação dos macrófagos humanos em contato com neutrófilos necróticos, com conseqüente redução da carga parasitária nos macrófagos (AFONSO et al., 2008). Outros trabalhos já foram publicados demonstrando a capacidade da *Leishmania braziliensis* em infectar diretamente as células dendríticas com taxas de infecção semelhantes às encontradas no nosso trabalho (CARVALHO et al., 2012; CARVALHO; PEARCE; SCOTT, 2008; VARGAS-INCHAUSTEGUI; XIN; SOONG, 2008)

Células apresentadoras de antígeno, tais como células dendríticas e macrófagos interagem com a *Leishmania* e podem atuar como células mediadoras da resistência ou susceptibilidade à doença (revisto em LIU; UZONNA; BENGOCHEA, 2012). Uma vez ativadas, essas células produzem citocinas que influenciam no seu papel efetor (GIACOMINI et al., 2001), porém os neutrófilos podem participar deste processo, pois também são fontes das citocinas e quimiocinas que devem influenciar os diferentes tipos de resposta. Já foi demonstrado que o sobrenadante de neutrófilos infectados com *T. gondii* induz a secreção de TNF- α e IL-12 pelas DCs, além de modular a expressão do CD86 e CD40 (BENNOUNA et al., 2003). Por sabermos que no sobrenadante dos neutrófilos infectados com *L. braziliensis* há diversos produtos secretados por essas células, avaliamos se esse sobrenadante é capaz de modular a expressão de moléculas de superfície nas células dendríticas, tais como HLA-DR, CD80 e DC-SIGN. Observamos uma redução significativa da expressão dessas três moléculas nas células dendríticas tratadas com o sobrenadante dos neutrófilos não infectados, em relação às células dendríticas sem estímulo. Podemos especular que neutrófilos apoptóticos interagiram com as DCs, diminuindo seu estado de ativação basal. De fato, estudo prévio já relatou que células dendríticas que capturaram neutrófilos apoptóticos infectados com *L. major* apresentaram atraso na sua ativação e conseqüentemente na ativação dos linfócitos, atrasando o início da resposta imune adaptativa (RIBEIRO-GOMES; SACKS, 2012). Entretanto, a

adição dos sobrenadantes dos neutrófilos infectados restaurou a expressão destas moléculas nas DCs, provavelmente pela presença dos produtos resultantes da degranulação e necrose destas células infectadas.

A influência dos neutrófilos na função das células dendríticas tem sido amplamente investigada. Neutrófilos ativados podem promover a migração de células dendríticas e modular sua maturação através da interação célula-célula ou através da secreção de mediadores (SCHUSTER; HURRELL; TACCHINI-COTTIER, 2013). As NETs (do inglês Neutrophils Extracellular Traps) podem ter um papel importante nesse contexto, já que são liberadas pelos neutrófilos ativados e já foi demonstrado *in vitro* que elas influenciam negativamente na maturação das células dendríticas, com consequente redução da proliferação dos linfócitos T CD4⁺ (BARRIENTOS et al., 2014). Já foi demonstrado que diversos parasitos do gênero *Leishmania*, tais como *L. amazonensis*, *L. major*, *L. chagasi* e *L. donovani* induzem a formação de NET (BRANZK; PAPAYANNOPOULOS, 2013). No nosso trabalho com *L. braziliensis* ainda não avaliamos a produção de NET nos neutrófilos infectados, porém, filtramos o sobrenadante desses neutrófilos como uma maneira de eliminar a NET e comparamos a expressão de moléculas de superfície das células dendríticas tratadas com o sobrenadante filtrado ou não dos neutrófilos infectados com *L. braziliensis*. Se a *L. braziliensis* induzisse a formação de NET nos neutrófilos humanos que avaliamos, essas redes de fibrinas presentes no sobrenadante ficariam presas no filtro e, ao tratarmos as células dendríticas, possivelmente observaríamos diferença na expressão das moléculas de superfície avaliadas (BARRIENTOS et al., 2014). Assim, avaliamos a expressão do DC-SIGN, CD80 e HLA-DR em DCs tratadas com os sobrenadantes dos neutrófilos infectados e filtrados. Em nenhum dos casos houve diferença quando comparamos as células tratadas com o sobrenadante filtrado e não filtrado, sugerindo que o neutrófilo infectado com esta espécie de *L. braziliensis* não produz NETs.

Células dendríticas co-cultivadas com *Leishmania braziliensis* produzem IL-12 e TNF- α (OLIVEIRA; BRODSKYN; SAMMONS-JACKSON, 2012). Diante disso, avaliamos a produção de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- α no sobrenadante da cultura das células dendríticas tratadas com o sobrenadante de neutrófilos infectados ou não. Observamos um aumento significativo da produção de IL-8 na cultura das células dendríticas tratadas com o sobrenadante dos neutrófilos infectados, comparando com as células dendríticas tratadas com o neutrófilo sem infecção. Além disso, a mediana do TNF- α e IL-12 parece aumentar na cultura das células dendríticas tratadas com o sobrenadante dos neutrófilos infectados. Estes

achados evidenciam a modulação da ativação das células dendríticas pelos produtos secretados dos neutrófilos infectados. Futuramente, aumentaremos o número de amostras nesse ensaio para confirmarmos ou não esse aumento. Diversos estudos já foram publicados evidenciando a importância da IL-12, que é principalmente secretada pelas células dendríticas e induzem a secreção de IFN- γ pelas células T CD4+ (LIU; UZONNA; BENGOCHEA, 2012). Células dendríticas humanas infectadas com *L. major* (FAVILA et al, 2014) e murinas infectadas com *L. amazonensis* (QI; POPOV; SOONG, 2001) em conjunto com o CD40L produzem IL-12, porém, *L. tropica* não induz a produção dessa citocina em células dendríticas murinas (MCDOWELL et al., 2002). Sugere-se assim, que a produção de IL-12 requer dois sinais: um de origem microbiana e um do hospedeiro.

Novos experimentos são necessários para concluirmos algumas questões como a produção de citocinas e expressão de algumas moléculas, visto que as diferenças não significativas podem ser devido ao número de amostras obtidas para realizarmos esse trabalho.

9 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho indicam que a *Leishmania braziliensis* infecta e ativa os neutrófilos humanos. Essa ativação leva a produção de espécies reativas de oxigênio, leucotrieno e degranulação, além da secreção de quimiocinas tais como IL-8 e CCL-3. Além disso, a *L. braziliensis* induziu necrose dos neutrófilos em cultura. A presença dos neutrófilos infectados induziu uma redução da taxa de infecção das DCs e os sobrenadantes das culturas dos neutrófilos infectados também parecem modular a ativação das células dendríticas, evidenciado pelo aumento da expressão do HLA-DR, DC-SIGN e CD80. A ativação dessas células parecem levar à produção de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-12 e TNF- α , que são importantes para a resposta imune e controle do parasito, porém, esses últimos dados não apresentam diferenças estatísticas, possivelmente pelo reduzido número de amostras analisadas.

10 REFERÊNCIAS

- AFONSO, L. et al. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **Journal of leukocyte biology**, v. 84, n. 2, p. 389–96, ago. 2008.
- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. *Leishmania* species : models of intracellular parasitism. v. 3002, p. 2993–3002, 1999.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, jan. 2012.
- AMULIC, B. et al. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annual review of immunology**, v. 30, p. 459–89, jan. 2012.
- APPELBERG, R. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. **Trends in microbiology**, v. 15, n. 2, p. 87–92, fev. 2007.
- ARAÚJO-SANTOS, T. et al. *Lutzomyia longipalpis* saliva triggers lipid body formation and prostaglandin E₂ production in murine macrophages. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 11, p. e873, jan. 2010.
- ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 523–532, set. 1996.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**. v. 392, n. March, p. 245–252, 1998.
- BARRIENTOS, L. et al. Neutrophil Extracellular Traps Downregulate Lipopolysaccharide-Induced Activation of Monocyte-Derived Dendritic Cells. **The Journal of Immunology**. 193: 000-000. 2014.
- BENNOUNA, S. et al. Cross-Talk in the Innate Immune System: Neutrophils Instruct Recruitment and Activation of Dendritic Cells during Microbial Infection. **The Journal of Immunology**. 171:6052-6058; 2003.
- BEZERRA, C. A et al. Evaluation of the microbicidal activity and cytokines/chemokines profile released by neutrophils from HTLV-1-infected individuals. **Scandinavian journal of immunology**, v. 74, n. 3, p. 310–7, set. 2011.
- BORREGAARD, N. et al. Changes in subcellular localization and surface expression alkaline phosphatase, and Mac-1 in human during of stimulation mediators. **Journal of Leucocyte Biology**. v. 56, n. July, 1994.
- BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 657–70, 24 nov. 2010.

BORREGAARD, N.; SØRENSEN, O. E.; THEILGAARD-MÖNCH, K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. **Trends in immunology**, v. 28, n. 8, p. 340–5, ago. 2007.

BRANZK, N.; PAPAYANNOPOULOS, V. Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. **Division of Molecular Immunology**. v. 35, p. 513–530, 2013.

BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? **The Journal of cell biology**, v. 198, n. 5, p. 773–83, 3 set. 2012.

CARVALHO, A K. et al. Leishmania (V.) braziliensis and L. (L.) amazonensis promote differential expression of dendritic cells and cellular immune response in murine model. **Parasite immunology**, v. 34, n. 8-9, p. 395–403, 2012.

CARVALHO, L. P.; PEARCE, E. J.; SCOTT, P. Functional Dichotomy of Dendritic Cells following Interaction with Leishmania braziliensis: Infected Cells Produce High Levels of TNF- α , whereas Bystander Dendritic Cells Are Activated to Promote T Cell Responses. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 9, p. 6473–6480, 20 out. 2008.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature reviews. Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873–82, nov. 2007.

CHARMOY, M. et al. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by Leishmania parasites. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2010, p. 719361, jan. 2010a.

CHARMOY, M. et al. Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of Leishmania major inoculation in resistant mice. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 2, p. e1000755, fev. 2010b.

CHAVES, L. F. et al. Sources and sinks: revisiting the criteria for identifying reservoirs for American cutaneous leishmaniasis. **Trends in parasitology**, v. 23, n. 7, p. 311–6, jul. 2007.

DHIMAN, M. et al. Increased myeloperoxidase activity and protein nitration are indicators of inflammation in patients with Chagas' disease. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 16, n. 5, p. 660–6, maio 2009.

ETHUIN, F. et al. Human neutrophils produce interferon gamma upon stimulation by interleukin-12. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 84, n. 10, p. 1363–71, out. 2004.

FADOK, V. A. et al. Macrophages That Have Ingested Apoptotic Cells In Vitro Inhibit Proinflammatory Cytokine Production Through Autocrine / Paracrine Mechanisms Involving TGF- β , PGE $_2$ and PAF. **The American Society for Clinical Investigation**. v.101, n.4, p.890-898.1998.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 14, p. 1317–1327, nov. 2003.

FAVALI, C. et al. Leishmania amazonensis infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. **Journal of leukocyte biology**, v. 82, n. 6, p. 1401–6, dez. 2007.

FIGUEIRÓ-FILHO, E. A. et al. Visceral leishmaniasis (kala-azar) and pregnancy. **Infectious diseases in obstetrics and gynecology**, v. 12, n. 1, p. 31–40, jan. 2004.

FILHO, A. V. C. et al. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 41, n. 4, p. 424–427, 2008.

FLAMAND, L.; TREMBLAY, M. J.; BORGEAT, P. Leukotriene B4 Triggers the In Vitro and In Vivo Release of Potent Antimicrobial Agents. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 12, p. 8036–8045, 4 jun. 2007.

FUKUTANI, K. F. et al. Serological survey of Leishmania infection in blood donors in Salvador, Northeastern Brazil. **BMC infectious diseases**, v. 14, p. 422, jan. 2014.

GHOSH, M.; BANDYOPADHYAY, S. Interaction of Leishmania parasites with dendritic cells and its functional consequences. **Immunobiology**, v. 209, n. 1-2, p. 173–7, jan. 2004.

GIACOMINI, E. et al. Infection of Human Macrophages and Dendritic Cells with Mycobacterium tuberculosis Induces a Differential Cytokine Gene Expression That Modulates T Cell Response. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 12, p. 7033–7041, 15 jun. 2001.

GONTIJO B., CARVALHO M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 36(1) p. 71-80. 2003.

GUIMARA, A. B. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **PNAS**. v. 106, n. 16, 2009.

HIRCHE, T. O. et al. Myeloperoxidase Plays Critical Roles in Killing Klebsiella pneumoniae and Inactivating Neutrophil Elastase: Effects on Host Defense. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 3, p. 1557–1565, 20 jan. 2005.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–15, ago. 2011.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis. **Human vaccines**, v. 7, n. 11, p. 1204–14, nov. 2011.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes – Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes? **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 210–214, maio 2003.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. **Immunobiology**, v. 213, n. 3-4, p. 183–91, jan. 2008.

LAU, D. et al. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b⁻ CD18 integrins. **PNAS**. v. 102, n. 2, p. 431–436, 2005.

LAUFS, H. et al. Intracellular Survival of *Leishmania major* in Neutrophil Granulocytes after Uptake in the Absence of Heat-Labile Serum Factors. **Infection and Immunity**. v.70, n.2. 2002.

LEE, W. L.; HARRISON, R. E.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis by neutrophils. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 14, p. 1299–1306, nov. 2003.

LEY, K. et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. 9, p. 678–89, set. 2007.

LIU, D.; UZONNA, J. E.; BENGOCHEA, J. A. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. v. 2, n. June, p. 1–8, 2012.

LUDWIG, I. S.; GEIJTENBEEK, T. B. H.; VAN KOOYK, Y. Two way communication between neutrophils and dendritic cells. **Current opinion in pharmacology**, v. 6, n. 4, p. 408–13, ago. 2006.

MACEDO, A B. B. et al. Multifunctional CD4⁺ T cells in patients with American cutaneous leishmaniasis. **Clinical and experimental immunology**, v. 167, n. 3, p. 505–13, mar. 2012.

MAYER-SCHOLL, A.; AVERHOFF, P.; ZYCHLINSKY, A. How do neutrophils and pathogens interact? **Current opinion in microbiology**, v. 7, n. 1, p. 62–6, fev. 2004.

MCDOWELL, M. A. et al. *Leishmania* Priming of Human Dendritic Cells for CD40 Ligand-Induced Interleukin-12p70 Secretion Is Strain and Species Dependent. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 3994–4001, 1 ago. 2002.

MEGIOVANNI, A. M.; GLUCKMAN, J. C.; BOUDALY, S. Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 79, p. 977-988. May, 2006.

MORATO, C. I. et al. Essential role of leukotriene B4 on *Leishmania (Viannia) braziliensis* killing by human macrophages. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 16, n. 11, p. 945–53, nov. 2014.

NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases). Disponível em: <http://www.niaid.nih.gov/topics/leishmaniasis/Pages/lifecycle.aspx>; 2012

NOVAIS, F. O. et al. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 12, p. 8088–98, 15 dez. 2009

OLIVEIRA, C. I. DE; BRODSKYN, C. I.; SAMMONS-JACKSON, W. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. **Frontiers in Immunology**. v. 3, p. 1–9, 2012.

OLIVEIRA, R. A et al. Visceral leishmaniasis after renal transplantation: report of 4 cases in northeastern Brazil. **Transplant infectious disease: an official journal of the Transplantation Society**, v. 10, n. 5, p. 364–8, out. 2008.

OLIVEIRA, F. et al. Sand flies, *Leishmania*, and transcriptome-borne solutions. **Parasitol Int.** v.1, p.1-5.2009.

OPDENAKKER, G. et al. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. **Journal of Leukocyte Biology**.v. 69, n. June, 2001.

PETERS, N. C.; SACKS, D. L. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. **Cellular microbiology**, v. 11, n. 9, p. 1290–6, set. 2009.

PHAM, C. T. N. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 7, p. 541–50, jul. 2006.

PILLAY, J. et al. In vivo labeling with $^2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. **Blood**, v. 116, n. 4, p. 625–7, 29 jul. 2010.

QI, H.; POPOV, V.; SOONG, L. *Leishmania amazonensis* -Dendritic Cell Interactions In Vitro and the Priming of Parasite-Specific CD4^+ T Cells In Vivo. **The Journal of Immunology**. v. 167, p. 4534–4542. 2001.

REAL, F. et al. Cell-to-cell transfer of *Leishmania amazonensis* amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. **Cellular microbiology**, v. 16, n. 10, p. 1549–64, out. 2014.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, n. May, p. 59, jan. 2012.

RITTER, U.; FRISCHKNECHT, F.; VAN ZANDBERGEN, G. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? **Trends in parasitology**, v. 25, n. 11, p. 505–10, nov. 2009.

ROGERS, M. E. et al. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**. v. 430, n. 6998, p. 463–467, 2004.

RUIZ, J. H.; BECKER, I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, México, v. 29, n. 12, p. 671-678, 2007.

SABROE, I.; WHYTE, M. K. B. Toll-like receptor (TLR) -based networks regulate neutrophilic inflammation in respiratory disease. **Biochemical Society Transactions**. v. 35, p. 1492–1495, 2007.

SAITOH, T. et al. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. **Cell host & microbe**, v. 12, n. 1, p. 109–16, 19 jul. 2012.

SAVILL, J. et al. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, n. 12, p. 965–75, dez. 2002.

SAVILL, J.; FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature**. v. 407, October, 2000.

SCHUSTER, S.; HURRELL, B.; TACCHINI-COTTIER, F. Crosstalk between neutrophils and dendritic cells: a context-dependent process. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 94, p. 671–675, 2013.

SEREZANI, C. H. et al. Leukotrienes Are Essential for the Control of *Leishmania amazonensis* Infection and Contribute to Strain Variation in Susceptibility. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 5, p. 3201–3208, 18 ago. 2006.

SHESHACHALAM, A. et al. Granule protein processing and regulated secretion in neutrophils. **Frontiers in immunology**, v. 5, n. September, p. 448, jan. 2014.

SILVA, F. L. et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary parasitology**, v. 160, n. 1-2, p. 55–9, 9 mar. 2009.

SILVEIRA, F. T. et al. Reviewing the role of the dendritic Langerhans cells in the immunopathogenesis of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 11, p. 1075–80, nov. 2008.

SOARES, R. P. P. et al. *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. **Molecular & Biochemical Parasitology** v. 121, p. 213–224, 2002.

SOONG, L. Modulation of Dendritic Cell Function by *Leishmania* Parasites. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 7, p. 4355–4360, 19 mar. 2008.

TAVARES, N. M. et al. Understanding the mechanisms controlling *Leishmania amazonensis* infection in vitro: the role of LTB₄ derived from human neutrophils. **The Journal of infectious diseases**, v. 210, n. 4, p. 656–66, 15 ago. 2014.

URBAN, C. F. et al. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. **Cellular Microbiology**, Berlin, Alemanha, v. 8, n. 4, p. 668-676, 2006.

VAN GISBERGEN, K. P. J. M. et al. Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. **The Journal of experimental medicine**, v. 201, n. 8, p. 1281–92, 18 abr. 2005.

VARGAS-INCHAUSTEGUI, D. A.; XIN, L.; SOONG, L. *Leishmania braziliensis* Infection Induces Dendritic Cell Activation, ISG15 Transcription, and the Generation of Protective Immune Responses. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 11, p. 7537–7545, 19 maio 2008.

ZANDBERGEN, G. VAN et al. *Leishmania* Promastigotes Release a Granulocyte Chemotactic Factor and Induce Interleukin-8 Release but Inhibit Gamma Interferon-Inducible Protein 10 Production by Neutrophil Granulocytes. **Infection and Immunity**. v. 70, n. 8, p. 4177–4184, 2002.

ZANDBERGEN, G. VAN et al. Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for Leishmania Entry into Macrophages. **The Journal of Immunology**. 2004.